

苯甲酸对蚕豆枯萎病菌致病力及根系组织结构抗性的影响

袁婷婷, 董艳*, 赵骞

云南农业大学资源与环境学院, 昆明650201

摘要: 本研究为探讨酚酸类自毒物质苯甲酸在枯萎病菌-蚕豆(*Vicia faba*)互作中的作用机制, 同时揭示蚕豆根系组织结构抗性对自毒物质胁迫的响应特征。采用室内培养实验研究了苯甲酸四个浓度(0、50、100、200 mg·L⁻¹)处理对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae*, FOF)生长和致病力的影响; 采用水培试验研究了苯甲酸处理对蚕豆幼苗生长、枯萎病发生、根系木质素含量和胼胝质沉积的影响, 利用透射电镜观察蚕豆根系超微结构的变化。结果表明, 苯甲酸不同浓度处理对蚕豆幼苗生长均有不同程度的抑制, 且处理浓度越高, 抑制效应越明显。苯甲酸胁迫显著增加蚕豆枯萎病发病率和病情指数; 显著提高尖孢镰刀菌孢子萌发率和产孢量; 显著提高尖孢镰刀菌的产酶和产毒能力; 同时, 还加剧对蚕豆根系细胞防御系统的摧毁和细胞组织结构的破坏。表明苯甲酸通过提高尖孢镰刀菌的致病力, 破坏寄主的组织结构抗性, 协助病原菌侵入蚕豆根系, 苯甲酸与尖孢镰刀菌的协同作用加重了蚕豆连作障碍的发生。

关键词: 苯甲酸; 蚕豆枯萎病; 尖孢镰刀菌; 细胞壁降解酶; 组织结构抗性

随着集约化种植程度的提高, 管理不善、单一作物连续种植等因素导致的土传病害日益严重, 使作物对农药的依赖程度不断提高, 对我国农业可持续发展、环境和农产品安全构成了极大的威胁(蔡祖聪等2016)。蚕豆(*Vicia faba*)是世界上重要的豆科作物, 在中国的栽培历史超过2 100年, 中国是世界上蚕豆栽培面积最大、总产量最多的国家。云南是中国最大的蚕豆主产区, 蚕豆种植面积近年平均稳定在30万hm²以上, 占全国蚕豆播种面积的1/3左右, 在全省116个县皆有种植(肖焱波等2007)。蚕豆是典型的忌连作作物, 但由于耕地面积减少, 人地矛盾不断加剧, 加上种植户过度追求经济利益, 主产区蚕豆连作种植导致枯萎病严重发生, 该病在德国、日本、英国等国家均有报道(董艳等2016a)。

尖孢镰刀菌是蚕豆枯萎病的主要致病菌, 属兼性寄生菌, 在无寄主植物存在时, 其休眠孢子仍能在土壤中存活较长时间, 对蚕豆生产造成巨大的经济损失, 严重制约了蚕豆产业的可持续发展(董艳等2016a)。

化感自毒作用与土传病害的发生具有密切的关系(Wu等2008b)。近年来的研究表明, 凡是容易引起自毒作用的作物一般也易引起土传病害产生而导致连作障碍(Wu等2008a)。人参(*Panax ginseng*)连作自毒物质苯甲酸能够显著促进人参锈

腐病菌菌丝生长和孢子萌发, 从而显著加重人参锈腐病的侵染(李自博等2016)。西瓜(*Citrullus lanatus*)连作自毒物质阿魏酸促进了西瓜枯萎病的发生(Ren等2016)。自毒物质抑制黄瓜(*Cucumis sativas*)的正常生长, 与多年累积的病原菌共同作用, 形成严重的土传病害, 是连作障碍产生的重要原因(Ye等2004)。蚕豆在生长过程中通过自然挥发、雨雾淋溶、根系分泌和植株分解等方式向环境中释放的化感物质是引起土壤微生物区系失衡, 刺激病原菌快速生长, 导致蚕豆生长不良、发病和死亡的重要因素之一(陈玲等2017)。酚酸类物质是蚕豆主要的化感自毒物质, 在蚕豆根与病原菌的互作中扮演着重要的角色, 被认为是导致蚕豆连作障碍的主导因素(董艳等2016a)。目前有关酚酸类自毒物质促进土传病害发生的机理研究主要集中于自毒物质对病原菌生长、土壤酶活性、根际微生物区系及群落结构的影响(Wu等2015; 李自博等2016; Zhou等2012), 而有关自毒物质胁迫对病原菌致病力及寄主作物抗病性的影响关注较少。

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, 并从蚕

收稿 2019-08-26 修定 2019-11-14

资助 国家自然科学基金(31860596和31560586)。

* 通讯作者(dongyanx@163.com)。

豆连作土壤中检测到7种酚酸(董艳等2016a), 进一步研究发现这些酚酸可显著降低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)。但目前有关这些酚酸类物质胁迫对蚕豆抗性的影响还尚未见报道。基于以上研究基础, 本研究通过外源添加苯甲酸(蚕豆连作土壤中检测到含量较高, 且在土壤中的含量随连作年限的增加而呈上升趋势), 研究不同浓度苯甲酸对蚕豆枯萎病菌(蚕豆专化型尖孢镰刀菌)致病力的影响, 明确蚕豆根系木质素含量、胼胝质沉积和超微结构对苯甲酸胁迫的响应特征, 阐明自毒物质-寄主组织结构抗性-病原菌侵染力之间的互作效应, 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 试验时间和地点

试验于2018年10~12月在云南农业大学资源与环境学院温室大棚内进行。

1.2 试验材料

病原菌为尖孢镰刀菌蚕豆专化型(*Fusarium oxysporum* schlecht. f. sp. *fabae* Yu et Fang, FOF), 由本实验室从蚕豆连作土壤中筛选并保存。在PDA平板上培养, 于28℃培养箱中恒温培养7 d后, 将PDA平板上的尖孢镰刀菌菌落用无菌水冲洗, 经4层纱布过滤收集孢子并稀释成浓度为 $\leq 1 \times 10^6$ cfu·mL⁻¹的孢子悬液。

供试蚕豆(*Vicia faba* L.)购于云南省农业科学院, 品种为‘89-147’。

PDA培养基: 马铃薯200 g·L⁻¹、葡萄糖20 g·L⁻¹、琼脂20 g·L⁻¹、蒸馏水1 L。

Hoagland营养液: CaCl₂·6H₂O 1.5 g·L⁻¹、KNO₃ 0.51 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.49 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 0.14 g·L⁻¹、H₃BO₃ 2.86 g·L⁻¹、MnCl₂·4H₂O 1.81 g·L⁻¹、ZnSO₄·7H₂O 0.22 g·L⁻¹、CuSO₄·5H₂O 0.08 g·L⁻¹、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.09 g·L⁻¹、Fe-EDTA 2 g·L⁻¹、蒸馏水1 L。

1.3 试验设计与实施

苯甲酸设四个处理浓度(0、50、100、200 mg·L⁻¹), 以0 mg·L⁻¹为对照处理(使用等量的Hoag-

land营养液代替), 每个处理4次重复, 共计16盆, 每盆种植6株蚕豆; 24 h通气泵通气。

挑选大小一致, 种皮完整的蚕豆种子, 用10%的H₂O₂浸泡30 min, 再用去离子水清洗干净, 置于25℃恒温培养箱中发芽后播种在Hoagland营养液浸透的无菌石英砂中培养。待蚕豆幼苗长到4~6片真叶时, 选取长势一致的蚕豆幼苗移入盛有2 L溶液(1.5 L Hoagland营养液+500 mL苯甲酸溶液)的容器中进行水培。待苯甲酸处理2 d后, 将25 mL浓度为 1×10^6 cfu·mL⁻¹的尖孢镰刀菌孢子悬浮液加入该容器中。每周换新鲜营养液和苯甲酸溶液, 共添加5次。

1.4 指标测定

1.4.1 蚕豆幼苗生长测定和枯萎病调查

蚕豆幼苗移栽40 d后, 每个重复采3株长势一致的植株测定叶片数、最大叶长、最大叶宽、株高、主根长、地上部干重、根干重。

蚕豆幼苗移栽40 d后进行枯萎病调查, 每个重复调查3株, 按5级分类标准进行枯萎病调查并计算发病率和病情指数(董艳等2010)。

发病率(%)=(发病株数/调查总株数)×100。

病情指数=[Σ(各级病株数×相应级值)/(最高级值×调查总株数)]×100。

1.4.2 尖孢镰刀菌菌丝生长、产孢量和孢子萌发率的测定

在1/4PDA培养基中分别加入不同浓度的苯甲酸(0、50、100、200 mg·L⁻¹), 倒入直径为8.5 cm平板冷却。用直径0.9 cm的打孔器打取生长一致、培养基厚度均匀的等龄尖孢镰刀菌菌饼接种至平板中心, 28℃培养6 d, 在第6天采用十字交叉法测量菌落直径大小, 每个处理重复3次, 最终取平均值(董艳等2016a)。将在PDA平板上培养7 d的尖孢镰刀菌菌落用无菌水洗下, 4层纱布过滤收集孢子并稀释成浓度 $\leq 1 \times 10^3$ cfu·mL⁻¹的孢子悬液, 每平板涂布0.1 mL孢子悬液, 28℃培养3 d后记录平板菌落数, 最终计算各浓度下的产孢量, 每处理3次重复(郝文雅等2010)。产孢测定参照郝文雅等(2010)的方法在Bilay's培养基中分别加入苯甲酸并均匀混溶, 各处理分别接种0.1 mL的镰刀菌孢子悬液, 28℃振荡培养3 d (120 r·min⁻¹)后于PDA平板稀释

涂布, 28°C培养2 d, 记录菌落数并转换成液体培养液中的孢子数量。

1.4.3 尖孢镰刀菌细胞壁降解酶制备与测定

粗酶溶液的制备: 使用合成培养基并添加1%的诱导底物(果胶、纤维素、可溶性淀粉、酪蛋白)制备产酶培养基。将25 mL产酶培养基加入100 mL烧瓶中, 接种直径9 mm菌龄7 d的菌块, 并在28°C、200 r·min⁻¹环境下培养7 d。将收集的培养液以1 789×g离心10 min, 取上清液, 使用孔径为0.45 μm的滤膜过滤, 得到的滤液即为粗酶溶液, 将其保存在4°C下待测。

DNS试剂制备: 称取3,5-二硝基水杨酸 3.15 g (化学纯), 加水500 mL, 搅拌5 s, 水浴加热至45°C, 搅拌并加入100 mL的0.2 g·mL⁻¹氢氧化钠溶液至溶液清澈透明。加入91 g酒石酸钾钠、2.5 g苯酚和2.5 g无水亚硫酸钠。加入300 mL水继续在45°C下加热, 不断搅拌至添加的药品完全溶解后停止加热, 冷却至室温, 定容至1 L。室温下避光保存7 d。

果胶酶活力测定(曹春蕾等2011): 1%果胶溶液(用0.1 mol·L⁻¹, pH=4.6的醋酸缓冲液配制) 1.9 mL, 粗酶液0.1 mL, 40°C水浴保温30 min后, 立即加入DNS试剂1.5 mL, 煮沸5 min, 取出冷却, 用蒸馏水稀释至30 mL, 500 nm测定溶液的吸光度, 每个处理3个重复, 取平均值。1个酶活单位定义为每分钟生成1 μmol半乳糖醛酸所需要的酶量。

纤维素酶活力测定(曹春蕾等2011): 量取1 mL粗酶液, 加入1 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 再加入1 mL底物(称取0.1 g纤维素钠溶于10 mL pH为5.0的50 mmol·L⁻¹柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中), 在50°C下酶解30 min, 加入1.5 mL 3,5-DNS, 沸水浴5 min, 取出后经流水冷却, 在540 nm处测定溶液的吸光度, 每个处理3个重复, 取平均值。1个酶活单位定义为每分钟生成1 μmol葡萄糖所需要的酶量。

淀粉酶活力测定(曹春蕾等2011): 1%可溶性淀粉(用0.1 mol·L⁻¹, pH=4.6的醋酸缓冲液配制) 1.9 mL, 粗酶液0.1 mL, 50°C水浴保温30 min后, 立即加入DNS试剂1.5 mL, 煮沸5 min, 取出冷却, 用蒸馏水稀释至30 mL, 500 nm测定溶液的吸光度, 每个处理3个重复, 取平均值。1个酶活单位定义为每分钟生成1 μmol葡萄糖所需要的酶量。

蛋白酶活性测定(陈钰泉等2019): 在1 mL酪蛋白(1%)底物中加入1 mL粗酶液, 在40°C, pH=7的条件下反应10 min后加入2 mL三氯乙酸(0.4 mol·L⁻¹)终止反应, 在680 nm处测定溶液的吸光度, 每个处理3个重复, 取平均值。1个酶活单位定义为每分钟水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸需要的酶量。

1.4.4 尖孢镰刀菌毒素提取和测定

产毒培养基采用改良Richard液体培养基配方(陈捷2007)。将125 mL培养液倒入250 mL三角瓶, 接种直径9 mm的7 d龄菌块, 每瓶接8片, 并在28°C, 180 r·min⁻¹环境下培养15 d。收集的培养液2 795×g离心10 min后, 取上清液, 使用孔径为0.45 μm的滤膜过滤, 取上清液灭菌后, 加入等体积乙酸乙酯, 震荡2 min, 室温下放置沉淀30 min, 将收集的有机相在1 789×g离心10 min, 于40°C干燥取上清液, 后将干燥物于5 mL乙酸乙酯中溶解, 在269 nm测定吸光度, 每个处理重复3次, 取平均值。

1.4.5 蚕豆木质素含量的测定和胼胝质沉积染色、观察

蚕豆移栽40 d后, 每个重复采3株长势一致的蚕豆植株测定木质素含量和胼胝质沉积。木质素含量的测定采用叶素芬(2004)的巯基乙酸法。胼胝质染色采用苯胺蓝法, 按王宁等(2013)的方法制作永久石蜡切片, 依次将切片放入二甲苯脱蜡两次, 脱蜡时间均为20 min; 在无水乙醇和75%酒精各脱水5 min后, 用自来水进行冲洗。将切片放入苯胺蓝染液5~10 min, 再次自来水冲洗后, 放入60°C烤箱内烤干, 放入二甲苯透明5 min, 使用中性树胶封片, 用正置光学显微镜(Nikon Eclipse E100)蓝色激发光下观察, 并用Image-pro plus 6.0软件进行荧光定量分析。

1.4.6 透射电镜制样和观察

蚕豆移栽40 d后, 每个重复采3株长势一致的蚕豆植株, 在离根尖1~2 cm处取样, 取样长度约5 mm, 使用戊二醛固定, 室温放置2 h, 后转入4°C冰箱。0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH=7.4)漂洗3次, 每次15 min, 1%的锇酸和0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液PBS (pH=7.4)室温固定5 h后脱水。使用Epon 812树脂包埋, 超薄切片机(Leica UC 7)进行切片, 进行铀铅双染色, 室温干燥过夜后, 用透射电子显微镜(HT 7700)观察。

1.5 数据处理

采用WPS (2019)软件处理原始数据, SPSS (20.0)统计软件对试验数据进行方差分析, 最小显著差异法(LSD)检验各处理间的差异显著性。

2 实验结果

2.1 苯甲酸处理对蚕豆幼苗生长和枯萎病发生的影响

2.1.1 苯甲酸处理对蚕豆幼苗生长的影响

随着苯甲酸处理浓度升高, 蚕豆幼苗的叶片数、最大叶长、叶宽、株高、地上部和地下部干

重等生长参数均显著降低($P<0.05$) (表1和图1)。与 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 相比, 50 、 100 和 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲酸处理分别显著降低蚕豆叶片数 19.00% 、 22.22% 和 35.00% , 平均降低 25.41% ; 显著降低地上部干重 45.35% 、 56.04% 和 74.65% , 平均降低 58.68% ; 显著降低根系干重 45.86% 、 55.88% 和 80.73% , 平均降低 60.82% ; 100 、 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲酸处理显著降低蚕豆幼苗最大叶宽 15.75% 和 28.08% , 平均降低 21.98% ; 显著降低幼苗株高 24.51% 和 35.55% , 平均降低 30.03% ; 显著降低幼苗主根长 51.57% 和 56.50% , 平均降低 54.04% , $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲酸对最大

表1 不同浓度苯甲酸处理对蚕豆幼苗生长的影响

Table 1 Effects of benzoic acid at different concentrations on the growth parameters of faba bean seedling

指标	苯甲酸处理浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			
	0	50	100	200
单株叶片数	18.00 ± 1.00^a	14.67 ± 2.31^b	14.00 ± 1.00^b	11.67 ± 2.08^b
最大叶长/cm	7.40 ± 0.85^a	7.20 ± 0.50^a	5.67 ± 2.15^{ab}	4.70 ± 0.75^b
最大叶宽/cm	4.87 ± 0.15^a	4.30 ± 0.53^{ab}	4.10 ± 0.35^{bc}	3.50 ± 0.53^c
株高/cm	34.13 ± 1.23^a	31.47 ± 1.06^a	25.77 ± 1.10^b	22.00 ± 3.12^c
主根长/cm	24.37 ± 3.80^a	18.70 ± 4.00^{ab}	11.80 ± 4.57^c	10.60 ± 1.77^c
地上部干重/g	3.37 ± 0.22^a	1.84 ± 0.45^b	1.48 ± 0.13^b	0.85 ± 0.30^c
根干重/g	1.73 ± 0.22^a	0.94 ± 0.24^b	0.76 ± 0.30^b	0.33 ± 0.12^c
根冠比	0.52 ± 0.10^a	0.51 ± 0.12^a	0.51 ± 0.15^a	0.39 ± 0.02^a

同行数值后不同小写字母表示差异达0.05显著水平。

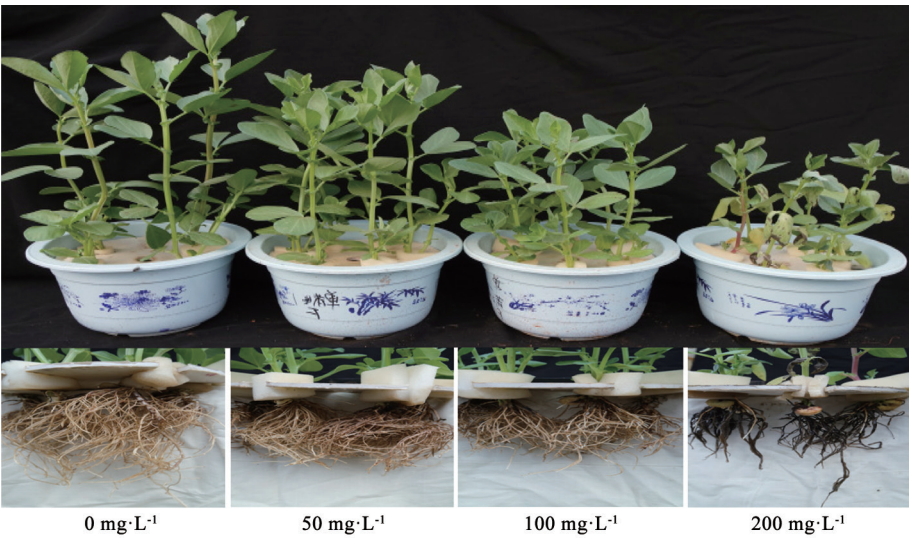


图1 苯甲酸不同浓度处理对蚕豆幼苗生长的影响

Fig.1 Effects of benzoic acid at different concentrations on the growth parameters of faba bean seedling

0、50、100、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 表示苯甲酸浓度, 图7和9同。

叶宽、株高和主根长均无显著影响。200 mg·L⁻¹苯甲酸处理显著降低幼苗最大叶长36.49%, 50 mg·L⁻¹和100 mg·L⁻¹处理对最大叶长无显著影响。表明苯甲酸处理对蚕豆幼苗生长有不同程度的抑制, 且处理浓度越高, 蚕豆根系生长损伤越严重, 发黑现象越明显, 地上部生长受到严重的抑制, 在200 mg·L⁻¹浓度处理时, 根系发黑腐烂变软, 地上部植株生长势弱, 萎焉坏死(图1)。

2.1.2 苯甲酸处理对蚕豆枯萎病发生的影响

苯甲酸处理对蚕豆枯萎病发病率和病情指数的影响如图2-A和B所示。随处理浓度的提高, 枯萎病发病率和病情指数显著增加, 200 mg·L⁻¹处理下发病率和病情指数达到最高。与0 mg·L⁻¹相比, 50、100、200 mg·L⁻¹苯甲酸处理分别显著提高枯萎病发病率3.0、4.7和5.0倍, 显著提高病情指数5.0、16.6和26.0倍。表明苯甲酸胁迫显著促进了蚕豆枯萎病发生, 且随处理浓度增加, 枯萎病的危害程度加重。

2.2 苯甲酸对尖孢镰刀菌菌丝生长、产孢量和孢子萌发的影响

苯甲酸不同浓度处理均对尖孢镰刀菌的菌落直径、生长速率、产孢量和孢子萌发率具有显著影响($P<0.05$) (表2)。与0 mg·L⁻¹相比, 50、100和200 mg·L⁻¹苯甲酸处理显著抑制尖孢镰刀菌菌丝生长速率19.65%、23.14%和22.71%, 平均抑制21.83%。与0 mg·L⁻¹相比, 50、100和200 mg·L⁻¹浓度的苯甲酸处理对尖孢镰刀菌产孢量和孢子萌发率有显著的促进作用。表明苯甲酸抑制尖孢镰刀菌菌丝的生长, 但却显著促进孢子的萌发并产生大量孢子。

2.3 苯甲酸处理对尖孢镰刀菌产酶和产毒的影响

2.3.1 苯甲酸处理对尖孢镰刀菌分泌细胞壁降解酶活性的影响

苯甲酸对尖孢镰刀菌分泌细胞壁降解酶活性的影响如图3和4所示。随苯甲酸处理浓度增加, 果胶酶和纤维素酶活性均显著增加($P<0.05$), 在200 mg·L⁻¹浓度下达到最高值(图3-A和B)。与0

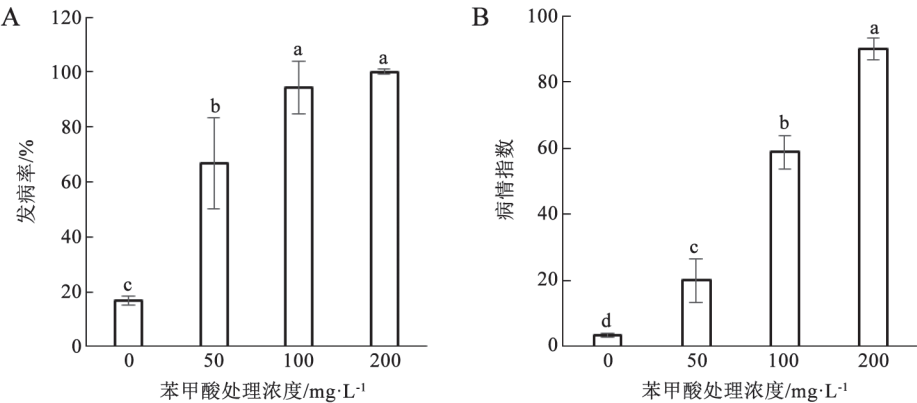


图2 苯甲酸不同浓度处理对蚕豆枯萎病发病率(A)和病情指数(B)的影响
Fig.2 Effects of benzoic acid at different concentrations on incidence (A) and index (B) of *Fusarium wilt*
柱形上不同小写字母表示差异达0.05显著水平, 图3~6和8同。

表2 苯甲酸不同浓度处理对尖孢镰刀菌菌落直径、产孢量和孢子萌发的影响

Table 2 Effects of benzoic acid at different concentrations on mycelium growth, sporulation and spore germination of FOF				
苯甲酸处理浓度/mg·L ⁻¹	菌落直径/cm	菌丝生长速率/cm·d ⁻¹	产孢量/×10 ⁶ cfu·mL ⁻¹	孢子萌发率/%
0	7.63±0.29 ^a	1.27±0.29 ^a	0 ^d	0 ^b
50	6.13±0.15 ^b	1.02±0.15 ^b	1.96±0.93 ^c	59.15±2.89 ^a
100	5.87±0.40 ^b	0.98±0.40 ^b	2.75±1.53 ^b	59.15±2.38 ^a
200	5.90±0.36 ^b	0.98±0.36 ^b	10.00±0.00 ^a	60.60±1.71 ^a

同列数值后不同小写字母表示差异达0.05显著水平。

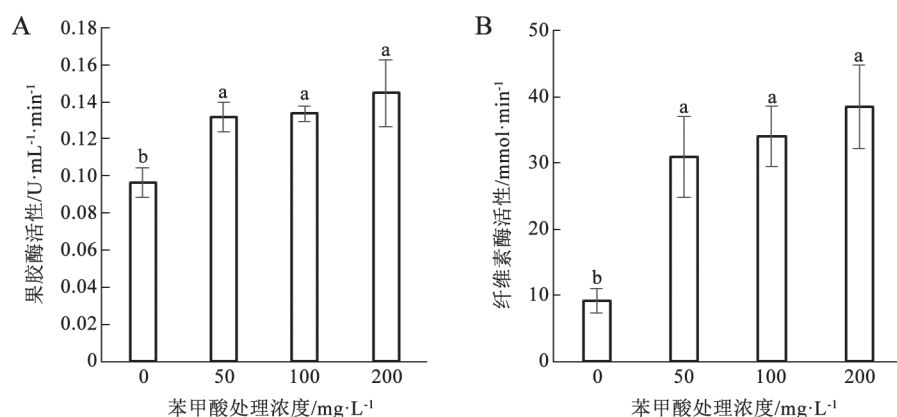


图3 苯甲酸不同浓度处理对尖孢镰刀菌分泌果胶酶(A)和纤维素酶活性(B)的影响

Fig.3 Effects of benzoic acid at different concentrations on activities of pectinase (A) and cellulase (B) secreted by FOF

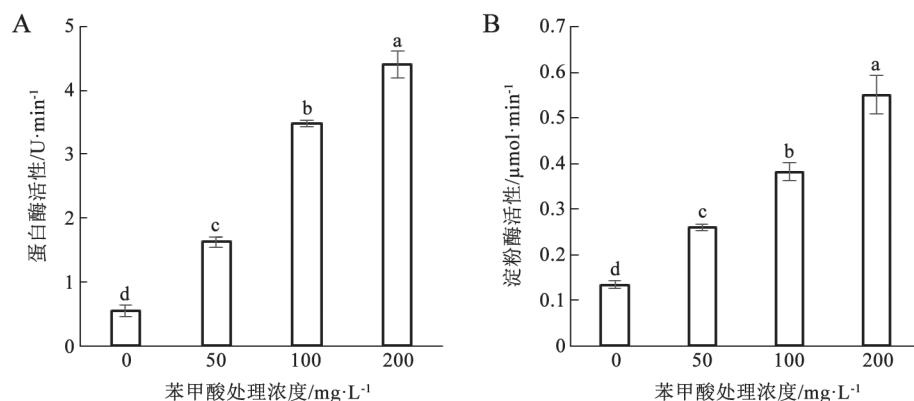


图4 苯甲酸不同浓度处理对尖孢镰刀菌分泌蛋白酶(A)和淀粉酶活性(B)的影响

Fig.4 Effects of benzoic acid at different concentrations on activities of proteinase (A) and amylase (B) secreted by FOF

mg·L⁻¹相比, 50、100、200 mg·L⁻¹苯甲酸处理显著增加果胶酶活性36.82%、38.94%和50.32%, 平均增加42.03%; 显著增加纤维素酶活性2.4、2.7和3.2倍, 平均增加2.8倍, 表明苯甲酸对纤维素酶活性的刺激作用大于果胶酶。

随苯甲酸处理浓度增加, 蛋白酶和淀粉酶活性均显著增加($P<0.05$) (图4-A和B)。与0 mg·L⁻¹相比, 50、100、200 mg·L⁻¹苯甲酸处理使蛋白酶活性显著增加2.0、5.4和7.1倍, 平均增加4.8倍; 使淀粉酶活性显著增加3.3、1.9和3.1倍, 平均增加2.0倍, 且50、100、200 mg·L⁻¹处理间达到显著差异。说明苯甲酸胁迫显著促进尖孢镰刀菌分泌更高活性的蛋白酶和淀粉酶, 其中苯甲酸对蛋白酶活性的促进作用强于淀粉酶。

2.3.2 苯甲酸处理对尖孢镰刀菌产毒的影响

随苯甲酸处理浓度升高, 尖孢镰刀菌产生的枯萎酸(fusaric acid, FA)含量显著增加($P<0.05$) (图5)。与0 mg·L⁻¹相比, 50、100、200 mg·L⁻¹苯甲酸处理分别显著增加FA含量3.9、6.3和9.9倍, 平均增加6.7倍, 且50、100、200 mg·L⁻¹处理间达到显著差异。表明苯甲酸促进了尖孢镰刀菌产毒, 且在200 mg·L⁻¹浓度下达到最高值。

2.4 苯甲酸处理对蚕豆根系组织结构抗性的影响

2.4.1 苯甲酸处理对蚕豆根系木质素含量及胼胝质沉积的影响

木质素是植物细胞壁的主要成分之一, 植物细胞的木质化是抵御外界不良胁迫的反应。苯甲酸对蚕豆根系木质素含量的影响如图6所示。与0

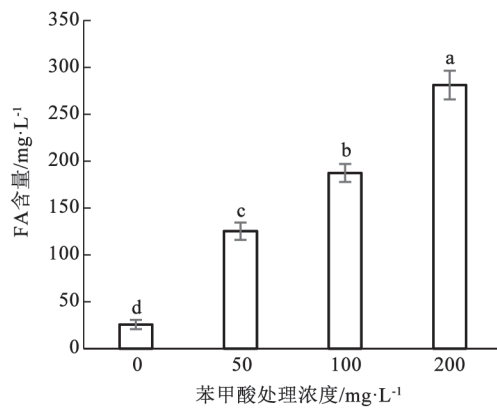


图5 苯甲酸不同浓度处理对尖孢镰刀菌产毒的影响
Fig.5 Effects of benzoic acid at different concentrations on content of mycotoxin produced by FOF

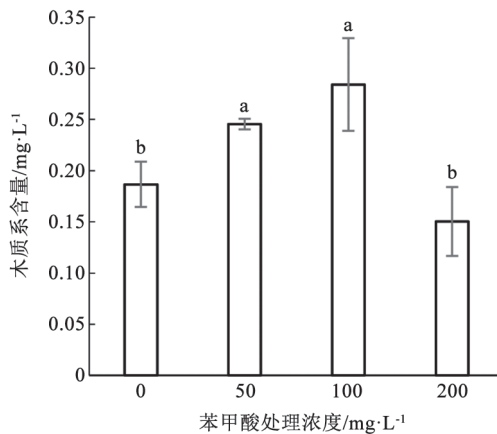


图6 苯甲酸不同浓度处理对蚕豆根系木质素含量的影响
Fig.6 Effects of benzoic acid at different concentrations on lignin content in faba bean roots

mg·L⁻¹相比, 在50和100 mg·L⁻¹苯甲酸处理浓度下, 蚕豆根系木质素含量分别显著增加31.53%和52.29%,

但200 mg·L⁻¹苯甲酸处理使木质素含量明显下降。表明随苯甲酸处理浓度增加, 木质素含量总体呈现先增加后降低的趋势。

植物在遭受外界不良因素胁迫时, 除产生木质素, 进行木质化外, 体内还会出现胼胝质沉积等一系列反应来抵御外界的干扰, 减缓病原菌的感染速度(王绍敏等2016)。苯甲酸处理对蚕豆根系胼胝质沉积的影响如图7和8所示。与0 mg·L⁻¹相比, 苯甲酸处理使蚕豆根系出现较多的胼胝质沉积, 且随处理浓度增加, 胼胝质沉积先增加后减少。与0 mg·L⁻¹相比, 50 mg·L⁻¹浓度的苯甲酸处理下, 胼胝质沉积明显增多(图7), 在单位面积中, 胼胝质沉积显著增加96.17% (图8); 100 mg·L⁻¹浓度处理下, 少量细胞壁破损, 胼胝质沉积减少(图7); 200 mg·L⁻¹浓度处理下, 根系腐烂坏死加剧, 细胞壁破损严重, 胼胝质沉积减少(图7)。与0 mg·L⁻¹相比, 100和200 mg·L⁻¹浓度处理下, 单位面积中胼胝质沉积无显著性变化。表明低浓度(50 mg·L⁻¹)苯甲酸胁迫促进蚕豆幼苗根系胼胝质沉积的增加, 增强植株的防御系统, 但中、高浓度(100和200 mg·L⁻¹)苯甲酸处理对胼胝质沉积无显著影响。

2.4.2 苯甲酸处理对蚕豆根系超微结构的影响

由图9可知, 0 mg·L⁻¹苯甲酸处理时, 蚕豆根系细胞间排列整齐, 细胞器形态结构正常, 细胞内出现少量空泡, 细胞核清晰可见, 细胞质均匀, 线粒体呈长椭圆形或球形, 双层膜清晰可见, 内脊结构完整。与0 mg·L⁻¹相比, 50 mg·L⁻¹苯甲酸处理下, 细胞发生质壁分离, 细胞质膜内陷, 部分线粒体脊消失, 出现大量的空泡。100 mg·L⁻¹苯甲酸处理下, 细胞核变形肿胀, 核膜破裂, 线粒体膜模糊不清, 空

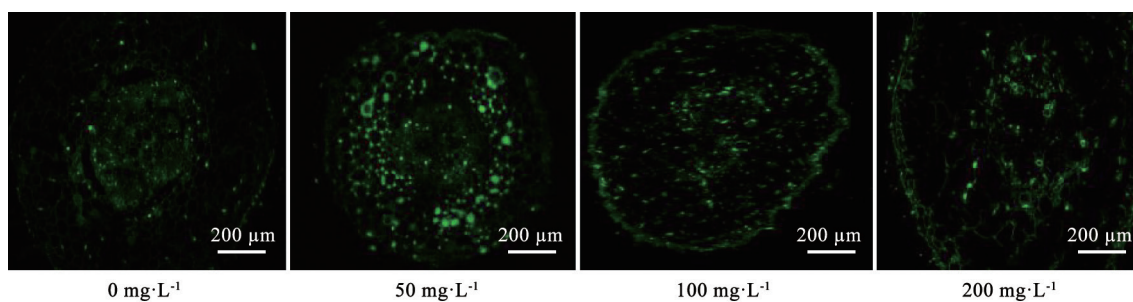


图7 苯甲酸不同浓度处理对蚕豆根系胼胝质沉积的影响
Fig.7 Effects of benzoic acid at different concentrations on callose deposition in faba bean roots

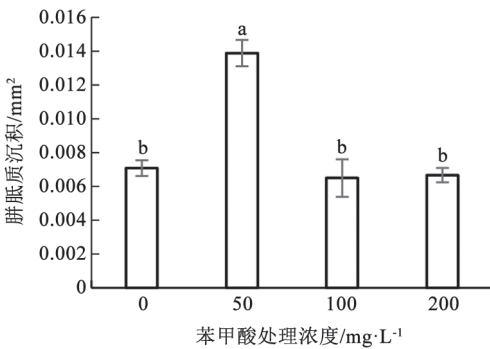


图8 苯甲酸不同浓度处理对单位面积胼胝质沉积的影响
Fig.8 Effects of benzoic acid at different concentrations on callose deposition per unit area

泡化程度加重, 大部分核质和细胞质被消解; 200 mg·L⁻¹苯甲酸处理时, 根系严重变形, 质膜、液泡膜破裂, 原生质消解, 细胞器完全解体, 胞内物质仅剩少量核质和核膜。

3 讨论

3.1 苯甲酸对蚕豆幼苗生长和枯萎病发生的影响

p-香豆酸对西洋参(*P. quinquefolium*)成株的生长具有自毒作用, 添加*p*-香豆酸后西洋参植株展叶推迟, 高浓度时约85%叶片不能完全展开, 叶片生长受到严重抑制, 地上部生物量比对照降低17.17%~

54.55% (焦晓琳等2015)。邻苯二甲酸胁迫下萝卜(*Raphanus sativus*)幼苗生长及物质积累受到显著抑制, 且邻苯二甲酸处理浓度越大, 抑制效果越强 (杨延杰等2013)。本研究中, 苯甲酸不同浓度处理对幼苗生长具有显著抑制作用, 且处理浓度越高, 对蚕豆幼苗生长的抑制作用越强。该效应还表现在草莓(*Fragaria ananassa*) (齐永志等2016)、黄瓜 (高长敏等2018)和茄子(*Solanum melongena*) (陈绍莉2015)等作物中。

随着蚕豆的产业化集约化种植, 蚕豆连作现象日益普遍, 由此引发的连作障碍严重制约着蚕豆的生产, 其中枯萎病是蚕豆连作障碍的主要病害之一, 其发生和传播受土壤中累积的酚酸类自毒物质影响极大(董艳2016a)。串珠镰孢菌和苹果 (*Malus pumila*)连作自毒物质(根皮苷)单独或组合处理均显著抑制了‘平邑甜茶’幼苗(*M. hupehensis*)的生长, 其中串珠镰孢菌+根皮苷处理最为显著, 说明根皮苷和串珠镰孢菌共同作用加重了苹果连作障碍现象(姜伟涛等2018)。本研究中, 苯甲酸显著抑制蚕豆幼苗的生长, 而且随处理浓度增加, 抑制效应增强(表1)。孙步蕾等(2015)也发现酚酸类自毒物质对平邑甜茶幼苗根系有较强的抑制作用, 是造成‘平邑甜茶’连作障碍的主要原因。长期单

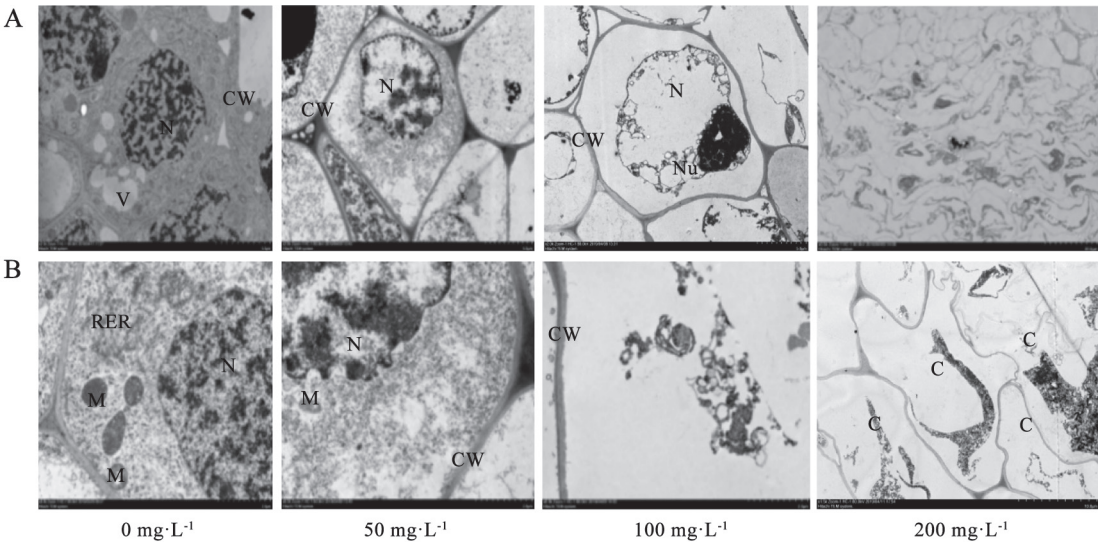


图9 苯甲酸不同浓度处理对蚕豆根系超微结构的影响

Fig.9 Effects of benzoic acid at different concentrations on ultrastructure of faba bean roots

A: 细胞整体结构图, B: 细胞细节图。C: 细胞; N: 细胞核; Nu: 核仁; RER: 糙面内质网; M: 线粒体; V: 液泡; CW: 细胞壁。

一种植花生(*Arachis hypogaea*)导致特定的根系分泌物刺激土壤中病原微生物大量生长并在根部定殖、进而破坏了根组织的正常分化和生理活动(姚小东等2019)。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(陈玲等2019)。本研究中,接种FOF条件下,随苯甲酸处理浓度增加,蚕豆根系生长逐渐受到抑制,损伤严重,发黑现象明显,其中高浓度处理时,根系发黑腐烂变软,地上部植株生长势弱,萎焉坏死(图1)。表明苯甲酸可抑制蚕豆根系生长并使其受损,为枯萎病菌的侵入创造有利条件,其中高浓度处理下,枯萎病发病率和病情指数显著增加5.0和26.0倍,进而显著促进蚕豆枯萎病的发生,加剧连作障碍的危害。

3.2 苯甲酸对尖孢镰刀菌的化感效应

3.2.1 苯甲酸对尖孢镰刀菌菌丝生长、产孢和孢子萌发的影响

酚酸类自毒物质对土传病害的助长效应直接表现为对病原菌的刺激作用。胡元森等(2007)对黄瓜枯萎病的研究发现,培养42 h内,低浓度($\leq 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的酚酸(香草酸、对羟基苯甲酸及阿魏酸)对枯萎病菌丝生长有刺激作用;浓度高于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对菌丝生长有抑制作用。Tian等(2019)对草莓枯萎病的研究表明,外源添加草莓连作自毒物质肉桂酸和阿魏酸50和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 促进了草莓专化型尖孢镰刀菌的菌丝生长,而高于 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肉桂酸和阿魏酸则显著抑制菌丝生长。本研究中, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲酸处理虽抑制菌丝生长但却显著促进镰刀菌产孢和孢子萌发(表2)。本研究结果与前人研究总体相似,但表现出不同病原菌对不同的自毒物质敏感程度不同的差异。本研究表明,尽管孢子不直接危害蚕豆,但大量孢子的产生,在适宜条件下萌发后,会形成若干潜在的侵染个体,从而提高蚕豆遭受尖孢镰刀菌潜在危害的风险(Wu等2009)。郝文雅等(2010)也发现在同一块土壤上,当重茬种植西瓜时,由于西瓜根系所分泌的阿魏酸以及与阿魏酸作用类似的其他物质的存在,大大刺激了西瓜专化型尖孢镰刀菌孢子的萌发,导致西瓜根际菌量增加,增大了病原菌从根系侵入的机率,从而诱发西瓜枯萎病的发生。

3.2.2 苯甲酸对尖孢镰刀菌产酶和产毒的影响

土传枯萎病的发生是病原真菌致病因子及寄主防卫反应相互斗争的结果。尖孢镰刀菌的致病能力与多种致病因子相关,其中细胞壁降解酶(cell wall degrading enzymes, CWDEs)和毒素是尖孢镰刀菌的重要致病因子,且在病原菌侵染过程中起协同作用(王麒然等2016)。细胞壁主要由纤维素和果胶组成,是抵御真菌和细菌病原体的主要防线,它提供了一个极好的结构屏障。细胞壁降解酶包括植物病原菌向外分泌的多种酶,作用于植物细胞壁或植物组织。尖孢镰刀菌在与寄主相互作用的初期会产生一些细胞壁降解酶,降解寄主的细胞壁和胞内物质后,植物细胞内释放出多糖等营养物质供真菌生长,为进一步侵入和定殖打开门户,这些酶与该菌的致病性密切相关(张荣等2011)。尖孢镰刀菌分泌的细胞壁降解酶主要包括果胶酶、纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶等。纤维素酶和果胶酶分解细胞壁中的纤维素和果胶成分;蛋白酶和淀粉酶主要作用于细胞内,分解胞内的蛋白质和淀粉,破坏植物细胞壁的完整性,使细胞结构变形,利于病原菌的进一步侵染。

Wu等(2008b, 2008c, 2009)的研究发现,在尖孢镰刀菌培养基中分别添加西瓜连作自毒物质(肉桂酸、阿魏酸、苯甲酸等)后,果胶酶、纤维素酶、淀粉酶等水解酶活性相应增强。在百合枯萎病的研究中也发现,向尖孢镰刀菌培养基中加入百合根系分泌的自毒物质(邻苯二甲酸)后促进镰刀菌产生了更高活性的果胶酶和纤维素酶(Wu等2015)。本研究中,不同浓度苯甲酸添加均显著促进了果胶酶、纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶活性。其中蛋白酶活性最强,说明蛋白酶是苯甲酸胁迫下蚕豆枯萎病菌分泌的主要细胞壁降解酶,在该病菌致病中可能发挥主导作用。除蛋白酶外,蚕豆枯萎病菌分泌的纤维素酶和淀粉酶活性也较高,说明该病菌致病性除有蛋白酶间的协同作用外,也有蛋白酶与其他酶的协同作用。王麒然等(2016)的研究表明花生叶腐病菌分泌的细胞壁降解酶以果胶酶活性最高,其次是漆酶和木聚糖酶,活性最弱的是纤维素酶,与本研究结果不同,可能原因是不同的病原菌与不同的寄主作物互作过程中分泌

的主要细胞壁降解酶不同,也可能是由于外界胁迫条件不同而导致病原菌分泌的细胞壁降解酶不同。

连作自毒物质的累积首先促使尖孢镰刀菌产生更高活性的细胞壁水解酶,加剧细胞壁和胞内物质的降解,协助病原菌侵入寄主根系,破坏自身的防御系统;下一步的致病策略通常是分泌毒素来调控寄主作物的生理生化过程,使其向有利于病原菌生长繁殖的方向改变(汪敏等2011)。FA是由镰刀菌产生的一种非特异性毒素,FA的含量与镰刀菌毒性间存在显著的正相关关系,镰刀菌毒性越强,产生的FA越多。处理三七(*P. notoginseng*)植株后,植株出现萎蔫症状、细胞膜透性被改变、细胞活性降低,最终植物生长被抑制,叶片失绿,组织坏死直至死亡(董鲜等2018)。尖孢镰刀菌产生的FA对寄主有致萎作用,FA致萎能力的强弱与致病力呈正相关(姬华伟等2012)。本研究结果表明,苯甲酸处理显著使FA含量提高了6.68倍,从而使尖孢镰刀菌致病力大大提高,加速了蚕豆枯萎死亡进程。

3.3 苯甲酸对蚕豆根系组织结构抗性的影响

植物遭受外界不良胁迫时,自身会产生一系列防卫反应来抵御外界不良胁迫的影响,木质素含量增加和胼胝质沉积是主要表现之一。木质素是木材的主要成分,而细胞壁“木质化”对病原体具有高度难渗透性。胼胝质沉积是一类多糖聚合物,在病原菌侵入寄主植物后,通常形成胼胝质沉积,使细胞壁加厚或形成乳突以阻碍病原菌的进一步侵染(夏启中和张明菊2004)。随黄瓜植株感染枯萎病程度的增加,叶柄胼胝质含量显著增加(郭晋云等2011)。本研究中,随苯甲酸处理浓度增加,木质素含量也随之增加,100 mg·L⁻¹苯甲酸处理时木质素含量达到最大值,超过100 mg·L⁻¹后木质素含量显著降低,原因可能是苯甲酸高浓度处理时,加剧尖孢镰刀菌产生更高活性的细胞壁水解酶(图3和4)和更高含量的FA(图5),导致蚕豆根系细胞结构破坏,胞内物质外泄,而使木质素大量流失。蚕豆根系胼胝质的沉积也出现类似的现象,低浓度苯甲酸处理促进蚕豆根系胼胝质沉积,而中、高浓度处理条件下由于细胞结构破坏,胞内物质外泄流失,胼胝质沉积也随之减少。

自毒物质一方面提高病原真菌的致病力,协助病原菌进一步侵入寄主植物,另一方面还可破坏寄主的组织结构,降低其抗病性。杨敏(2015)通过透射电镜观察发现,三七根系分泌的皂苷类自毒物质Rg1处理三七根系后使其根系细胞变形、细胞壁增厚、原生质浓缩,随处理时间延长,细胞壁逐渐溶解,细胞内形成数个空腔,根系细胞逐渐死亡,丧失功能,从而促进根腐病菌的侵染。本研究中,苯甲酸低浓度处理时,细胞壁有异常增厚现象,细胞器出现轻微的变形,空泡化严重,高浓度处理时,细胞变形严重,细胞壁破裂,细胞器消解,内含物外泄流出细胞。表明随苯甲酸处理浓度提高,促进尖孢镰刀菌产生高活性的细胞壁水解酶,加速尖孢镰刀菌入侵蚕豆根系并产生毒素(FA),进而使蚕豆达到自身防御系统的临界点,导致蚕豆根系细胞严重变形扭曲,细胞壁破裂,细胞器膜消解,蚕豆根系内胼胝质、木质素和细胞内含物等物质大量流失,致使蚕豆的防御系统被摧毁,最终导致枯萎病发病严重。齐永志等(2015)通过显微镜观察也发现,对羟基苯甲酸胁迫下草莓根系的表皮、皮层、中柱破壁细胞等细胞组织结构均受到严重的破坏,最终根系中尖孢镰刀菌感染率显著提高。李勇等(2017)的研究也表明,苯甲酸胁迫下,人参幼苗的细胞壁异常增厚,核膜、核仁解体、消散,细胞内出现大量空泡。

苯甲酸胁迫显著抑制幼苗生长,其中对根系生长的抑制效应最明显,同时还增加蚕豆根系的受损,为镰刀菌侵染创造条件。在枯萎病菌-蚕豆互作过程中,苯甲酸对病原和寄主均具有显著影响。从对病原菌的影响来看,苯甲酸首先促进尖孢镰刀菌产孢并提高孢子萌发率,其次,苯甲酸还进一步促进尖孢镰刀菌产生更高活性的细胞壁降解酶和毒素,最终提高尖孢镰刀菌的致病力。从对寄主的影响角度来看,苯甲酸胁迫导致蚕豆根系扭曲变形、细胞壁增厚、空泡化严重,随处理浓度增加,根系细胞变形严重,细胞壁破裂,细胞器消解,组织结构抗性遭受破坏,降低蚕豆的抗性,促使枯萎病严重发生,加速枯萎死亡进程。表明苯甲酸一方面增加镰刀菌的致病力,另一方面降低蚕豆的抗性,在蚕豆连作障碍进程中起到重要的作用。

参考文献(References)

- Cai ZC, Huang XQ (2016). Soil-borne pathogens should not be ignored by soil science. *Acta Pedol Sin*, 53 (2): 305–310 (in Chinese with English abstract) [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): 305–310]
- Cao CL, Cui BK, Qin WM (2011). Activity changes of several extracellular enzymes in liquid culture of *Phellinus mori*. *Mycosystema*, 3 (2): 275–280 (in Chinese with English abstract) [曹春蕾, 崔宝凯, 秦问敏(2011). 桑木层孔菌液体培养过程中几种胞外酶活性的变化. *菌物学报*, 3 (2): 275–280]
- Chen J (2007). *Research Methods of Modern Plant Pathology*. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [陈捷 (2007). *现代植物病理学研究方法*. 北京: 中国农业出版社]
- Chen L, Dong K, Yang ZX, et al (2017). Allelopathy autotoxicity effect of successive cropping obstacle and its alleviate mechanism by intercropping. *Chin Agr Sci Bull*, 33 (8): 91–98 (in Chinese with English abstract) [陈玲, 董坤, 杨智仙等(2017). 连作障碍中化感自毒效应及间作缓解机理. *中国农学通报*, 33 (8): 91–98]
- Chen L, Zhao Q, Dong K, et al (2019). Physiological mechanism of faba bean fusarium wilt promoted by benzoic acid and cinnamic acid. *Acta Phytophy Sin*, 46 (2): 298–304 (in Chinese with English abstract) [陈玲, 赵赛, 董坤等(2019). 苯甲酸和肉桂酸促进蚕豆枯萎病发生的生理生化机制. *植物保护学报*, 46 (2): 298–304]
- Chen SL (2015). *Studies on the mechanism and regulating effect of grafting of allelopathy of cinnamic acid and vanillin in eggplant continuous cropping obstacle* (dissertation). Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese with English abstract) [陈绍莉(2015). 茄子连作障碍的主要化感物香草醛和肉桂酸的作用机理及嫁接调节(学位论文). 沈阳: 沈阳农业大学]
- Chen YQ, Liu YT, Chou M, et al (2019). Effects of mixed extracts from different plants using saponin as substrate on co-expression of protease and pectinase in *Bacillus subtilis* fermentation. *Jiangsu Agric Sci*, 47 (11): 322–326 (in Chinese with English abstract) [陈钰泉, 刘玉婷, 仇敏等 (2019). 植物皂素提取液对枯草芽孢杆菌发酵表达蛋白酶与果胶酶的影响. *江苏农业科学*, 47 (11): 322–326]
- Dong X, Ma XH, Chen CJ, et al (2018). The isolation and identification of *fusarium oxysporum* and the study about its pathogenesis effect on *panax notoginseng*. *J Chin Med Mater*, 41 (1): 8–12 (in Chinese with English abstract) [董鲜, 马晓惠, 陈传娇等(2018). 三七根腐病尖孢镰刀菌分离鉴定及致病作用研究. *中药材*, 41 (1): 8–12]
- Dong Y, Dong K, Yang ZX, et al (2016a). Microbial impacts of *Fusarium wilt* promoted by cinnamic acid in the rhizosphere of *Vicia faba*. *Acta Horti Sin*, 43 (8): 1525–1536 (in Chinese with English abstract) [董艳, 董坤, 杨智仙等 (2016a). 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, et al (2016b). Rhizosphere microbial impacts of alleviating faba bean *Fusarium wilt* with inoculating AM fungi. *Chin J Appl Ecol*, 27 (12): 4029–4038 (in Chinese with English abstract) [董艳, 董坤, 杨智仙等(2016b). AM真菌控制蚕豆枯萎病发生的根际微生物效应. *应用生态学报*, 27 (12): 4029–4038]
- Gao CM, Ma GS, Lian H, et al (2018). Effect of trichoderma on the growth of cucumber seedlings, membrane lipid indexes and control effect against *Fusarium wilt*. *Chin J Biol Control*, 34 (5): 762–770 (in Chinese with English abstract) [高长敏, 马光恕, 廉华等(2018). 木霉菌对黄瓜幼苗生长和膜脂过氧化指标的影响及对枯萎病的防治效果. *中国生物防治学报*, 34 (5): 762–770]
- Guo JY, Hu XF, Li Y, et al (2011). Effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* on photosynthesis and water physiological characteristics in cucumber. *J Nanjing Agric Univ*, 34 (1): 79–83 (in Chinese with English abstract) [郭晋云, 胡晓峰, 李勇等(2011). 黄瓜枯萎病对黄瓜光合和水分生理特性的影响. *南京农业大学学报*, 34 (1): 79–83]
- Hao WY, Ran W, Shen QR, et al (2010). Effects of root exudates from watermelon, rice plants and phenolic acids on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Sci Agric Sin*, 43 (12): 2443–2452 (in Chinese with English abstract) [郝文雅, 冉炜, 沈其荣等(2010). 西瓜、水稻根分泌物及酚酸类物质对西瓜专化型尖孢镰刀菌的影响. *中国农业科学*, 43 (12): 2443–2452]
- Hu YS, Wu K, Li CX, et al (2007). Effects of phenolic compounds on the growth of *Cucumis sativus* seedlings and *Fusarium oxysporum hypha*. *Chin J Ecol*, 26 (11): 1738–1742 (in Chinese with English abstract) [胡元森, 吴坤, 李翠香等(2007). 酚酸物质对黄瓜幼苗及枯萎病菌菌丝生长的影响. *生态学杂志*, 26 (11): 1738–1742]
- Ji HW, Zheng QS, Dong X, et al (2012). Effects and mechanism of copper and zinc elements on controlling fusarium-wilt disease of banana. *Acta Horti Sin*, 39 (6): 1064–1072 (in Chinese with English abstract) [姬华伟, 郑青松, 董鲜等(2012). 铜、锌元素对香蕉枯萎病的防治效果与机理. *园艺学报*, 39 (6): 1064–1072]
- Jiang WT, Yi CM, Duan YN, et al (2018). Phloridzin and *Fusarium moniliforme* aggravated the replanted soil environment and inhibited the growth of *malus hupehensis* seedlings. *Acta Horti Sin*, 45 (1): 21–29 (in Chinese with English abstract) [姜伟涛, 尹承苗, 段亚楠等(2018). 根皮苷和串珠镰孢菌加重苹果连作土壤环境及其对平

- 邑甜茶生长的抑制. 园艺学报, 45 (1): 21–29]
- Jiao XL, Bi XB, Gao WW (2015). Allelopathic effect of *p*-coumaric acid on American ginseng and its physiological mechanism. *Acta Horti Sin*, 35 (9): 3006–3013 (in Chinese with English abstract) [焦晓林, 毕晓宝, 高微微 (2015). *p*-香豆酸对西洋参的化感作用及生理机制. 生态学报, 35 (9): 3006–3013]
- Li Y, Wang Z, Long QL, et al (2017). Morphological response of ginseng root to benzoic acid and differential genes expression analysis. *Mod Chin Med*, 19 (7): 995–1000 (in Chinese with English abstract) [李勇, 王梓, 龙期良等 (2017). 人参幼根对苯甲酸胁迫的形态学响应及基因差异表达. 中国现代中药, 19 (7): 995–1000]
- Li ZB, Zhou RJ, Xie YJ, et al (2016). Allelopathic effects of phenolic compounds of ginseng root rhizosphere on *Cylindrocarpon destructans*. *Chin J Appl Ecol*, 27 (11): 3616–3622 (in Chinese with English abstract) [李自博, 周如军, 解宇娇等 (2016). 人参连作根际土壤中酚酸物质对人参锈腐病菌的化感效应. 应用生态学报, 27 (11): 3616–3622]
- Qi YZ, Jin JJ, Chang N, et al (2016). Improvement effect of 4-hydroxybenzoic acid on occurrence of wilt disease of strawberry. *Chin Plant Prot*, 36 (9): 5–10 (in Chinese with English abstract) [齐永志, 金京京, 常娜等 (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, et al (2015). Observation on histological structure of strawberry roots after inoculating *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* under 4-hydroxybenzoic acid stress. *Acta Horti Sin*, 42 (10): 1909–1918 (in Chinese with English abstract) [齐永志, 苏媛, 王宁等 (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, Huo HW, Zhang F, et al (2016). The components of rice and watermelon root exudates and their effects on pathogenic fungus and watermelon defense. *Plant Signal Behav*, 11 (6): e1187357
- Sun BL, Wang YF, Zhang XF, et al (2015). Effect of residual roots on the biomass of *malus hupehensis* seedlings, phenolic acids and microbiology in the soil of continuous cropping. *Acta Horti Sin*, 42 (1): 131–139 (in Chinese with English abstract) [孙步蕾, 王艳芳, 张先富等 (2015). 连作土壤中残根对平邑甜茶幼苗生物量及土壤酚酸类物质和微生物的影响. 园艺学报, 42 (1): 131–139]
- Tian GL, Bi YM, Cheng JD, et al (2019). High concentration of ferulic acid in rhizosphere soil accounts for the occurrence of *Fusarium* wilt during the seedling stages of strawberry plants. *Physiol Mol Plant Pathol*, 108: 101435
- Wang LR, Wu JX, Zhang RQ, et al (2016). Analysis of cell wall degrading enzymes secreted by *Rhizoctonia solani* and its pathogenicity. *Plant Physiol J*, 52 (3): 269–276 (in Chinese with English abstract) [王麒麟, 吴菊香, 张茹琴等 (2016). 花生叶腐病菌分泌的细胞壁降解酶活性测定及致病性分析. 植物生理学报, 52 (3): 269–276]
- Wang M, Jiao R, Xing XP, et al (2011). The molecular mechanism of pathogenicity for *Verticillium dahliae* Kleb. *Cotton Sci*, 23 (3): 272–278 (in Chinese with English abstract) [汪敏, 焦睿, 邢小萍等 (2011). 棉花黄萎病菌致病分子的机理. 棉花学报, 23 (3): 272–278]
- Wang N, Qi YZ, Shi RR, et al (2013). Manufacture of paraffin section on strawberry root and observation on the development of lateral root. *J Hebei Agric Univ*, 36 (3): 34–38 (in Chinese with English abstract) [王宁, 齐永志, 时荣荣等 (2013). 草莓根系的石蜡切片制作及侧根发育过程的观察. 河北农业大学学报, 36 (3): 34–38]
- Wang SM, Zhao XL, Ma YN, et al (2016). Histological changes and expression of defense related genes of maize during the interaction with *Rhizoctonia solani* AG1-IA. *J Maize Sci*, 24 (5): 37–42 (in Chinese with English abstract) [王绍敏, 赵新兰, 马亚男等 (2016). *Rhizoctonia solani* AG1-IA 侵染玉米过程中组织病理学变化及防卫反应基因的表达. 玉米科学, 24 (5): 37–42]
- Wu HS, Raza W, Fan JQ, et al (2008a). Antibiotic effect of exogenously applied salicylic acid on *in vitro* soilborne pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Chemosphere*, 74 (1): 45–50
- Wu HS, Raza W, Fan JQ, et al (2008c). Cinnamic acid inhibits growth but stimulates production of pathogenesis factors by *in vitro* cultures of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *J Agric Food Chem*, 56 (4): 1316–1321
- Wu HS, Wang Y, Zhang CY, et al (2009). Physiological and biochemical responses of *in vitro* *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to benzoic acid. *Folia Microbiol*, 54 (2): 115–122
- Wu HS, Yin XM, Liu DY, et al (2008b). Effect of fungal fusaric acid on the root and leaf physiology of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. *Plant Soil*, 308 (1–2): 255–266
- Wu K, Yuan SF, Xun GH, et al (2015). Root exudates from two tobacco cultivars affect colonization of *ralstonia solanacearum* and the disease index. *Eur J Plant Pathol*, 141 (4): 667–677
- Xia QZ, Zhang MJ (2004). Metabolic basis of plant-disease resistance. *J Huanggang Polytechnic*, 6 (3): 38–41 (in Chinese with English abstract) [夏启中, 张明菊 (2004). 植物抗病的物质代谢基础. 黄冈职业技术学院学报, 6 (3): 38–41]
- Xiao YB, Duan ZY, Jin H, et al (2007). Spared N response and yields advantage of intercropped wheat and faba bean. *J Plant Nutr Fert Sci*, 13 (2): 267–271 (in Chinese with En-

- glish abstract) [肖焱波, 段宗颜, 金航等(2007). 小麦/蚕豆间作体系中的氮节约效应及产量优势. 植物营养与肥料学报, 13 (2): 267–271]
- Yang M (2015). Investigation on autotoxic mechanism of ginsenosides from *Panax notoginseng* roots strains (dissertation). Kunming: Yunnan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [杨敏(2015). 三七根系皂苷的自毒作用机制研究(学位论文). 昆明: 云南农业大学]
- Yang YJ, Wang XW, Zhao K, et al (2013). Effects of phthalic acid on seed germination, membrane lipid peroxidation and osmoregulation substance of radish seedlings. *Acta Ecol Sin*, 33 (19): 6074–6080 (in Chinese with English abstract) [杨延杰, 王晓伟, 赵康等(2013). 邻苯二甲酸对萝卜种子萌发、幼苗叶片膜脂过氧化及渗透调节物质的影响. 生态学报, 33 (19): 6074–6080]
- Yao XD, Li XG, Ding CF, et al (2019). Variation of soil microbial community with peanut cropping system, monocropping or rotation, and its relationship with disease occurrence. *Acta Pedol Sin*, 56 (4): 975–985 (in Chinese with English abstract) [姚小东, 李孝刚, 丁昌峰等(2019). 连作和轮作模式下花生土壤微生物群落不同微域分布特征. 土壤学报, 56 (4): 975–985]
- Ye SF (2004). Research on promotive effects of fusarium wilt in *Cucumis sativus* by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates of *Cucumis sativus* L., and mitigation mechanism by grafting and cinnamic acid-degrading microbial strains (dissertation). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [叶素芬(2004). 黄瓜根系自毒物质对其根系病害的助长作用及其缓解机制研究(学位论文). 杭州: 浙江大学]
- Zhang R, Jiang ZD, Li MH, et al (2011). Research progress in pathogenesis and pathogenic related genes of *Fusarium oxysporum*. *Chin Agr Sci Bull*, 27 (15): 254–258 (in Chinese with English abstract) [张荣, 姜子德, 李敏慧等(2011). 尖孢镰孢菌致病机理及相关致病基因研究进展. 中国农学通报, 27 (15): 254–258]
- Zhou XG, Wu FZ (2012). *p-coumaric* acid influenced cucumber *rhizosphere* soil microbial communities and the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* owen. *PLoS ONE*, 7 (10): e48288

Effects of benzoic acid on pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae* and tissue structure resistance of faba bean root

YUAN Tingting, DONG Yan*, ZHAO Qian

College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201

Abstract: Experiments were carried out to investigate mechanisms of phenolic acid autotoxic substance benzoic acid in interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae* (FOF) and faba bean, and to explore the response characteristics of root tissue structure resistance to benzoic acid stress. Four concentrations of benzoic acid were set (0, 50, 100 and 200 mg·L⁻¹), the effects of benzoic acid on seedling growth of faba bean and pathogenicity of FOF *in vitro*, the effects of benzoic acid on the seedlings growth, the occurrence of *Fusarium* wilt, lignin content and callus deposition in faba bean roots were studied under hydroponics condition, the ultrastructure of faba bean roots by transmission electron microscopy were observed. The results showed that seedling growth was inhibited with increasing benzoic acid concentration, the higher the treatment concentration, the more obvious the inhibitory effect. Exogenously applied benzoic acid significantly increased the incidence and the disease index of faba bean *Fusarium* wilt, significantly increased the spore germination and sporulation, significantly increased cell wall degrading enzymes activity and mycotoxin production by FOF. Benzoic acid stress also aggravates the destruction of the defense system of faba bean root cells. It was concluded that benzoic acid increased the pathogenicity of FOF and destroyed faba bean tissue resistance, helped FOF to invade the roots of faba bean, and the synergistic effect of benzoic acid and FOF was helpful to aggravate the occurrence of continuous cropping obstacle of faba bean.

Key words: benzoic acid; *Fusarium* wilt of faba bean; *Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae*; cell wall degrading enzymes; tissue structure resistance

Received 2019-08-26 Accepted 2019-11-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860596 and 31560586).

*Corresponding author (dongyanyx@163.com).