

醋糟生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄系统抗性的影响

裴广鹏, 李俞昕, 朱宇恩, 刘伟, 李华

引用本文:

裴广鹏, 李俞昕, 朱宇恩, 等. 醋糟生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄系统抗性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(2): 267-276.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0881>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

施用秸秆生物炭和鸡粪对镉胁迫下玉米生长及镉吸收的影响

悦飞雪, 李继伟, 王艳芳, 刘领

农业环境科学学报. 2018, 37(10): 2118-2126 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0242>

不同生物炭对酸化茶园土壤N₂O和CO₂排放的影响

孙贇, 何志龙, 林杉, 张水清, 柳维扬

农业环境科学学报. 2017, 36(12): 2544-2552 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0845>

外源NO对铝胁迫下西瓜幼苗生长及生理特性的影响

肖家昶, 郑开敏, 马俊英, 郑阳霞

农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1650-1658 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0145>

草坪基质添加碳纳米材料对高羊茅生长和蚯蚓生理的影响

王彦力, 白雪, 多立安, 赵树兰

农业环境科学学报. 2019, 38(4): 773-778 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0851>

湿地植物香蒲根系抗氧化酶活性和根系分泌物对阿特拉津胁迫的响应

武淑文, 侯磊, 刘云根, 范黎明, 叶敏

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2751-2760 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0205>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

裴广鹏, 李俞昕, 朱宇恩, 等. 醋糟生物质炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄系统抗性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(2): 267-276.

PEI G P, LI Y X, ZHU Y E, et al. Vinegar residue biochar regulates the systemic resistance of tomato under *Fusarium oxysporum* stress[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(2): 267-276.



开放科学 OSID

醋糟生物质炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄系统抗性的影响

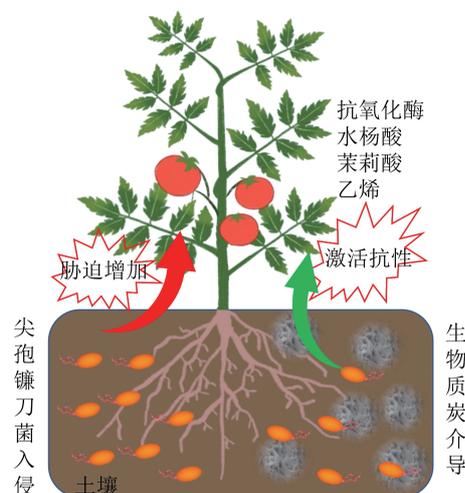
裴广鹏^{1,2}, 李俞昕², 朱宇恩², 刘伟³, 李华^{2*}

(1. 山西农业大学资源环境学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西大学环境与资源学院, 太原 030006; 3. 山西省科技情报与战略研究中心, 太原 030024)

摘要:为探明生物质炭介导的系统抗性在土传病害防治过程中的作用,以番茄枯萎病为对象,采用盆栽试验,研究尖孢镰刀菌胁迫下生物质炭对番茄体内抗氧化酶活性和非酶类抗氧化分子含量的变化,及对相关抗性基因表达的影响。结果表明:施加生物质炭可显著降低番茄的病害程度。在尖孢镰刀菌胁迫下,番茄叶片光合色素显著降低,丙二醛含量显著增加,生物质炭的施加可显著降低尖孢镰刀菌胁迫造成的光合色素和丙二醛含量变化。施加生物质炭在降低番茄体内过氧化物酶活性的同时,可提高“解毒酶”(包括过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽S-转移酶)的活性。在尖孢镰刀菌胁迫下,番茄体内氧化型谷胱甘肽含量明显升高,生物质炭的施加(3%)在显著降低氧化型谷胱甘肽含量的同时,显著提高了还原型谷胱甘肽含量,表明生物质炭可通过提高抗氧化分子含量来加强番茄体内活性氧的清除效率。此外,在生物质炭的作用下,番茄水杨酸相关基因 *PR1a*、*MPK2* 和 *NPR1* 的表达下调,而茉莉酸相关基因 *DEF1*、*JAZ1*、*JAZ3* 和乙烯相关基因 *ACO1* 和 *ACS* 的表达上调。结果表明施加生物质炭可增强番茄系统防御尖孢镰刀菌入侵的启动效应和能力。

关键词: 番茄枯萎病;尖孢镰刀菌;生物质炭;系统抗性

中图分类号:S432;S435.79 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)02-0267-10 doi:10.11654/jaes.2021-0881



Vinegar residue biochar regulates the systemic resistance of tomato under *Fusarium oxysporum* stress

PEI Guangpeng^{1,2}, LI Yuxin², ZHU Yuen², LIU Wei³, LI Hua^{2*}

(1. School of Resource and Environment, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. School of Environment Science and Resources, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Science & Technology Information and Strategy Research Center of Shanxi, Taiyuan 030024, China)

Abstract: To explore the effects and possible mechanisms associated with biochar-elicited suppression of soil-borne diseases and improved plant performance, pot experiments were used to explore the ability of biochar to induce systemic resistance in tomato against *Fusarium wilt* caused by a soil-borne pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder and Hansen. Results showed that biochar application significantly reduced tomato disease severity. The photosynthetic pigments and malondialdehyde content of tomato leaves were

收稿日期:2021-08-05 录用日期:2021-11-01

作者简介:裴广鹏(1989—),男,山西浑源人,博士,从事环境污染与治理研究。E-mail:peiguangpeng@163.com

*通信作者:李华 E-mail:lihua@sxu.edu.cn

基金项目:山西省重点研发计划项目(201703D211014);山西农业大学博士科研启动项目(2021BQ93)

Project supported: The Key Research and Development Program of Shanxi Province, China (201703D211014); Scientific Research Starting Project for the Doctor of Shanxi Agricultural University (2021BQ93)

significantly decreased and increased, respectively under *F. oxysporum* stress, and the application of biochar significantly reduced the changes in photosynthetic pigments and malondialdehyde content. The activity of peroxidase in tomato significantly reduced, whereas the activity of "detoxification enzymes" (including catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, and glutathione S-transferase) significantly increased during the biochar treatment. The content of oxidized glutathione in tomato was significantly increased under *F. oxysporum* stress. The application of biochar(3%) significantly reduced the content of oxidized glutathione but significantly increased the content of reduced glutathione, indicating that the biochar could enhance the removal efficiency of active oxygen in tomato. In addition, application of biochar could enhance the priming effect and ability of tomato system against *F. oxysporum* invasion, which is mainly dependent on the pathway mediated by jasmonic acid and ethylene. Specifically, with the treatment of biochar, the relative expression of salicylic acid-related genes (*PR1a*, *MPK2*, and *NPR1*) was down-regulated, while the relative expressions of jasmonic acid-related genes (*DEF1*, *JAZ1*, and *JAZ3*) and ethylene-related genes (*ACO1* and *ACS*) were up-regulated. The above results indicate that the application of biochar can enhance the resistance ability of tomato system to defend against *F. oxysporum* stress.

Keywords: tomato Fusarium wilt; *Fusarium oxysporum*; biochar; systemic resistance

集约化作物生产系统中长期连作所引起的土传病害对作物产量和农业可持续发展的限制问题日益突出,农民的经济利益因此遭到重大损失^[1-2]。同时,土传病害的日益严重使得作物生产对农药依赖程度越来越大,而农药的大量使用又造成环境污染^[3]。其中,由尖孢镰刀菌番茄专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder and Hansen,以下简称尖孢镰刀菌)引起的枯萎病是番茄的主要病害之一^[4]。目前,对于番茄枯萎病的防治方法主要包括物理防治、化学防治及生物防治,但是这些防治方法均存在不同程度的局限性^[5]。近年来,生物质炭作为集吸附剂、肥料和修复剂于一身的新型富碳材料在土传病害防治方面的作用受到广泛关注^[6-8]。生物质炭所具有的物理、化学和微观结构等特性对防治土传病原菌、提高作物抗病能力和产量等都具有显著效果^[7,9-10]。

相对于由地上病原菌引起的病害,生物质炭对土壤环境中的病原菌及其引发的植物病害的抑制机制更加多样化。这是因为生物质炭和土传病原菌都存在于土壤中,二者之间存在直接和间接的相互作用^[11]。生物质炭抑制由土传病原菌引起的植物病害的机制可能包括:(1)改善土壤养分含量和可利用性^[12];(2)改良土壤理化特性^[13];(3)吸附致病酶和毒性代谢物^[14];(4)改变土壤微生物群落结构和多样性^[15];(5)诱导植物抗病性^[13]。其中,生物质炭诱导植物抗性的介导因子可能是生物质炭含有的化学物质或诱导的微生物^[16-17]。诱导植物的先天防御系统可以降低其对包括土传病原菌在内的多种病原菌和寄生虫引起的疾病的易感性^[18]。目前对生物质炭对植物抗性的影响研究仅有草莓灰霉病和白粉病、大豆叶枯病及番茄灰霉病和根腐病^[19-22],关于生物质炭介导下的番茄系统抗性对枯萎病的作用效果还鲜有报道。

另外,现有研究结果证实了生物质炭可以通过诱导植物抗性而降低其发病率,但其机理仍需进一步深入研究。因此,本研究旨在探讨生物质炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄体内抗氧化酶活性和非酶类抗氧化分子含量的变化及信号分子(水杨酸、茉莉酸和乙烯)相关基因表达的影响,为生物质炭在防治土传病害中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验土壤采自山西省晋中市某农田表层土壤,土样自然风干、去除杂质过筛后备用。土样基本理化性质如下:土壤类型为粉砂质壤土,成土母质为冲积母质,土壤pH 7.95,阳离子交换量 $19.04 \text{ cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$,有机质含量 $21.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮含量 $1.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效磷含量 $47.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾含量 $353.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

番茄枯萎病致病菌尖孢镰刀菌由山西农业大学农学院提供。醋糟由山西省晋中市某醋厂提供。供试番茄品种为维也纳二号。

1.2 生物质炭的制备

生物质炭的制备^[23-24]:以去除杂质后的醋糟为原料,将其置于真空气氛炉中(SX2-12-10Q,武汉亚华电炉有限公司),在 $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 且无氧环境下(通入氮气)持续热解2 h使醋糟完全炭化,冷却至室温,即得醋糟生物质炭。将生物质炭混合均匀后过100目筛,贮于干燥器中备用。该生物质炭基本性质如下:pH 9.98 ($m_{\text{生物质炭}}:V_{\text{水}}=1:20$),比表面积 $10.13 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$,元素组成C 67.18%、H 1.49%、O 27.91%、N 3.10%、S 0.32%。

1.3 病原菌制备及接种

将尖孢镰刀菌在马铃薯蔗糖培养基上进行活化和培养。在 $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养5 d后,使用灭菌后的打孔器

(6 mm)在菌落边缘取菌饼6个加入到100 mL马铃薯液体培养基中,继续于26 ℃、200 r·min⁻¹下振荡培养5 d。培养结束后将菌液离心浓缩(10 000 r·min⁻¹,5 min),去掉上清液,然后将剩余菌液重悬在蒸馏水中,使用血球计数板对其进行计数。按每克土含有7.89×10⁵个尖孢镰刀菌孢子进行土壤尖孢镰刀菌的接种,接种完成后培养一周备用。

1.4 盆栽试验

番茄苗培育:挑选外形大小相近、无损伤且种粒饱满的番茄种子,将其用1.5%的次氯酸钠溶液浸泡消毒5 min,然后用蒸馏水反复冲洗5次。将消毒后的番茄种子播种到育苗盘中,育苗基质为泥炭和凝灰岩混合物(V:V=7:3)。待番茄苗长出4~5片真叶后用于后续盆栽试验。

盆栽试验在温室大棚中进行。试验共设4个处理,分别为:(1)未经处理的土壤(CK);(2)土壤接种尖孢镰刀菌(FC0);(3)土壤接种尖孢镰刀菌后施加生物质炭,施加量为1%(FC1);(4)土壤接种尖孢镰刀菌后施加生物质炭,施加量为3%(FC3)。每个处理设置3个重复,共计12盆。每盆(盆口和底部直径分别为16.0 cm和13.0 cm,高17.5 cm)装相当于2 kg干土质量的新鲜土壤(过3 mm筛)。将各处理土壤装入盆中,选择生长大小一致的番茄苗进行移栽,每盆移栽1株番茄苗,然后将盆放入温室大棚中培养,并按需浇水和除草。番茄生长60 d后,采取一部分番茄叶片分别测定光合色素和丙二醛含量、抗氧化酶活性、还原型和氧化型谷胱甘肽含量,同时,将一份番茄叶片经液氮速冻后存于-80 ℃冰箱,用于信号分子(水杨酸、茉莉酸和乙烯)相关基因*PRIa*、*MPK2*、*NPR1*、*DEF1*、*JAZ1*、*JAZ3*、*ACO1*、*ERF1*和*ACS*的相对定量分析。

1.5 测试指标及方法

1.5.1 番茄枯萎病发病级别鉴定

观察记录番茄叶片黄化和枯萎情况,收获后纵向剖开茎部记录维管束褐变程度。番茄枯萎病分级标准如表1所示^[25]。

1.5.2 光合色素含量的测定

叶绿素a(Chl a)、叶绿素b(Chl b)和类胡萝卜素(Caro)含量采用95%乙醇提取-分光光度法(Cary 60 UV-Vis, Agilent, 美国)测定(以鲜质量计)。叶绿素含量[Chl(a+b)]由Chl a和Chl b含量相加所得。

1.5.3 丙二醛含量的测定

丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸显色法

表1 番茄枯萎病分级标准

Table 1 Classification standard of tomato Fusarium wilt

发病级别 Disease severity	症状 Symptom	
	叶片 Leaf	维管束 Vascular bundle
0级	无症状	不变色
1级	下部叶片出现轻微症状	纵剖茎秆维管束1/4以下变色
2级	下部1~2片叶黄化	纵剖茎秆维管束1/4~1/2以下变色
3级	下部1~2片叶枯死	纵剖茎秆维管束1/2~3/4以下变色
4级	整株萎蔫、倒伏或枯死	

测定(以鲜质量计)。

1.5.4 抗氧化酶活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性测定分别采用氮蓝四唑比色法、愈创木酚比色法和高锰酸钾滴定法^[26]。抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)和谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性分别采用试剂盒A123-1-1、A062-1-1、A004-1-1(南京建成生物工程研究所)进行分析,具体测试步骤参照说明书。其中,GR和GST活性采用比活力表示,即每克蛋白质所具有的酶活力单位数;其余酶活性以每克鲜质量所具有的酶活力单位数表示。

1.5.5 非酶类抗氧化分子含量的测定

还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量的测定分别采用试剂盒A006-1-1、A061-2-1(南京建成生物工程研究所),具体测试步骤参照说明书。GSH和GSSG含量采用每克蛋白质所含有的质量表示。

1.5.6 基因表达量的测定

(1)总RNA的提取与cDNA合成

采用OmniPlant RNA Kit(DNase I)试剂盒(CW2598S,北京康为世纪生物科技有限公司),根据说明书方法提取各样品总RNA。然后采用HiScript Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒(R123-01,南京诺唯赞生物科技有限公司)进行反转录。

(2)内参基因检测 cDNA 模板质量

以反转录得到的cDNA作为模板,加入PCR反应体系中,体系如表2所示,内参基因为 β -actin。反应条件为50 ℃逆转录反应15 min,然后80 ℃ 2 min灭活逆转录酶。

(3)荧光定量PCR检测

采用荧光定量PCR仪(9600plus,杭州博日科技有限公司)进行定量分析,反应体系如表3所示。所

表2 反转录反应体系

Table 2 RNA reverse transcription reaction system

试剂 Reagent	体积 Volume
4×gDNA 去除反应混合物	4 μL
RNA 模板	总 RNA: 1 000 ng
无 RNase 酶双蒸水	补足至 16 μL
42 °C 下反应 2 min	
5×实时定量 PCR 反应混合物	4 μL
总体积	20 μL

表3 qRT-PCR 反应体系

Table 3 qRT-PCR reaction system

试剂 Reagent	体积 Volume/μL
2X ChamQ SYBR 颜色实时定量 qPCR 反应混合物	10
上游引物 (5 μmol·L ⁻¹)	0.4
下游引物 (5 μmol·L ⁻¹)	0.4
模板	2
双蒸水	7.2
总体积	20

用引物和反应程序见表4,其中β-actin为内参基因。以2^{-ΔΔCt}计算各样品基因相对表达量。

1.6 数据统计分析

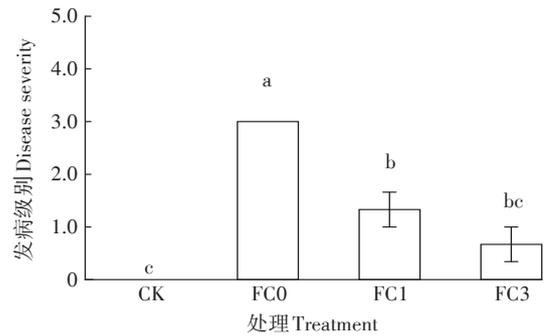
使用SPSS 25.0对试验数据进行One-way ANOVA

差异显著性分析(P<0.05),每个处理设置3次重复,试验结果以“平均值±标准误(SE)”表示。使用软件OriginPro 2018做图。

2 结果与分析

2.1 生物质炭对番茄发病级别的影响

从图1可以看出,与CK相比,在尖孢镰刀菌胁迫下,番茄病害程度显著增加。随着生物质炭的施加,番茄病害程度显著降低。当生物质炭施加量为1%



不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)。下同
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments(P<0.05). The same below

图1 生物质炭对番茄发病级别的影响

Figure 1 Effects of biochar on disease severity of tomato

表4 引物序列和qRT-PCR 反应程序

Table 4 Primers and procedures for qRT-PCR

信号分子 Signal molecule	基因 Gene	引物名称 Primer name	序列(5'~3') Sequence(5'~3')	反应程序 Procedure	参考文献 Reference		
水杨酸	PR1a	PR1a-F	GAGGGCAGCCGTGCAA	95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[27]		
		PR1a-R	CACATTTTCCACCAACACATTG				
	MPK2	MPK2-F	GTTTACGCATAATGAAAGGATCAGAAG			95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[28]
		MPK2-R	TTATCTATGGAGCTTGCACACCA				
	NPR1	NPR1-F	GCGATATTCCAACCTATA			95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[29]
		NPR1-R	TAGATTCAAATACACCATTG				
茉莉酸	DEF1	DEF1-F	CTCTTTGTTACCTATGAGGTAG	95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[30]		
		DEF1-R	CTTCCTCACCCAAAGTTGCT				
	JAZ1	JAZ1-F	CTGATCAATCTGGTGTGAGTTT			95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[31]
		JAZ1-R	CAGAAGGCTGTGGCATTGAC				
	JAZ3	JAZ3-F	GATGGTCAATGTCTTCGAGG			95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[32]
		JAZ3-R	CAAACACCATCTGCAGCAG				
乙烯	ACO1	ACO1-F	CAATGAAGGCAATGAAAAGT	95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[33]		
		ACO1-R	CATATGCAGCAAATCACAATC				
	ERF1	ERF1-F	AAAAGATGTCAAGCCCACTAG			95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[33]
		ERF1-R	AAATGTTCTTAACCAAACCCTA				
	ACS	ACS-F	TGTTATTCAGATGGTCTGG			95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[33]
		ACS-R	CTGGCAAGCCATGATAATCT				
内参基因	β-actin	β-actin-F	TTGCCGATGCCATTCT	95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35次循环	[34]		
		β-actin-R	TCGGTGAGGATATTCATCAGGTT				

时,番茄病害程度比尖孢镰刀菌胁迫处理显著降低。继续增加生物炭施加量至3%,番茄病害程度较施加量为1%的处理没有显著变化。

2.2 生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄光合色素含量的影响

生物炭介导对尖孢镰刀菌胁迫下光合色素含量的影响如图2所示。在尖孢镰刀菌胁迫下,番茄叶片光合色素含量较CK均明显降低,Chl(a+b)、Chl a、Chl b和Caro含量分别比CK降低了29.06%、29.13%、28.89%和13.59%。随着生物炭的施加,番茄叶片光合色素含量较尖孢镰刀菌胁迫处理显著升高($P<0.05$),且含量基本可恢复到CK组水平。当生物炭施加量为1%时,Chl(a+b)、Chl a、Chl b和Caro含量分别比尖孢镰刀菌胁迫处理显著增加了29.65%、21.76%、51.57%和24.65%。继续增加生物炭施加量至3%,番茄叶片光合色素含量较施加量为1%的处理没有显著变化。以上结果表明,生物炭的介入可显著缓解尖孢镰刀菌胁迫对番茄光合作用造成的不利影响。

2.3 生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄丙二醛含量的影响

生物炭介导对尖孢镰刀菌胁迫下MDA含量的影响

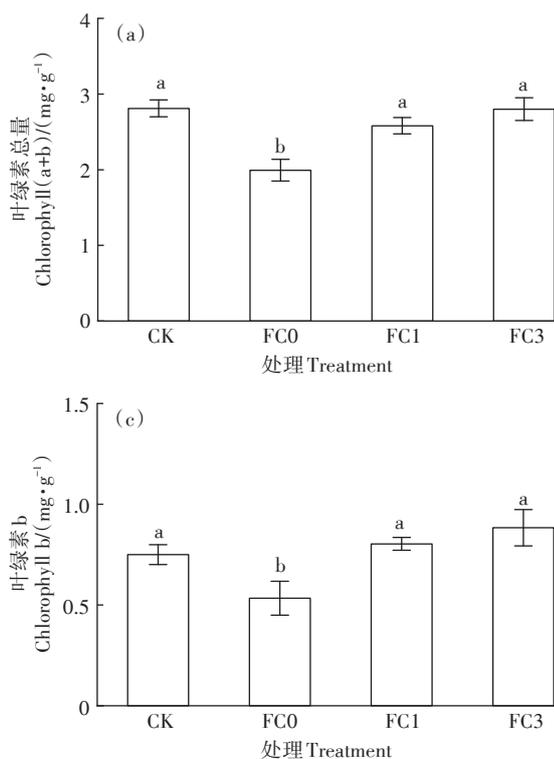


图2 生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄叶片光合色素含量的影响

Figure 2 Effects of biochar on the content of photosynthetic pigments in tomato leaves under *Fusarium oxysporum* stress

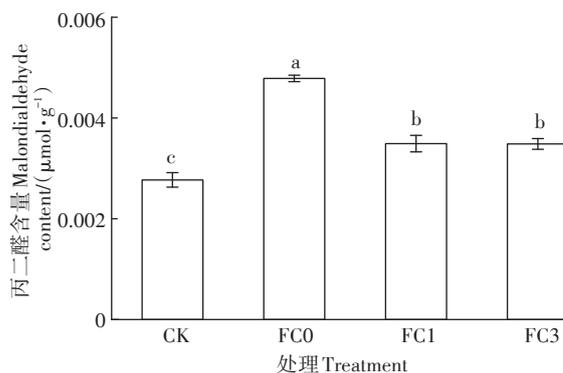


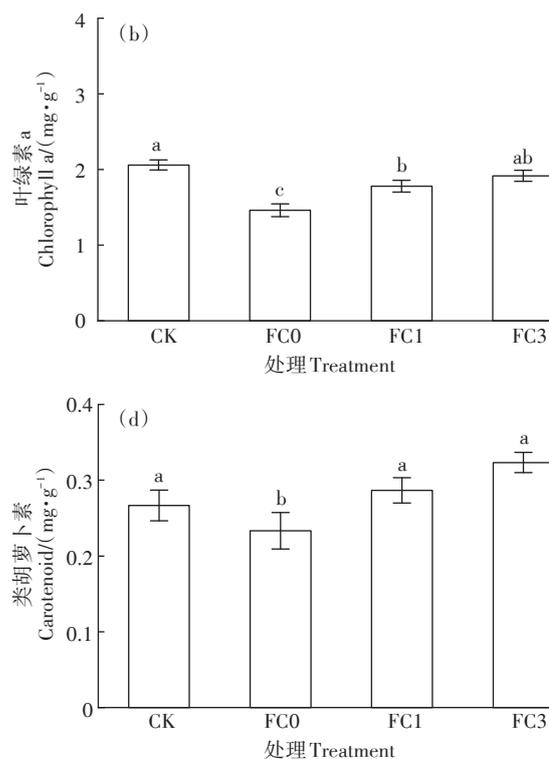
图3 生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄体内丙二醛含量的影响

Figure 3 Effects of biochar on the content of malonaldehyde of tomato under *Fusarium oxysporum* stress

影响如图3所示。当番茄植株遭受尖孢镰刀菌胁迫后,其体内MDA含量显著高于CK,增加量为72.17%,表明番茄受逆境伤害程度较高。随着生物炭的施加,番茄体内MDA含量较尖孢镰刀菌胁迫处理时显著降低,当生物炭施加量为1%和3%时,MDA含量分别降低了27.07%和27.17%。以上结果表明,生物炭可缓解尖孢镰刀菌带来的胁迫。

2.4 生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄抗氧化酶活性的影响

生物炭介导对尖孢镰刀菌胁迫下番茄体内抗



氧化酶活性的影响如图4所示。由图4a可知,尖孢镰刀菌胁迫下番茄CAT活性较CK显著增加了61.48%。随着生物质炭的施加及其施加量的增加番茄CAT活性进一步升高。当生物质炭施加量为1%和3%时,番茄CAT活性分别较CK增加了88.02%和104.51%。

由图4b可知,与CK相比,尖孢镰刀菌胁迫对番茄体内SOD活性无显著影响,且生物质炭在低施加量下(1%)同样对SOD活性无显著影响。继续增加生物质炭用量至3%时,番茄SOD活性显著提高,较尖孢镰刀菌胁迫处理增加17.11%。由此可见,较高添加量(3%)的生物质炭对SOD活性有促进作用。

由图4c可知,与CK相比,番茄植株遭受尖孢镰刀菌胁迫时,其体内POD活性显著升高,增加量为16.11%。但随着生物质炭的施加,番茄体内POD活性较尖孢镰刀菌胁迫处理显著降低,并恢复到CK水平。

由图4d可知,与CK相比,番茄植株遭受尖孢镰刀菌胁迫时,其体内APX活性显著降低,比CK降低了30.11%。随着生物质炭的施加,番茄体内APX活性较尖孢镰刀菌胁迫处理升高,且在生物质炭施加量为1%时达到最高,显著增加了18.62%,但仍低于CK处理;在生物质炭的施加量至3%时,番茄体内APX

活性却较1%时显著降低。

由图4e可知,与CK相比,番茄遭受尖孢镰刀菌胁迫后,其体内GR活性无显著变化。但随着生物质炭施加,番茄体内GR活性却显著上升,当生物质炭施加量为3%时,GR活性比CK增加46.96%。

由图4f可知,与CK相比,番茄遭受尖孢镰刀菌胁迫后,其体内GST活性显著升高($P<0.05$),比CK增加44.60%。随着生物质炭施加量的增加,番茄GST活性呈现先升高后降低的趋势,当施加量为1%,GST活性最高,且比CK增加了75.43%。

2.5 生物质炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄非酶类抗氧化分子含量的影响

前述结果显示施加生物质炭可缓解尖孢镰刀菌入侵引起的氧化损伤,降低MDA的积累。为进一步探究生物质炭缓解氧化损伤的作用,本研究分析了生物质炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄GSH和GSSG含量的影响,结果见图5。在尖孢镰刀菌胁迫下,番茄体内GSH含量升高,但与CK差异不显著(图5a)。但随着生物质炭的施加,番茄体内GSH含量较CK和尖孢镰刀菌胁迫下的含量显著升高,在生物质炭施加量为1%和3%时,较CK分别增加了38.55%和40.99%。

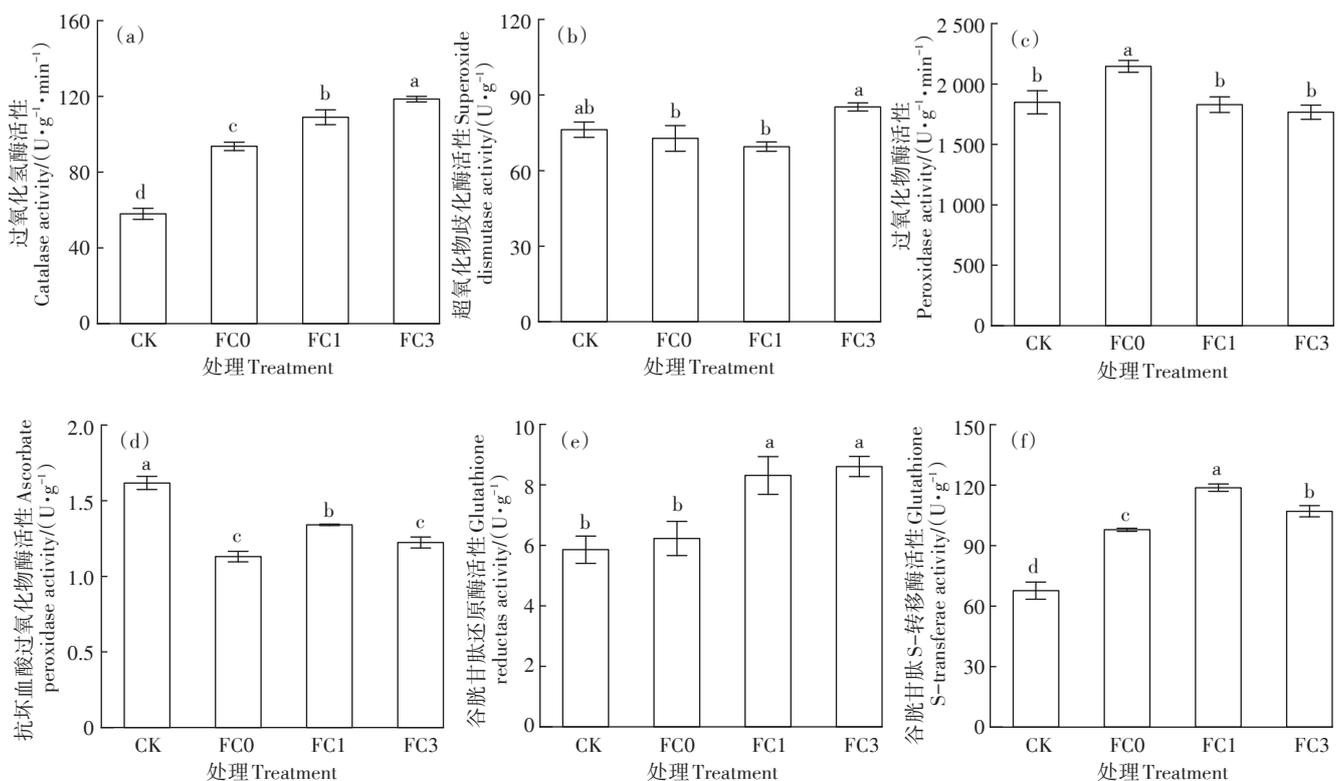


图4 生物质炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄抗氧化酶活性的影响

Figure 4 Effects of biochar on the antioxidant enzyme activities of tomato under *Fusarium oxysporum* stress

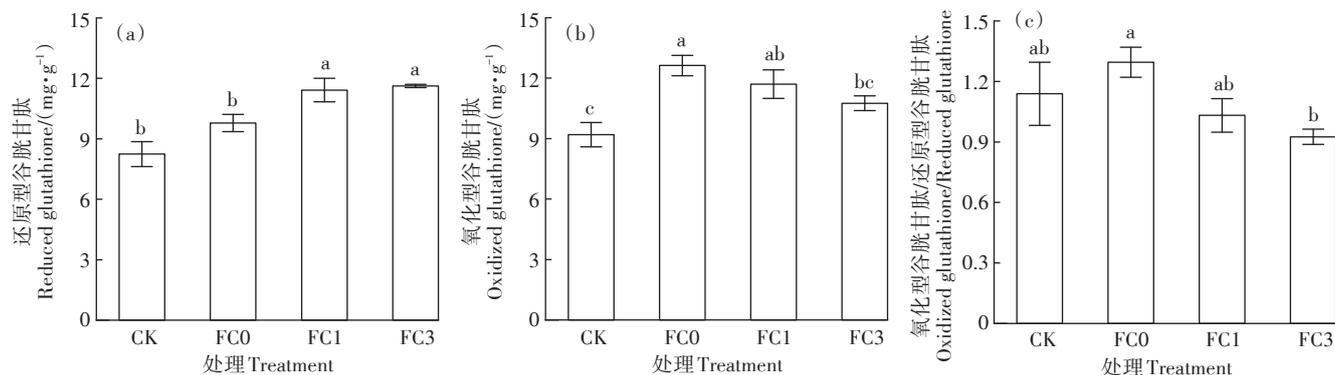


图5 生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄谷胱甘肽含量的影响

Figure 5 Effects of biochar on the contents of glutathione of tomato under *Fusarium oxysporum* stress

番茄植株遭受尖孢镰刀菌胁迫时,其体内GSSH含量较CK显著增加了37.30%(图5b)。随着生物炭的施加量的增加,GSSG含量呈现下降趋势,且施加量为3%时,GSSG含量较尖孢镰刀菌胁迫时降低了14.84%。进一步分析谷胱甘肽的GSSG/GSH值可知(图5c),在尖孢镰刀菌胁迫下,GSSG/GSH值升高,但与CK差异不显著。随着生物炭的施加,GSSG/GSH值逐渐降低,且施加量为3%时,GSSG/GSH值达到最低。以上结果表明,生物炭介导提高了番茄体内的还原力,可清除植物体内因外界胁迫而产生的过量活性氧。

2.6 生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄抗性相关基因表达的影响

为了探究生物炭介导对尖孢镰刀菌胁迫下番茄抗性的影响,进一步分析了可能参与番茄系统防御反应的通路相关基因表达情况,包括*PR1a*、*MPK2*、*NPR1*(参与水杨酸合成或信号传导)、*DEF1*、*JAZ1*、*JAZ3*(参与茉莉酸合成或信号传导)和*ACO1*、*ERF1*、*ACS*(参与乙烯合成或信号传导)。结果表明,在生物炭的作用下,水杨酸相关基因*PR1a*、*MPK2*和*NPR1*的转录出现下调(图6a~图6c),茉莉酸相关基因*DEF1*、*JAZ1*、*JAZ3*的转录却呈现上调(图6d~图6f)。同时,对乙烯信号通路中,尖孢镰刀菌和生物炭均能上调基因*ACO1*和*ACS*的表达(图6g、图6i),但基因*ERF1*却呈现下调(图6h)。

3 讨论

生物炭对多种植物病害表现出抑制作用,其作用机理可能涉及到生物炭-土壤、生物炭-植物、土壤-植物和生物炭-土壤-植物系统等多个体系的相互作用^[35]。生物炭对存在于土壤中的病原菌

有直接或间接的抑制作用,其可通过改良土壤性质、吸附细胞壁降解酶和毒性代谢物及提高土壤微生物群落多样性等作用抑制病原菌向植物的入侵,同时,生物炭可激活植物对病原菌的防御能力^[11]。本研究结果表明,生物炭可从抗氧化酶活性、非酶类抗氧化分子含量及信号分子(水杨酸、茉莉酸和乙烯)相关基因表达方面提高番茄抗性,降低尖孢镰刀菌对番茄的胁迫。

在尖孢镰刀菌胁迫下,番茄体内CAT、POD、GR和GST活性显著增加,SOD活性无显著变化,而APX活性显著降低。随着生物炭的施加,番茄体内CAT、SOD、GR、APX和GST活性较尖孢镰刀菌胁迫时显著增加,而POD活性显著降低。APX在宿主植物的病害防御过程中具有重要作用,其可通过建立结构屏障或通过产生大量活性氧和活性氮创造剧毒环境来限制感染细胞的扩散^[36]。但活性氧的过度积累会破坏细胞膜结构和功能,进而使得病原菌更容易入侵^[37]。因此,植物会产生“解毒酶”(包括CAT、SOD、GR和GST)来降低过量活性氧的危害。在本研究中,生物炭可提高尖孢镰刀菌胁迫下番茄体内“解毒酶”活性,说明生物炭能较好地缓解尖孢镰刀菌入侵造成的番茄植株过氧化现象,进而防御其入侵。

JAISSWAL等^[21]比较了接种病原菌并经生物炭处理和未接种病原菌且未添加生物炭处理组的植物基因表达模式的差异,结果表明,生物炭处理对被病原菌侵染的植物基因表达具有启动效应。启动效应是诱导性系统抗性和系统获得性抗性的一个重要组成部分,并通过依赖于茉莉酸、水杨酸、乙烯、脱落酸、活性氧和苯丙素类的通路介导^[38-39]。本研究发现,与对照处理相比,尖孢镰刀菌胁迫和生物炭的施加对番茄系统防御的启动效应主要依赖于茉莉

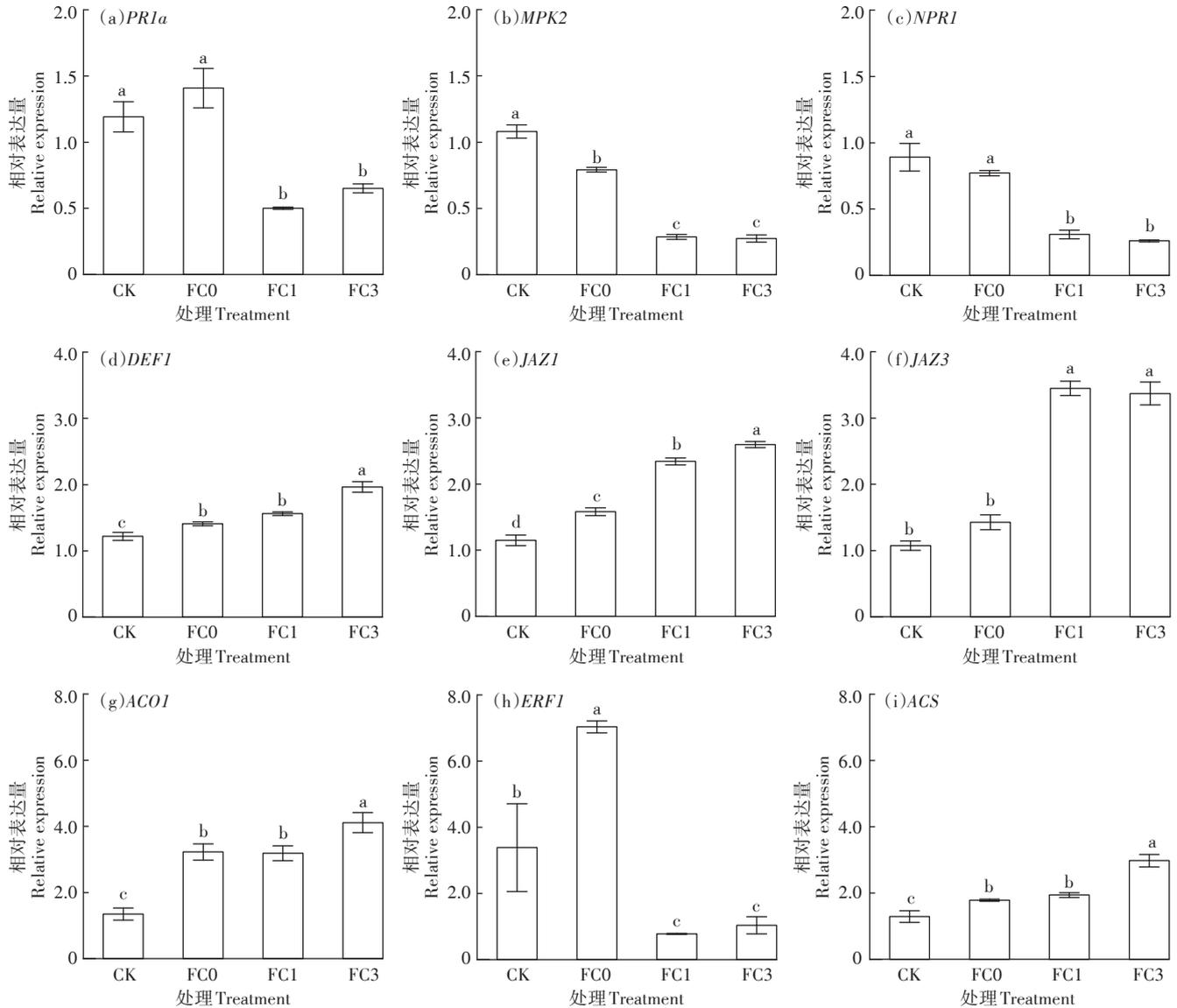


图6 生物质炭对尖孢镰刀菌胁迫下参与水杨酸、茉莉酸及乙烯生物合成和/或信号转导相关基因表达的影响

Figure 6 Effects of biochar on the transcription of genes involved in the endogenous biosynthesis and/or signaling of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene under *Fusarium oxysporum* stress

酸和乙烯通路介导。JAISWAL等^[21]通过设置番茄茉莉酸缺失突变体 *def1* 为对照的方法证实生物质炭介导下,茉莉酸通路在番茄对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis and Shoemaker)的抗性中发挥关键作用。事实上,茉莉酸作为一种信号分子,可参与各种植物的发育和防御过程^[40],在草莓中也发现了由生物质炭介导的茉莉酸参与的叶面病原菌的防御过程^[19]。

在本研究中,与水杨酸合成和信号传导相关的基因全部呈现下调,该结果与JAISWAL等^[21]学者的研究结果相同。其研究结果表明水杨酸对番茄抗病有负面影响,且水杨酸和茉莉酸相关的防御通路之间存在

在相互拮抗作用。同样,有研究指出在对死体营养型病原菌的免疫过程中,茉莉酸是必需的,而水杨酸的拮抗作用可能导致植物对病原菌更加敏感^[41]。但有报道得到不同的研究结果,MELLER等^[19]研究了生物质炭对草莓灰霉病、炭疽病和白粉病的抗性,通过分析叶片中与抗性相关的基因表达,发现草莓在接种病原菌后,生物质炭处理同时诱导了水杨酸途径相关的系统获得性抗性和茉莉酸及乙烯途径相关的诱导性系统抗性,从而增强植物的抗病性。MEHARI等^[20]的研究表明生物质炭在降低番茄灰霉病发病率的同时,显著上调与乙烯和水杨酸途径相关的抗病基因的表达,进一步证实生物质炭介导植株的抗病性与水杨酸

代谢途径有关。造成这一不同现象的原因可能与生物质炭的制备原料、宿主植物种类以及病害类型等密切相关。

4 结论

(1) 生物质炭可显著提高番茄叶片光合色素含量,同时可显著降低因尖孢镰刀菌胁迫造成的丙二醛含量增加。

(2) 生物质炭可通过增加过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽S-转移酶活性来降低过量活性氧造成的细胞损伤。同时,非酶类抗氧化分子还原型谷胱甘肽在生物质炭的作用下得到有效提高,且氧化型谷胱甘肽/还原型谷胱甘肽比值也显著降低。因此,生物质炭的介入可从不同途径增强番茄的抗氧化能力。

(3) 施加生物质炭可增强番茄系统防御尖孢镰刀菌入侵的启动效应和能力,主要依赖于茉莉酸和乙烯的通路介导。同时,发现水杨酸和茉莉酸相关的防御通路之间可能存在相互拮抗的作用。

参考文献:

- [1] 曹焯程, 刘晓漫, 郭美霞, 等. 作物土传病害的危害及防治技术[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 6-16. CAO A C, LIU X M, GUO M X, et al. Incidences of soil-borne diseases and control measures[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(2): 6-16.
- [2] 王海洋, 王春云, 耿安红, 等. 不同混配醋糟基质对设施蔬菜育苗和生长及土传病害的影响[J]. 上海蔬菜, 2017(2): 62-66. WANG H Y, WANG C Y, GENG A H, et al. Effects of different mixed substrates of vinegar residue on seedling and growth of greenhouse vegetables and soilborne diseases[J]. *Shanghai Vegetables*, 2017(2): 62-66.
- [3] LI H, ZENG E Y, YOU J. Mitigating pesticide pollution in China requires law enforcement, farmer training, and technological innovation [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(5): 963-971.
- [4] BORISADE O A, UWAIDEM Y I, SALAMI A E. Preliminary report on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Sensu lato*) from some tomato producing agroecological areas in southwestern Nigeria and susceptibility of F1-resistant tomato hybrid (F1-Lindo) to infection[J]. *Annual Research & Review in Biology*, 2017, 18(2): 1-9.
- [5] MCGOVERN R J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*[J]. *Crop Protection*, 2015, 73: 78-92.
- [6] 马艳, 王光飞. 生物质炭防控植物土传病害研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2014(6): 14-20. MA Y, WANG G F. Review of biochar utilization on soil-borne disease control[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2014(6): 14-20.
- [7] GUEDES L, DE ANDRADE C A, BETTIOL W. Biochar amendment increases soil microbial biomass and plant growth and suppresses *Fusarium wilt* in tomato[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2020, 45(1): 73-83.
- [8] ROGOVSKA N, LAIRD D, LEANDRO L, et al. Biochar effect on severity of soybean root disease caused by *Fusarium virguliforme*[J]. *Plant and Soil*, 2017, 413(1): 111-126.
- [9] 饶霜. 生物质炭对番茄青枯病抗性、土壤微生物活性及有机酸含量的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2016. RAO S. Effects of biochar on bacterial wilt resistance of tomato, soil microbial activity and organic acid[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [10] JAISWAL A K, GRABER E R, ELAD Y, et al. Biochar as a management tool for soilborne diseases affecting early stage nursery seedling production[J]. *Crop Protection*, 2019, 120: 34-42.
- [11] GRABER E R, FRENKEL O, JAISWAL A K, et al. How may biochar influence severity of diseases caused by soilborne pathogens?[J]. *Carbon Management*, 2014, 5(2): 169-183.
- [12] ELMER W H, PIGNATELLO J J. Effect of biochar amendments on mycorrhizal associations and *Fusarium crown and root rot* of asparagus in replant soils[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(8): 960-966.
- [13] 蔡昆争, 高阳, 田纪辉. 生物质炭介导植物病害抗性及其作用机理[J]. 生态学报, 2020, 40(22): 8364-8375. CAI K Z, GAO Y, TIAN J H. Effects and mechanisms of biochar-mediated plant disease resistance[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(22): 8364-8375.
- [14] JAISWAL A K, FRENKEL O, TSECHANSKY L, et al. Immobilization and deactivation of pathogenic enzymes and toxic metabolites by biochar: A possible mechanism involved in soilborne disease suppression[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 121: 59-66.
- [15] 李成江, 李大肥, 周桂凤, 等. 不同种类生物质炭对植烟土壤微生物及根茎病害发生的影响[J]. 作物学报, 2019, 45(2): 289-296. LI C J, LI D F, ZHOU G S, et al. Effects of different types of biochar on soil microorganism and rhizome diseases occurrence of flue-cured tobacco[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(2): 289-296.
- [16] ELAD Y, DAVID D R, HAREL Y M, et al. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(9): 913-921.
- [17] GRABER E R, MELLER HAREL Y, KOLTON M, et al. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media[J]. *Plant and Soil*, 2010, 337(1): 481-496.
- [18] VALLAD G E, GOODMAN R M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture[J]. *Crop Science*, 2004, 44(6): 1920-1934.
- [19] MELLER HAREL Y, ELAD Y, RAV-DAVID D, et al. Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens[J]. *Plant and Soil*, 2012, 357(1): 245-257.
- [20] MEHARI Z H, ELAD Y, RAV-DAVID D, et al. Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling[J]. *Plant and Soil*, 2015, 395: 31-44.
- [21] JAISWAL A K, ALKAN N, ELAD Y, et al. Molecular insights into biochar-mediated plant growth promotion and systemic resistance in tomato against *Fusarium crown and root rot* disease[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 13934.
- [22] COPLEY T, BAYEN S, JABAJI S. Biochar amendment modifies expression of soybean and *Rhizoctonia solani* genes leading to increased

- severity of *Rhizoctonia* foliar blight[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:221.
- [23] LI Y, PEI G, QIAO X, et al. Remediation of cadmium contaminated water and soil using vinegar residue biochar[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(16):15754–15764.
- [24] AHMAD M, OK Y S, RAJAPAKSHA A U, et al. Lead and copper immobilization in a shooting range soil using soybean stover- and pine needle-derived biochars: Chemical, microbial and spectroscopic assessments[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 301:179–186.
- [25] 尚双华. 设施土壤氮素积累条件下番茄枯萎病发生的微生态机制研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2016. SHANG S H. Micro-ecological mechanism of soil-borne tomato Fusarium wilt in the nitrogen-rich facilities cultivation soil[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.
- [26] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000. LI H S. Principles and techniques of plant physiology and biochemistry experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [27] JOGAI AH S, ABDELRAHMAN M, TRAN L P, et al. Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against Fusarium wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(4):870–882.
- [28] 李琳琳. 钙对SA诱导番茄抗灰霉病的作用机制研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2012. LI L L. The research of mechanism of calcium effect on SA-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2012.
- [29] HE M, JAHAN M S, YU W, et al. Compost amendments based on vinegar residue promote tomato growth and suppress bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. *Pathogens*, 2020, 9(3):227.
- [30] STOTZ H U, SPENCE B, WANG Y. A defensin from tomato with dual function in defense and development[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71:131–143.
- [31] MIELKE K, FORNER S, KRAMELL R, et al. Cell-specific visualization of jasmonates in wounded tomato and *Arabidopsis* leaves using jasmonate-specific antibodies[J]. *New Phytologist*, 2011, 190(4):1069–1080.
- [32] ABOUELSAAD I, RENAULT S. Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant *def-1* exposed to NaCl stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 226:136–144.
- [33] LIU D, LI J, LI Z, et al. Hydrogen sulfide inhibits ethylene-induced petiole abscission in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1):14.
- [34] JOGAI AH S, ABDELRAHMAN M, TRAN L P, et al. Characterization of rhizosphere fungi that mediate resistance in tomato against bacterial wilt disease[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(12):3829–3842.
- [35] 刘铭龙, 刘晓雨, 潘根兴. 生物质炭对植物表型及其相关基因表达影响的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(3):789–798. LIU M L, LIU X Y, PAN G X. Advance in effect of biochar on plant phenotype and gene expression[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2017, 23(3):789–798.
- [36] VAN LOON L C, REP M, PIETERSE C M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44:135–162.
- [37] 丁桔. 黄瓜自毒物质和枯萎病的致害及其调控机制研究[D]. 杭州:浙江大学, 2008. DING J. Study on pathogenesis and regulation mechanism of autotoxic substances and Fusarium wilt in cucumber [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [38] MAUCH-MANI B, BACCELLI I, LUNA E, et al. Defense priming: An adaptive part of induced resistance[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2017, 68:485–512.
- [39] BALMER A, PASTOR V, GAMIR J, et al. The ‘prime-one’: Towards a holistic approach to priming[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(7):443–452.
- [40] SANTINO A, TAURINO M, DE DOMENICO S, et al. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(7):1085–1098.
- [41] PIETERSE C M, VAN DER DOES D, ZAMILOUDIS C, et al. Hormonal modulation of plant immunity[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2012, 28:489–521.