分类号： 密级：

UDC ： 编号：



博士学位论文

**烤烟不同品种根系分泌物与黑胫病抗性关系研究**

**Researches on the relationship between root exudates of different flue-cured tobacco varieties and resistant of black shank disease (*phytophora parasitic*a var. *nicotiana*)**

**博 士 研 究 生：王戈**

**指** 导 教 **师：杨焕文** **教授 申请学位类别 ：农学博士**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **专** |  | **业：作物遗传育种** |
| **研** | **究** 方 | **向：植物种质资源评价与利用** |
| **培** | **养** 学 | **院： 农学与生物技术学院** |

**二 O 一二年五月**

TCLC: Secrecy:

UDC : No. :

**Yunnan Agricultural University Ph.D. Dissertation**

**Researches on the relationship between root exudates of different flue-cured tobacco varieties and resistant of black shank disease (*phytophora parasitic*a var. *nicotiana*)**

**Ph.D. Candidate：Wang Ge Advisor：Prof. Yang Huan Wen**

**Major：Crop Genetic and Breeding Specialty：Plant Germplasm Resources**

**Evaluation and Utilization**

**Yunnan Agricultural University May, 2012**

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成 果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发 表或撰写过的研究成果，也不包含为获得云南农业大学或其它教育机构的学位或证书 而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明 确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的声明**

本人完全了解云南农业大学有关保存、使用学位论文的管理办法及规定，即：云 南农业大学有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影 印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意云南农业大学可以用不同方式 在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研究生签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |
| 导师签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |

摘 要

本研究以4个不同烤烟品种（云85、K326、净叶黄和红花大金元）为试验材料，通过溶液培养等方法研究了不同烤烟品种根系分泌物酚酸和有机酸组分差异及其与品种抗性的相关性，通过模拟连作条件研究了根系分泌物和酚酸对幼苗生长的影响，并通过盆栽等方法研究了不同烤烟品种根际微生物数量及多样性差异。旨在丰富烤烟黑胫病抗性机制研究，明确病害发生机制，同时为今后开展生物防治和抗性栽培提供必要的理论依据。主要研究结果如下：

1. 采用反相色谱法以30%甲醇-0.2%乙酸体系和磷酸盐体系为分析条件适用于烤烟根系分泌物中酚酸和有机酸的定性和定量分析。两种方法操作简单、准确度高、重现性好。

2. 不同烤烟品种不同生育时期根系分泌物酚酸类物质共检出4种酚酸，其中以对羟基苯甲酸和丁香酸为主，可检出酚酸种类和含量因生育时期和品种抗性存在差异，抗病品种根系分泌物中较少或不检出对羟基苯甲酸，整个生育期酚酸检出总量与病情指数显著正相关。人工接种黑胫病菌促进了酚酸分泌量，各品种根系分泌物对羟基苯甲酸和丁香酸含量均呈上升趋势，且感病品种分泌量大于抗病品种，不同品种对羟基苯甲酸、丁香酸和酚酸总量与病情指数显著或极显著正相关。添加不同酚酸对黑胫病菌落生长和孢子囊产生量具有促进或抑制作用，作用方式和强度取决于作用浓度，各浓度下阿魏酸均抑制了孢子囊的产生，香草酸、香豆酸和阿魏酸在高浓度时完全抑制，相同浓度下羟基苯甲酸、丁香酸和香豆酸促进作用较大，香草酸和阿魏酸抑制作用较大；添加不同酚酸基本上促进了游动孢子释放，其作用强度随浓度升高而增大，当作用浓度大于

0.05g/L和0.10g/L促进作用减小。

3. 不同烤烟品种不同生育时期根系分泌物有机酸类物质共检出7种，其中以草酸、乳酸和马来酸为主，可检出有机酸种类和含量因生育时期和品种抗性存在差异，抗病品种主要检出马来酸， 而感病品种主要检出乳酸，感病品种有机酸检出总量大于抗病品种。人工接种黑胫病菌促进了有机酸的分泌，且分泌量随接种时间延长而增加，除抗病品种酒石酸检出量大于感病品种外其余有机酸检出量均为感病品种大于抗病品种，接种后整个时期感病品种有机酸检出总量均大于抗病品种。添加有机酸基本抑制了黑胫病菌菌落生长，且抑制作用随浓度增加而增大，添加苹果酸、乳酸和富马酸对孢子囊产生和游动孢子释放具有促进或抑制作用，作用方式和强度取决于作用浓度， 草酸、酒石酸和丁二酸在各作用浓度下均表现为抑制孢子囊产生和游动孢子释放，且随作用浓度加大抑制加强，乙酸基本完全抑制孢子囊产生和游动孢子释放。

4. 添加不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌生长的影响存在差异。添加抗病品种根系分泌物 一定程度上抑制了黑胫病菌丝生长，而感病品种根系分泌物在各个生育期均促进了菌丝生长；除 旺长期外，添加感病品种根系分泌物均明显促进了孢子囊的产生和游动孢子的释放，抗病品种根 系分泌物对孢子囊产生量促进作用较小，且在旺长期表现出对游动孢子释放的抑制作用。

5. 在不同浓度根系分泌物作用下，自身种子萌发和幼苗生长明显受到抑制，幼苗叶绿素总量 和根系活力下降，叶片和根系相对电导率增大，叶片和根际pH值降低，根系分泌物对烤烟幼苗的不利影响随作用浓度的增加而增大；随根系分泌物作用增加，除幼苗叶片POD活性保持较高活

性呈一直上升趋势外，其它SOD、POD和CAT活性均呈先增加后降低趋势，幼苗叶片和根系MDA

生成量增加。

6. 添加外源酚酸抑制了烤烟种子发芽率和幼苗株高，酚酸对地上部和地下部鲜重的影响因酚酸种类及作用浓度差异表现为抑制或促进；添加酚酸基本抑制了叶绿素总量（SPAD）和根系活力， 并提高和促进了叶片pH值、根系相对电导率和根系丙二醛含量；添加酚酸对根系POD活性的影响均表现为“低促高抑”，香草酸和丁香酸处理根系SOD活性分别呈持续上升和下降趋势，其余处理表现为先增后减趋势，香草酸处理根系CAT活性低浓度变化不大，之后迅速升高且保持较高活性，其他酚酸处理CAT活性呈先增后减趋势。

7. 不同烤烟品种根际细菌数量随生育进程先增加后减少，真菌刚好相反，且细菌和真菌趋势拐点均出现在现蕾期，放线菌变化不大；团棵期和旺长期细菌和放线菌数量与品种抗性正相关，真菌数量与品种抗性呈负相关。人工接种黑胫病菌条件下，抗病品种根际环境刺激了细菌生长，而相对抑制感病品种细菌生长，不同品种均促进了根际真菌和放线菌生长，且真菌数量与品种抗性负相关。Biolog功能多样性分析表明，不同品种碳源总体利用能力及功能多样性存在一定差异，团棵期和旺长期抗病品种AWCD值、Shannon指数和Mclntosh指数大于感病品种；接种降低了感病品种碳源总体利用能力及功能多样性。

**关键词：**烤烟；品种；黑胫病；微生物；根系分泌物

**Abstract**

Four different varieties of flue-cured tobacco (*Nicotiana tobacum* L.) including Yun85(high resistance, HR), K326(middle resistance, MR), Jingyehuang(middle susceptibility, MS) and Honghuadajingyuan(high susceptibility, HS) were selected as experiment materials. Composition difference of phenolic acids and organic acids of root exudates of different flue-cured tobacco varieties and correlation between the difference and varieties resistance were studied with solution culture, difference of rhizosphere microorganism in difference varieties were studied with pot culture, and effect of root exudates and phenolic acids on seedling growth were studied with imitating condition of continuous cropping. And main results were as follows:

1. Analysis condition of 30% methanol-0.2% acetic acid system and phosphate system with reversed phase chromatography were suitable for qualitative and quantitative detection of phenolic acids and organic acids of root exudates. These methods were convenient, high accuracy and good reproducibility.

2. Four phenolic acids were detected in different growth stage of different flue-cured tobacco varieties, and P-hydrobenzoic and syringic acid were main compounds. And there were difference in species and content for growth stage and vareties resistance. P-hydrobenzoic acid was less or none detected in root exudates of resistance varieties and there was significant positive correlation between total phenolic acids during whole stage and disease index. In addition, secretions of phenolic acids were promoted after inoculation, and content of P-hydrobenzoic and syringic acid showed an increasing tendency in root exudates of difference varieties. Moreover, secretion of susceptible varieties was greater than resistant varieties, and there was significant or very significant positive correlation between P-hydrobenzoic, syringic acid and total phenolic acids and disease index. However, adding difference phenolic acids had promotive or inhibitory effect on colony growth and sporangium yield of *phytophora parasitica* var. *nicotiana*, and mode of action and strength depend on action concentration. And sporangium yield were all restrained by ferulic acid in each concentration and were completely restrained by vanillic acid, coumaric acid and ferulic acid in high -concentration. Promotive effect of P-hydrobenzoic, syringic acid and coumaric acid and inhibitory effect of vanillic and ferulic acid were greatly in same concentration. Zoopore release was mainly promoted by adding different phenolic acids, and the higher concentration, the action strength increase.

3. Seven organic acids were detected in different growth stage of different flue-cured tobacco varieties, and oxalic, lactic and maleic acid were main compounds. And there were difference in species and content for growth stage and vareties resistance. Maleic acid of resistance varieties and lactic acid of susceptible varieties was mainly detected, and total organic acids of susceptible varieties were bigger than resistance varieties. In addition, secretions of organic acids were promoted after inoculation and the inoculation time extension, the secretion increase. Detectable amount of organic acids of susceptible varieties were bgger than resistance varieties except tartaric acid. Total organic

Acids of susceptible varieties were greater than resistance varieties. Colony growths of phytophora parasitica var. nicotiana were restrained by adding organic acids, and the higher concentration, the inhibitory increase. Sporangium yield and zoopore release were promoted or restained by adding maleic acid, lactic and fumaric acid, and mode and strength of action depend on action concentration. While sporangium yield and zoopore release were restrained by oxalic acid, tartaric and succinic acid in each concentration, and were completed restrained by acetic acid.

4. Mycelium growth of phytophora parasitica var. nicotiana were inhibited as well as mycelium growth and biomass liveweight by resistant cultivar root exudates, but mycelium growth and biomass liveweight were stimulated by susceptible cultivar root exudates in all stage. Meanwhile, except rapid growing stage, sporangium yield and release zoospore rate of other stage were stimulated by susceptible cultivar root exudates, but sporangium yield were relatively small stimulated by resistant cultivar root exudates and release zoospore rate were inhibited in rapid growing stage. So the whole results show that different resistant cultivar root exudates are related to cultivar resistance. And stimulation of susceptible and inhibition of resistant cultivars focus on rapid growing stage and flower budding stage.

5. Seed germination and seeding growth was obvious inhibited, chlorophyll content and root activity reduced, relative conductivity of leaves and root increased and pH value of root and rhizosphere decreased. And the negative influence was enhanced with concentration increasing. In addition, SOD, POD and CAT activity all presented trend of first increased and then decreased except keeping hot activity and presenting increase trend all the time in leaves POD activity. Meanwhile, MDA content of leaves and root was increased.

6. Germination percentage and seeding height were restrained by phenolic acid. And impact of phenolic acid on above-ground FW and under-ground FW were difference for species and concentration of phenolic acid. At the same time, total chlorophyll and root activity were inhibited and pH, relative conductivity of root and MDA content were increased by treatment of phenolic acid. The effect of treatment on enzyme activity was difference. POD activity of root all presented increase at low concentration and then decrease at high concentration in different treatment of phenolic acid. And SOD activity of treatment of vanilic acid and syringic acid respectively presented continue rise and down trend, other treatment all presented trend of fist increase and then decrease. CAT activity were changed little at low concentration and then rapid promoted an d maintained high activity, and CAT activity of others presented trend of fist increase and then decrease.

7. Bacterial numbers of different cultivars are first increased and then decreased with the growing process, while fungal numbers are reverse. Meanwhile, the trend inflexions of bacteria and fungi are all happened at the flower budding stage, and that of actinomyces is relatively stable. There are positive correlations between rhizosphere microorganism counts of bacteria and actinomyces and

Cultivar resistance, and a negative correlation between fungal number and cultivar resistance at the rosette stage and the rapid growing stage. In addition, growth of bacteria is stimulated in rhizosphere environment of the resistance cultivars, while the growth is relatively restrained in the susceptible cultivars. And growths of fungi and actinomyces are promoted in all experiment materials. The analysis results of the Biolog method show that there are some differences in total utilization ability of carbon source and functional diversity in different growth stages of different cultivars, and the average well color development (AWCD), Shannon index and Mclntosh index of the resistance cultivars are more than that of the susceptible cultivars in different growth stages of different cultivars. At the same time, AWCD values and functional diversity of the susceptible cultivars are decreased after inoculating *phytophora parasitica* var. *nicotiana*.

**Key words:** Flue-cured tobacco; Varieties; *Phytophora parasitica* var. *nicotiana*; Microorganism; Root exudates

目 录

[摘 要](#_Toc68612044) 3

**[Abstract](#_Toc68612045)** 3

[第一章 文献综述](#_Toc68612046) 9

[1.1 植物根系分泌物研究进展](#_Toc68612047) 9

[1.1.1 根系分泌物的概念、种类组成和产Th机制](#_Toc68612048) 9

[1.1.2 根系分泌物作用](#_Toc68612049) 10

[1.1.3 根系分泌物的研究方法](#_Toc68612050) 13

[1.2 烟草黑胫病研究进展](#_Toc68612051) 13

[1.2.1 基本概况](#_Toc68612052) 13

[1.2.2 烟草黑胫病菌形态特征](#_Toc68612053) 13

[1.2.3 烟草黑胫病菌Th理特征](#_Toc68612054) 14

[1.2.4 烟草黑胫病的症状及发病规律](#_Toc68612055) 14

[1.2.5 烟草黑胫病抗性机制研究](#_Toc68612056) 14

[1.3 研究目的与意义](#_Toc68612057) 15

[第二章 不同烤烟品种根系分泌物酚酸组分差异及其对黑胫病菌](#_Toc68612058) 15

[2.1 材料与方法](#_Toc68612059) 15

[2.1.1 供试材料](#_Toc68612060) 15

[2.1.2 仪器与试剂](#_Toc68612061) 16

[2.1.3 材料培养及根系分泌物收集](#_Toc68612062) 16

[2.1.4 方法](#_Toc68612063) 17

[2.1.5 数据处理和统计方法](#_Toc68612064) 17

[2.2 结果与分析](#_Toc68612065) 17

[2.2.1 色谱条件选择及优化](#_Toc68612066) 17

[2.2.2 不同烤烟品种根系分泌物酚酸种类和数量差异](#_Toc68612067) 19

[2.2.3 接种黑胫病菌后不同烤烟品种根系分泌物酚酸种类和数量差异](#_Toc68612068) 24

[2.2.4 不同酚酸对黑胫病菌Th长的影响](#_Toc68612069) 27

[2.3 讨论与小结](#_Toc68612070) 33

[2.3.1 高效液相色谱法测定根系分泌物中酚酸的条件优化](#_Toc68612071) 33

[2.3.2 不同烤烟品种根系分泌物中酚酸种类和数量差异及其与品种抗性的关系](#_Toc68612072) 33

[2.3.3 不同酚酸对黑胫病菌Th长的影响](#_Toc68612073) 33

[第三章 不同烤烟品种根系分泌物有机酸组分差异及其对黑胫病菌Th长的影响](#_Toc68612074) 33

[3.1 材料与方法](#_Toc68612075) 33

[3.1.1 供试材料](#_Toc68612076) 33

[3.1.2 仪器与试剂](#_Toc68612077) 33

[3.1.3 材料培养及根系分泌物收集](#_Toc68612078) 34

[3.1.4 方法](#_Toc68612079) 34

[3.1.5 数据处理和统计方法](#_Toc68612080) 34

[3.2 结果与分析](#_Toc68612081) 34

[3.2.1 色谱条件选择及优化](#_Toc68612082) 34

[3.2.2 不同烤烟品种根系分泌有机酸种类和含量差异](#_Toc68612083) 37

[3.2.3 接种黑胫病菌后不同烤烟品种根系分泌物有机酸种类和含量差异](#_Toc68612084) 39

[3.2.2 不同有机酸对黑胫病菌Th长的影响](#_Toc68612085) 41

[3.3 讨论与小结](#_Toc68612086) 49

[3.3.1 高效液相色谱法测定根系分泌物中有机酸的条件优化](#_Toc68612087) 49

[3.3.2 不同烤烟品种根系分泌物中有机酸种类和数量差异及其与品种抗性的关系](#_Toc68612088) 50

[3.3.3 不同有机酸对黑胫病菌Th长的影响](#_Toc68612089) 50

[第四章 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌Th长的影响](#_Toc68612090) 50

[4.1 材料与方法](#_Toc68612091) 50

[4.1.1 供试材料](#_Toc68612092) 50

[4.1.2 材料培养及根系分泌物收集](#_Toc68612093) 50

[4.1.3 试验方法](#_Toc68612094) 50

[4.1.4 数据处理和统计方法](#_Toc68612095) 50

[4.2 结果分析](#_Toc68612096) 51

[4.2.1 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌Th长的影响](#_Toc68612097) 51

[4.2.2 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌孢子囊产Th量的影响](#_Toc68612098) 55

[4.2.3 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌游动孢子释放率的影响](#_Toc68612099) 55

[4.3 讨论与小结](#_Toc68612100) 56

[第五章 烤烟根系分泌物对自身幼苗Th长的影响](#_Toc68612101) 56

[5.1 材料与方法](#_Toc68612102) 56

[5.1.1 供试材料](#_Toc68612103) 56

[5.1.2 根系分泌物收集](#_Toc68612104) 56

[5.1.3 试验方法](#_Toc68612105) 56

[5.1.4 数据处理和统计方法](#_Toc68612106) 57

[5.2 结果分析](#_Toc68612107) 57

[5.2.1 根系分泌物对烤烟种子发芽率和幼苗Th长的影响](#_Toc68612108) 57

[5.2.2 根系分泌物对烤烟幼苗Th理指标的影响](#_Toc68612109) 58

[5.2.3 根系分泌物对烤烟幼苗保护酶活性和膜脂过氧化物的影响](#_Toc68612110) 61

[5.3 讨论与小结](#_Toc68612111) 63

[第六章 不同酚酸对烤烟幼苗Th长的影响](#_Toc68612112) 63

[6.1 材料与方法](#_Toc68612113) 63

[6.1.1 供试材料](#_Toc68612114) 63

[6.1.2 试验设计及指标测定](#_Toc68612115) 63

[6.1.3 数据处理和统计方法](#_Toc68612116) 63

[6.2 结果与分析](#_Toc68612117) 64

[6.2.1 不同酚酸对烤烟幼苗Th长的影响](#_Toc68612118) 64

[6.2.2 不同酚酸对烤烟幼苗Th理指标的影响](#_Toc68612119) 67

[6.2.3 不同酚酸对烤烟幼苗根系防御酶活性的影响](#_Toc68612120) 70

[6.3 讨论与小结](#_Toc68612121) 73

[第七章 不同烤烟品种根际微Th物数量及多样性差异](#_Toc68612122) 73

[7.1 材料方法](#_Toc68612123) 73

[7.1.1 供试材料](#_Toc68612124) 73

[7.1.2 植株培养及试验设计](#_Toc68612125) 73

[7.1.3 试验方法](#_Toc68612126) 73

[7.1.4 数据处理和统计方法](#_Toc68612127) 75

[7.2 结果分析](#_Toc68612128) 76

[7.2.1 不同品种烤烟不同Th育时期根际可培养微Th物变化](#_Toc68612129) 76

[7.2.2 不同品种烤烟接种后根际可培养微Th物差异](#_Toc68612130) 81

[7.3 讨论与小结](#_Toc68612131) 83

[第八章 结论与展望](#_Toc68612132) 83

[8.1 主要结论](#_Toc68612133) 83

[8.1.1 利用反相色谱法以30%甲醇-0.2%乙酸体系和磷酸盐体系为分析条件可以同时进行烤烟根系分泌物中酚酸和有机酸组分定性和定量研究，此法操作简单、准确度高、重现性好。](#_Toc68612134) 83

[8.1.2 不同烤烟品种根系分泌物主要检出对羟基苯甲酸和丁香酸，抗病品种对羟基苯甲酸较少分泌 或不分泌，整个生育期酚酸分泌总量与病情指数显著正相关。人工接种黑胫病菌后酚酸分泌量加大，且感病品种分泌量大于抗病品种，对羟基苯甲酸、丁香酸和酚酸总量与病情指数正相关。](#_Toc68612135) 83

[8.1.3 不同烤烟品种根系分泌物有机酸主要检出草酸、乳酸和马来酸，抗病品种主要分泌马来酸， 而感病品种主要分泌乳酸，感病品种有机酸分泌总量大于抗病品种；人工接种黑胫病菌促进了有机酸的分泌，接种后整个时期感病品种有机酸分泌总量均大于抗病品种。](#_Toc68612136) 83

[8.1.4 添加有机酸和酚酸纯品对黑胫病菌生长及孢子囊产生和游动孢子释放的影响亦存在差异，其 作用方式及强度取决于作用浓度大小。](#_Toc68612137) 83

[8.1.5 添加不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌生长及孢子囊产生和游动孢子释放的影响存在差异，且与品种抗性密切相关，抗病品种对黑胫病菌生长繁殖的抑制和感病品种的促进作用最大的时期集中在旺长期或现蕾期。](#_Toc68612138) 83

[8.1.6 证实烤烟根系分泌物具有化感自毒作用，自毒物质的释放和积累是造成烤烟连作障碍的重要 因素。根系分泌物对幼苗生长及防御酶活性均有不同不利影响。添加外源酚酸对烤烟生长及代谢 产生重要影响，且证实酚类物质具有化感自毒作用，酚酸物质积累是造成烤烟连作障碍的重要原 因。](#_Toc68612139) 83

[8.1.7 不同烤烟品种根际可培养微生物数量存在差异且与品种抗性密切相关，烤烟生长前期（团棵 期和旺长期）品种抗性差异较明显。人工接种黑胫病后抗病品种根际细菌数量增加，而感病品种 细菌数量减少，真菌数量增加且与品种抗性负相关，放线菌数量增加。不同品种碳源总体利用能力及功能多样性存在一定差异，团棵期和旺长期抗病品种碳源总体利用能力及功能多样性大于感病品种，接种降低了感病品种碳源总体利用能力及功能多样性。](#_Toc68612140) 83

[8.2 主要创新点](#_Toc68612141) 83

[8.2.1 从根系分泌物角度研究不同烤烟品种根系分泌物中酚酸和有机酸种类和含量差异及其与品种抗性的相关性；](#_Toc68612142) 83

[8.2.2 设计并优化了烤烟根系分泌物提取方法及定性和定量检测条件；](#_Toc68612143) 83

[8.2.3 较系统研究了根系分泌物及其有机酸和酚酸组分对黑胫病菌生长和繁殖的影响。](#_Toc68612144) 83

[8.3 展望](#_Toc68612145) 83

[8.3.1 目前常用的收集方法为溶液培养法、土培法以及原位收集等较先进的收集方法，各种方法各有优缺。一般认为溶液法操作简单，但与植株生长土壤环境差别较大，根系分泌物组分相对较少， 而土培法很难避免根际微生物的影响。所以单独采取一种收集方法确定的根系分泌物组分可能跟真实根系分泌物组分存在较大差异，那么怎样最大程度确定出烤烟根系分泌物组分的种类和含量？怎样最大程度剔除由于不同收集方法导致的分析鉴定结果的差异？这些都需要进一步的研究。](#_Toc68612146) 83

[8.3.2 本研究得出不同烤烟品种根系分泌物中酚酸和有机酸种类和含量存在差异，且这种差异与品种抗病性存在一定联系，那么这种关联性能否在大田中试验中体现出来还需要我们进一步验证。本研究根系分泌物及其酚酸和有机酸对黑胫病菌生长的影响存在差异，那么在正常植株生长过程中通过添加某些对黑胫病菌具有抑制作用的物质能否降低黑胫病发病率，也同样值得进一步研究。](#_Toc68612147) 83

[8.3.3 通过研究发现，根系分泌物组分在土壤中的释放和积累是造成烤烟连作障碍的一个重要因素，但自毒物质在土壤中是以什么形式积累，这种积累对连作年限增加变化趋势如何，烤烟前茬作物根系分泌物对烤烟生长有何影响，不同的前茬作物对烤烟连作障碍发生程度是否存在差异，需要我们进一步对烤烟根系分泌物与连作障碍发生关系进行系统研究。](#_Toc68612148) 84

[8.3.4 从根系分泌物角度研究烤烟生长发育及相关生理生化研究较少，烤烟生长发育过程与根系分 泌物分泌特性有何关系，根系分泌物与烤烟根际环境、养分吸收等有何联系等等，因此有必要对烤烟根系分泌物及其相关因素进行较系统的研究。](#_Toc68612149) 84

[参考文献](#_Toc68612150) 84

表格目录

表1 根系分泌物种类 9

表2 供试品种抗病性评价 15

表3 Hogland完全营养液营养液 16

表4 Amon微量元素营养液 16

表5 各种酚酸的回归分析和检出限 18

表6 不同品种不同Th育期根系分泌物酚酸种类和数量差异(μg/mL) 19

表7 不同烤烟品种根系分泌酚酸总量随Th育期的变化(μg/mL) 23

表8 不同烤烟品种不同Th育时期酚酸总量与病情指数的相关性比较 24

表9 接种黑胫病后不同烤烟品种根系分泌物中酚酸含量差异(µg/mL) 24

表10 接种黑胫病后不同烤烟品种根系分泌物中酚酸总量差异(µg/mL) 26

表11 接种后不同烤烟品种根系分泌物中酚酸浓度与病情指数的相关性比较 27

表12 不同酚酸对黑胫病菌菌落Th长的影响(cm) 27

表13 各种有机酸回归分析和检出限 36

表14 不同品种不同Th育期根系分泌物中有机酸种类和含量差异(μg/mL) 37

表15 不同品种根系分泌有机酸总量随Th育期的变化(μg/mL) 38

表16 不同品种不同Th育时期根系分泌物种有机酸总量相关性比较 39

表17 接种后不同品种分泌有机酸种类和含量差异(μg/mL) 39

表18 接种黑胫病后不同品种根系分泌物中有机酸总量差异(μg/mL) 40

表19 接种后不同品种根系分泌物中有机酸含量与病情指数的相关性比较 41

表20 不同有机酸对黑胫病菌菌落直径的影响(cm) 42

表21 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌Th长的影响(cm) 51

表22 根系分泌物对烤烟自身种子萌发和幼苗Th长的影响 57

表23 不同酚酸对烤烟幼苗Th长的影响 64

表24 牛肉膏蛋白胨培养基（细菌） 74

表25 马丁氏培养基（真菌） 74

表26 改良高氏1号培养基（放线菌） 75

表27 不同烤烟品种根际微Th物AWCD值和多样性指数的差异(72 h) 78

表28 接种后第8 d不同品种根际微Th物AWCD值和多样性指数的差异(72 h) 82

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| RE | Root exudates | 根系分泌物 |
| HR | High resistance | 高抗品种 （云 85） |
| MR | Middle resistance | 中抗品种（K326） |
| MS | Middle susceptibility | 中感品种（净叶黄） |
| HS | High susceptibility | 高感品种（红花大金元） |
| Met | Methionine | 甲硫氨酸 |
| NBT | Nitroblue tetrazolium | 氮蓝四唑 |
| PBS | Phosphate buffer solution | 磷酸缓冲液 |
| TBA | Thiobarbituric acid | 硫代巴比妥酸 |
| CAT | Catalase | 过氧化氢酶 |
| SOD | Superoxide dismutase | 超氧化物歧化酶 |
| POD | Peroxidase | 过氧化物酶 |
| PPO | Polyphenol oxidase | 多酚氧化酶 |
| PAL | Phenylalanine ammonialyase | 苯丙氨酸解氨酶 |
| MDA | Malonaldehyde | 丙二醛 |
| PDA | Potato dextrose agar | 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 |
| OA | Oat medium | 燕麦培养基 |

# 第一章 文献综述

## 1.1 植物根系分泌物研究进展

### 1.1.1 根系分泌物的概念、种类组成和产Th机制

#### 1.1.1.1 概念

根系分泌物（Root exudate）是植物在生长过程中通过根的不同部位向生长基质中释放的多种物质的组合，是一种植物长期适应外界环境而形成的一种适应机制。广义的根分泌物包括1）渗出物，即细胞中主动扩散出来的一类低分子量的化合物；2）分泌物，即细胞在代谢过程中释放出来的物质；3）粘胶质，包括根冠细胞、未形成次生壁的表皮细胞和根毛分泌的粘胶状物质；4）裂解物质，即成熟根段表皮细胞的分解产物、脱落的根冠细胞、根毛和细胞碎片等；狭义的概念指 根细胞的代谢产物(Rovira, 1956)。

#### 1.1.1.2 根系分泌物的种类和组成

根系分泌物种类和数量繁多，影响因素复杂，除受植物种类、生长环境、营养状况、气候因子、生长阶段等因素的影响（刘军等，2007），还受试验条件、方法的制约，很难收集到完整的根系分泌物。目前已有200多种物质被鉴定为根系分泌物，根系分泌物分为大分子有机物、小分子有机物和细胞或组织脱落物及溶解产物三大类（王树起等，2007；张福锁，1992）。

根系分泌物中的低分子物质种类繁多，包括低分子量糖类、有机酸、氨基酸和酚类化合物。低分子量糖以葡萄糖和果糖较普遍；除蛋白类氨基酸外，还有非蛋白类植物高铁载体（Higuchi等, 1994）；到目前为止至少已有10种低分子量糖和20种氨基酸在根分泌物中被发现。大部分有机酸都是三羧酸循环的低分子中间体，它们可以通过改变pH值、氧化还原条件或通过螯合作用和还原作用来增加某些养分的溶解度和移动性，进而促进植物对这些养分的吸收，如有排根的植物可以分泌柠檬酸、木豆分泌的番石榴酸、苹果酸、苯甲酸、肉桂酸、脂肪酸等等（马敬，1994），它们可以活化矿质养分，其中苯甲酸、肉桂酸和某些酚类物质能作为他感物质（Allelochemicals）对邻近生物产生克制作用（吴辉等，1992；曹亨云，1994），而脂肪酸在豆科中出现较多，对固氮微生物的活力影响很大。

高分子粘胶物质包括：多糖、酚类化合物、多聚半乳糖醛酸等（王树起等，2007）。它们主要从根冠和外皮层细胞中分泌出来，包裹在根尖细胞表面以防止幼嫩细胞脱水，同时也起润滑的作用，加强根系与土壤不规则表面的联结，从而促进了根表面-胶粘层-土壤颗粒之间的水分运移和离子交换；通过填充某些空隙，降低了养分迁移过程的曲折度；完善了根-土水分体系，有利于植物根系对水分和养分的吸收，这对干旱、半干旱地区土壤供水供肥能力有重要作用。当表层土壤水势低于萎蔫点的水势时，植物根系仍然可以从这一层土壤中吸收大量锌的原因就是由于根系分泌的胶粘物质降低了养分迁移的曲折度，从而促进了锌从土壤颗粒经胶粘层向其原生质膜吸附部

位的运输。另外，在酸性土壤上，胶粘物质能够吸附固定一些重金属元素，如Fe、Al、Mn、Cd

等（张福锁，1992；刘文菊等，1999），以减轻它们对植物的毒害作用（李花粉等，1998）。

另外，根系分泌物还包含质子和无机离子，比如H+、NH4、Na、K、Ca、Mg 、NO、Cl-、SO4、HPO4等，它们对根际土壤的pH值及氧化还原电位有一定的调节作用，进而可以影响营养元素在根际的有效性（廖利平等，2001）。一些维生素类物质和酶也是根系分泌物的成分之一，West发现了亚麻根系分泌物中有生物素和维生素。Knudson发现根系分泌物中转化酶的存在，人们又相续发现了磷酸酶、蛋白酶、淀粉酶、RNA酶和DNA酶等，它们对修饰土壤以及提高植物抗逆能力有一定的作用（齐泽民等，2005）。

2- 2–

+ + + 2+ 2+ -

细胞或组织脱落物及溶解产物包括根冠细胞和根毛细胞内含物，它们是微生物的能源物质， 通过影响根际微生物的种类、数量和活动而对土壤中营养元素起到间接的活化作用（朱丽霞等，2003）。

表1 根系分泌物种类

Table 1 Types of root exudates

| 类别 | 根系分泌物种类 |
| --- | --- |
| 糖类 | 葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、棉子糖、核糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、寡糖、甘露糖、  半乳糖、蜜三糖 |
| 氨基酸 | 亮氨酸、异亮氨酸、r-氨基丁酸、谷氨酰氨、α-丙氨酸、天冬酰氨、色氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、胱氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、赖氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、精氨酸、  β-丙氨酸 |
| 有机酸 | 酒石酸、草酸、苹果酸、柠檬酸、乌头酸、乙酸、丙酮酸、丁酸、戊酸、琥珀酸、延胡索酸、丙  二酸、乙醇酸、乙醛酸、羟基乙酸、羟基丁酸 |
| 脂肪酸 | 棕榈酸、油酸、花生酸、亚麻酸、花生四烯酸、胆固醇、豆甾醇、麦角甾醇 |
| 生长因子 | 生物素、硫胺素、尼克酸、泛酸、胆碱、肌醇、吡丁醇、α-氨基苯甲酸 |
| 胞外酶类 | 转化酶、蛋白酶、淀粉酶、RNA 酶、DNA 酶、吲哚乙酸酶、蔗糖酶、脲酶 |
| 其他 | 核苷、黄酮类化合物、植物生长素、生长调控物、皂角苷、糖苷、相克物质、植物抗毒素、铁螯  合物质 |

#### 1.1.1.3 根系分泌物的影响因素

##### 1.1.1.3.1 植物种类及发育阶段

根系分泌物的种类和数量与植物生态型和基因型差异有关。豆科植物与其他植物相比，豆科植物根系分泌物中的脂肪酸较常见（齐泽民等，2005）。水稻根系分泌物主要成分为酒石酸等，而小麦根系分泌物主要成分为草酸、乙酸和丙酸等(Cieslinski, 1998)。大麦和小麦在相同的栽培条件下根系分泌物中糖含量有很大的差异，大麦根系分泌的半乳糖比小麦高3倍，小麦根系分泌的

鼠李糖确是大麦的2倍多。喜钙植物分泌的二羧酸和三羧酸的量明显高于喜酸植物，其中柠檬酸

的分泌量高出喜酸植物一个数量级，喜钙植物二羧酸分泌量是喜酸植物的4-5倍，而喜酸植物所分泌的乳酸则是喜钙植物的3倍多（Tyler等, 1995）。烟草属植物与玉米相比，根系分泌物的C/N、

糖、氨基酸比率存在很大差异。此外，即使是同一种类的植物，在不同的发育阶段其分泌物也有 所不同(Perez, 1991)，如培养30d的玉米根分泌物对固氮菌产生的正效应比培养7d的玉米根分泌物产生的正效应明显的多。

##### 1.1.1.3.2 环境因素

植物根系分泌物是植物自身的反应特征，环境因素对分泌物的种类和数量影响较大。光照、 温度、营养状况及根际微生物都影响着根系的分泌的种类和数量，特别是当植物处于环境胁迫下根系分泌物种类和数量会发生较大变化，严重时将导致植物生长停滞或死亡（高子勤等，1998）。

光照是植物进行光合作用的关键因子，光照时间和强度的变化影响光合作用效果及光合产物 的定位。作为光合产物的根系分泌物，直接的受到光照的时间和强度影响。同时，光照强度还可 以影响植物的生理活性，进而新影响根系的分泌。在黑暗条件下大豆根尖分泌的异黄酮类物质的 数量大幅度降低(Graham, 1991)。另有许多研究表明植物在适宜生长的温度范围内，多数根系分泌作用随温度升高而加强（沈宏等，1999）。

土壤温度的高低是决定植物根系生理状况的重要因子，过高或过低的土壤温度会造成逆境胁 迫，对根系生理代谢造成伤害，进而影响根系分泌物种类和数量。草莓根系分泌物中氨基酸的含 量在5～10℃的条件下比在20～30℃时高的多(Yang等, 2000)。同时，当土壤水分过低时将影响植物体内蛋白质的合成，影响核酸代谢，导致酶活性降低，根系将分泌较多的有机酸、氨基酸， 酚酸类物质也明显上升（沈宏等，1999）。无菌培养条件下，豌豆、大豆、小麦与番茄在砂土或砂壤土中生长，使土壤水分达萎蔫点后再灌水，结果根系释放的氨基酸较正常条件下高。

植物在缺乏营养条件下根系分泌物与正常条件下根系分泌物无论是在种类和数量上都有明显不同，这是植物对养分胁迫下的一种适应机制（张福锁，1997）。营养元素的丰缺影响植物的生长发育，甚至改变物质的代谢途径，而影响根系分泌物的组成和含量。植物在缺磷条件下，苜蓿根系分泌的有机酸有柠檬酸、苹果酸和丁二酸，其中柠檬酸的分泌量是正常供磷时的2倍（Lipton等, 1998）；油菜分泌大量苹果酸和柠檬酸（Hoffland 等, 1989）；我国南方酸性土壤上的肥田萝卜酒石酸的分泌量比不缺磷条件下增加近10倍（马敬，1994）；石灰性土壤上的白羽扇豆，缺磷

胁迫下形成特殊的排根并于排根处分泌大量的柠檬酸，其释放量可达干物重的15%～23%(Gardner

等，1983）；小麦缺磷时根际H+分泌量为正常的153%左右，水稻缺磷时比正常供应的H+分泌量高22%～35 %（严小龙等，1997）。有研究表明，玉米根系分泌物中的糖、有机酸和氨基酸的组成受钾的影响显著。植物缺锌时，根溢泌出大量的无机离子和低分子有机化合物如氨基酸、碳水化合物和酚类化合物（张福锁，1992）。植物缺铁时将加强根系质子的分泌，且在根尖积累有机酸和有机物质，尤以酚类化合物为多，缺铁、缺铜会导致氨基酸、有机酸、酚类分泌量增加（高子勤等，

1998）。缺锰、缺铜会导致植物氨基酸、有机酸、酚酸分泌量增加。铝毒胁迫显著增加豆科作物有机酸，尤其是柠檬酸的分泌量（宋勇春等，2000）。双子叶植物在缺锌时，根分泌物能够使石灰性土壤中铁、锰的活化率分别提高1.6~2.1和2.7~3.5倍，而对锌的活化作用不明显；禾本科植物在缺锌时，根分泌物对难溶性锌和铁的活化能力不同于双子叶植物，缺锌小麦的根分泌物不仅可以 活化石灰性土壤中的难溶性锌，而且可以活化新沉淀的难溶性铁，与对照比较，其活化能力高出

13~14倍（张福锁，1991, 1991）。

#### 1.1.1.4 根系分泌物的产生机制

在植物生长期间，约有30％～60％的净光合产物运输到植物根系，其中由于植物根系和微生物呼吸以CO2的形式释放到根际的量约占运输到地下部分全部光合产物的40％～80％（Lynch等, 1990）。

一般认为根系分泌物的产生有两条基本途径，即植物的代谢途径和非代谢途径。代谢途径又可分为初生（或基础）代谢和次生代谢，初生代谢产物为植物生长、发育和繁殖提供物质、能量及信息，部分物质在代谢过程中以根系分泌物形式释放至根际。就初生代谢机理，许多学者的见解并不一致，其分歧的焦点在于主动释放和被动释放。一种看法认为根系的物质分泌可能是沿电化学梯度的扩散过程，最后发生渗漏，这个过程是被动释放过程(Jones等, 1995)。属于这一过程的根系分泌物包括糖、有机酸、氨基酸、水、无机离子和维生素等。另一种根分泌物释放的机制可能是一个逆电化学梯度、耗能的主动分泌过程，这种分泌具有很强的选择性，是植物活细胞的一种基本功能，如植物铁载体受缺铁胁迫诱导，在植物体内合成的代谢产物，通过主动分泌作用释放到根际（张福锁，1992）。一些化合物，特别是羧酸在营养缺陷或者铝毒下分泌的浓度很高，不能通过根细胞膜进行扩散作用，这时候需要阴离子通道介入来控制这些羧酸的释放（Samuels等, 1992）。与初生代谢不同，次生代谢产物用于适应不良环境，不直接参与植物生长、发育和繁殖，次生代谢产物很大部分是相克物质，如野燕麦根系分泌物中含有阿魏酸、咖啡酸和丁香酸等物质（Francisco, 1991）。非代谢途径产生的分泌物主要是指不受代谢调控的，根表皮衰老细胞分解及其细胞内含物释放的产物，如黑麦残株降解时产生的阿魏酸、原儿茶酸、鞣酸和香子兰酸等化感物质（Wojcik等, 1990）。

酚类和萜类化合物是两类研究较多且较清楚的化感物质。酚类物质来源于莽草酸途径，萜类物质来源于甲羟戊酸途径。在更高等植物中，有2条途径来形成C5萜类单体，即异戊二烯基焦磷酸：（1）在质体中的3-磷酸甘油醛2丙酮酸途径；（2）在细胞质中的乙酸-甲瓦龙酸途径（Lichtenthaler等, 1997）。

根分泌物释放的部位主要集中在根的顶端区域，包括根冠区、分生区、伸长区和根毛区。根系不同部位的功能及作用导致了分泌的物质在种类和数量也存在着差异。一般而言，大分子有机物质主要是由根尖分泌的，而可溶性小分子物质的释放则以伸长区为主。禾本科植物在石灰性土壤中适应缺铁机制时麦根酸类植物高铁载体的主要分泌部位集中在微生物尚未侵染的根尖中（张福锁，1995）。缺P胁迫的状态下白羽扇豆根系分泌物中苹果酸的分泌部位是距根尖5mm的非根毛区，而柠檬酸的分泌部位是逆境下形成的簇状排根区(Neumann, 1999)。

### 1.1.2 根系分泌物作用

#### 1.1.2.1 根系分泌物对植物养分吸收的影响

植物生长过程中，根系分泌物作为一种正常和积极的植物生理功能，在提高作物吸收养分， 促进植物生长发育方面取到了积极和重要的作用。植物可以通过被动地溢泌非专一性根系分泌物 或主动分泌专一性分泌物释放到根际，使该营养活化，植物吸收利用率显著提高，实现其自身调

节（Earl, 1979）。

植物可以通过对难溶性养分的酸化、螯合、离子交换及还原作用等提高植物对根际养分的吸收。当植物出现某种元素亏缺时，根系可以调节根系分泌物的组成来改变根际状态以适应外界环境，通过提高土壤养分的有效性来增加植物对根际养分的吸收。烟草磷和钾缺乏时，根系分泌物对土壤中磷和钾的活化能力提高，但不同基因型间存在较大差异（周冀衡等，2005）。根系分泌物组分中的有机酸对提高土壤养分有效性有较大影响，根系分泌物有机酸还对土壤P的释放有明显的促进作用（陆文龙等，1998），在缺磷条件下，白羽扇豆、苜蓿和油菜的根系分泌物中柠檬酸增多，木豆根分泌物中的番石榴酸分泌增多。这些有机酸一方面可降低根际pH值，提高难溶磷化合物的溶解度；另一方面与Al、Fe和Ca等金属离子间进行络和反应，造成含磷化合物的溶解，从而活化土壤中磷（Fox等, 1990, 1990; David等, 1994）。另外，柠檬酸可在酸性土壤上活化

Ca、Mg、Fe等2价和3价阳离子（Ofosu-budu等, 1987）。根分泌物中有机酸对结合Fe3+、Zn2+有较重要的作用，而氨基酸却对Cu2+的溶解性有着重要贡献。也有研究表明根系水溶性小分子分泌物对镉的结合作用较强（吴启堂，1993），禾本科植物根系专一性分泌物，麦根酸类植物高铁载体对Fe、Cu、Zn、Mn的螯合效率特别高（Zhang等, 1991）。研究强富钾植物籽粒苋的根系分泌物，发现其低分子量有机酸主要是草酸，进一步的研究证实，草酸对土壤矿物钾具有超强的释放 作用。

植物还可以通过对植物本身分泌的某些无机离子和低分子有机物的再吸收利用，促进了植物营养元素的物质循环和能量流动。黄瓜根系分泌物的存在提高了土壤三大营养元素的利用效率，同时提高了氮、磷、钾的速效比率（潘凯等，2008）。同时，分泌物中的高分子粘胶物质包裹跟尖细胞表面，防止幼嫩细胞脱水，同时起润滑剂的作用，还能加强根系与土壤不规则表面的接触，促进根-粘胶层-土壤颗粒之间的水分运移和离子交换，也能填充某些空隙降低养分迁移过程的曲折度，完善根-土水分体系，有利于植物根系对水分和养分的吸收（张福锁等，1997）。植物根系分泌物产生的高分子粘质多糖对土壤颗粒有很强的粘着力（Killham, 1994），高分子粘胶物质与土壤颗粒相互作用，促进微团聚体的形成。种植豌豆、玉米和黑麦的土壤，大于9.5mm的团聚体明显减少，而0.25-9.5mm的团聚体明显增加(Materchera等, 1992)。另外，植物根际通过微生物活性来影响植物对养分的吸收，根系分泌物为根际微生物提供营养和能源，使微生物产生趋向性聚居并大量繁殖，酶活性得到提高，从而促进土壤中有机化合物的分解和矿化作用，提高土壤中有效养分的含量，从而促进了植物的养分的吸收利。根系分泌物影响了根际微生物区系的种类和分布，即产生根际效应，根际效应使根际土壤的氧化还原电位明显低于非根际土壤。由于氧化还原电位的下降，也可使土壤中Fe、Mn等变价元素还原，而提高这些元素的生物有效性。

#### 1.1.2.2 植物的化感作用

化感作用(Allelopathy)是指植物（含微生物）通过释放化学物质到环境中而产生对植物的作用

（董章杭等，200）。化感作用一词来源于希腊语―Allelon（相互）‖和―Pathos（损害、妨碍）（孙文浩等，

1992）. 最初是由德国人H. Molisch于1937年提出并定义的（Rice, 1988），后来Rice对此定义加以修改和补充，成为目前为大多数学者所接受的概念（Rice, 1984）。国家自然科学名词审定委员会在1992年公布为“化感作用”。按Rice的分类，即将它们分为水溶性有机酸、直链醇、脂肪

族醛和酮；简单不饱和内酯；长链脂肪酸和多炔；酮类；苯甲酸及其衍生物；肉桂酸及其衍生物； 香豆素类；类黄酮类；单宁；类酯；氨基酸和多肽；生物碱和氰醇；硫化物和芥子油苷；嘌呤和核苷等14类（阎飞等，2000），也可依其作用效果分为抑制型和促进型两大类。

植物化感作用的媒体被称为化感物质（孔垂华，1998），根系分泌物是植物产生化感物质的一个重要来源，植物根系分泌的某些物质能抑制其它植物的生长及根系活动，造成一种克生现象，同时有些根系分泌物的积累可对植物的连作产生自毒作用从而造成连作障碍。

##### 1.1.2.2.1 克生作用

在自然环境中，一种植物的根系与其邻近植物根系持续保持着联系，并通过化学信使迅速识别和阻止其他植物根系的入侵。植物根系分泌物含有许多具有生物活性的化感物质，这些物质对受体植物的影响主要表现为对种子萌发和幼苗生长的促进或抑制作用（Callaway等, 2000）。

##### 1.1.2.2.2 促进作用

植物的化感物质能对受体植物表现出促进生长的作用。大豆残茬对玉米苗高和苗重有促进作用，苜蓿秸秆覆盖可促进马铃薯、黄瓜、莴苣等几种作物生长（王震宇等，1991；喻景权，1999；

Nelson，1985）。向日葵和牛蒡种子萌发的黏液中Lepidimoide含量较高，可通过促进叶绿素的合成（Yamada等, 1995, 1996; Chen等, 1998），刺激尾穗苋下胚轴的生长（Hasegawa等, 1992）、与激动素协同抑制离体燕麦叶片叶绿素含量的下降，抑制叶片衰老的进程等（Miyamoto等, 1997）。西方豚草根际土壤对Amaranthus retroflexus等7种植物的生长都有较强的促进效应，即其根系分泌物对一些植物也可能有促进作用（Tang等, 1982）。

##### 1.1.2.2.3 抑制作用

植物化感物质大部分对受体植物的生长表现为抑制作用。研究指出供体植物根系分泌物中对受体植物生长呈抑制作用的主要是酚类化合物(Tang等, 1982)。残株腐解产生的苯甲酸、香草酸、香豆酸、阿魏酸和苯甲醛等物质，作物根系分泌的酚酸类物质以及脂肪酸等在根际环境中积累可抑制其他作物生长。如番茄不仅有自毒作用，且植株挥发物和根系分泌物对黄瓜生长有明显抑制作用

（周志红，1997）。Kim等人研究了番茄的化感作用，他们发现番茄的挥发物能抑制莴苣干重的增加，在温室中接近番茄的葡萄藤不能很好地生长主要是由于番茄的根能分泌出单宁等酚酸类化感物质对邻近作物的生长产生不良影响(Kim等, 1987)。脱氢母菊酯对芦笋种子的萌发表现出了明显的光抑制现象，这种抑制作用可能涉及到其光敏效应和活性氧（如单线态氧）的参与（Tsao等, 1996）。另据研究，玉米、高粱、燕麦的腐解产物可抑制大豆、向日葵、烟草的正常生长(Perez, 1991)，豌豆根系分泌物中的苯甲酸、香草酸、肉桂酸、香豆酸等物质能抑制连作豌豆种子的萌发和幼苗的生长（喻景权等，1999；杜英君等，1999）。

化感作用可以是作物之间的影响，也可以是作物与杂草之间的作用。在美国每年由于杂草带来水稻生产的损失大约为潜在产量的17%，约合2亿美元。在泰国的水稻生产中，杂草每年会带来大约25%～75%的产量损失(Maneechote等, 1996)。有研究列举出240种对作物具有化感抑制活性的杂草（Qasem等, 2001）。有些作物本身对杂草有化感作用，如大麦、小麦、向日葵等，可用来与其他作物间作，从而控制杂草生长，减少除草剂的用量（彭少麟等，2001），胜红蓟地上部、

地下部和三叶鬼针草水提液对萝卜、水稻、黄瓜均表现不同程度化感抑制作用（曾任森等，1995）。在东北地区和长江中下游地区豚草和三叶裂豚草不仅与作物争夺生存空间，而且能挥发对玉米、小麦、大豆等作物种子萌发有较强抑制作用的化感物质，抑制其根系生长发育（王大力等，1996）。

##### 1.1.2.2.4 自毒作用

作物连作，往往会引起作物生长受阻，代谢紊乱、病害加重，从而导致大幅度减产，大豆在连作的情况下，产量下降10％～20％，病害也相应加剧（高子勤等，1998）。有关连作机理并不十分明确，但可以肯定的是根系分泌物的中自毒成分的积累是引起连作障碍的重要因素。植物在正常的生命活动中，会向环境释放一些次生代谢物质，这些分泌物在土壤中积聚，对植物自身会产生毒害作用，即植物的化感自毒作用(Autotoxicity)。

有报道指出，台湾1910到1975年二茬水稻的产量比头茬低25%，特别是在排水不良的地区，通过一系列实验发现，水稻残株的腐解和自毒作用是两个主要原因。水稻残茬及秸秆在分解过程中能产生某些有毒物质，抑制水稻幼苗生长，温度为20～25℃时抑制作用最强，> 30℃时抑制作用随时间推移显著下降，其结果降低水稻的有效分蘖数、有效穗数、千粒重及产量（Chon, 1992）。一些酚酸类物质加入霍格兰营养液中培养大豆，发现咖啡酸、肉桂酸、香豆酸、阿魏酸、五倍子酸和香草酸在一定浓度时明显抑制大豆的生长，使光合作用显著下降。主要原因是抑制了卟啉的合成，或加速了叶绿素的分解，从而降低了叶片的叶绿素含量，使叶子失绿，进而影响光合作用（Pateron等，

1997）。近来，喻景权先后证实了豌豆、番茄、黄瓜、西瓜和甜瓜根系分泌物和残茬所引起的自毒作用，并从中分离出以肉桂酸为代表的多种自毒物质，这些物质通过影响离子吸收、水分吸收、光合作用、蛋白质和DNA合成等多种途径来影响植物生长（喻景权等，2000）。

##### 1.1.2.2.5 化感作用机理

##### 1.1.2.2.5.1 对细胞器膜透性的影响

化感物质可以影响植物质膜透性，提高细胞膜过氧化水平，增加离子的渗出量，最终导致细胞膜系统破坏，黄瓜根系分泌物和根提取物能够增加离子溢出，黄瓜根中丙二醛含量增加(Politycka等, 1996; Yu等, 1997)。有研究表明，酚类物质糖基化的减退和酚基-β-葡糖基转移酶(PGT)活性的降低与细胞膜透性的增加是联系在一起的，酚酸类物质增加了细胞膜的脂质过氧化作用，并造成细胞膜的损坏（Politycka 等, 1997）。菊科植物根系分泌物中存在一种天然的倍半萜内酯-脱氢中美菊素C可引起黄瓜子叶原生质膜破裂、原生质降解，导致细胞内含物快速渗漏，推测脱氢中美菊素C是通过两个独立的机制来对受体植物发生作用，使受体细胞膜功能丧失，同时使某些氨基酸的生化合成受到抑制（Galindo等, 1999; Juan等, 1999）。银胶菊叶片提取物能降低凤眼莲根部细胞膜的完整性（Pandey等1993）。另外，化感物质增加离子的渗出在芦笋（Hartung等, 1989）和大豆(Baziramakenga等, 1995)等许多植物上亦有报道。另外，根系过氧化水平与多种酶活性密切相关。酚酸类物质可以使PLA和GLD 的活性升高，PGT 的活性降低，并抑制了根的生长

（Politycka等, 1998）。化感物质处理黄瓜幼苗能够明显增加过氧化物酶和超氧化物歧化酶(SOD)的活性（Politycka等, 1996）。PLA和肉桂酸-4-羟化酶(CA4H)活性的大小与酚类物质的含量密切相关（林群慧等，1001）。

##### 1.1.2.2.5.2 对细胞分裂、伸长和亚显微结构的影响

化感物质中的某些物质能对细胞分裂、伸长和亚显微结构产生显著影响。鼠尾草叶片中的挥发性萜类物质可引起黄瓜根尖细胞中脂质小体的积累、完整细胞器（如线粒体）数目的下降以及细胞核、线粒体和高尔基体膜的破裂。大麦根所释放的生物碱能引起白芥根尖细胞壁损伤，液泡数量和体积的增大以及细胞器结构的损坏（Liu等, 1993）。葫芦所产生的化感物质能使菜豆和南瓜属植物根冠细胞中产生不定形和无活性的细胞核、线粒体和内质网，并且液泡发生内陷（Cruz等, 1998）。1, 8-桉叶素和1,4-桉叶素能抑制有丝分裂过程（Romagni等, 2000）。

##### 1.1.2.2.5.3 对植物激素活性的影响

一些化感物质对植物激素水平影响较大，绿原酸、异绿原酸和新绿原酸可以抑制豌豆上胚轴中的吲哚乙酸氧化酶。阿魏酸能引起生长素、赤霉素和细胞分裂素含量的积累，并造成脱落酸含量的升高（Hollapa等, 1991; Yu等, 1993;刘秀芬等, 2001）。酚类物质处理黄瓜幼苗1h后，腐胺和亚精胺大幅度下降，同时多胺氧化酶活性增加（Politycka等, 2000）。

##### 1.1.2.2.5.4 对离子和水分吸收的影响

根系分泌物中酚酸类物质能抑制根系对一些离子的吸收（Yu等, 1994; Lyu等, 1990; Booker等, 1992）。化感物质对离子吸收的抑制主要受物质浓度、根际Ph和根系与化感物质接触面积。

pH值降低，根际与酚酸类物质接触面积增大，都会使抑制作用加强（Klein等，1990；Lehman等，

1994）。也有研究表明酚酸类物质对植物的抑制作用中，根系与这些物质的接触比根系对这些物质的吸收更能体现酚酸类物质的抑制活性（Blum等, 1999; Lehman等, 1999）。阿魏酸抑制黄瓜苗净离子吸收量特别是NO3的吸收，同时促进了K从根部的溢出，而水分吸收的下降造成了叶面水势和膨压的下降（Booker等, 1992）。芳香酸可以抑制黄瓜根系对NO3、SO4 、K、Ca 、Mg和Fe2+的吸收（Yu等, 1997）。

- +

- 2- + 2+ 2+

##### 1.1.2.2.5.5 对呼吸和光合作用的影响

化感物质对植物线粒体新陈代谢的抑制作用是化感作用重要的机理之一(Hejl等, 1993)。肉桂酸等化感物质可降低大豆下胚轴氧的消耗，同时使电子向其它途径传导(Penuelas等, 1996)。另外，化感物质可引起叶片中叶绿素含量的降低，并最终造成植物光合作用的下降（Pandey等，

1993; Baziramakenga等，1994)。

#### 1.1.2.3 根系分泌物与根际微生物关系

土壤中的微生物包括细菌、放线菌、真菌、藻、原生动物和病毒（陈华癸，1981）。在―根际‖这一特殊环境里，根系分泌物一方面作用于根系周围环境产生根际效应。另一方面根际微生物在植物根系趋向性聚居并通过各自的代谢活动分解转化根系分泌物和脱落物，对根系分泌物起着重要的修饰限制作用（朱丽霞等，2003）。

##### 1.1.2.3.1 根系分泌物对根际微生物的影响

##### 1.1.2.3.1.1 微生物的种类和数量

不同植物种类或同种植物不同发育阶段的根系分泌物对根际微生物的作用是不同的。在烤烟 生长过程中，随发育期不同，根系分泌物的数量和种类存在差异，而其根际微生物的数量亦随之发生变化（湛方栋等，2005），根系分泌物中的多数物质对根系微生物都具有调节作用，既有促进又有抑制作用，对微生物活性的影响一般均表现为―低促高抑‖。如凤眼莲根系分泌物对微生物的

影响，就表现出低浓度促进，高浓度抑制的规律（赵大君等，1996）。不同基因型小麦苗期根系分泌物对根际反硝化细菌生长量和反硝化活性均有不同程度的影响，分泌物中氨基酸总量高的基因型小麦，其根际反硝化细菌的生长量和反硝化活性均高（李振高等，l995）。有研究表明根系分泌物中的化感物质进入土壤后，能导致土壤微生物胞内酶与胞外酶比例失调或改变酶的构象，增强脲酶活性（袁光林等，1998）。

根系分泌物还可以通过改变成分来控制根际微生物种类。N对土壤微生物的种群数量和密度的影响是通过改变根系分泌物来间接实现的（Liljeroth等, 1990），研究转基因玉米BT176对根际微生物种群的影响时发现根系分泌物能够决定对不同微生物种群的选择（Brusetti等, 2003）。玉米根系分泌物在不同生育期蛋白质与总糖含量有明显差异，这些物质的种类与数量差异对土壤微生物群的分布有直接影响（Chaboud, 1983）。毛白松和刺槐混交林中根分泌氨基酸的种类及数量均比纯木多，使根际微生物（细菌、真菌和放线菌）的数量及活性显著提高（李传涵等，1991）。人工合成的根系分泌物灌溉根系，真菌比细菌占优势（Grifiths等, 1999），但也有学者认为根分泌物的量是很少的，不足以让根际微生物进行快速生长（Marschner等, 1997）。

##### 1.1.2.3.1.2 微生物的分布

根系分泌物中的糖、氨基酸、维生素等物质的存在为根际微生物的生长和繁殖提供了大量的能源和营养物质，这些有益物质吸引微生物趋向性聚居，使根际微生物不仅种类和数量远高于非根际土壤，而且其代谢活动也比非根际微生物高，进而对根际微生物的种类、数量和分布产生影响。有研究表明，根系分泌物的种类、数量以及沿根的可溶性含碳化合物的分布距离直接影响根际微生物的种类、数量和分布，分泌物越多，微生物生长越旺盛（Darrah等, 1991）。此外，根分泌物对微生物种类和数量的影响既有特异性又有非特异性。大多数情况下根分泌物对根际微生物的作用是非特异性的。

##### 1.1.2.3.1.3 微生物的代谢

根系分泌物除了对根际微生物数量和种类产生影响外，还对微生物的代谢及生长发育有一定的影响（Martinei-toledo, 1988），其影响有时起促进作用，有时起抑制作用。以往研究表明大多酚酸类物质对根际微生物均表现为抑制作用。阿魏酸对枯草菌生物量增加有抑制作用（Ma等，

1998）. 酚酸物质能抑制微生物产生气体与挥发性脂肪酸的作用，并且减少微生物对其生长介质的消耗（Muarray等, 1996），阿魏酸对枯草菌生物量增加有抑制作用（Ma等, 1998）。番茄根系分泌物中大量存在的柠檬酸和苹果酸对假单胞菌具有很大的促进作用（Sood, 2003），细叶亚菊挥发油的主要成分樟脑精对土壤反硝化细菌起重要作用，它促进土壤反硝化的强度，加速土壤的氮素损失（杜昱光等，1996）。

黄酮类物质也是植物根系分泌物之一。苜蓿种子根系分泌物中分离出黄酮类物质有诱导根瘤菌结瘤的作用，另从植物群落中提取出的类黄酮能抑制细菌生长(Harwing等, 1990)。大豆根系分泌物中含有两种黄酮类物质*Coumestrol*和黄豆苷原，*Coumestrol*可使根瘤菌*R. japonicum* USDA138菌株的生长量提高30%，根瘤菌*R. loguminosarum*菌株生长量提高15%，而黄豆苷原可使根瘤菌*R. japonicum* USDA138生长量提高USDA20%（Darcy, 1987）。

苹果前茬种植小麦，其根系分泌物促进了土壤中荧光假单胞菌的生长，从而抑制了后茬苹果病

虫害发生的几率（Gu等, 2003）。黄瓜根系分泌物对于抗病黄瓜品种根区土壤中的真菌数量有促进作用，黄瓜植株的根系分泌物对黄瓜根区土壤的尖孢镰刀菌的增加具有明显的促进作用，且感 病品种的促进作用强于抗病品种，不同抗性黄瓜的根系分泌物，对根区土壤的细菌的增加具有抑 制作用，感病黄瓜品种的土壤中的放线菌的数量明显高于抗病品种。黄瓜根系分泌物对根区土壤 中放线菌的影响，整体规律性不明显（潘凯等，2008）。

##### 1.1.2.3.2 根际微生物对根系分泌物的影响

根系分泌物影响周围环境产生根际效应，形成根际微生物群落和特异的种类、数量和分布结 构，并通过各自的代谢活动分解转化分泌物，对根系分泌物起着重要的修饰限制作用，这种分泌 作用既有刺激又有抑制。目前研究结果表明，微生物主要通过改变膜透性，改变初生代谢，产生 浓度梯度和改变根际矿质营养四个方面对根系分泌物产生影响。

##### 1.1.2.3.2.1 改变膜透性

多黏杆菌产生的抗菌素-多糖素可增强细胞膜的通透性，从而导致根系分泌较多的氨基酸（张高峡等，l998）。石灰性土壤中有机酸的生物降解速率时得出苹果酸和柠檬酸在玉米根系的降解得到了加强，而草酸由于形成草酸钙生物可降解性较低。微生物产生的激动素可以减弱细胞膜的流动性，降低细胞膜的通运性，从而改变根分泌物的种类和数量（Strom等, 2001）。

##### 1.1.2.3.2.2 影响初生代谢

根际微生物可以通过影响植物根系的代谢活动进而影响根系分泌物的分泌，特别是当根受细菌、病毒感染时，根系分泌物中的糖、氨基酸和脂类等初生代谢物发生改变，次生代谢物受到相应的刺激也会发生变化，以抵御不良环境。根际微生物消耗和转化根系分泌物中的有机物，造成各种有机物的浓度梯度，促进根系分泌物的产生。微生物通过改变根际的矿质营养成分，间接影响根系分泌物的产生。用粪产碱菌接种水稻时发现，浸种和沾根2种方式均能刺激水稻根系分泌质子，浸种的刺激效应更加明显（林敏等，1992）。*Pseudomonas bacteria* 和*Fusariumfungi*代谢产物可显著加强苜蓿、玉米、小麦根系氨基酸的分泌（Phillips等, 2004）。

##### 1.1.2.3.2.3 改变根际矿质营养

根际微生物可以通过改变根际营养状况和影响植物体内激素含量来改变植物体内生理生化过程，从而影响到根分泌物的种类和数量（Graham, 1988）。根际微生物还可以通过有选择地利用根分泌物中的特定成分来改变根分泌物的组成成分及其比例。*Bacillusm egaterium strain B153-2-2*对根系分泌物中的丙氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸等有化学趋性作用（Zheng等，

1996）. 小麦根际微生物*Pseudomonasputida*可以转化小麦根分泌物中糖等有机化合物，刺激根分泌物的分泌，而解磷细菌*Enterobacter agglomerans*可以有效利用根分泌物，促进玉米生长并提高其光合速率，从而减少根分泌物的分泌(Prikry, 1980)。

#### 1.1.2.4 根系分泌物与连作障碍

连作障碍（Continuous cropping obstacles）是指同一块土壤中连续栽培同种或同科的作物时，即使在正常的栽培管理状况下，也会出现生长势变弱、产量降低、品质下降、病虫害严重的现象（驹田旦，1994）。日本称这类问题为忌地现象，欧美国家则称之为再植病害(Replant disease)或再植问题(Replantproblem)（张子龙等，2010）。早在公元前300年连作障碍就已经被人们认识，随着现代

种植业集约化、复种指数高和种类单一的发展趋势，植物的连作障碍现象愈加突出，已成为制约农业生产可持续发展的重要因素。连作障碍形成及加重发生的原因非常复杂，包括土壤的传染性病害、土壤理化性状劣变、根系分泌物和残茬分解物等引起的自毒作用等。最近一些研究表明，根系分泌物的自毒作用（Yu等, 1997）以及由此引发的病原菌增殖（吴凤芝等，1999）是导致作物连作障碍的主要因素（[胡元森](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e8%83%a1%e5%85%83%e6%a3%ae%22%2BDBID%3aWF_QK)等，2004）。

##### 1.1.2.4.1 连作对植物生长发育的影响

植物连作对其植株形态、叶片的光合生理特性和活性氧代谢等都有不同程度的影响。连作使株高降低，叶面积减小，叶绿素含量降低，光合速率下降（王才斌等，2007）。连作还导致植株活性氧积累和膜脂过氧化损伤，直接影响其生长发育（王才斌等，2007）。连作植株的根系生长受到影响，根系活力下降。

连作严重影响了植物对各种营养元素的吸收和积累。研究表明，连作导致大豆植株体内的硝态氮、速效磷和速效钾含量显著降低；但也有研究发现，连作大豆植株对氮素的吸收保持在正常范围内， 只是对磷、钾的吸收显著降低（阮维斌等，2003）。连作胁迫下大豆对微量元素的吸收减少，而对中量元素钙的吸收却显著增加。

连作导致植株病害加重，尤其是根部的病害发生加重。胡萝卜春、秋两季连作栽培后，根结线虫和黑腐病严重发生，并逐年蔓延（曹永胜等，2006）。连作条件下，植株生长发育受到影响，最终导致其产量降低。连作大豆的生物产量减少7.26% ~14.52%，收获期大豆减产12.19%

~14.59%。有研究表明，种烟的时间间隔越短，发病率越高，如烟草黑胫病、烟草花叶病、根结线虫病、根黑腐病、低头黑、青枯病、赤星病、角斑病和炭疽病等的发病率都与连作呈不同程度的正相关（李天福等，2006）。

连作除降低植物的产量外，也可使其品质变劣。随连作年限的延长，黄瓜的可溶性固形物和维生素C的含量均下降，但硝酸盐含量上升（贺丽娜等，2008）。烟草是不耐连作的作物，随连作年限的增加，烟株的产量、产值、均价和上中等烟比例都下降，烟叶中的总糖、还原糖和钾含量随连作年限的增加而下降，而烟叶中的烟碱含量则随连作年限的增加而增加（晋艳等，2002）。对烤烟连作、轮作的4年定位比较，连作烟株的田间长相长势、产量、产值、外观质量均低于轮作，连作的产量仅有轮作的59.12%，产值仅有轮作的29.93%，中上等烟比例仅有轮作的52.07%，均价仅有50.6%，与轮作相比，烤烟连作后黑胫病和赤星病的发病率升高（晋艳等，2004）。

##### 1.1.2.4.2 根系分泌物与连作障碍

根系分泌物在作物连作障碍中扮演重要角色，某些前茬作物的根系分泌物能刺激某些有害微生物的生长和繁殖，这些微生物抑制下茬同一作物的生长，从而造成连作障碍。植物根部某些特定分泌物对根际微生物有强烈的刺激作用，并且某种作物根部分泌物对该种作物根际微生物的刺

激作用，比他种作物根分泌物的刺激作用大（张庆平等，1994）。大豆孢囊线虫病是重茬大豆的一种常发主要病害，孢囊线虫卵以孢囊形式存在于土壤中，并可存活多年，大豆根系分泌物可促进孢囊线虫的孵化，重茬越久患病越严重（王光华等，1995）。

##### 1.1.2.4.3 根际微生物与连作障碍

土壤微生物对维持土壤系统稳定性、健康和质量非常关键（Garbeva 等，2004；郭瑞英等，

2005）。作物长期连作后，病源微生物数量增加，土壤微生物群落及其结构会明显变化，病原微生物数量增加，长期连作造成土壤微生物区系变化，根际正常的微生物群落及其结构被打破，使微生物多样性水平降低，病原拮抗菌减少（Mithofer, 2003; Yang等, 2001），影响植物的正常生长与发育，进而影响产品的产量与质量。

公认土传病虫害加剧是连作大豆减产的主要原因，并且根际分泌物影响土壤微生物变（许艳丽等，1997；邹莉等，2005）。大豆连作障碍是植物和土壤两个系统内部诸多因素综合作用的结果

（战秀梅等，2004），土壤微生物生态功能与土壤功能联系密切，微生物群落结构与组成变化会直接影响土壤功能发挥（张晶等，2006）。连作大豆根际形成特殊的小生态区域，土壤微生态环境改变

（王光华等，2004）。大豆连作3年以上，土壤微生物数量与组成发生改变，细菌数量减少，真菌数量增加（邹莉等，2005；周飞等，2007；徐凤花等，1998；马春梅等，2004；台莲梅等，2004；陈中宽等，2006；孙志高等，2008），其中以青霉菌、镰刀菌、立枯丝核菌占多数（许艳丽等，1995）。随生育期进程，大豆真菌数量逐渐上升，连作与轮作相比，真菌数量增加，花期、结荚期及成熟期均高于轮作，以花期最为显著（陈宗泽等，1999）。以往研究结果证实，连作使根际微生物区系由高肥力的―细菌型‖向低肥力的―真菌型‖转化（王光华等，1995；陈宗泽，1997）。烟草连作8年以下的旱地土壤中的好气性细菌、厌气性细菌、放线菌及真菌的数量随连作年限增加而有上升趋势，连作8年以上的微生物数量却有下降趋势。烟草连作对旱地土壤的细菌数量影响最大，对真菌数量的影响次之，对放线菌数量的影响最小。烟草长期连作将改变土壤微生物的数量及多样性，会影响连作病害的发生，不利于土壤生态系统的健康发展（盘莫谊等，2008）。

#### 1.1.2.5 根系分泌物与土传病害的关系

对于土传病害来说，根系分泌物是寄主自身抗病性的第一阶段，是植物体自身防御作用之一， 面对病原微生物的入侵，必须迅速且有选择地采取相应的机制，并有选择地向根际加大释放分泌物来抑制病原菌的产生，有人把它叫做体外抗病性。一般认为，作物感病品种的根系分泌物能刺激病原菌孢子萌发，而抗病品种的根系物则抑制孢子萌发。有关根系分泌物抗性机制方面的研究较少，就目前的研究结果来看，根系分泌物能感知根际微生物的存在，通过次生代谢产生相关物质抑制病原微生物生长。根系分泌物可在一定程度上控制根际微生物环境，促进一些微生物生长，而限制另一些微生物类群生长（刘素萍，1998）。总的来说，根系分泌物主要通过1）分泌物本身对病原菌的抑制或直接杀死病原菌；2）改变分泌物的种类和数量来抑制病原菌的生长和繁殖；3）根系的化感物质对病原菌的抑制。

##### 1.1.2.5.1 根系分泌物种类和数量差异

有研究表明，作物抗病性差异可以通过根系分泌物差异体现出来。感根腐病和大豆胞囊线虫病大豆品种合丰25号根系分泌物中的主要有机酸种类丰富，含量高，抗病品种绥农10号和抗线

2号根系分泌物中主要有机酸种类单一，含量低。感病大豆品种合丰25号在苗期根系分泌物中发现对羟基苯甲酸和香草酸两种酚酸，两个抗病大豆品种成熟期前的根系分泌物中仅检测到对羟基苯甲酸（张俊英等，2007）。袁虹霞等（2002）对不同品种棉花根系分泌物研究表明，感病品种分泌物中氨基酸含量和种类较多，而苯丙氨酸、脯氨酸等仅出现在感病品种的分泌物中，抗病品种根

系分泌物中糖类物质含量亦明显低于感病品种。棉花抗性品种的根系分泌物对土壤中病菌的孢子 萌发和菌丝生长有一定抑制作用，而感病品种的根系分泌物能刺激土壤中病菌的生长（李洪连，

1998）。另外，小麦根系分泌物能直接抑制小麦全蚀病原菌的菌丝发育（Srniley等, 1973）。荞麦的根系分泌物对小麦全蚀病菌有明显抑制作用（熊明彪等，2002）

##### 1.1.2.5.2 加剧作用

根系分泌物和植物残茬腐解物给病原菌提供了丰富的营养和寄主，使病原菌具有良好的生长繁殖环境，从而加速病原物数量的不断增加，病害加剧，在连作情况下病害加剧现象则更为常见。重迎茬大豆根分泌物对大豆根腐病的病原菌有增殖作用（贾新民等，1997），大豆根系分泌物中，高浓度的邻苯二甲酸和丙二酸与对照相比，对半裸镰孢菌、粉红粘帚菌和尖镰孢菌，尤其是对半裸镰孢菌的生长有化感抑制作用，差异达显著或极显著水平。低浓度的邻苯二甲酸和丙二酸对半裸镰孢菌、粉红粘帚菌和尖镰孢菌的生长有化感促进作用，部分差异达显著水平（鞠会艳等，

2002），肉桂酸、苯甲酸可以显著提高西瓜枯萎病的发病率（王倩等，2003）。小麦根分泌物对小麦全蚀病菌有促进生长作用和刺激作用（张庆平等，1994）。阿魏酸对枯草菌的生物量的增加有抑制作用，对羟基苯甲酸在高浓度时对枯草菌密度的增加有一定的刺激作用（马瑞霞等，1998）。

根系分泌物也可对根际环境有益菌和有害菌的种类和数量产生影响。有研究表明，外加酚酸物质可以刺激真菌繁殖与生长或为真菌生长提供有效的碳源（张淑香等，2001）。大豆连作3年以上，土壤微生物的数量与组成发生了改变，细菌数量减少，真菌数量增加（许艳丽等，1995），大豆重茬土壤中镰刀菌是优势种群（王震宇等，1991）。连作两年以上的西瓜地每克土壤含西瓜枯萎病菌1.6×103~2.8×10 3个，属严重发病地或绝产地（丁金城等，1991）。

##### 1.1.2.5.3 缓解作用

在少数情况下，根系分泌物也可以抑制病害发生。在连种西瓜抗病品种的田块中即使加入中等量的病原菌和种植感病品种，发病率也不会很高，不过在种植感病品种的田块中，仍保持很高的发病率（Larkin, 1993）。在豆类、棉花和茄子等根系分泌物的吸引下，*Talaromyceeflowu* 能在作物根际聚集能有效防止*Verticililium*的传染，*Celastrusangulatu*的分泌物可以有效地防止病原细菌危害。植物根系还能分泌一些毒素直接杀死病原微生物（郑师章等，1990）。

### 1.1.3 根系分泌物的研究方法

根系分泌物的种类繁多、数量差异大、影响因子众多，这给根系分泌物的研究带来很大困难， 大量的研究结果证明，不同的研究方法对研究结果有直接的影响，因此，选取合适的研究方法对于根系分泌物的研究对于试验结果的真实性、准备性和代表性具有重要意义。

#### 1.1.3.1 根系分泌物的收集

根系分泌物的收集方法多种多样，目前较常用的有：溶液培养法、基质法以及土培法，随着 分析技术的发展，又相续有了分根装置收集法、自动连续装置收集法、多孔陶头塑料管减压原位 收集法、层析滤纸或纤维素膜定位收集法、土壤溶液取样器收集法、同位素标记结合土壤溶液取 样器收集法等。

##### 1.1.3.1.1 溶液培养法

利用溶液培养收集根系分泌物是目前最常用的根系分泌物收集方法。该方法首先要培育幼苗， 按试验所需生长到一定程度时，用蒸馏水和去离子水反复淋洗根部，去除养分离子和根系分泌物， 然后移至蒸馏水或营养液中，使之生长一段时间，然后将植株移走，经过收集→过滤→浓缩（有时），即为所收集的根系分泌物。该法操作简单，但是水培环境与自然生长状况有一定差距，不能准确反应根系分泌物状况。

##### 1.1.3.1.2 基质培养法

该法的基本原理是将植物种植在固体基质（包括土壤、砂、玻璃珠、琼脂等）上，从中提取根分泌物。基质培养的优点在于较接近根系自然生长状况，所获得的根系分泌物较多，缺点是操作麻烦，释放的根分泌物经基质作用往往会发生变化，难以保证根分泌物的稳定性。张福锁等将琼脂固定定位收集与交换配位和专一性阳离子交换树脂收集结合起来，分离和纯化根分泌物(张福锁，1997)。Yoshitomi等（2001）将石英砂培装置和受污染土样连接从而研究土壤微生物群落与实际的植物根系分泌物之间的相互作用。Sandnes等（2005）将营养液泵入玻璃珠无菌培养装置连续分离和纯化根系分泌物。

##### 1.1.3.1.3 其他方法

研究人员根据研究目的的不同，设计一些系统或装置来收集根系分泌物，如循环水根系分泌 物收集装置以及多孔陶头塑料管减压原位收集装置、层析滤纸或纤维素膜定位收集法、微透析技 术等。其中最有应用前景的是微透析技术，该法是将膜探针（由纤维素、聚丙烯腈和聚碳酸酯等膜 制成）直接插到生物活体部位进行采样，不影响和损害生物的生长。如果该方法可行的话，这将是 根分泌物收集的最理想的方法。微透析技术还可以和色谱等仪器联用，使采集和分离鉴定一体化 得以实现。

#### 1.1.3.2 根系分泌物的分离

迄今为止还没有一种方法能够直接从样品中检测未知成分，直接收集的根系分泌物不能直接用于分析，必须经过预处理后才能作定性和定量分析。原因是1）根系分泌物质种类多但含量较低；2）根系分泌物中杂质较多，除有机物外还存在大量无机离子。因此根系分泌物的分离对根系分泌物研究结果具有重要作用。目前常被采用的分离方法包括萃取法、树脂法、层析法、分子膜 及超滤技术等。

萃取法是目前最为常用的分离方法，该方法是依据物质在两个不相容或部分互溶的溶剂中分配不同从而达到分离纯化目的。此方法优点是简单方便且快速，缺点是操作繁琐。因为根系分泌 物一般为水溶液，因此较常用与之不相容的有机溶剂作为萃取剂，常见的有乙醚、乙酸乙酯和二氯甲烷等（何海斌等，2005；柴强等，2004）。

树脂法是近年来发展起来的一种方法，可分为交换法和吸附法。交换法是利用阳离子和阴离子树脂吸附阴阳离子，无极性或极性较弱的有机分子通过，然后洗脱和提取目标组分，从而达到纯化的目的。吸附法则是使用吸附树脂（如XAD-4、XAD-2或GDX-102树脂、活肚炭以及硅胶等），

吸附和富集含化感物质在内的一些有机化合物，进行分离和纯化（杨建峰等，2007；何海斌等，

2007）. 黄瓜根系分泌物采用XAD-4吸附树脂进行吸附，然后用甲醇洗脱，再进行分析和鉴定（程智慧等，2005）。刘秀芬等在分离根际他感化学物质时首先采用GDX-102树脂吸附土壤溶液，再用甲醇淋洗，然后收集淋洗液用于生物测定和鉴定（刘秀芬等，1996）。Shen 等（2005）用阴离子树脂膜放置在根的周围收集根系分泌物。Yu等（2000）用XAD-4树脂选择性地截留循环使用的营养液中疏水性分泌物来研究化感物质潜在的自毒作用。但这些方法操作步骤繁琐，取样时间较长。

层析法是利用混合物中各组分在固定相和流动相中分配平衡常数的差异而使各组分在固定相中得到了分离的方法。包括纸层析、柱层析、薄板层析等，各有优缺，柱层析法手续繁琐，且时 间长，而纸层析和薄板层析法虽然操作简便，但是不够精确，所以它们现在基本上已经不作为检 测手段了。

分子膜与超速离心分离技术是目前较为先进且在根系分泌物物研究中广泛应用的分离方法。利用分子膜结合超滤技术可以对根系分泌物的蛋白质、氨基酸及多肽进行有效分离。还可以利用分子膜超滤将分泌物中的细菌、蛋白质甚至病毒进行分离，防止微生物对根系分泌物的降解作用。 超速离心技术可以将理化性质相近、分子量差异大的根系分泌物进行有效分离，其原理主要根据不同根分泌物组分离心力不同而分布于不同层面上达到分离。

#### 1.1.3.3 根系分泌物的鉴定

根系分泌物的鉴定主要有生物测试和化学测试两种方式，是根系分泌物定性半定量的测定方 法，生物测定技术常常被用于鉴定分离出的物质是否具有化感作用。对于化感物质的生物测定多 采用主体植物根分泌物，观察受体（土壤生物或其他植物体）对根分泌物中化感物质的不同程度的反应，从而判断根分泌物中化感物质生物活性的大小。目前这些技术也被大多数研究者所采用， 但还存在一定的局限性。

##### 1.1.3.3.1 生物鉴定

常用的生物测定方法有种子发芽试验，幼苗生长发育测定，田间试验测定、盆栽试验等。因为根系分泌物均是与土壤结合在一起，这就造成根系分泌物物质无法避免的受到土壤微生物的干 扰，因此，根系分泌物的生物检测一般采用模拟实验与田间实验相结合的方法进行。

最为直接的生物检测方法是应用水培、沙培或土壤浸提液直接作用于受体作物，研究其对受体种子发芽率及幼苗生长的影响，曾任森等（1994）用1/2强度的斯泰耐营养液加l％琼脂制成培养基，培养蟛蜞菊茎节40d后，每烧杯放30粒萝卜种子和30粒黄瓜种子，进行发芽试验，发现萝卜种子和黄瓜种子的发芽明显受阻。张淑香等（2000）分别向培养皿中加入重茬3年、重茬1 年

与正茬土壤浸提液，然后播人大豆种子，测定发芽种子胚根伸长量，结果表明，在重茬3年的土壤上大豆胚根长度远低于其他各处理，且差异达到极显著水平。实验室的模拟实验可以评估某种植物是否具有化感作用潜能，但要确认其被观察的化感作用能否表达出来，则田间试验是必不可 少的。田间试验主要采用附加栽培法和置换栽培法来研究植物地下部分间的相互作用。附加栽培 法是将两种植物混植，固定一种植物的种植密度，而变化另一种植物的种植密度的栽培法。置换

栽培法是将两种植物混植，固定总的种植密度，而改变种植比例的栽培方法。

##### 1.1.3.3.2 化学鉴定

化学鉴定根据根系分泌物的物理化学反应特性确定其组成和含量。目前常用于化学测试鉴定根系分泌物的仪器有氨基酸自动分析仪(Automatic amino acid analyzer)、紫外-可见光谱(UV-VIS)、红外光谱(IR)、毛细管电泳(CK)、气相色谱(GC)、液相色谱(HPLC或RPLC)、质谱(MS)和核磁共振(NMR)等。

气相色谱一般要求沸点在500以下，分子量要少于450，而对热稳定性差、易于分解、变质以及具有生理活性的物质，都不适合GC检测，它所分析的物质占有机物总数的15％～20％。但

HPLC可以检测的物质占有机物总数的80％～85％，而且样品不受热稳定性影响、流动相种类多等特点，因此，液相色谱是目前较为常用的根系分泌物组分分析方法。Shen等（1998）建立了小分子量有机酸测定的HPLC条件、干扰因素和消除方法，Grogory等（2003）用改进的RPLC测定了植物根系分泌物中的10种有机酸。

## 1.2 烟草黑胫病研究进展

### 1.2.1 基本概况

烟草(*Nicodana tabacwn* L.)是以收获叶片为主的重要经济作物，是世界上最广泛种植的商业性非食用叶用经济作物，几乎遍及世界各地，从北纬600至南纬450都有烟草栽培（王瑞新，2003；王万能等，2003）。同时，烟草也是病虫害种类最多，受害最为严重的一种农作物（谈文，1989）。烟草黑胫病菌(*Phytophthora nicotianae*)是一种可危害所有栽培烟草的毁灭性土传病害，破坏力极强且蔓延较快，大田侵染后常造成烟株整株死亡，我国平均每年因此病害损失1.2亿元人民币（孔凡玉等，1995）。

烟草黑胫病菌目前的分类地位为：藻物界、卵菌门、卵菌纲、腐霉目、腐霉科、疫霉属（尚志强，2007），最早由van Breda de Haan于1896年在印度尼西亚的爪哇发现后，于上世纪20年代开始在美国发现，之后迅速流行，现已遍布全世界（陈瑞泰，1989），近40个国家和地区受到烟草黑胫病的危害。有关我国黑胫病报道始见于上世纪前阶段（方中达等，1996），烟草黑胫病在我国分布范围很广，除黑龙江省尚未发现之外，其余各植烟省区，包括台湾在内，均有发生。以河南、ft东、安徽、浙江、湖南、湖北、福建、广东、广西、云南、贵州、四川等省区发生较为普遍，危害较为严重（陈瑞泰等，1997；苏德成，1992）。世界各国对此做了深入、广泛的工作，目前研究主要集中在黑胫病致病力分化、生理生化和一些生防菌筛选方面（赵蕾等，2000）。

### 1.2.2 烟草黑胫病菌形态特征

多数研究一致认为烟草疫霉区别于其他疫霉种的特征是：异宗配合；雄器围生，藏卵器小：孢子囊多近球形，乳突明显，脱落具短柄；不对称孢子囊较常见；最高生长温度大于35℃（Stamps等, 1990; Ho, 1992）。烟草黑胫病菌在固体培养基上产生菌丝旺盛，菌丝粗细不均，无隔，有分枝，宽8.5(5～11)μm。菌丝膨大体有或无，其上有若干条放射状菌丝。孢囊梗简单合轴分枝或

不规则分枝。孢子囊卵圆形至近圆形，平均长47(23～64)μm，宽35(18-51)μm，长宽比1.3(1.2～

1.5）. 孢子囊具乳突，通常1个，少数2个，乳突半球形，大多明显，平均厚度5.8(3～8.5)μm，孢子囊顶生，常不对称，具脱落性，孢囊柄短，平均2.8(0.5～5)μm，排孢孔宽5.8(4～8.3)μm。部分孢子囊上有丝状附属物。孢子囊在条件适合时可释放5～30个游动孢子。游动孢子椭圆形、圆形或肾形，直径7～11μm，侧生双鞭，能在水中游动，遇寄主时失去鞭毛，萌发产生芽管侵入寄主。在条件不适宜时，孢子囊可直接长出芽管侵入寄主。厚垣孢子有或无，顶生或间生，平均直径32(18～51)μm。异宗配合，配对培养易产生大量卵孢子。藏卵器小，球形，壁光滑，直径

26(20～32)μm。雄器围生，近圆形或卵形，高10(8～11)μm，宽13(10～19)μm。卵孢子满器或不满器，直径22(18～26)μm，最适生长温度25～30℃，最高36℃，最低10℃（许学明，2007）。

### 1.2.3 烟草黑胫病菌Th理特征

烟草黑胫病菌的菌丝生长最适温度为28～32℃，最高36℃，最低10℃；孢子囊产生最适温度为24～28℃，最高33℃，最低13℃，孢子囊在自然界遇骤然降温3～10℃就释放出游动孢子；游动孢子活动与萌发的最适温度为20℃，最高34℃，最低7℃（朱贤朝，1996；苏德成等，1992）。也有不同研究结果，马国胜等（2007）认为，菌丝最适生长温度20℃～30℃，最高生长温度大于35℃，小于40℃，最低生长温度大于8℃，小于10℃。周志成（2004）认为适宜两菌株生长的温度为25～28℃，且在燕麦片培养基上生长21～28d的菌丝产孢能力强，该菌龄菌丝在0.1%KNO3溶液中浸泡48～72h产孢量多。王革等（1998）认为温度对菌丝体和厚垣孢子在土壤中的存活影响最为明显，低温有利于两者的存活，4℃时可分别存活2个月和3个月，25℃时可分别存活1个多

月和2个多月，且存活量较4时减少25％左右。湿度是烟草黑胫病菌重复侵染的关键因素，大田期烟草黑胫病是否流行的决定因素是湿度，而温度较少成为限制因子。雨后，田间相对湿度保持 在80%以上3～5d，就会出现发病高峰期(姚革，1996)。pH对烟草黑胫病菌生长的影响较小，在

pH3～11之间都能生长，以pH5.5最有利生长（王智发等，1985）。

自1962年首次提出烟草黑胫病存在生理分化以来，先后在美国肯塔基州鉴定出0号、1号和

3号小种，2号小种只在南非报道过（谢成颂等，1987；朱贤朝，1982）。中国也已经发现很多黑胫病菌系，大致分为强、中、弱3类，其中0号小种为优势种，亦有1号小种和一个致病型（朱贤朝等，1987）。

### 1.2.4 烟草黑胫病的症状及发病规律

烟草黑胫病菌可以在烟草的任何生育阶段侵染为害，但主要为害大田期烟株。苗床期较少发 生，但是苗期发病往往会造成烟苗成片死亡，成猝倒状，苗床湿度过大或多雨天气病苗上长满白 色菌丝，气候干燥时，病苗呈褐色干枯死亡。大田期发病则可以造成整个烟株突然凋萎并伴有根 部或茎基部变黑症状，常造成无法挽救的损失（马国胜等，2003）。移栽后以侵染烟株茎基部和根为主，发病烟株主要表现为5大症状：黑胫、腰漏、穿大褂、碟片状、黑膏药。感病烟株的茎基部出现黑褐色凹陷病斑，并迅速纵向和横向环茎扩展，严重时黑斑可环绕整个茎基部，病斑可长达

0.3~0.7m。病原菌侵染茎基部后很快向髓部扩展，病株叶片自下而上依次变黄。大雨后遇高温烈日全株叶片突然凋萎变黄。

烟草黑胫病以土传为主，风雨、流水、灌溉水、粪肥、病土、病苗、农事操作等都是其传播途径。远距离传播主要靠烟苗调运、农事操作等人为方式传播。烟草黑胫病属高温高湿型病害，其发生流行与温湿度有密切的关系。平均气温24.5~32℃最适合病菌侵染，28~32℃发病最快，低于20℃很少发病（苏德成，1992）。烟株在感病阶段（现蕾前），降雨量的多少对病情发展影响很大，雨量大，病情增长速度快，流行加重（蔡红艳等，1993）。不同年份黑胫病发生危害程度与年平均降雨量呈正相关，与温度变化呈非线形关系，随着温度上升而上升。4月份发病重，5月递减，6月上升（张修国等，2001）。烟草黑胫病菌主要以休眠菌丝体和厚垣孢子在土壤或粪肥中的病残体上越冬（陈瑞泰，1989），在死亡的烟草病组织中烟草黑胫病菌可以存活3年（Mehrotra, 1985;朱贤朝, 2002）。烟草黑胫病菌主要集中在距土表0~5cm 的范围内活动，通过伤口或直接侵入，侵染部位主要是茎基部。游动孢子在再侵染过程中起着重要作用（Duniway, 1983），游动孢子的侵入并不需要伤口。游动孢子受弱电流吸引聚集在根表面，以根冠及伤口处最多。它们在3h内发芽并直接穿人表皮，产生的菌丝迅速进入皮层细胞内部或居于细胞之间，6h 内到达中柱（陈瑞泰，

1989)。

### 1.2.5 烟草黑胫病抗性机制研究

#### 1.2.5.1 品种抗性

品种自身遗传因素对植物抗病性具有绝对性作用。选育抗病品种是最直接最有效方法。目前， 我国较抗黑胫病的烤烟品种有：豫烟2号、中烟9203、NC82、单育3号、革新3号等。中抗品种有国外引进的K346、K326、G-28、Coker371、NC37NF等，国内育成的云烟85、云烟87等（梁元存等，2003；高正良等，2004；许美玲等，2003）。

#### 1.2.5.2 栽培措施

有研究表明，改进一些栽培措施可以一定程度上减轻烤烟黑胫病的发生。黑胫病的发生与田间气候有很大关系，因此采取一些措施防止田间积水，挖好排水沟，可以适当减轻感病机会。另 外加强田间卫生管理，晴天时及时拔出病株并带出烟地，避免病株残体进行二次传染。大量研究 表明，合理轮作对减少作物病虫害具有重要作用，特别是对于土传病害来说尤为重要。另外，适时早栽可以避过高温高湿多雨季节的感病阶段以减轻田间发病（朱贤朝，1982；王家和，1994）。

#### 1.2.5.3 生理生化抗性

当植物受到病原物侵染时，植物体内往往会发生一系列生理生化变化以应对侵染，植物的抗病反应涉及植物体内一系列复杂的生理生化变化，如植物细胞内活性氧的积累与清除、次生代谢产物的产生、抗病信号的产生与转导、防卫反应的表达与调控等(Matsuyama, 1983; Montalbini等, 1986)。大量研究表明，在寄主植物和病原物非亲和性互作（抗病反应）和亲和性互作（感病反应）中这些酶与植物抗性密切相关（马春红等，2011；王桥美等，2011；房保海等，2004）。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，过氧化氢酶（catalase, CAT），过氧化物酶(peroxidase, POD)、多酚氧化酶（polyphenol oxidase, PPO）和苯丙氨酸解氨酶（phenylalanine ammonia lyase, PAL）是植物体内较重要的保护酶和防御酶，MDA是膜脂过氧化作用的产物。多数研究表明，植物体内

SOD、POD、CAT、PPO、PAL和丙二醛可以作为植物抗病性的生理指标。

活性氧（ROS）是植物进行正常生理代谢的必然产物（Scandalios, 1993），SOD和POD是膜脂过氧化重要的保护酶，承担着保持活性氧平衡的作用。当植物处于环境胁迫条件下，不利条件导致活性氧产生和消除机制失衡，这种活性氧激增诱导了SOD和POD发生相应变化以此减轻氧化伤害。江彤等研究认为，接种黑胫病菌后，感病烟草品种SOD活性明显高于抗病品种及对照，而抗病品种变化较小且呈下降趋势（江彤等，2006）。植物次生代谢过程是植物长期适应不良环境的结果，多数次生代谢产物具有抗生作用，PPO和PAL与次生代谢过程密切相关（Takahashi等，

1999）。PPO能催化多酚类氧化成醌类，抑制病虫害侵染。同时PPO也参与木质素的形成，木质素一方面增加了细胞壁抗病原物的穿透压力，另一方面限制真菌酶和毒素的扩散，也对病原菌从寄主获得水和营养物质的路径起到限制作用。PAL是植保素、木质素和酚类化合物合成的关键酶和限速酶。陈惠明等（1994）发现，PPO活性与品种抗赤星病呈正相关，汤会君等（2006）研究认为

PAL活性在感病后升高，且与烟草抗野火病正相关。

#### 1.2.5.4 生物防治

在正常情况下，土壤中存在一些致病菌的同时一定存在一些抑制或促进致病菌生长繁殖的微生物群体，这也是微生态系统平衡的表现（沈其益等，1995）。一般来说，据Broadbent（1971）报道，对烟草疫霉菌具有拮抗作用的细菌有芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)和假单孢杆菌（*Pseudomonas*

spp.），主要通过产生抗菌素而使烟草疫霉菌丝溶解。English等（1988）报道，土壤真菌中的青霉(*Penicillum* spp.)、木霉(*Trichoderma* spp.)等也是常见的拮抗菌，具有刺激其菌丝溶解、抑制菌丝生长以及重寄生等功能。同时，English等（1988）还进一步在田间土壤中采用加入由拮抗细菌(*Pseudomonas putida*)和拮抗真菌(*Trichoderma harzianum, Aspergillus carbonarius, Aspergillus terreus, Peuillum steckii*)的繁殖机构组成的复合体，使之迅速在烟草根系上定殖，占据相应的侵染敏感位点，与烟草黑胫病菌形成竞争关系，从而显著降低了烟草黑胫病菌的侵染致病机会。

Cartwrigh 等(1988)研究表明，在温室条件下用非致病双核丝核菌(nonpathogenic binucleate

*Rhizoctonia*，NBR）控制烟草黑胫病菌的效果达到了40%~70%。1999年，Patel等（1999）报道，哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)在培养皿上可以吞没烟草黑胫病菌，对烟草黑胫病菌0号小种具有很强的对抗性。Sreera mulu等（1998）报道，用哈茨木霉和*Glomus fasciculatum*于苗期防治烟草黑胫病，可以提高成苗率和提高烟苗的生长参数。王家和（1994）报道，通过分离、纯化与拮抗活性测定，筛选到一株抗烟草黑胫病菌的拮抗真菌。李梅云等（2001）研究认为，大多数木霉菌株对烟草黑胫病菌均有一定的防效，以TR13菌株在平板对峙培养中对烟草黑胫病菌的拮抗作用最明显，但在温室盆栽试验中，TR13菌株的防效仅为40.3%，而TR14和TR17在平板对峙培养中对烟草黑胫病菌的拮抗作用较小，但在温室盆栽试验中，其防效却分别达94.2%和97.6%，并据此认为

TR14和TR17是防治烟草黑胫病的有效菌株。

有些微生物的存在可以促进烟草黑胫病菌的侵染，这些微生物主要指线虫、类微动物。Dropkin

（1992）研究表明，线虫造成的伤口有利于真菌的侵入和定殖，被根结线虫感染的植物易受根部病原真菌的侵染为害。Sasser&Lucas(1990)研究表明，根结线虫可增加黑胫病的发病严重度，烟草 黑胫病大多发生在受线虫侵染的田块，且多数抗病品种明显丧失部分抗性。如果土壤中线虫发生

严重，并且移栽时烟苗带有黑胫病菌，那么，即使种植抗黑胫病品种，烟草黑胫病的发病率仍将可能达到100%。如果烟草品种对两种病原物都具有抗性，则可以生长良好。康业兵等（1990）报道，在根结线虫和烟草黑胫病混合发生的地区，凡是前期烟草根结线虫发病率高的田块，后期黑胫病流行广且为害重。林代福等（1998）通过盆栽和大田接种试验研究表明，烟草黑胫病的发生不依赖于根结线虫的侵染，但根结线虫的存在会加重烟草黑胫病的发生，根结线虫与烟草黑胫病菌混合接种比烟草黑胫病菌单独接种处理的烟草黑胫病发病率分别高11.2%和9.2%。

## 1.3 研究目的与意义

一直以来，烟草在我国国民经济中占有重要地位，2008年，云南的烟草税收占全省财政的

48.8%。烟草种植是烟草工业的基础，烟草的产量丰欠、品质高低必定会波及烟草工业。云南是全国烟草行业重要的原料基地，烟叶产量占全国总量的三分之一以上，肩负着云南卷烟工业企业和全国重点骨干卷烟企业的原料保障任务。根据2010年3月全国工业企业提供数据，在全国工业企业烟叶库存量中，云南烟叶占30.6%（云南工业77.42%、省外工业19.12%）。随着卷烟品牌快速发展，目前全国工业企业对云南烟叶需求量在逐步增大。但是与此同时，随着烤烟种植规模的逐年扩大，致使我国大部分烟区连作现象普遍。据统计，我国烤烟连作面积占烤烟总种植面积的

30%～60%，经济损失严重（时鹏等，2011）。烤烟长期连作造成土壤理化性状变差，养分失衡，烟叶产质量下降，病虫害特别是土传病虫害抗性降低（张科等，2010；邓阳春等，2010；于方玲等，

2010），严重制约了我国烟叶生产的可持续发展。烟草黑胫病菌(*Phytophthora nicotianae*)是一种可危害所有栽培烟草的毁灭性土传病害，破坏力极强且蔓延较快，大田侵染后常造成烟株整株死亡， 我国平均每年因此病害损失1.2亿元人民币（孔凡玉等，1995）。云南烟区是黑胫病的多发区，每年因其造成的经济损失巨大（尚志强，2007），土传病害是制约烤烟产质量提高的重要障碍因子。从目前已发表的报道来看，烤烟黑胫病的研究主要集中在品种抗性鉴定、生化抗性、拮抗菌筛选等方面，也在生物防治方面取得了一定成果，但效果并不十分理想。

对于土传病害来说，根系是烟株抵御黑胫病菌入侵及侵染的主要部位，那么有理由相信烤烟根际环境一定是与黑胫病存在相互作用的，对其他一些作物研究也发现，根土界面环境对作物抵御土传病原菌入侵至关重要。但目前为止尚未见从根系角度研究烤烟黑胫病抗性机制的报道。另外，根际环境区别与非根际环境的一个主要特点就是根系通过其分泌物质修饰着根际环境。目前， 有关根系分泌物的研究多侧重根系分泌物的的种类及其影响因素、分泌机制、对植物生长发育的影响等方面，而有关根系分泌物与土传病害发生关系方面的研究只有零星报道，但这些报道也同时说明了植物对土传病害的抗病性差异是可以通过根系分泌物差异体现出来。植物根系分泌物是根际微生物主要的碳源和能源，其种类和数量也决定根际微生物区系的种类、数量及分布，当病原微生物入侵时也必然会引起根系分泌物和根际微生物之间的相互作用。

不同作物种类或同种作物不同生育时期其根系分泌物组分存在差异，这种差异主要受品种遗 传特性及生长代谢功能影响，对大豆、黄瓜、茄子、棉花等作物研究发现，不同抗感土传病害品 种根系分泌物种类和数量存在差异。大量研究发现，酚酸类物质是根系分泌物中最具化感潜力的 物质，其对周围作物及环境均能产生较大影响，有机酸类物质也在根系分泌物较为常见，且对植 物生长发育同样具有重要作用。同时，大量研究表明，根系分泌物可以直接作用于病原微生物从

而表现为促进或抑制病原物的生长。基于此，科技人员也在不断尝试从众多根系分泌物中找到一 些特异性物质，以期能更好了解作物抗性机制以期能利用这些物质进行病害防治。

目前作物连作现象普遍，连作给农业生产带来巨大损失。作物连作发生主要有两个原因，一 是连作导致大量病原微生物在土壤中聚集，二是土壤中自毒物质的积累。根系分泌物是土壤有毒 物质的主要来源，大量研究表明，根系分泌物在土壤中积累会抑制种子萌发、幼苗生长、养分吸 收等，并最终表现为作物减产，病虫害加重等连作障碍。为减少外界环境特别是土壤微生物的影 响，目前根系分泌物与连作障碍的研究基本上均采用模拟连作方法，以期明确根系分泌物在连作 障碍中的作用。

本研究以4个不同烤烟品种（云85、K326、净叶黄和红花大金元）为试验材料，通过盆栽和溶液培养等方法研究了不同烤烟品种不同生育时期根际微生物数量和根系分泌物中酚酸和有机酸 种类和含量差异及其与品种抗性的相关性，并模拟连作条件研究了根系分泌物和酚酸对幼苗生长 的影响。旨在丰富烤烟黑胫病抗性机制研究，明确病害发生机制，同时为今后开展生物防治和抗 性栽培提供必要的理论依据。

# 第二章 不同烤烟品种根系分泌物酚酸组分差异及其对黑胫病菌

Th长的影响

## 2.1 材料与方法

### 2.1.1 供试材料

供试品种为不同烤烟品种：云85（高抗黑胫病品种，HR）、K326（中抗黑胫病品种，MR）、净叶黄（中感黑胫病品种，MS）和红花大金元（高感黑胫病品种，HS），由云南烟草科学研究所提供。常规烤烟漂浮育苗，均采用裸种，表面消毒、浸种和催芽后播于育苗盘上，常规管理待其长到五叶一心时备用。采用菌丝块创伤茎基部接种方法接种（黄成江等，2006），接种3天后拆棉花，并于第10天按照病情分级标准分级，并计算病情指数。按照国家行业标准YC/T39-1996和YC/T41-1996对各品种进行抗性评价，结果见表2。

表2 供试品种抗病性评价

Table 2 Resistance evaluation of testing cultivars

| 品种 Varieties | 平均病情指数 Disease index | 抗性评价 Resistance evaluation |
| --- | --- | --- |
| 云 85 | 19.84 | HR |
| K326 | 38.70 | MR |
| 净叶黄 | 57.26 | MS |
| 红花大金元（红大） | 89.31 | HS |

注：抗病：病情指数25.00以下，用HR表示；中抗：病情指数25.01～50.00，用MR表示；中感：50.01～75.00，用MS表示；感病：病情指数75.00以上，用HS表示。

供试病原菌为烤烟黑胫病菌，菌株由烟草学院分离并保存，菌株经PDA斜面活化后，转入适于黑胫病菌生长的燕麦培养基（OA，1000mL培养基中含燕麦片30.0g，琼脂20.0g）进行纯培养，

27℃黑暗培养10d后备用。

### 2.1.2 仪器与试剂

仪器：Agilent 1200高效液相色谱仪（四元泵，可变波长检测器，自动进样器，控温箱），Agilent化学工作站，旋转蒸发仪，strtorius电子微量分析天平（北京赛多利斯天平有限公司），有机相针式过滤器（孔径0.45μm），有机滤膜（孔径0.45μm），G4漏斗。

试剂：乙酸、对羟基苯甲酸、香草酸、香豆酸、丁香酸、阿魏酸均为国产分析纯，超纯水。

### 2.1.3 材料培养及根系分泌物收集

采用常规烤烟漂浮育苗，种子表面消毒、侵种和催芽后播于育苗盘上，烟苗长至4叶1心时

小心取出烟苗，用蒸馏水洗去基质，移至黑色塑料桶中进行水培，每桶定植1株，每个品种定植

10株。营养液采用Hogland营养液（表3）和Amon微量元素营养液（表4），营养液以淹没幼苗根部为度，每天加去离子水至刻度，每天通氧，每次1h，每3d用1mol/L HCl和1mol/L NaOH 将

pH保持在6.0±0.2，每7d更换一次营养液。

于烤烟团棵期、旺长期、现蕾期和成熟期收集各品种根系分泌物，收集方法为：将烟苗从营养液中取出，先用自来水冲洗3次，后用蒸馏水冲洗3次，再用去离子水冲洗3次，冲洗过程中尽量避免伤根。在原光照条件下将烟株移植到盛有500mL无菌去离子水的烧杯中培养，烧杯用锡箔纸包裹，收集时间为6 个小时（9:00～15:00），收集期间持续通氧，收集完毕后用去离子水定容至500mL，并立即用布氏漏斗过0.22µm有机相滤膜过滤，将滤液转入1000mL分液漏斗中，萃取剂采用二氯甲烷，萃取3次，每次100mL，收集有机相并转入旋转蒸发瓶，40℃旋转蒸发至干，超纯水洗瓶并定容至2mL，低温（-20℃）保存待用。

接种试验采用室内溶液培养方法。育苗方法同上，烟苗长至4叶1心时小心取出烟苗并移入

250mL三角瓶中，定量加入200mL营养液，其他操作同上。培养2周后进行接种处理，接种采用菌丝块创伤接种法，具体步骤参照王革（1998）的方法。于接种后前、接种后第2天、第4天和第6天收集根系分泌物，收集体积为200mL，其他操作步骤同上。

表3 Hogland完全营养液营养液

Table 3 Hogland’s completely nutrient solution

| 试剂 Reagent | 标准浓度 Standard concentration |
| --- | --- |
| Ca(NO3)2·4H2O | 1.18g/L |
| KNO3 | 0.51g/L |
| MgSO4·7 H2O | 0.49g/L |
| KH2PO4 | 0.14g/L |
| Fe-EDTA | 20mg/L |

表4 Amon微量元素营养液

Table 4 Amon nutrient solution

| 试剂 Reagent | 标准浓度 Standard concentration |
| --- | --- |
| H3BO3 | 2.86mg/L |
| MnCl2·4H2O | 1.81mg/L |
| ZnSO4·7 H2O | 0.22mg/L |
| CuSO4·5 H2O | 0.08mg/L |
| H2Mo4·4H2O(85%Mo2O) | 0.09mg/L |

### 2.1.4 方法

#### 2.1.4.1 不同烤烟品种根系分泌物酚酸种类和含量测定

##### 2.1.4.1.1 酚酸标准溶液配制

分别称取对羟基苯甲酸、香草酸、香豆酸、丁香酸、阿魏酸各0.1000g，用少量甲醇溶解并用超纯水定容至1000mL，制成质量浓度为100μg/mL的酚酸混合储备液，将混合储备液分别稀释5倍、10倍、20倍、40倍和100倍作为标准工作液。

##### 2.1.4.1.2 色谱条件

色谱柱为Synergi 4u Hydro-RP 80A色谱柱(250×4.6mm ID)，流动相为甲醇和乙酸水溶液，流速为1.0mL/mim，进样量为10μL，检测波长280nm，分析时间30min。利用不同溶质的保留值规律初步定性，再在样品中加入标准溶液，根据峰高的突增进一步验证色谱峰。定量采用峰面积外标法定量。

#### 2.1.4.2 不同酚酸对黑胫病菌生长的影响

##### 2.1.4.2.1 酚酸储备液配置

准确称取对羟基苯甲酸、香草酸、香豆酸、丁香酸、阿魏酸各0.2000g，各用5mL甲醇溶解并用超纯水定容至100mL，配成浓度为2.0g/L酚酸储备液。用G4漏斗过0.22µm有机滤膜，滤液即为酚酸和有机酸储备液，备用。

##### 2.1.4.2.2 酚酸培养基制备

用移液器分别准确移取酚酸储备液0.10mL、0.50mL、1.00mL和5.00mL于灭菌培养基中

（Ф=9cm），分别加入燕麦培养基18.00mL、16.00mL、14.00mL和12.00mL，使培养基中有机酸浓度为0.01g/L、0.05g/L、0.10g/L和0.50g/L，每浓度4次重复，以不加酚酸培养基为对照。

##### 2.1.4.2.3 不同酚酸对黑胫病菌落生长的影响

参考李梅云（2006）方法，略有改动：每皿接种一个菌落直径、厚度和形态均相同的供试菌株菌饼（Ф=0.5cm）。接种后将培养皿置于28℃恒温培养箱中黑暗培养，菌种培养2天、3天、4天和5天后测定菌落直径，以不加酚酸培养基为对照，每个处理4次重复。

##### 2.1.4.2.4 不同酚酸对黑胫病孢子囊产生量和游动孢子释放率的影响

在培养10d的含不同酚酸的培养基上用打孔器随机分别打取菌落直径、厚度和形态均相同的

10块菌饼（Ф=0.5cm），移入含15ml 0.2%KNO3(W/V，灭菌去离子水配制)的培养皿中（王万能等，

2005），置28℃黑暗诱导5d。充分混匀后，随机挑取4块菌丝块在显微镜下（10×16）观察3视野，计算每个视野的孢子囊数目，每个处理重复4次。将各处理培养皿置4℃冰箱0.5h，再移至培养28℃恒温培养箱中黑暗培养24h，取出放置0.5h后每块菌丝块随机镜检5视野，观察游动孢子释放情况（杨建卿等，2001），参考左豫虎（2002）的方法计算每隔视野空壳孢子囊数占视野总孢子囊数的百分比。

### 2.1.5 数据处理和统计方法

实验数据采用Excel2003初步处理和作图，统计分析采用SPSS13.0统计分析软件对数据进行方差分析(One way ANOVA)，再利用Duncan's新复极差法进行多重比较分析。

## 2.2 结果与分析

### 2.2.1 色谱条件选择及优化

#### 2.2.1.1 波长

分别对对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、香豆酸和阿魏酸在190～400nm波长范围内扫描，，选取210nm、230nm、245nm和280nm进行比对发现，采用280nm波长较为适宜。

#### 2.2.1.2 流动相

实验采用反相色谱法中最常用的甲醇-水体系，选取30%甲醇-70%水、25%甲醇-75%水、15%甲醇-85%水、10%甲醇-90%水进行对比，结果发现5种酚酸在各流动相中均没有很好的选择性和峰型（图略），其中对羟基苯甲酸、香草酸和丁香酸不能分开，且随甲醇比例的下降各物质保留时间延长，香豆酸和阿魏酸峰型扁平，有拖尾现象。

酚酸结构中的酚羟基、羧基在水溶液中容易发生电离，极性增强，容易造成双重保留，色谱峰拖尾，因此，此流动相中需要加入少量酸性调节剂，以有效抑制羟基解离，增加溶质疏水性，改善分离效果。本实验选择较为常用的乙酸作为调节剂，通过对浓度为0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%乙酸水溶液对比发现，甲醇-乙酸水溶液体系明显改善了色谱峰型及分离度，乙酸浓度越大，保留时间越长，综合考虑采用30%甲醇-0.2%乙酸溶液较为适宜，峰型和分离度最好，分析时间适中，5种酚酸类化合物色谱图见图1，样品色谱见图2。进样量和流速对各酚酸的保留值和峰型也有影响，当进样量为5μL时，保留时间增大，进样量为10μL和20μL时，保留值和峰型差异不大，因此进样量选用10μL，流速为1.0mL/min。因此，流动相采用30%甲醇-0.2%乙酸体系，进样量

10μL，流速1.0mL/min。

0

5

10

15

20

25

30

min

mAU

12

10

8

6

4

2

0

3

1

2

4

5

图1 酚酸标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of phenolic acid standards

注(Note): 1对羟基苯甲酸（10.839）；2香草酸（12.624）；3丁香酸（13.688）；4 香豆酸（24.955）；5 阿魏酸（28.970）。1ρ-hydrobenzoic acid; 2 Vanillic acid; 3 syringic acid; 4 Coumaric acid; 5 Ferulic acid

0

5

10

15

20

25

30

min

mAU

10

8

6

4

2

0

2

1

3

图2 样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of sample

注(Note): 1对羟基苯甲酸（10.839）；2丁香酸（13.688）；3阿魏酸（28.970）1ρ- hydrobenzoic acid; 2 syringic acid; 3 Ferulic acid

#### 2.2.1.3 线性关系和检出限

对各酚酸标准溶液浓度与其相应峰面积进行回归，线性回归方程、线性范围及检出限见表5。通过以上研究认为，本研究建立的同时检测多种酚酸的高效液相色谱方法，重现性好，保留时间和峰面积的变异系数较小，工作曲线线形良好，检出限低。

表5 各种酚酸的回归分析和检出限

Table 5 Regression analysis and detection limit of the five phenolic

| 酚酸  Phenolic | 回归方程  Linear regression equation | 相关系数(r)  Correlation coefficient | 线性范围  (μg/mL) Linear range | 检出限(μg/mL) Detection limit |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 对羟基苯甲 ρ-hydrobenzoic acid | y=14.20673x－14.87927 | 0.99911 | 0.50～30.0 | 0.032 |
| 香草酸 Vanillic acid | y=17.09268x－12.59971 | 0.99947 | 0.25～25.0 | 0.024 |
| 丁香酸 Syringic acid | y=29.45403x－20.10864 | 0.99965 | 0.50～20.0 | 0.020 |
| 香豆酸 Coumaric acid | y=22.32832x－43.16395 | 0.99940 | 0.50～20.0 | 0.010 |
| 阿魏酸 Ferulic acid | y=9.86471x－14.72941 | 0.99548 | 0.50～25.0 | 0.025 |

注（Note）：检出限按3倍信噪比计算(S/N=3). The detection limit by three times to the ratio of signal noise (S/N= 3).

### 2.2.2 不同烤烟品种根系分泌物酚酸种类和数量差异

#### 2.2.2.1 不同烤烟品种不同生育期根系分泌物中酚酸种类和数量比较

在整个烤烟生育期间不同品种根系分泌物中共检出4种酚酸类物质，分别为对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸和香豆酸（表6）。根系分泌物中酚酸种类以对羟基苯甲酸和丁香酸为主，香草酸

和香豆酸仅在HR和MR中团棵期被检出。

HR整个生育期未检出对羟基苯甲酸，MR团棵期和成熟期检出，且成熟期显著大于团棵期（*p*

＜0.05），MS和HS团棵期、旺长期和成熟期均检出对羟基苯甲酸，含量大小为成熟期＞团棵期

＞旺长期，且各时期间达显著差异（*p*＜0.05）。不同品种均检出丁香酸，其中HR和MR旺长期、现蕾期和成熟期检出，且含量随生育进程逐渐下降，各时期间差异显著（*p*＜0.05），MS成熟期未检出丁香酸，各时期含量大小为旺长期＞团棵期＞现蕾期，且各时期间差异显著（*p*＜0.05）。HS各时期均检出丁香酸，各时期含量大小为旺长期＞团棵期＞现蕾期＞成熟期，且各时期有显著差异（*p*＜0.05）。同一生育时期不同品种间酚酸类物质种类和含量也存在差异（图3），对羟基苯甲酸团棵期MS＞HS＞MR，且MS和HS显著高于MR（*p*＜0.05），旺长期和成熟期HS含量显著高于MS和MR。丁香酸含量团棵期HS显著高于MS，旺长期HS＞MS＞HR＞MR，且各品种间具有显著差异（*p*＜0.05），现蕾期HR＞HS＞MR＞MS，且各品种间具有显著差异，成熟期HR＞

MR＞HS，且品种差异显著（*p*＜0.05）。

以上分析说明，不同烤烟根系分泌物中酚酸类物质主要以对羟基苯甲酸和丁香酸为主，酚酸种类和含量因不同时期及不同品种存在差异，可检出对羟基苯甲酸品种各时期差异显著且表现为 成熟期＞团棵期＞旺长期；可检出丁香酸品种各时期间差异亦显著且表现为旺长期＞团棵期＞现蕾期＞成熟期。两种酚酸含量与品种抗性存在一定相关性，抗黑胫病品种较感病品种较少或不检 出对羟基苯甲酸，且感病品种对羟基苯甲酸检出量均大于抗病品种，团棵期和旺长期感病品种丁 香酸检出量均大于抗病品种。

表6 不同品种不同Th育期根系分泌物酚酸种类和数量差异(μg/mL)

Table 6 Difference of species and quantity of phenolic in root exudates of different resistance varieties

| 酚酸  Phenolics | 生育期  Growth stage | 云 85  HR | K326  MR | 净叶黄  MS | 红大  HS |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | A | — | (0.9421±0.0157) | (0.9714±0.0022)b | (0.9632±0.0003)b |
| 对羟基苯甲酸  ρ-hydrobenzoic acid | B | — | — | (0.8786±0.0138)a | (0.9399±0.0141)a |
| C | — | — | — | — |
|  | D | — | (2.3967±0.0988) | (2.4395±0.0109)c | (6.6504±0.0086)c |
|  | A | (0.7201±0.0081) | — | — | — |
| 香草酸  Vanillic acid | B | — | — | — | — |
| C | — | — | — | — |
|  | D | — | — | — | — |
|  | A | — | — | (0.7857±0.005)b | (0.9415±0.0034)c |
| 丁香酸  Syringic acid | B | (1.8551±0.0103)c | (0.8060±0.0069)c | (6.2229±0.0139)c | (6.2639±0.0079)d |
| C | (1.0350±0.0413)b | (0.7550±0.0329)b | (0.0801±0.0016)a | (0.8276±0.0034)b |
|  | D | (0.7222±0.0064)a | (0.5877±0.0073)a | — | (0.0532±0.0026)a |
|  | A | — | (0.2872±0.0027) | — | — |
| 香豆酸  Coumaric acid | B | — | — | — | — |
| C | — | — | — | — |
|  | D | — | — | — | — |

注(Note)：表中数据为3次重复平均值，“-”表示未检测到。A、B、C和D分别表示各烤烟品种不同生育时期，A表示团棵期、B表示旺长期、C表示现蕾期、D表示成熟期。不同小写字母表示同一品种不同生育时期酚酸含量差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means of three replicates. - indicate

No detected. A, B, C and D indicate different growth stage of flue-cured tobacco respectively, A indicate rosette stage, B indicate rapid growing stage, C indicate flower budding stage and D indicate mature stage. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different growth stage in same cultivar.

HR MR MS HS HR MR MS HS



a a

a b b

a b

ND ND ND

ND

7.00 b



c d

a b

d

b

c

c b

ND

a

ND a

b

a

7.00

6.00 6.00

对羟基苯甲酸浓度（ µg /mL） ρ-hydrobenzoic acid

5.00

4.00

3.00

2.00

1.00

0.00

团棵期旺长期现蕾期成熟期生育时期

Growth stage

5.00

4.00

丁香酸浓度（ µg /mL） Syringic acid

3.00

2.00

1.00

0.00

团棵期旺长期现蕾期成熟期生育时期

Growth stage

图3 不同烤烟品种根系分泌物对羟基苯甲酸和丁香酸含量比较(μg/mL)

Fig. 3 Compare concentration ofρ-hydrobenzoic acid and Syringic acid in root exudate of different varieties

注(Note)：图中数据为3次重复平均值，ND表示未检测到。不同小写字母表示同一生育时期不同品种酚酸含量差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means of three replicates and" -“

Indicate no detected. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different cultivar in same growth stage

#### 2.2.2.2 不同烤烟品种根系分泌物中酚酸分泌总量比较

不同品种根系分泌物中酚酸类物质总量随生育时期变化趋势存在差异（表7），HR 酚酸总量对生育进程先增后减小趋势，且旺长期＞现蕾期＞成熟期＞团棵期；MR酚酸总量随生育进程呈先减小后增加趋势，且成熟期＞团棵期＞旺长期＞现蕾期；MS分泌总量随生育进程先增加，至旺长期最大，之后大幅下降，成熟期稍有增加，且旺长期＞成熟期＞团棵期＞现蕾期；HS酚酸总量随生育进程先大幅增加，至旺长期最大，之后大幅下降，现蕾期最小，最后又大幅增加。从整个生育时期分泌的酚酸总量来看，HS＞MS＞MR＞HR。

表7 不同烤烟品种根系分泌酚酸总量随Th育期的变化(μg/mL)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 生育期 Growth stage | 云 85 HR | K326 MR | 净叶黄 MS | 红大 HS |
| 团棵期 Rosette stage | 0.7201 | 1.2293 | 1.7571 | 1.9047 |
| 旺长期 Rapid growing stage | 1.8551 | 0.8060 | 7.1015 | 7.2038 |
| 现蕾期 Flower budding stage | 1.0350 | 0.7550 | 0.0801 | 0.8276 |
| 成熟期 Mature stage | 0.7204 | 2.9845 | 2.4395 | 6.7036 |
| 酚酸总量 Total phenolic acid | 4.3306 | 5.8465 | 11.3061 | 16.6397 |

Table 7 Change of total phenolic of root exudates in different growth stage of different resistance varieties

#### 2.2.2.3 不同烤烟品种根系分泌物中酚酸分泌总量与病情指数相关性比较

从不同品种不同生育期酚酸总量与病情指数相关性分析可知（表8），除现蕾期酚酸分泌总量与病情指数之间呈负相关外，其余各时期均与病情指数正相关，其中整个生育期分泌酚酸总量与病情指数之间显著正相关（*p*＜0.05），即酚酸分泌总量与品种抗性负相关，抗病性越强的品种根系分泌酚酸总量越少，说明烤烟根系分泌中酚酸含量与品种抗性密切相关。

表8 不同烤烟品种不同Th育时期酚酸总量与病情指数的相关性比较

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 团棵期  Rosette stage | 旺长期  Rapid growing stage | 现蕾期  Flower budding stage | 成熟期  Mature stage | 酚酸总量  Total phenolic acid |
| 病情指数  Disease index | 0.9405 | 0.8241 | -0.2744 | 0.9309 | 0.9858\* |

Table 8 Compare of correlation coefficient between total phenolic and disease index of different resistance varieties in different growth stage

注(Note): \*表示相关系数0.05水平显著，\*\*表示相关系数0.01水平显著。\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). \*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### 2.2.3 接种黑胫病菌后不同烤烟品种根系分泌物酚酸种类和数量差异

#### 2.2.3.1 接种后不同烤烟品种根系分泌物酚酸含量比较

接种后不同抗性品种根系分泌物中检出3种酚酸，分别是对羟基苯甲酸、丁香酸和香草酸，其中香草酸仅在未接种HR品种中检出，浓度为0.0221µg/mL。接种黑胫病菌后不同烤烟品种根系分泌物中对羟基苯甲酸浓度差异见表。接种前只有HS中检出对羟基苯甲酸，接种黑胫病菌后各品种根系分泌物中对羟基苯甲酸呈上升趋势，上升幅度依品种存有差异，接种后第2天和第6天各品种对羟基苯甲酸浓度大小均为HS＞MS＞MR＞HR，第4天为HS＞MS＞HR＞MR。接种黑胫病菌后不同抗性烤烟品种根系分泌物中丁香酸浓度差异见表9，接种前除中抗品种丁香酸外均检出丁香酸，且MS＞HS＞HR，但无显著差异（*p*＞0.05），接种后各品种根系分泌物中丁香酸均呈上升趋势，且接种期间丁香酸浓度大小均为HS＞MS＞MR＞HR，且基本上均达显著差异（*p*

＜0.05）。

表9 接种黑胫病后不同烤烟品种根系分泌物中酚酸含量差异(µg/mL)

Table 9 Compare concentration of phenolic acid in root exudate of different cultivars after inoculating

Phytophora parasitica var. nicotiana

| 酚酸  Phenolic | 品种  Cultivars | 接种前  Before inoculation |  | 接种后 After inoculation |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2d | 4d | 6d |
|  | HR | ― | (0.0405±0.0018)a | (0.1407±0.0130)a | (0.2523±0.0300)a |
| 对羟基苯甲酸  ρ-hydrobenzoic acid | MR | ― | (0.0672±0.0154)b | (0.1363±0.01 57)a | (0.3460±0.0465)b |
| MS | ― | (0.0719±0.0080)b | (0.1835±0.0262)b | (0.5588±0.0049)c |
|  | HS | (0.0364±0.0033)a | (0.0922±0.0082)c | (0.3331±0.0270)c | (0.7929±0.0819)d |
|  | HR | (0.0108±0.0094)a | (0.0172±0.0005)a | (0.0185±0.0007)a | (0.0205±0.0024)a |
| 丁香酸  Syringic acid | MR | ― | (0.0248±0.0006)a | (0.1466±0.0157)b | (0.2070±0.0148)b |
| MS | (0.0174±0.0004)a | (0.1040±0.0084)b | (0.2800±0.0224)c | (0.4537±0.0098)c |
|  | HS | (0.0171±0.0003)a | (0.2718±0.0288)c | (0.3435±0.0116)d | (0.6847±0.0085)d |

注（Note）:数据为平均数±标准差，n=3，“―”表示未检测到。不同小写字母表示相同接种天数不同品种对羟基苯甲酸和丁香酸浓度差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates, and"―“indicate no detected. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test amongρ-hydrobenzoic acid and syringic acid concentration in same time of inoculation.

#### 2.2.3.2 接种后不同烤烟品种根系分泌物酚酸总量比较

接种黑胫病菌后不同抗性品种根系分泌物中酚酸总量的差异见表10，接种后0~6d各品种酚酸浓度大小均为HS＞MS＞MR＞HR。以上分析说明，接种黑胫病菌后根系增加了酚酸的分泌量，且随接种后时间分泌量加大。

表10 接种黑胫病后不同烤烟品种根系分泌物中酚酸总量差异(µg/mL)

Table 10 Compare content of total of phenolic acid in root exudate of different cultivars after inoculating

Phytophora parasitica var. nicotiana

| 品种  Varieties |  | 接种后 After inoculation | |  | 0~6d 平均  Average |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0d | 2d | 4d | 6d |
| HR | 0.0108 | 0.0577 | 0.1592 | 0.2728 | 0.1251 |
| MR | ― | 0.0900 | 0.2829 | 0.5530 | 0.2320 |
| MS | 0.0174 | 0.1759 | 0.4635 | 1.0125 | 0.4173 |
| HS | 0.0535 | 0.3640 | 0.6766 | 1.4776 | 0.6429 |

注（Note）:数据为平均数±标准差，n=3，“―”表示未检测到。Data are means±standard deviation of three replicates, and"―“indicate no detected.

#### 2.2.3.3 接种后不同烤烟品种根系分泌物酚酸与病情指数相关性比较

从相关分析结果可以得出（表11），接种黑胫病后不同抗性品种根系分泌物中对羟基苯甲酸浓度与病情指数呈正相关，其中第2d和接种后0~6d平均值与病情指数显著正相关（*p*＜0.05），第6d与病情指数极显著正相关（*p*＜0.01）。接种后丁香酸第2d和第4d与病情指数显著正相关（*p*

＜0.05），第6d和接种后0~6d平均值与病情指数极显著正相关（*p*＜0.01）。接种后不同品种根系分泌物中检出酚酸总量与病情指数全部正相关，其中第2d酚酸总量与病情指数显著正相关（*p*＜0.05），第4d、6d和0~6d平均值与病情指数极显著正相关（*p*＜0.01）。以上分析说明，接种黑胫病菌后不同抗性品种根系分泌物中对羟基苯甲酸、丁香酸和酚酸总浓度与病情指数正相关，即与品种抗性负相关。

表11 接种后不同烤烟品种根系分泌物中酚酸浓度与病情指数的相关性比较

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 接种后 After inoculation | |  |  |
|  | 酚酸  Phenolic acid | 0d | 2d | 4d | 6d | 平均  Average |
| 病情指数  Disease index | 对羟基苯甲酸  ρ-hydrobenzoic acid | ― | 0.9624\* | 0.9308 | 0.9929\*\* | 0.9695\* |
|  | 丁香酸  Syringic acid | 0.5740 | 0.9623\* | 0.9587\* | 0.9920\*\* | 0.9935\*\* |
|  | 酚酸总量  Total phenolic acid | 0.8738 | 0.9798\* | 0.997\*\* | 0.9944\*\* | 0.9644\*\* |

Table 11 Compare of correlation coefficient betweenρ-hydrobenzoic acid and disease index of different resistance cultivars after inoculating *phytophora parasitica* var. *nicotiana*

注(Note):\*表示相关系数0.05水平显著; \*\*表示相关系数0.01水平显著。\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). \*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### 2.2.4 不同酚酸对黑胫病菌Th长的影响

#### 2.2.4.1 不同酚酸对黑胫病菌菌落生长的影响

表12 不同酚酸对黑胫病菌菌落Th长的影响(cm)

Table 12 Effect of different phenolic on growth of phytophora parasitica var. nicotiana

| 酚酸  Phenolic acids | 浓度(g/L) Concentration |  | 培养时间 Culture time | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2d | 3d | 4d | 5d |
|  | 0.01 | （5.87±0.46 ）bc | （7.25±0.44 ）c | （8.50±0 .00）c | （8.50±0 .00）c |
| 对羟基苯甲酸  ρ-hydrobenzoic acid | 0.05 | （6.19±0.18 ）c | （6.48±0.28 ）bc | （8.17±0.29 ）c | （8.33±0.15 ）c |
| 0.10 | （4.68±0.53 ）b | （6.08±0.88 ）b | （6.98±0.44 ）b | （7.38±0.59 ）b |
| 0.50 | （0.53±0.06 ）a | （0.73±0.4 0）a | （1.15±0.57 ）a | （1.43±0.51 ）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）b | （6.99±0.72 ）bc | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.01 | （5.63±0.38 ）b | （7.62±0.13 ）d | （8.42±0.14 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.05 | （5.10±1.43 ）b | （6.03±0.41 ）c | （8.25±0 .00）c | （8.50±0 .00）c |
| 香草酸  Vanillic acid | 0.10 | （1.42±0.73 ）a | （3.57±1.42 ）b | （4.68±1.36 ）b | （5.93±1.36 ）b |
|  | 0.50 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）b | （6.99±0.72 ）cd | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.01 | （6.55±0.49 ）c | （7.83±0.38 ）c | （8.42±0.14 ）c | （8.50±0 .00）b |
|  | 0.05 | （5.08±0.52 ）b | （7.67±0.29 ）c | （8.17±0. 29）c | （8.50±0 .00）b |
| 丁香酸  Syringic acid | 0.10 | （4.42±0.88 ）b | （6.08±1.02 ）b | （7.17±0.14 ）b | （7.93±0.35 ）b |
|  | 0.50 | （0.62±0.03 ）a | （0.92±0.31 ）a | （1.40±0.46 ）a | （1.72±0.66 ）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）b | （6.99±0.72 ）bc | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）b |
|  | 0.01 | （5.78±0.51 ）c | （7.97±0.26 ）c | （8.50±0 .00）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.05 | （5.00±0.43 ）c | （7.20±0.26 ）c | （8.25±0.25 ）c | （8.50±0 .00）c |
| 香豆酸  Coumaric acid | 0.10 | （3.22±1.05 ）b | （5.20±2.19 ）b | （6.12±1.27 ）b | （7.45±1.04 ）b |
|  | 0.50 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0. 00）a | （0.50±0.00）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）c | （6.99±0.72 ）c | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.01 | （6.07±0.53 ）c | （7.25±0.43 ）c | （8.25±0 .00）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.05 | （4.82±0.65 ）c | （6.73±0.53 ）c | （8.02±0.2 0）c | （8.50±0 .00）c |
| 阿魏酸  Ferulic acid | 0.10 | （3.25±0.59 ）b | （4.80±0.7 0）b | （5.92±0.73 ）b | （6.77±0.49 ）b |
|  | 0.50 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
|  | CK | （4.88±1 .10）c | （6.99±0.72 ）c | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |

注（Note）:数据为平均数±标准差，n=4。不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间菌落直径差异达5%显著水平（*p*

＜0.05，字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic.

五种酚酸对黑胫病菌落直径的影响均表现为促进或抑制（表12）。具体来看，对羟基苯甲酸在浓度为0.01g/L时明显促进了菌落生长，随作用浓度增大，促进作用消失且逐步转变为抑制作用，抑制强度随作用浓度增加而增大，作用浓度为0.10g/L和0.50g/L时菌落直径显著低于对照（*p*

＜0.05）。香草酸在作用浓度为0.01g/L 和0.05 时均促进了黑胫病菌菌落生长，当作用浓度大于

0.10g/L和0.50g/L时菌落直径显著低于对照（*p*＜0.05）。丁香酸在作用浓度为0.01g/L和0.05g/L时均促进了黑胫病菌菌落生长，当作用浓度为0.50g/L时抑制菌落生长且显著低于对照（*p*＜0.05）。香豆酸在作物浓度为0.01g/L和0.05时均促进了黑胫病菌菌落生长，作用浓度为0.10g/L时菌落直

径显著低于对照（*p*＜0.05），作用浓度为0.50g/L时菌落不生长。阿魏酸仅在作用浓度为0.01g/L促进黑胫病菌生长，其他浓度均表现为抑制作用，且随作用浓度增加抑制作用增大，0.50g/L时菌落不生长。以上结果说明，酚酸类物质对黑胫病菌落生长具有促进或抑制作用，作用方式和强度由酚酸类物质作用浓度决定，当作用浓度小于0.10g/L时，各种酚酸对黑胫病菌落生长具有促进作用，作用浓度大于0.10g/L时则表现为抑制生长。

#### 2.2.4.2 不同酚酸对黑胫病菌孢子囊产生量的影响

添加不同酚酸对烤烟黑胫病菌孢子囊生成量的影响存在差异（图4）。各种酚酸对孢子囊生成量具有促进或抑制作用，具体来看，对羟基苯甲酸、丁香酸和香豆酸在作用浓度为0.01g/L 和

0.05g/L 时对黑胫病菌孢子囊产生量均具有促进作用且均显著高于对照（*p*＜0.05），作用浓度为

0.01g/L时促进作用大于浓度为0.05g/L，随浓度加大，这种促进作用转变为抑制，且抑制作用随作用浓度增加而加大，三种酚酸除香豆酸在作用浓度为0.50g/L时没有产生孢子囊外，均显著小于对照（*p*＜0.05）。阿魏酸对黑胫病菌孢子囊生成影响主要为抑制作用，作用浓度为0.01g/L时与对照相差不大（*p*＞0.05），之后随作用浓度增加抑制作用增大，当浓度为0.50g/L时完全抑制了孢子囊的产生。在相同作用浓度下，对羟基苯甲酸、丁香酸和香豆酸对黑胫病菌孢子囊产生量的促 进作用较大，香草酸和阿魏酸抑制作用更大。以上结果说明，这5种酚酸对黑胫病孢子囊的产生具有直接作用，且促进或抑制取决于作用浓度。

CK 0.01g/L 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L



20.00

18.00

16.00

14.00

孢子囊数量（个）

Sporangium yield

12.00

10.00

8.00

6.00

4.00

2.00

0.00



d

d

c

d

c d c

b

c c

d

c

cd

a d

b c

b

b

b

a

a

a

a

b

a

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸阿魏酸

ρ-hydrobenzoic acid

Vanillic acid

Syringic acid Coumaric acid Ferulic acid

图4 不同酚酸对烤烟黑胫病菌孢子囊产Th量的影响

Fig.4 Effect of difference phenolic acids on sporangium yield of *phytophora parasitica* var. *nicotiana*注（Note）：数据为平均数±标准差，n=4. 不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间孢子生成量差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）. Data are means±standard deviation of four replicates. Different

Small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic (*p*＜0.05).

#### 2.2.4.3 不同酚酸对黑胫病菌游动孢子释放的影响

不同酚酸种类对烤烟黑胫病游动孢子释放率的影响存在差异（图5）。5种酚酸对黑胫病菌游动孢子释放率基本上均具有促进作用，其中，对羟基苯甲酸对游动孢子释放的促进作用随作用浓度大而增大，当作用浓度为0.10g/L时促进作用最大，随后作用浓度为0.50g/L时促进作用减小，但各浓度均显著高于对照（*p*＜0.05）。香草酸、丁香酸、香豆酸和阿魏酸在作用浓度为0.10g/L以前对游动孢子释放的促进作用均随作用浓度增加而增大且显著高于对照（*p*＜0.05），当作用浓度为0.05g/L三种酚酸促进作用最大，作用浓度为0.10g/L时促进作用稍有下降。在相同作用浓度下，对羟基苯甲酸、丁香酸和香豆酸对黑胫病菌游动孢子释放的促进作用较大。以上结果说明，5种酚酸对黑胫病菌游动孢子的释放均具有促进作用，其作用强度随浓度升高而增大，当作用浓度大于0.05g/L或0.10g/L促进作用稍有减小。

CK 0.01g/L 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L



d

cd

d

c

c

d

d

d

b

a

c

b

b

b a

c

a

c c

b

b

b

a

a

a

60

50

40

游动孢子释放率（%）

Zoopore release rate

30

20

10

0

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸阿魏酸

ρ-hydrobenzoic acid

Vanillic acid

Syringic acid Coumaric acid Ferulic acid

图5 不同酚酸对烤烟黑胫病菌游动孢子释放率的影响

Fig.5 Effect of difference phenolic acids on zoopore release rate of *phytophora parasitica* var. *nicotiana*注（Note）：数据为平均数±标准差，n=4. 不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间游动孢子释放率差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates.

Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic (*p*＜0.05).

## 2.3 讨论与小结

### 2.3.1 高效液相色谱法测定根系分泌物中酚酸的条件优化

目前，对于根系分泌物中酚酸类物质的检测主要有高效液相（张俊英等，2007）、气相色谱（何海斌等，2005）和离子色谱等等方法，各种分析方法各有优缺，因为高效液相不受试样的挥发性和热稳定性限制，应用范围广，且流动相种类多，因此，分析根系分泌物中有机酸类物质用高效液相色谱法较为适宜。

本研究采用反相色谱法有机酸专用分析柱（Synergi 4u Hydro-RP 80A），以30%甲醇-0.2%乙酸体系为流动相，流速1.0mL/mim，进样量为10μL，检测波长280nm，分析时间30min为分析条件能较好分离根系分泌物中5中酚酸类物质，该方法操作简单、准确度高、重现性好的优点，适用于测定烤烟根系分泌物中酚酸的定性和定量。

### 2.3.2 不同烤烟品种根系分泌物中酚酸种类和数量差异及其与品种抗性的关系

植物根系分泌物的种类和数量影响因素复杂，包括植物种类，生长阶段、栽培措施、矿质营养、根际微生物、气候因子以及病虫害胁迫等因素（张福锁等，1992；Tyler等，1995；Perez，1991；

Hoffland等，1989, 1989；马敬，1994；Cieslinski，1998）。不同大豆品种根系分泌物中主要含有对羟基苯甲酸和香草酸（张俊英等，2007），正茬和重茬大豆的根系分泌物中分别检测到3 种和5种酚酸类物质的存在（战秀梅等，2004）。大豆重茬土壤中对羟基苯甲酸和香草酸的含量大于正茬土壤，且差异达极显著水平，重茬大豆根系水浸提液中对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸、香草醛、香豆素含量均高于正茬（张淑香等，2000）。草莓根系分泌物中检测到对羟基苯甲酸的存在（甑文超，2004），日光温室黄瓜连作土壤中含有酚酸类物质对羟基苯甲酸、阿魏酸和苯甲酸，且随连作年限在土壤中积累（马云华等，2005）。本研究中不同品种根系分泌物中检出4种酚酸，对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸和香豆酸，其中主要分泌对羟基苯甲酸和丁香酸。从不同作物及同种作物不同基因型根系分泌酚酸种类和数量的差异也说明了根系分泌物组分的复杂性。

一般来说，植物根系分泌量随生育进程，光合作用加强，地上部和地下部代谢加强，因此由根系释放到根际的有机化合物种类和数量也相应增加，到植物生长后期植株代谢能力减弱，根系分泌能力也应相应减弱。本研究中，不同品种根系分泌物中酚酸类物质总量随生育时期变化趋势存在差异，HR酚酸总量随生育进程先增后减小趋势，MR酚酸总量随生育进程呈先减小后增加趋势，MS和HS分泌总量随生育进程先增加，至旺长期最大，之后大幅下降，成熟期稍有增加。这可能是因为根系分泌种类繁多，酚酸类物质只是根系分泌组分中很小一部分，不能代表根系分泌物总量随生育进程的变化趋势。本研究中抗、感品种之间出现的酚酸分泌量随生育期的变化趋势不一致的原因很可能跟品种抗病性差异有关，但具体机理有待进一步研究。本研究中感病品种对羟基苯甲酸分泌量显著高于抗性品种，抗病品种根系分泌物中对羟基苯甲酸较少分泌或不分泌。本结果中，检出酚酸总量与病情指数显著正相关，即与品种抗性显著负相关。这与张俊英等（2007）对不同抗性大豆品种根系酚酸物质分泌种类和数量差异的研究结果相似，感病品种根系分泌物酚酸类物质种类和数量均高于抗病品种。已有研究表明，酚酸类物质是植物重要的化感物质，其对

植物生长发育、养分吸收、微生物环境均能产生较大影响，酚酸物质可以刺激真菌生长（张淑香等，2000）。

当植物受到病原菌侵染时，植物自身防御机制启动导致植物生长代谢发生改变以应对病原菌的侵染，根系分泌物因此也会发生相应变化。对于土传病害来说，根系分泌物是寄主自身抗病性的第一阶段，是植物自身防御作用之一，很多植物面对病原物的入侵会迅速有选择地采取相应机制，并有选择地向根际加大释放分泌物来抑制病原菌的快速生长和侵入（齐泽民等，2005），有人把这一过程称为“体外抗病性”。因此，品种的抗性差异可以通过根系分泌体现出来，本研究中，人工接种黑胫病菌促进了酚酸分泌量，各品种根系分泌物对羟基苯甲酸和丁香酸含量均呈上升趋势，且抗病品种分泌量大于感病品种。相关分析表明，接种黑胫病菌后不同抗性品种根系分泌物中对羟基苯甲酸、丁香酸和酚酸总浓度与病情指数正相关，即与品种抗性负相关。已有研究表明， 酚酸类物质是植物重要的化感物质，其对植物生长发育、养分吸收、微生物环境均能产生较大影响，酚酸物质可以刺激真菌生长（张淑香等，2000）。因此，为进一步弄清黑胫病抗性机制，还有必要对酚酸与黑胫病菌的关系作进一步研究。

### 2.3.3 不同酚酸对黑胫病菌Th长的影响

业已证明，根系分泌物在植物抗病作用中起着重要作用（张庆平等，1994；杨之为等，1995；袁虹霞等，2002）。根系分泌物能对病原菌产生促进或抑制生长的作用，酚酸类物质是根系分泌物中重要组分，且酚酸类物质也被公认为根系分泌物典型的具有化感作用的物质（杜英君等，1999；

Wu等，2001）。对羟基苯甲酸、苯甲酸、丁香酸、邻苯二甲酸、香草酸能抑制禾顶囊壳菌、平脐蠕胞菌、禾谷丝核菌的菌丝生长（梁春启等，2009），丁香酸和香草酸对西洋参立枯丝核菌生长的影响表现为“低促高抑”的浓度效应，阿魏酸和香豆素会促进西洋参根腐菌的生长（杨家学等，

2009），低浓度酚酸类物质会刺激细菌、放线菌的繁殖和生长，而高浓度酚酸类物质则对其具有抑制作用（马云华等，2005），而且外加酚酸物质可以刺激真菌繁殖与生长或为真菌生长提供有效的碳源（张淑香，2000）。

本研究中，添加不同浓度酚酸对黑胫病菌菌落生长和孢子囊产生具有“低促高役”的浓度效应。对羟基苯甲酸在0.01g/L~0.50g/L均促进尖镰孢菌生长，但在作用浓度为0.10g/L之后抑制腐皮镰孢菌生长（张俊英，2007）。香豆素在一定程度表现出对西瓜专化型尖孢镰刀菌孢子萌发和产孢能力的抑制作用(Wu等, 2008)。本研究发现，阿魏酸对黑胫病孢子囊均表现为抑制作用，这与郝文雅等（2010）研究有所不同，其认为阿魏酸对西瓜专化型尖孢镰刀菌孢子萌发和产孢能力均具有促进作用。这可能是因为病源微生物的不同进而导致对其作用方式及强弱出现差异。

# 第三章 不同烤烟品种根系分泌物有机酸组分差异及其对黑胫病菌Th长的影响

## 3.1 材料与方法

### 3.1.1 供试材料

供试烤烟品种，病原菌同2.1.1

### 3.1.2 仪器与试剂

仪器同2.1.2

试剂：草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、马来酸、柠檬酸、丁二酸、磷酸二氢钾、甲醇 均为分析纯。

### 3.1.3 材料培养及根系分泌物收集

材料培养及根系分泌物收集方法同2.1.3

### 3.1.4 方法

#### 3.1.4.1 不同烤烟品种根系分泌物有机酸组分分析

##### 3.1.4.1.1 有机酸酸标准溶液配制

分别准确称取草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、马来酸、柠檬酸、丁二酸和富马酸各0.1000g，用超纯水定容至1000mL，制成质量浓度为100μg/ml的有机酸混合储备液，将储备液分别稀释2倍、4倍、8倍、20倍、40倍和80倍作为标准工作液。

##### 3.1.4.1.2 色谱条件

色谱柱为Synergi 4u Hydro-RP 80A色谱柱(250×4.6mm ID)，流动相为10mmoL/L磷酸二氢钾缓冲溶液，用磷酸调节pH=4.0，流速为1.0mL/mim，进样量为10μL，检测波长210nm，分析时间20min。利用不同溶质的保留值规律初步定性，再加入标准溶液，根据峰高的突增进一步验证色谱峰。定量采用峰面积外标法定量。

#### 3.1.4.2 不同有机酸对黑胫病菌生长的影响

##### 3.1.4.2.1 有机酸储备液配置

准备称取草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、马来酸、柠檬酸、丁二酸各0.5000g，并用超纯水定容至100mL，配成浓度为5.0g/L有机酸储备液。用G4漏斗过0.22µm有机滤膜，滤液即为

酚酸和有机酸储备液，备用。

##### 3.1.4.2.2 有机酸培养基制备

用移液器分别准确移取有机酸储备液0.50mL、1.00mL、5.00mL和10.00mL于灭菌培养基中

（Ф=9cm），分别加入燕麦培养基19.50mL、19.00mL、15.00mL和10.00mL，使培养基中有机酸浓度为0.05g/L、0.10g/L、0.50g/L和1.00g/L，每浓度4次重复，以不加有机酸培养基为对照。

##### 3.1.4.2.3 不同有机酸对黑胫病菌落生长的影响方法同2.1.4.2.3

##### 3.1.4.2.4 不同有机酸对黑胫病孢子囊产生量和游动孢子释放率的影响方法同2.1.4.2.4

### 3.1.5 数据处理和统计方法

实验数据采用Excel2003初步处理和作图，统计分析采用SPSS13.0统计分析软件对数据进行方差分析(One way ANOVA)，再利用Duncan's新复极差法进行多重比较分析。

## 3.2 结果与分析

### 3.2.1 色谱条件选择及优化

#### 3.2.1.1 波长

分别对草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、马来酸、柠檬酸、丁二酸和富马酸在190～400nm波长范围内扫描，选取210nm、230nm、245nm和280nm进行比对发现，9种有机酸均在210nm初有较大吸收值，稳定性好，故采用210nm波长为有机酸检测波长。

#### 3.2.1.2 流动相及pH 值

有机酸在水相中大部分以离子态存在，而离子在反相色谱柱上几乎无保留，有机酸分析一般采用抑制电离法使其成为分子态酸从而增加再反相柱上的保留。磷酸盐缓冲液是一种常见弱酸电 离抑制剂且在紫外区几乎无吸收，因此以磷酸盐作为流动相有利于有机酸分离而不影响检测，因 此本研究采用磷酸二氢钾水溶液为流动相。过高的磷酸盐溶液对泵和色谱柱均有影响且浓度过大 时会造出过载，本研究选用磷酸二氢钾浓度为0.005mol/L、0.01mol/L、0.02mol/L进行对比，发现浓度0.005 mol/L时分离不理想，有机酸0.01mol/L时分离较好，因此本研究以0.01 mol/L磷酸二氢钾为流动相。

流动相的pH值对有机酸的分离有较大影响，一般来说，pH值越低分离越好，但pH过低会造出反相柱塌陷，一般要求pH不能低于2.0，本研究以pH=2.4、pH=2.5、pH=2.6、pH=2.8、pH=4.0进行比较，结果发现pH值对有机酸分离影响较大，pH=2.6以上有机酸均没有很好分离，pH=2.4和pH=2.5有机酸分离较好且二者效果差异不大，因此，本研究选用pH=2.5为流动相pH值。

#### 3.2.1.3 柱温和流速

有报道指出，柱温对有机酸分离有影响，以25℃、30℃、35℃和40℃为梯度进行对比，结果表明35℃时峰型较好，且能在较短时间内完成9种有机酸的分离，因此本研究确定柱温采用35℃。以0.5 mL/min、0.6 mL/min、0.8 mL/min、1.0 mL/min为流速进行试验发现，流速越低，保留时间越大，0.5 ml/min需要20min才能分离出9种有机酸，而流速为1.0 mL/min时只要10min就能对

9种有机酸进行全部分离。因此，本研究确定流速为1.0 mL/min。

综合以上分析，本研究色谱条件为：色谱柱为Synergi 4u Hydro-RP 80A色谱柱(250×4.6mm

mAU

8

300

250

7

1

200

6

150

2

100

3

5

50

4

9

0

0

2

4

6

8

10

12

14 min

ID），流动相为10 mmoL/L磷酸二氢钾缓冲溶液，用磷酸调节pH=2.5，流速为1.0 ml/mim，进样量为10μL，检测波长210 nm，分析时间10 min。9种有机酸标准液分离图谱见图6，以及样品分离图谱见图7。

图6 有机酸标准品色谱图

Fig. 6 Chromatogram of organic acid standards

注(Note): 1 草酸（2.604）;2 酒石酸（4.000）; 3 苹果酸（4.925）; 4 乳酸（4.998）; 5乙酸（5.627）; 6 马来酸

(6.454); 7柠檬酸（7.049）; 8富马酸（8.303）; 9丁二酸（8.984）1 Oxalic acid; 2 Tartaric acid; 3 Malic acid; 4 Lactic acid; 5 Acetic acid; 6 Maleic acid; 7 Citric acid; 8 Fumaric acid; 9 Succinic acid

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |  |  |  |  |  |  | 7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |  | 6 | 7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 9 |  |  |  |  |  |  |  |

mAU

30

25

20

15

10

5

0

8

图7 样品色谱图

Fig. 7 Chromatogram of sample

min

注(Note): 1草酸（2.604）; 2酒石酸（4.000）; 3苹果酸（4.925）; 4乳酸（4.998）; 5乙酸（5.627）; 6马来酸

(6.454); 7柠檬酸（7.049）1 Oxalic acid; 2 Tartaric acid; 3 Malic acid; 4 Lactic acid; 5 Acetic acid; 6 Maleic acid; 7 Citric acid.

#### 3.2.1.3 线性关系和检出限

对9种有机酸标准溶液浓度与其相应峰面积进行回归，线性回归方程、线性范围及检出限见表13。通过以上研究认为，本研究建立的同时检测多种有机酸的高效液相色谱方法，重现性好，保留时间和峰面积的变异系数较小，工作曲线线形良好，检出限低。

表13 各种有机酸回归分析和检出限

Table 13 Regression analysis and detection limit of the nine organic acids

| 有机酸  Organic acids | 回归方程  Linear regression equation | 相关系数(r)  Correlation coefficient | 线性范围  (μg/ml) Linear range | 检出限(μg/ml) Detection limit |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 草酸 Oxalic acid | y=6.28470x－6.18490 | 0.99922 | 0.50～30.0 | 0.030 |
| 酒石酸 Tartaric acid | y=1.04982x－4.00342 | 0.99910 | 0.25～10.0 | 0.020 |
| 苹果酸 Malic acid | y=0.58084x－1.45269 | 0.99827 | 0.25～10.0 | 0.020 |
| 乳酸 Lactic acid | y=0.46868x－2.85130 | 0.99174 | 0.25～10.0 | 0.010 |
| 乙酸 Acetic acid | y=0.332356x－1.43293 | 0.99377 | 0.25～10.0 | 0.025 |
| 马来酸 Maleic acid | y=60.53012x－164.43479 | 0.99856 | 0.25～50.0 | 0.020 |
| 柠檬酸 Citric acid | y=1.11710x－4.33316 | 0.99936 | 0.25～20.0 | 0.020 |
| 富马酸 Fumaric acid | y=76.35138x－88.43105 | 0.99984 | 0.25～50.0 | 0.030 |
| 丁二酸 Succinic acid | y=0.486025x－0.316866 | 0.99832 | 0.25～20.0 | 0.030 |

注(Note): 检出限按3倍信噪比计算(S/N=3). The detection limit by three times to the ratio of signal noise (S/N= 3).

### 3.2.2 不同烤烟品种根系分泌有机酸种类和含量差异

#### 3.2.2.1 不同烤烟品种不同生育时期根系分泌有机酸种类和含量差异

在整个烤烟生育期内不同品种根系分泌物中共检出7种有机酸类物质，分别为草酸、酒石酸、乳酸、乙酸、马来酸、富马酸和丁二酸（表14），其中以草酸、乳酸和马来酸为主。整个生育期内HR主要分泌乙酸和马来酸，MR主要分泌草酸和马来酸，MS和HS均主要分泌乳酸。

HR团棵期检出酒石酸、乙酸、马来酸和富马酸，其中以酒石酸和乙酸为主，分别占同时期有机酸总量的38.50%和44.76%, MR和MS只检出马来酸，HS检出草酸、乳酸和马来酸，其中乳酸含量最大，占同时期有机酸总量的67.07%；烤烟旺长期HR检出乙酸和马来酸，其中马来酸占同时期有机酸总量96.99%；MR检出草酸和马来酸；MS和HS均只检出乳酸；烤烟现蕾期HR和MR均只检出马来酸，MS和HS均只检出乳酸；成熟期HR检出草酸和乳酸，其中以乳酸为主，占同时期有机酸总量的78.25%, MR 检出草酸和酒石酸，其中草酸含量占同时期有机酸总量的

64.43%, MS检出草酸、酒石酸、乳酸、富马酸和丁二酸，其中乳酸和酒石酸为主，分别占同时期有机酸总量的52.89%和14.26%, HS只检出乳酸。不同品种根系分泌有机酸随生育进程的变化趋势也有不同，MS和HS乳酸分泌量随生育进程而增加，且成熟期＞现蕾期＞旺长期＞团棵期；

HR和MR马来酸分泌量随生育进程变化不大。以上分析说明不同品种不同时期根系分泌物中可检出有机酸和数量存在差异，整体来看，感病品种根系分泌有机酸要高于抗病品种，抗病品种主 要分泌马来酸，而感病品种主要分泌乳酸。

表14 不同品种不同Th育期根系分泌物中有机酸种类和含量差异(μg/mL)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 有机酸  Organic acid | 生育期  Growth stage | 云 85 HR | K326 MR | 净叶黄  MS | 红大  HS |
|  | A | ― | ― | ― | (1.2451±0.0055) |
| 草酸  Oxalic acid | B | ― | (1.5605±0.0179) | ― | ― |
| C | ― | ― | ― | ― |
|  | D | (1.0952±0.0314) | (1.1985±0.0138) | (1.4478±0.0142) | ― |
|  | A | (4.1337±0.0993) | ― | ― | ― |
| 酒石酸  Tartaric acid | B | ― | ― | ― | ― |
| C | ― | ― | ― | ― |
|  | D | ― | (0.3602±0.0163) | (2.3516±0.0139) | ― |
|  | A | ― | ― | ― | (5.2229±0.09 00)a |
| 乳酸  Lactic acid | B | ― | ― | (5.5385±0.0121)a | (5.7044±0.1538)b |
| C | ― | ― | (7.5139±0.0986)b | (7.8407±0.0523)c |
|  | D | (4.9404±0.0969) | ― | (8.7243±0.009 0)c | (16.927±0. 1471)d |
|  | A | (4.6977±0.029 0) | ― | ― | ― |
| 乙酸  Acetic acid | B | (0.0408±0.0093) | ― | ― | ― |
| C | ― | ― | ― | ― |
|  | D | ― | ― | ― | ― |
|  | A | (1.2715±0.0105)b | (1.2374±0.0138)a | (1.2278±0.006 0) | (1.0935±0.0954) |
| 马来酸  Maleic acid | B | (1.314±0.0163)c | (1.2284±0.0185)a | ― | ― |
| C | (1.2473±0.0066)a | (1.2446±0.008 7)a | ― | ― |
|  | D | ― | ― | ― | ― |
|  | A | (0.6334±0.0046) | ― | ― | ― |
| 富马酸  Fumaric acid | B | ― | ― | ― | ― |
| C | ― | ― | ― | ― |
|  | D | ― | (0.3316±0.0156) | (0.6784±0.0064) | ― |
|  | A | ― | ― | ― | ― |
| 丁二酸  Succinic acid | B | ― | ― | ― | ― |
| C | ― | ― | ― | ― |
|  | D | ― | ― | (4.2932±0.0219) | ― |

Table 14 Difference of species and content of organic acids in root exudates of different resistance varieties

注(Note)：表中数据为3次重复平均值，“-”表示未检测到。A、B、C和D分别表示各烤烟品种不同生育时期，

A表示团棵期、B表示旺长期、C表示现蕾期、D表示成熟期。不同小写字母表示同一品种不同生育时期有机酸含量差异达5%显著水平(*p*＜0.05)，字母相同表示差异不显著(*p*＞0.05)。Data are means of three replicates. - indicate no detected. A, B, C and D indicate different growth stage of flue-cured tobacco respectively, A indicate rosette stage, B

Indicate rapid growing stage, C indicate flower budding stage and Dindicate mature stage. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different growth stage in same cultivar.

#### 3.2.2.2 不同烤烟品种根系分泌有机酸总量比较

不同抗性品种根系分泌有机酸总量也存有不同(表15)，HR有机酸分泌总量随生育进程先减小后增加，且团棵期＞成熟期＞旺长期＞现蕾期；MR有机酸分泌总量先增后减趋势，且旺长期＞成熟期＞现蕾期＞团棵期；MS有机酸分泌总量随生育期持续增加，HS分泌总量随生育期先减小后增加。从同一生育时期来看，团棵期MR＞HS＞MS＞HR，旺长期HS＞MS＞MR＞HR，现蕾期HR和MR差别不大，且HS＞MS，成熟期HS＞MS＞HR＞MR。从整个生育时期有机酸分泌总量来看HS＞MS＞HR＞MR，说明不同品种有机酸分泌总量存在差异，且感病品种有机酸总量大于抗病品种。

表15 不同品种根系分泌有机酸总量随Th育期的变化(μg/mL)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 生育期 Growth stage | 云 85 HR | K326 MR | 净叶黄 MS | 红大 HS |
| 团棵期 Rosette stage | 10.7362 | 1.2374 | 1.2278 | 7.5615 |
| 旺长期 Rapid growing stage | 1.3548 | 2.7888 | 5.5385 | 5.7044 |
| 现蕾期 Flower budding stage | 1.2473 | 1.2446 | 7.5139 | 7.8407 |
| 成熟期 Mature stage | 5.0358 | 1.8917 | 16.4952 | 16.9270 |
| 有机酸总量 Total organic acid | 18.3741 | 7.1625 | 30.7754 | 38.0336 |

Table 15 Change of total organic acids of root exudates in different growth stage of different resistance varieties

#### 3.2.2.3 不同烤烟品种根系分泌有机酸总量与病情指数比较

从不同品种不同生育期酚酸总量与病情指数相关性分析可知（表16），除现蕾期酚酸分泌总量与病情指数之间呈负相关外，其余各时期均与病情指数正相关。团棵期与其余三个时期均呈负相关，旺长期与现蕾期，现蕾期与成熟期，成熟期与有机酸总量之间呈显著正相关（*p*＜0.05）。以上分析表明，根系分泌有机酸总量与品种抗性存在一定相关性。

表16 不同品种不同Th育时期根系分泌物种有机酸总量相关性比较

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 病情指数  Disease index | 团棵期  Rosette stage | 旺长期  Rapid growing stage | 现蕾期  Flower budding stage | 成熟期  Mature stage |
| 团棵期 Rosette stage | -0.1389 | 1 |  |  |  |
| 旺长期 Rapid growing stage | 0.9105 | -0.3927 | 1 |  |  |
| 现蕾期 Flower budding stage | 0.8737 | -0.1736 | 0.9615\* | 1 |  |
| 成熟期 Mature stage | 0.8134 | -0.0433 | 0.9028 | 0.9862\* | 1 |
| 有机酸总量 Total | 0.7955 | 0.2151 | 0.7955 | 0.9238 | 0.9641\* |

Table 16 Compare of correlation coefficient between total organic acid and disease index of different resistance varieties in different growth stage

注(Note): \*表示相关系数0.05水平显著；\*\*表示相关系数0.01水平显著。\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). \*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### 3.2.3 接种黑胫病菌后不同烤烟品种根系分泌物有机酸种类和含量差异

#### 3.2.3.1 接种后不同品种根系分泌物有机酸种类和含量差异

人工接种黑胫病菌后各品种根系分泌物中共检出有机酸物质6种，分别为草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸和马来酸，其中各品种有机酸检出种类和含量也存在差异（表17）。HR和MR在接种0d～6d内均未检出草酸，HS和MS在接种后基本上均检出草酸且随接种时间分泌含量呈增加趋势，其中在接种0d～6d内MR均显著大于MS(*p*＜0.05)；HS和MS接种前未检出酒石酸，接种后MS检出而HS直到接种后第6d才检出少量酒石酸，HR和MR酒石酸含量随接种时间波动变化，其中MR和HR在接种0d～6d内均显著大于MS和HS（*p*＜0.05）；只有MR和MS根系分泌物中检出苹果酸，且随接种时间含量呈增加趋势，其中接种前MR＞MS，接种后MS＞MR；只有MS和HS根系分泌中检出乳酸，接种后含量差异不大，其中HS除接种后第6d未检出外含量均大于MS；各品种根系分泌物均检出乙酸，且随接种后时间均呈增加趋势，其中各品种含量基本表现为HS＞MS＞MR＞HR，且HS和MS接种0d～6d内均显著大于MR和HR（*p*＜0.05）；除接种前HR未检出乙酸外其余各品种接种后各时期均检出，且含量随接种后时间呈增加趋势，其中HS在接种0d～6d内均显著大于其他品种；以上分析说明，人工接种黑胫病菌刺激了烤烟根系分泌物中有机酸的分泌，且含量随接种时间延长而增大，抗病品种接种后不分泌草酸和乳酸，较少分泌苹果酸，感病品种除较少分泌苹果酸外均分泌其他有机酸，且除抗病品种酒石酸分泌量大于感病品种外，其他有机酸均为感病品种大于抗病品种，分析这种抗感品种之间有机酸分泌差异可能与品种抗性有关。

表17 接种后不同品种分泌有机酸种类和含量差异(μg/mL)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 有机酸  Organic acid | 品种  Cultivars | 接种前  Before inoculation | 接种后 After inoculation | |  |
| 2d | 4d | 6d |
|  | HR | ― | ― | ― | ― |
| 草酸  Oxalic acid | MR | ― | ― | ― | ― |
| MS | (0.0157±0.0008) | (0.0747±0.0075) | (0.1164±0.0115) | (0.1535±0.0046) |
|  | HS | ― | (0.055±0.0069) | (0.0621±0.0045) | (0.1044±0.0089) |
|  | HR | (0.0922±0.007) | (0.0891±0.0105)b | (0.1153±0.0045)c | (0.1212±0.0021)c |
| 酒石酸  Tartaric acid | MR | (0.085±0.0078) | (0.0956±0.0094)b | (0.0996±0.0097)b | (0.1078±0.005)c |
| MS | ― | (0.0556±0.0116)a | (0.0446±0.0104)a | (0.0715±0.0182)b |
|  | HS | ― | ― | ― | (0.0171±0.0046)a |
|  | HR | ― | ― | ― | ― |
| 苹果酸  Malic acid | MR | (0.1258±0.0070) | (0.1760±0.0152) | (0.2666±0.0092) | (0.6012±0.0177) |
| MS | (0.0531±0.0092) | (0.3086±0.0151) | (0.9840±0.0406) | (1.1709±0.0817) |
|  | HS | ― | ― | ― | ― |
|  | HR | ― | ― | ― | ― |
| 乳酸  Lactic acid | MR | ― | ― | ― | ― |
| MS | (0.1358±0.0041) | (0.1297±0.0063) | (0.1399±0.0095) | (0.1413±0.0102) |
|  | HS | (0.1415±0.009) | (0.1421±0.0091) | (0.1418±0.0008) | ― |
|  | HR | (0.1002±0.0413)a | (0.1449±0.0064)a | (0.2128±0.0093)a | (0.5647±0.0149)a |
| 乙酸  Acetic acid | MR | (0.1154±0.0059)a | (0.1558±0.0055)a | (0.2504±0.0119)b | (0.6649±0.0267)c |
| MS | (0.1571±0.0003)b | (0.2500±0.0091)b | (0.3310±0.0197)c | (0.6107±0.0116)b |
|  | HS | (0.2157±0.0102)c | (0.3742±0.0657)c | (0.6714±0.0065)d | (1.0903±0.0331)d |
|  | HR | ― | (0.0279±0.0053)a | (0.0447±0.0017)a | (0.0684±0.0134)a |
| 马来酸  Maleic acid | MR | (0.0179±0.0053)a | (0.0372±0.0076)ab | (0.0655±0.0074)b | (0.0823±0.0114)a |
| MS | (0.0154±0.0133)a | (0.0400±0.0024)b | (0.0561±0.0081)ab | (0.9933±0.0981)b |
|  | HS | (0.0350±0.0059)b | (0.0580±0.0044)c | (0.0804±0.0067)c | (1.1241±0.0884)c |

Table 17 Species and content compare of organic acids in different varieties after inoculating *phytophora parasitica* var. *nicotiana*

注（Note）:数据为平均数±标准差，n=3，“―”表示未检测到。不同小写字母表示相同接种天数不同品种对羟基苯甲酸和丁香酸浓度差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates, and"―“indicate no detected. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test amongρ-hydrobenzoic acid and syringic acid concentration in same time of inoculation.

#### 3.2.3.2 接种后不同烤烟品种根系分泌物有机酸总量比较

人工接种黑胫病后各品种根系分泌物中有机酸总量比较见表18，在接种0d～6d内各品种有机酸总量均随接种时间延长而增加，接种前HS＞MS＞MR＞HR，接种后及种0d～6d平均值均为

MS＞HS＞MR＞HR，说明感病品种根系分泌有机酸总量要大于抗病品种。

表18 接种黑胫病后不同品种根系分泌物中有机酸总量差异(μg/mL)

Table 18 Compare content of total of organic acid in root exudate of different cultivars after inoculating

Phytophora parasitica var. nicotiana

| 品种  Varieties |  | 接种后 After inoculation | |  | 0~6d 平均  Average |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0d | 2d | 4d | 6d |
| HR | 0.1924 | 0.2649 | 0.3733 | 0.7543 | 0.3962 |
| MR | 0.3479 | 0.4613 | 0.6823 | 1.4431 | 0.7337 |
| MS | 0.3843 | 0.8564 | 1.6551 | 4.0846 | 1.4951 |
| HS | 0.3926 | 0.6273 | 0.9463 | 2.3329 | 1.0748 |

#### 3.2.3.3 接种后不同烤烟品种根系分泌物有机酸总量与病情指数比较

从接种后各品种根系分泌物中有机酸含量与病情指数相关性差异来看（表19），酒石酸和苹果酸基本上与病情指数呈负相关关系，且酒石酸在接种后第4d、第6d以及平均值均与病情指数显著负相关（*p*＜0.05）；其余有机酸种类均与病情指数正相关，且乙酸在接种0d～4d内以及马来酸接种后第2d均与病情指数显著正相关；有机酸总量与病情指数也呈正相关，但未达显著水平。

表19 接种后不同品种根系分泌物中有机酸含量与病情指数的相关性比较

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 接种后 After inoculation | | | | |
|  | 有机酸  Organic acids | 0d | 2d | 4d | 6d | 平均  Average |
|  | 草酸 Oxalic acid | 0.2845 | 0.7401 | 0.6511 | 0.7039 | 0.6384 |
| 病情指数  Disease index | 酒石酸 Tartaric acid | -0.8720 | -0.9455 | -0.9830\* | -0.9891\* | -0.9715\* |
| 苹果酸 Malic acid | -0.2391 | -0.0276 | 0.0614 | -0.0112 | 0.0032 |
|  | 乳酸 Lactic acid | 0.8710 | 0.8852 | 0.8627 | 0.1347 | 0.7686 |
|  | 乙酸 Acetic acid | 0.9898\* | 0.9754\* | 0.9513\* | 0.8846 | 0.9500 |
|  | 马来酸 Maleic acid | 0.9055 | 0.9652\* | 0.7517 | 0.9114 | 0.9280 |
|  | 有机酸总量 total | 0.8213 | 0.6663 | 0.5269 | 0.7221 | 0.6736 |

Table 19 Compare of correlation coefficient between organic acids and disease index of different resistance varieties after inoculating *phytophora parasitica* var. *nicotiana*

注(Note):\*表示相关系数0.05水平显著；\*\*表示相关系数0.01水平显著。\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). \*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### 3.2.2 不同有机酸对黑胫病菌Th长的影响

#### 3.2.2.1 不同有机酸对黑胫病菌菌落直径的影响

表20 不同有机酸对黑胫病菌菌落直径的影响(cm)

Table 20 Effect of different organic acids on growth of phytophora parasitica var. nicotiana

| 有机酸  Organic acids | 浓度(g/L) Concentration |  | 培养时间 Culture time | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2d | 3d | 4d | 5d |
|  | 0.05 | （4.23±0.25 ）c | （5.27±0.31 ）d | （6.23±0.31 ）d | （6.33±0.31 ）d |
|  | 0.10 | （3.00±0.26 ）b | （3.50±0.3 0）c | （4.13±0.45 ）c | （4.43±0.5 0）c |
| 草酸  Oxalic acid | 0.50 | （1.53±0.42 ）a | （1.87±0.12 ）b | （3.23±0.25 ）b | （3.50±0.38 ）b |
|  | 1.00 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）c | （6.99±0.72 ）e | （8.19±0.47 ）e | （8.50±0 .00）e |
|  | 0.05 | （4.77±0.25 ）b | （5.70±0.26 ）d | （6.83±0.35 ）d | （7.83±0.35 ）d |
|  | 0.10 | （4.00±0.3 0）b | （4.73±0.51 ）c | （5.47±0.42 ）c | （5.83±0.21 ）c |
| 酒石酸  Tartaric acid | 0.50 | （2.03±0.68 ）a | （2.5±0.62 ）b | （3.27±0.68 ）b | （3.37±0.68 ）b |
|  | 1.00 | （1.37±0.15 ）a | （1.50±0.10）a | （1.53±0.06 ）a | （1.67±0.15 ）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）b | （6.99±0.72 ）e | （8.19±0.47 ）e | （8.50±0 .00）e |
|  | 0.05 | （5.23±0.25 ）c | （7.30±0.56 ）c | （8.23±0.46 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.10 | （4.43±0.21 ）bc | （5.77±0.4 0）b | （5.97±0.29 ）b | （6.93±0.06 ）b |
| 苹果酸  Malic acid | 0.50 | （4.07±0.23 ）b | （5.00±0.62 ）b | （5.77±0.23 ）b | （6.60±0.17 ）b |
|  | 1.00 | （1.00±0.2 0）a | （2.60±0.2 0）a | （3.80±0.26 ）a | （4.60±0.44 ）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）bc | （6.99±0.72 ）c | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.05 | （4.93±0.32 ）b | （6.77±0.4 0）c | （7.90±0.46 ）c | （8.43±0.12 ）c |
|  | 0.10 | （4.83±0.35 ）b | （6.40±0.72 ）c | （7.63±0 .32）c | （8.40±0.1 0）c |
| 乳酸  Lactic acid | 0.50 | （3.00±0.2 0）a | （3.77±0.47 ）b | （4.87±0.31 ）b | （5.43±0.4 ）b |
|  | 1.00 | （1.93±0.4 0）a | （2.37±0.75 ）a | （2.63±0.65 ）a | （3.03±0.42 ）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）b | （6.99±0.72 ）c | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.05 | （2.20±0.26 ）b | （2.37±0.15 ）c | （2.47±0.15 ）c | （2.73±0.25 ）c |
|  | 0.10 | （0.77±0.25 ）a | （1.27±0.31 ）b | （1.37±0.29 ）b | （1.50±0.42 ）b |
| 乙酸  Acetic acid | 0.50 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.57±0.06 ）a | （0.57±0.06 ）a |
|  | 1.00 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）c | （6.99±0.72 ）d | （8.19±0.47 ）d | （8.50±0 .00）d |
|  | 0.05 | （0.50±0 .00）a | （2.00±0.2 0）b | （2.17±0.15 ）b | （2.47±0.06 ）b |
|  | 0.10 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
| 马来酸  Maleic acid | 0.50 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
|  | 1.00 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）b | （6.99±0.72 ）c | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.05 | （4.73±0.49 ）c | （6.77±0.38 ）c | （8.37±0.45 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.10 | （4.10±0.36 ）bc | （5.53±0.65 ）b | （7.67±0.42 ）c | （8.23±0.25 ）c |
| 富马酸  Fumaric acid | 0.50 | （3.43±0.4 0）b | （4.73±0.25 ）b | （6.03±0.4 0）b | （6.97±0.25 ）b |
|  | 1.00 | （1.67±0.47 ）a | （2.13±0.32 ）a | （2.97±0.84 ）a | （3.43±0.4 0）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）c | （6.99±0.72 ）c | （8.19±0.47 ）c | （8.50±0 .00）c |
|  | 0.05 | （3.17±0.59 ）b | （4.13±0.21 ）c | （6.33±0.51 ）d | （8.07±0.25 ）d |
|  | 0.10 | （0.57±0.12 ）a | （2.17±0.35 ）b | （4.00±0.44 ）c | （4.87±0.38 ）c |
| 丁二酸  Succinic acid | 0.50 | （0.50±0 .00）a | （0.67±0.15）a | （1.50±0.1 0）b | （2.00±0.2 0）b |
|  | 1.00 | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a | （0.50±0 .00）a |
|  | CK | （4.88±1.1 0）c | （6.99±0.72 ）d | （8.19±0.47 ）e | （8.50±0 .00）e |

注（Note）:数据为平均数±标准差，n=4。不同小写字母表示同一有机酸不同浓度间菌落直径差异达5%显著水平

（*p*<0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different

Small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different concentration in same organic acid.

不同有机酸种类对烤烟黑胫病菌菌落生长的影响见表20。八种有机酸不同浓度间基本均抑制了黑胫病菌菌落生长，其抑制作用随浓度增加而增大。具体来看，草酸对菌落直径的抑制随作用浓度增加而增大，至1.00g/L时完全抑制菌落生长；酒石酸第2天在作用浓度为0.05g/L和0.10g/L时与对照差异不显著（*p*＞0.05），其余时间各浓度均显著低于对照（*p*＜0.05）；之后显著低于对照。苹果酸在作用浓度为0.05g/L时促进了菌落生长，但与对照差异不显著，作用浓度0.10g/L之后转变为抑制作用且随浓度增加抑制作用加大，且基本显著低于对照（*p*＜0.05）；乳酸在作用浓度为

0.05g/L和0.10g/L时对菌落生长抑制作用不大，与对照差异不显著（*p*＞0.05），随作用浓度加大菌落直径显著小于对照（*p*＜0.05）；乙酸对菌落生长抑制作用较大，在0.05g/L和0.10g/L时显著抑制菌落生长，且0.50g/L时后完全抑制菌落生长（*p*＜0.05）；马来酸除在作用浓度为0.05g/L时菌落能在培养后期有小量生长外，其余浓度对菌落生长均表现为完全抑制；富马酸在作用浓度为

0.05g/L和0.10g/L时对菌落生长抑制作用不大，与对照差异不显著（*p*＞0.05），随作用浓度加大菌落直径显著小于对照（*p*＜0.05）；丁二酸在各作用浓度均显著抑制菌落生长*p*＜0.05）。在相同浓度下，苹果酸对黑胫病菌生长抑制作用最小，而马来酸对黑胫病抑制作用最大。以上结果表明， 有机酸对黑胫病菌的生长基本上均表现为限制作用，且作用强度随作用浓度增加而增大。

#### 6.2.2.2 不同有机酸对黑胫病菌孢子囊产生量的影响

各种有机酸对烤烟黑胫病孢子囊产生量的影响如图8所示，因为添加富马酸完全抑制了黑胫病菌生长，因此未在图中列出。不同有机酸不同浓度间对孢子囊具有促进或抑制作用。具体来看， 苹果酸、乳酸和富马酸在作用浓度为0.05g/L和0.10g/L时相对促进黑胫病菌孢子囊的产生，但与对照差异不显著（*p*＜0.05），作用浓度为0.50g/L之后转变为抑制作用，且与对照差异显著；草酸、酒石酸和丁二酸在各作用浓度下均表现为抑制孢子囊产生且随作用浓度加大抑制加强，其中草酸抑制作用相对更大，与对照均达显著差异（*p*＜0.05）；乙酸对黑胫病孢子囊产生抑制作用最大，在作用浓度为0.10g/L之后完全抑制了孢子囊的产生。以上结果表明，7种有机酸对烤烟黑胫病孢子囊的产生具有重要影响，其对孢子囊的促进和抑制作用取决于作用浓度。

20.00

18.00

16.00

14.00

孢子囊数量（个）

Sporangium yield

12.00

10.00

8.00

6.00

4.00

2.00

0.00



c

d

c

c

c

c

c

c c c

c

c

d

c

c c

b

d

b

c

b

a

b

c

a

a

a

b

b

b

a

a a a

a

草酸酒石酸苹果酸乳酸乙酸富马酸丁二酸

Oxalic acid

Tartaric acid

M alic acid

Lactic acid Acetic acid

有机酸Organic acid

Fumaric acid

Succinic acid

图8 不同有机酸对烤烟黑胫病菌孢子囊产Th量的影响

Fig. 8 Effect of difference organic acids on sporangium yield of*phytophora parasitica* var. *nicotiana*

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=4。不同小写字母表示相同有机酸不同浓度间孢子生成量差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different

Small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different concentration in same organic acid (*p*＜0.05).

#### 6.2.2.3 不同有机酸对黑胫病菌游动孢子释放的影响

不同有机酸不同浓度间对孢子囊具有促进或抑制作用（图9）。具体来看，苹果酸在作用浓度为0.05g/L和0.10g/L时相对促进了黑胫病菌游动孢子的释放，其中作用浓度为0.10g/L与对照存在显著差异（*p*＜0.05），作用浓度为0.50g/L后对游动孢子产生抑制作用且随作用浓度加大抑制作用增大；乳酸和富马酸在作用浓度为0.05g/L时促进了黑胫病游动孢子释放，其中乳酸促进作用显著（*p*＜0.05），作用浓度超过0.10g/L时对游动孢子产生抑制作用且随作用浓度加大抑制作用增大，且0.50g/L和1.00g/L显著低于对照（*p*＜0.05）；草酸、苹果酸和丁二酸在各处理浓度均抑制了黑胫病游动孢子释放且随作用浓度加大抑制作用增大，其中丁二酸各处理浓度均显著小于对照

（*p*＜0.05），乙酸在各处理浓度下基本完全抑制了游动孢子释放。以上分析说明，有机酸对烤烟黑胫病菌游动孢子释放具有促进或抑制作用，作用强度取决于作用浓度。



d

c

d

d

d

c

c

c

cd

cd d

c

cd c

e

b

c

b

d

a

a

b

c

b

a

b

b

a

a a a

a

c

b

a

45

40

35

30

游动孢子释放率（%）

Zoopore release rate

25

20

15

10

5

0

草酸酒石酸苹果酸乳酸乙酸富马酸丁二酸

Oxalic acid

Tartaric acid

M alic acid

Lactic acid Acetic acid

有机酸Organic acid

Fumaric acid

Succinic acid

图9 不同有机酸对烤烟黑胫病菌游动孢子释放的影响

Fig.9 Effect of difference organic acids on zoopore release rate of *phytophora parasitica* var. *nicotiana*注（Note）：数据为平均数±标准差，n=4. 不同小写字母表示相同有机酸不同浓度间孢子生成量差异达5%显著水平（*p*＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different concentration in same organic acid (*p*＜

0.05).

## 3.3 讨论与小结

### 3.3.1 高效液相色谱法测定根系分泌物中有机酸的条件优化

目前分析根系分泌物中有机酸主要有酶法、分光光度法、气相色谱法(GC)、离子色谱法(IC)、 高效液相色谱法(HPLC)及毛细管电泳法(CE)等，其中IC、HPLC和CE是目前较精确、较常用的仪器（王平，2006）。采用反相色谱法分析有机酸已在杨梅果实（刘文静等，2011）、小麦根系分泌物（王君等，2009）等多种作物上有过报道。

本试验采用Synergi 4u Hydro-RP 80A色谱柱(250×4.6mm ID)，流动相为10mmoL/L磷酸二氢钾缓冲溶液，用磷酸调节pH=2.5，流速为1.0ml/mim，进样量为10μL，检测波长210nm，分析时间10min。该方法操作简单、准确度高、重现性好的优点，适用于测定烤烟根系分泌物中有机酸的定性和定量。

### 3.3.2 不同烤烟品种根系分泌物中有机酸种类和数量差异及其与品种抗性的关系

根系分泌是长期适应外界环境而形成的一种适应机制，根系分泌物作为联系根系-土壤的纽带，其分泌种类和数量受多种因素影响。根系分泌物中常见有机酸种类有柠檬酸、草酸、琥珀酸、酒石酸、苹果酸、乙酸和丙二酸等（刘颖坤等，2011；张小冰，2004）。不同植物根系分泌有机酸种类和数量差异较大，苹果幼树根系分泌物中检测到草酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸（张建成，

2000），油菜根系主要分泌草酸和琥珀酸（王俊儒等，1995），籽粒苋主要分泌苹果酸、柠檬酸和草酸（李廷轩等，2005），水稻根系分泌物主要成分为酒石酸等，而小麦根系分泌物主要成分为草酸、乙酸和丙酸等（Cieslinski, 1998）。大豆根系分泌中含有9种有机酸，且不同基因型大豆根系有机酸种类和含量有差异（张俊英，2007），杨梅根系分泌物中草酸、酒石酸、苹果酸和柠檬酸（张利等，2009），马尾松根系分泌物检出草酸、苹果酸和柠檬酸（王水良等，2010）。小麦根系分泌物中检出苹果酸和柠檬酸，以及少量草酸（王平等，2006）。有研究表明，植物抗病性差异可以通过根系分泌物体现出来(Buxton, 1962)，根系分泌物对土传病原微生物具有重要的修饰限制作用

（Katanelson, 1954;范俊岗等, 1995）。抗感大豆根腐病品种根系分泌物种类和数量存有差异，抗病品种分泌有机酸较少，且种类单一，感病品种分泌有机酸种类较为丰富，且含量较大（张俊英，2007）。不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌孢子萌发，菌丝生物量和菌落生长具有促进或抑制作用（韩雪等，2006；吴凤芝等，2002），不同砧木嫁接茄子根系分泌物差异造成对黄萎病的抗性出现差异（周宝利等，2001）。

本研究中，烤烟根系分泌物中可检出7种常见有机酸，其中主要以草酸、乳酸和马来酸为主，且不同品种有机酸分泌种类和含量均存在差异。不同抗性品种之间也表现出一定差异，抗黑胫病品种根系分泌马来酸较多，而感病品种不分泌或分泌较少，感病品种分泌乳酸较多，而抗病品种不分泌或分泌较少。另外，感病品种整个生育期有机酸分泌总量明显大于抗病品种。这与张俊英对不同抗感大豆根腐病品种根系分泌物种类和数量差异研究结果相似，抗病品种分泌有机酸较少，且种类单一，感病品种分泌有机酸种类较为丰富，且含量较大（张俊英，2007）。根系分泌到根际环境的物质是植株代谢、根际环境共同作用的结果，其各种含量和种类处于某种平衡，有机酸是植株体内三羧酸循环中间产物，其有机酸之间可以通过某种形式进行转化，但总量在一定时期应该保持一定平衡，因此，我们推测根系分泌有机酸总量的差异更能体现品种的抗性差异。这从各时期和有机酸总量与品种病情指数之间的正相关关系也可以看出。

根系分泌物会通过调节分泌作用以此适应外界环境的改变（苗淑杰等，2011；陈凯等，1999；

Kihara等，2003），对于土传病害来说，根系分泌物是寄主自身抗病性的第一阶段，是植物自身防御作用之一，很多植物面对病原物的入侵会迅速有选择地采取相应机制，并有选择地向根际加大释放分泌物来抑制病原菌的快速生长和侵入（齐泽民等，2005），有人把这一过程称为“体外抗病性”。本研究中，人工接种黑胫病菌刺激了烤烟根系有机酸的分泌，除抗病品种酒石酸分泌量大于感病品种外，其他有机酸均为感病品种大于抗病品种，且酒石酸和苹果酸基本上与病情指数呈负相关关系，而其他有机酸与病情指数正相关。有关采用人工接种方法分析不同品种根系分泌物差异的文献鲜见报道，本研究表明，人工接种方法可以诱发根系分泌物产生变化，在一定程度上是能够反映出品种抗性差异的。而有关有机酸对病原菌的报道很多，草酸都可以诱导油菜叶片中PPO和POD的活性提高，从而提高植物的抗病性（毛玮等，2011）。“苹果梨”采后用苹果酸处理对青霉病病菌生长的抑制明显（张怀予等，2009）。柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸均对轮纹病病原菌生长具有抑制作用，富马酸和奎尼酸对病原菌生长有促进作用（赵晓芳，2008）。

根系分泌物中的有机酸具有调节植物细胞新陈代谢、固定植物养分、活化植物细胞的作用，而且可以降低根际土壤的pH值，同时可与铝、铁、钙等金属元素形成螯合物，提高磷化物的溶解度，有效提高磷的利用率，从而促进树体健康生长（刘博等，2009）。对于烟草来说，有机酸对产

质量形成特别是有利于香气量的提高具有重要作用（刘世亮等，2005, 2008），腐殖酸能有效提高烟株体内硝酸还原酶、过氧化氢酶、抗坏血酸氧化酶、多酚氧化酶的活性，腐殖酸还能促进烤烟 生理代谢，提高抗逆能力，植株感染花叶病和黑茎病的病情得到了有效控制，从而促进烟株的生长发育（靳志丽等，2000, 2002）。苹果酸、腐植酸和油酸能不同程度提高烟叶中钾素和还原糖含量，降低蛋白质含量及烟碱（化党领等，2011），还可以提高中糠醛、苯钾醛、茄酮、巨豆三烯酮和新植二烯等主要香气物质的含量（刘世亮等，2010）。而有关烤烟根系分泌物的研究甚少，从本研究可以得出有机酸与品种抗性密切相关，这种相关性对于提高烤烟抗性及产质量具有很好的参 考价值。

### 3.3.3 不同有机酸对黑胫病菌Th长的影响

本研究中，不同有机酸类物质对黑胫病菌生长具有显著作用，各种有机酸基本抑制了黑胫病菌菌落生长，但其对孢子囊产生和游动孢子释放随浓度变化出现促进或抑制作用。草酸可以影响多酚氧化酶PPO的活性处理以及具有提高黄瓜抗炭疽病的能力（Yoruk等，2002；刘毅胜等，1998），邻苯二甲酸和丙二酸对半裸镰孢菌、粉红粘帚菌和尖镰孢菌存在促进或抑制作用（鞠会艳等，

2002）。水杨酸对西瓜专化型尖孢镰刀菌孢子萌发的作用存在“低促高抑”浓度效应，且不同浓度处理均抑制其产孢能力（郝文雅等，2010）。有关根系分泌物有机酸类物质的研究较多涉及有机酸对于提高土壤养分有效性，增加根系养分的活化及吸收等，而有关有机酸类物质与病源微生物之 间的关系研究较少，张俊英研究认为，大豆根系分泌物中有机酸类物质对尖镰孢菌和腐皮镰孢菌 均具有显著抑制作用，分析其原因可以是因为有机酸对根际的酸化作用间接影响了根系微生物的种类和分布（张俊英，2007）。黑胫病菌有较强的酸度适应力，但过酸依然会对其菌落生长及孢子囊产生和释放产生消极影响。综上，烤烟根系分泌物中酚酸和有机酸对烤烟黑胫病生长，孢子囊 产生和游动孢子释放均具有较大影响，其作用方式和强度因种类和浓度不同而存在。

# 第四章 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌Th长的影响

## 4.1 材料与方法

### 4.1.1 供试材料

供试材料及供试菌株同2.1.1。

### 4.1.2 材料培养及根系分泌物收集

烤烟育苗方法和溶液培养方法同2.1.3。

于烤烟团棵期、旺长期、现蕾期和成熟期收集各品种根系分泌物，收集方法为：将烟苗从营养液中取出，先用自来水冲洗3次，后用蒸馏水冲洗3次，再用去离子水冲洗3次，冲洗过程中尽量避免伤根。在原光照条件下将烟株移植到盛有500mL无菌去离子水的烧杯中培养，烧杯用锡箔纸包裹，收集时间为6 个小时（9:00～15:00），收集期间持续通氧，收集完毕后用去离子水定容至500mL，并立即用布氏漏斗过0.22µm有机相滤膜过滤并加入几滴5mg/L百里酚溶液以抑制微生物活动，低温（-20℃）保存待用。

### 4.1.3 试验方法

#### 4.1.3.1 根系分泌物对黑胫病菌菌落生长的影响

参考李梅云（2006）方法，略有改动：在直径9cm的培养皿中，加入无菌（过0.22µm微孔滤膜）根系分泌物2mL，再加入18mL燕麦培养基。每皿接种一个菌落直径、厚度和形态均相同的供试菌株菌饼（Ф=0.5cm）。接种后将培养皿置于28℃恒温培养箱中黑暗培养，菌种培养2天、3天、

4天和5天后测定菌落直径，以添加等体积的无菌水作为对照，每个处理4次重复。

#### 4.1.3.2 根系分泌物对黑胫病孢子囊产生量和游动孢子释放率的影响

在培养10d的含各种根系分泌物的培养基上用打孔器随机分别打取菌落直径、厚度和形态均相同的10块菌饼（Ф=0.5cm），移入含15ml 0.2%KNO3(W/V，灭菌去离子水配制)的培养皿中（王万能等，2005），置28℃黑暗诱导5d。充分混匀后，随机挑取4块菌丝块在显微镜下（10×16）观察3视野，计算每个视野的孢子囊数目，每个处理重复4次。将各处理培养皿置4℃冰箱0.5h，再移至培养28℃恒温培养箱中黑暗培养24h，取出放置0.5h后每块菌丝块随机镜检5视野，观察游动孢子释放情况（杨建卿等，2001），参考左豫虎（2002）的方法计算每隔视野空壳孢子囊数占视野总孢子囊数的百分比。

### 4.1.4 数据处理和统计方法

实验数据采用Excel2003初步处理和作图，统计分析采用SPSS13.0统计分析软件对数据进行方差分析(One way ANOVA)，再利用Duncan's新复极差法进行多重比较分析。

## 4.2 结果分析

### 4.2.1 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌Th长的影响

表21 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌Th长的影响(cm)

Table 21 Effect of root exudates on growth of phytophora parasitica var. nicotiana in different varieties

| 生育期  Growth stage | 品种  Varieties |  | 培养时间 Culture time | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2d | 3d | 4d | 5d |
|  | HR | (1.48±0.10)bc | (3.24±0.13)a | (4.03±0.15)a | (5.07±0.20)a |
|  | MR | (1.35±0.14)b | (3.42±0.20)a | (4.70±0.20)b | (7.86±0.31)c |
| 团棵期  Rosette stage | MS | (1.57±0.03)c | (3.86±0.21)b | (6.72±0.10)d | (8.24±0.25)cd |
|  | HS | (1.87±0.05)d | (4.22±0.17)c | (7.25±0.15)e | (8.41±0.09)d |
|  | CK | (1.05±0.07)a | (3.59±0.24)ab | (5.42±0.26)c | (7.20±0.20)b |
|  | HR | (0.96±0.11)a | (2.03±0.19)a | (4.37±0.34)a | (3.28±0.40)a |
| 旺长期  Rapid growing stage | MR | (1.20±0.24)a | (3.48±0.22)b | (5.25±0.25)b | (5.03±0.76)b |
| MS | (1.22±0.11)a | (3.64±0.21)b | (7.65±0.25)c | (8.37±0.15)d |
| HS | (1.53±0.19)b | (4.14±0.17)c | (8.32±0.09)d | (8.47±0.06)d |
|  | CK | (1.05±0.07)a | (3.59±0.24)b | (5.42±0.26)b | (7.20±0.20)c |
|  | HR | (0.75±0.11)a | (2.06±0.25)a | (4.40±0.26)a | (5.91±0.17)a |
| 现蕾期  Flower budding stage | MR | (1.07±0.14)b | (2.61±0.30)b | (5.11±0.38)b | (6.69±0.10)b |
| MS | (1.59±0 .19)d | (3.68±0.22)c | (7.33±0.16)c | (8.43±0.12)d |
| HS | (1.54±0.13)d | (4.16±0.17)d | (7.32±0.09)c | (8.47±0.06)d |
|  | CK | (1.05±0.07)c | (3.59±0.24)c | (5.42±0.26)b | (7.20±0.20)c |
|  | HR | (0.79±0.08)a | (2.87±0.20)a | (2.77±0.21)a | (6.56±0.23)a |
|  | MR | (1.09±0.14)b | (2.90±0.30)a | (3.20±0.16)b | (6.53±0.25)a |
| 成熟期  Mature stage | MS | (1.31±0.22)bc | (3.42±0.07)b | (5.67±0.15)c | (7.47±0.15)b |
|  | HS | (1.41±0.11)c | (4.37±0.03)c | (7.23±0.18)d | (8.35±0.19)c |
|  | CK | (1.05±0.07)b | (3.59±0.24)b | (5.42±0.26)c | (7.20±0.20)b |

注（Note）:数据为平均数±标准差，n=4。不同小写字母表示相同生育时期内，同一培养时间不同品种间差异达

5%显著水平（*p* <0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different cultivar in one culture time at same growth stage.

不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病病菌生长的影响有明显差异。团棵期各品种根系分泌物处

理菌落直径在培养后第2d均显著大于对照（*p*＜0.05），培养第3d～4d抗病品种根系分泌物抑制菌丝生长，而感病品种根系分泌物促进菌丝生长且一直显著大于对照（*p*＜0.05），且各品种菌落直径依次为HS＞MS＞CK＞MR＞HR；旺长期和现蕾期除MR根系分泌物处理在培养第2d表现为促进菌丝生长外，其他时间抗病品种均不同程度抑制了菌丝生长，感病品种自培养开始即表现为促进作用；成熟期除MR根系分泌物处理在培养第2d表现为促进菌丝生长外，其他时间抗病品种均不同程度抑制了菌丝生长，MS在培养第4d才表现为促进菌丝生长。同一品种不同生育时期根系分泌物对黑胫病菌丝生长也有明显差异(图10)，HR和MR品种随生育期进程先减小后增加，且HR和MR品种旺长期根系分泌物菌落直径均显著低于其他时期及对照（*p*＜0.05）。除MS成熟期显著低于其他时期，其他HS和MS品种随生育期进程变化较小。说明添加抗病品种根系分泌物对黑胫病菌丝生长有不同程度的抑制作用，而感病品种则显著促进其生长。抗病品种生长最旺盛时期抑制作用最强，而感病品种在各生育期均表现出较高的促进作用。

CK团棵期旺长期现蕾期成熟期



b b

b

b b b

c

b

e

a

d

c

bc

b b

a

a

a

b

a

9.0

8.0

7.0

菌落直径（cm）

Colony diameter

6.0

5.0

4.0

3.0

2.0

HR MR MS HS

图10 不同品种不同Th育期根系分泌物对黑胫病菌丝Th长的影响(cm)

Fig. 10 Effect of root exudates on growth of*phytophora parasitica* var. *nicotiana* in different growth period of different resistance varieties

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=4。不同小写字母表示同一品种不同生育期间的差异达5%显著水平（*p*

＜0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different growth stage at same varieties (*p*＜0.05).

### 4.2.2 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌孢子囊产Th量的影响

添加不同抗性烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌孢子囊产生量均有明显促进作用（图11）。添加抗性品种根系分泌物处理的孢子囊数量略高于对照，但与对照没有显著差异（*p*＞0.05），添加感病品种根系分泌物处理的孢子囊数量显著高于对照（*p*＜0.05）。整个生育期，除旺长期抗性品种根系分泌物处理孢子囊数量相等外，其余时期孢子囊数量均表现为HS＞MS＞MR＞HR＞CK。在整个生育期中，添加抗病品种根系分泌物处理的孢子囊数量相对稳定，感病品种对生育进程呈现增后减小趋势，HS旺长期达到最大值，较对照提高了76.76%, MS品种现蕾期达到最大值。较对照提高了44.24%。可见添加各品种根系分泌物能刺激孢子囊产生，且刺激作用与品种抗性负相关。

CK HR MR MS HS



c

b

b

c

b

b

a

a

a

a

a

a

b

a a

a

a

ab

b

a

30.0

25.0

20.0

孢子囊量（个）

Sporangium yield

15.0

10.0

5.0

0.0

团棵期旺长期现蕾期成熟期

Rosette stage

Rapid growing stage

Flower budding stage Mature stage

图11 不同品种根系分泌物对黑胫病菌孢子囊产Th量的影响(个)

Fig. 11 Effect of root exudates on sporangium yield of*phytophora parasitica* var. *nicotiana* in different resistance varieties

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=4。不同小写字母表示相同生育期内不同品种的差异达5%显著水平（*p* <

0.05），字母相同表示差异不显著（p＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different cultivar at growth stage (p *<*0.05).

### 4.2.3 不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌游动孢子释放率的影响

添加不同抗性品种根系分泌物对黑胫病菌游动孢子释放的影响存在明显差异（图12）。整个生育期感病品种根系分泌物处理的黑胫病游动孢子释放率均高于对照及抗病品种，且在旺长期显著高于对照及抗病品种(*p*<*0.05*)。添加抗病品种根系分泌物处理在旺长期游动孢子释放受到抑制，

低于对照但没有达到显著水平（*p*＞*0.05*），除团棵期MR 外，其他时期均促进了游动孢子释放。这个生育期以旺长期对感病品种促进作用最大，HS和MS较对照分别提高了40.95%和38.51%，旺长期抑制作用最大，HR和MR较对照分别降低14.29%和8.30%。说明烤烟感病品种根系分泌物中含有某些可以刺激黑胫病菌游动孢子释放的物质，而抗病品种随生育期变化而表现出促进和抑制两种作用，其原因可能是不同时期根系分泌物种类和数量发生变化引起的。

CK HR MR MS HS



ab b

b

b

NS

NS

a ab

ab ab

a ab

60.0

50.0

40.0

游动孢子释放率(%)

Zoopore release rate

30.0

20.0

10.0

0.0

团棵期旺长期现蕾期成熟期

Rosette stage

Rapid growing stage

Flower budding stage Mature stage

图12 不同品种根系分泌物对黑胫病菌游动孢子释放的影响（%）

Fig. 12 Effect of root exudates on release zoospore rate of*phytophora parasitica* var. *nicotiana* in different resistance varieties

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=4。不同小写字母表示相同生育期内不同品种的差异达5%显著水平（*p* <

0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of four replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different varieties at growth stage (*p* <0.05).

## 4.3 讨论与小结

根系分泌物中的糖、氨基酸、维生素等物质为根际微生物的生长和繁殖提供了大量的能源和营养物质，这些物质对根际微生物的种类、分布、品种以及生理特性产生重要影响影响（涂书新等, 2000; Meyer等, 1996; Saeki等, 1996）。有关根系分泌物对病原菌的影响已在小麦（康萍芝等，2006）、棉花（袁虹霞等，2002）、黄瓜（韩雪，2006）、大豆（张俊英等，2008）、西瓜（田永强等，2008）、茄子（周宝利等，2010）等作物有过报道。

已有研究结果表明，作物抗性差异可以通过植物根系分泌物对病原菌化感作用的差异体现出来（周宝利等，2010），不同抗病品种根系分泌物能在不同程度抑制菌丝生长、病菌生物量和孢子

萌发，而感病品种根系分泌物则对其具有刺激作用（杨之为等，1995；袁虹霞等，2002；韩雪，2006；Smiley等，1973；田永强等，2008）。本试验中，添加抗病品种根系分泌物抑制了黑胫病菌丝的生长，而感病品种根系分泌物在各个生育期均促进了菌丝生长。这与以往研究结果一致，说明不同烤烟对黑胫病的品种抗性差异与根系分泌物有密切关系，由此也可以证实抗性烤烟品种根系分泌物中确实存在某些化感物质，这些物质的差异导致了对病原物生长的促进或抑制作用，但究竟是那些物质起到这种作用，还需进一步分析不同抗性品种根系分析物中的物质种类和量，以及这些物质对黑胫病菌生长的影响和作用关系。从以往对根系分泌物分离鉴定结果来看，根系分泌物中的糖、氨基酸、酚酸和有机酸等物质均可在一定浓度表现出对病原菌生长的促进或抑制作用（张俊英等，2008；袁虹霞等，2002；刘素萍等，1998；Ye等，2004；Seheffknecht等，2006；李勇等，2009）。

在疫霉菌生活史的所有发育阶段中，孢子囊的产生和游动孢子的释放及其萌发为繁殖体数量 的快速增加、对寄主的侵染以及病害的发生流行提供了最大的机会。本研究中，除旺长期外，添 加感病品种根系分泌物均明显促进了孢子囊的产生和游动孢子的释放，抗病品种根系分泌物对孢 子囊产生量促进作用较小，同时只在旺长期表现出对游动孢子释放的抑制作用。这说明在大部分 时间不同抗性品种根系分泌物均促进了孢子囊产生量和游动孢子释放量，但感病较抗病品种促进 作用更大。这种现象可能随烤烟连作年限增加，根系分泌物在土壤中不断积累，进而引起病害加 重，抗性品种抗病性降低的原因之一。另外，本研究中抗病品种并没有对孢子囊和游动孢子释放 有明显抑制作用，相反在大部分时间还出现促进作用，这可能是因为所收集根系分泌物浓度或收 集方法差异造成的，确切原因有待进一步研究。

在植物生长期间，约有30％～60％的净光合产物运输到植物根系（Lynch等, 1990）。植株的生长代谢随生育时期变化，根系的分泌作用以及根系分泌物的组分也会发生明显的变化。根系发育旺盛时期也是根系分泌量增多的时期（胡锋等，1998）。总体来说，供试不同抗感黑胫病烤烟品种中，抗病品种对黑胫病菌生长繁殖的抑制作用和感病品种的促进作用最明显或者作用最大的时期集中在烤烟生长发育最旺盛阶段，即旺长期和现蕾期。这可能是因为烤烟生长最旺盛时期也是烤烟根系分泌物中具有抑制和促进黑胫病菌生长和繁殖的物质最多的时期。本研究也显示，植物根系分泌物在作物抗病性方面具有重要作用和影响，很有必要对其进行深入研究，以期从根系分泌物角度进一步揭开作物抗病机理和连作障碍引发机理等方面的研究。

# 第五章 烤烟根系分泌物对自身幼苗Th长的影响

## 5.1 材料与方法

### 5.1.1 供试材料

供试烤烟品种为红花大金元（以下简称红大），供试品种采用裸种，种子表面消毒（2%CuSO4，

15min）、24h催芽后播于育苗盘上，采用常规烤烟漂浮育苗烟苗。

### 5.1.2 根系分泌物收集

采用水培法收集烤烟根系分泌物，具体步骤为：先将红大幼苗移至三角瓶中进行培养，营养液采用Hogland营养液和Amon微量元素营养液，营养液以淹没幼苗根部为度，每天加去离子水至刻度，每天通氧，每次1h，每3d用1mol/L HCl和1mol/L NaOH将pH保持在6.0±0.2，每7d更换一次营养液。溶液培养14d后收集根系分泌物，先将烟苗从营养液中取出，先用自来水冲洗3次，后用蒸馏水冲洗3次，再用去离子水冲洗3次，冲洗过程中尽量避免伤根。在原光照条件下将烟苗放入盛有500ml无菌去离子水的三角瓶中培养，三角瓶用锡箔纸包裹，收集时间为6个小时（9:00～15:00），收集期间持续通氧，连续收集5d，合并收集液，收集完毕后取出植株，用少量无菌去离子水冲洗根系，将各品种根剪下，用滤纸吸干根表面水分称鲜重，以1.00g/mL（表示1ml水溶液中含有1.0g植物鲜重的根系分泌物）作为根系分泌物母液，母液加入几滴5mg/L百里酚溶液以抑制微生物活动密并密封置于低温冰箱保存（-20℃）。

### 5.1.3 试验方法

#### 5.1.3.1 试验设计

实验用土壤为已灭菌的烤烟育苗基质，每盆装基质50g（9.5cm×9.0cm×11.5cm），含水量为

60%，将生长均匀一致的烟苗定植于盆中，定期浇Hoagland培养液，置于气候培养箱中培养5天后按各处理浓度每盆100ml 均匀加入盆中，浓度梯度为0g/mL(CK)、0.25g/mL、0.50g/mL 和

1.00g/mL。定期浇Hoagland培养液和Arnon微量元素营养液，30d后测量幼苗生长指标和生理指标。

#### 5.1.3.2 根系分泌物对自身种子萌发的影响

取不同浓度根系分泌物10ml加入到放有灭菌滤纸的培养皿中（Ф=9cm），分别均匀点播各烤烟品种种子（裸种）50粒，每处理3个重复，置于光照培养箱中26℃黑暗培养，每天补充2ml蒸馏水，14d后调查各处理种子发芽数。

#### 5.1.3.3 生物性状及总叶绿素测定

取样后立即测量各处理株高和根长（cm），地上部分和地下部分鲜重（g）。采用叶绿素仪（型

号SPAD502，日本）测定叶片中叶绿素含量，读数用SPAD值表示。每盆测定3株，测定对象选取充分展开的功能叶3片，每次测量重复3次，取其平均值。

#### 5.1.3.4 根系活力、pH值及相对电导率测定

参考李合生（2000）方法，采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定地黄根系活力，测定485nm处OD值，以TTC还原量表示根系活力(µg·g-1h-1, FW). pH值采用PHS-2C酸度计测定。采用电导仪（上海雷磁）测定相对电导率。

#### 5.1.3.5 保护酶活性测定

##### 5.1.3.5.1 酶液制备

称取新鲜叶片0.5g，加入预冷0.05mol/L pH=7.8的磷酸缓冲液1mL研磨匀浆，洗入离心管于

2000r/min离心20min，倾出上清液并加入磷酸缓冲液提取残渣一次，合并上清液并定容至5mL。

##### 5.1.3.5.2 SOD活性测定

SOD反应体系为0.05mol/L磷酸缓冲液1.5mL、130mmol/L Met溶液0.3ml、750umol/LNBT溶液0.3mL、100 umol/L EDTA-Na2溶液0.3mL、20 umol/L核黄素溶液0.3mL、酶液0.05mL、蒸馏水0.25mL、对照用缓冲液代替。混匀后将1支对照管置于暗处，其他管于4000Lx日光下反应20min，以SOD抑制NBT光化还原反应50％为一个酶活力单位，测OD560.

SOD活性=[VT×(Ack-Az)÷(0.5ACK×W×Vt)]

式中：A为吸光值；VT表示酶液总体积(mL)；W表示样品重量（g）；Vt表示测定时提取液体积(mL)。

##### 5.1.3.5.3 POD活性测定

POD反应体系为0.3%H2O21 mL、0.2 mL愈创木酚0.95 mL、0.05mol/L pH=7.0磷酸缓冲液 1

mL、酶液0.05 mL、对照用pH=7.0磷酸缓冲液代替。启动反应后，测定1min和5min时A470，以每min增加0.1为一个酶单位，测定OD470。

POD活性=[VT×(A5-A1)÷(0.1×W×4×Vt)]

式中：A为吸光值；VT表示酶液总体积(mL)；W表示样品重量（g）；Vt表示测定时提取液体积(mL)。

##### 5.1.3.5.4 CAT活性测定

CAT反应体系为0.3%H2O21 mL（pH=7.8的磷酸缓冲液配置），H2O1.9mL，酶液0.1mL，对照用0.05mol/L pH=7.8的磷酸缓冲液代替。启动反应后，测定1min和4min时A240，以每min减少0.01为一个酶单位，测定OD240.

CAT活性=[VT×(A1-A4)÷(0.01×W×3×Vt)]

式中：VT表示酶液总体积(mL)；W表示样品重量（g）；Vt表示测定时提取液体积(mL)。

##### 5.1.3.5.5 丙二醛含量（MDA）测定

MDA含量测定：取酶液1.5mL，加入0.5%硫代巴比妥酸2.5mL，混合后于沸水浴中反应20min，冷却后于3000转/min离心15min，上清液于532nm、600nm和450nm处测定A值。

MDA含量= [(A532-A600)×6.45–0.56A450]×1 000V/W

式中，A为吸光值；V为提取液总体积(mL)；W为样品鲜重（g）。

### 5.1.4 数据处理和统计方法

实验数据采用Excel 2003进行初步处理和作图，统计分析采用SPSS13.0统计分析软件对数据进行方差分析(one-way ANOVA)，再利用Duncan's新复极差法进行多重比较分析。

## 5.2 结果分析

### 5.2.1 根系分泌物对烤烟种子发芽率和幼苗Th长的影响

烤烟根系分泌物对红大种子发芽率和各项生物性状指标均表现出明显的抑制作用，且随根系分泌物浓度增加其抑制作用逐渐加强（表22）。各处理红大发芽率分别较对照降低了23.67%、

48.79%和86.81%，且各处理间差异显著（*p*＜0.05）；除株高和地下部鲜重在低浓度（0.25g/mL）与对照差异不显著外，其余各指标在各处理间均达显著水平（*p*＜0.05），说明烤烟根系分泌物含有对自身种子萌发和生长产生抑制作用的物质。

表22 根系分泌物对烤烟自身种子萌发和幼苗Th长的影响

Table 22 Effect of root exudates on itself seed germination and seedling growth

| 处理  Treatment (g/mL) | 发芽率  Germination (%) | 株高  Plant height (cm) | 根长  Root length (cm) | 地上部鲜重  Above-ground FW (g) | 地下部鲜重  Under-ground FW (g) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ck | (98.29±0.78)d | (5.84±0.12)b | (8.37±0.15)d | (2.86±0.10)d | (0.30±0.03)c |
| 0.25 | (75.02±2.2 8)c | (5.50±0.11)b | (7.55±0.17)c | (2.56±0.09)c | (0.27±0.02)c |
| 0.50 | (50.33±1.22)b | (4.43±0.15)a | (6.48±0.16)b | (1.94±0.09)b | (0.17±0.03)b |
| 1.00 | (12.96±1.75)a | (4.38±0.32)a | (5.32±0.20)a | (1.52±0.06)a | (0.11±0.03)a |

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=3. 表中不同小写字母表示处理间在0.05水平有显著差异（*p*<0.05），字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small letters indicate significant difference among treatments at 5% level.

### 5.2.2 根系分泌物对烤烟幼苗Th理指标的影响

#### 5.2.2.1 根系分泌物对叶绿素总量（SPAD）的影响

根系分泌物明显抑制了红大幼苗总叶绿素含量（图13），且随作用浓度增加而逐渐减低，低浓

度（0.25g/mL）时幼苗SPAD 值较对照降低4.42%，没有显著差异（*p*＜0.05）；浓度为0.50g/mL和1.00g/mL时较对照显著降低（*p*＜0.05），分别降低了39.18%和54.64%。以上说明根系分泌物抑制了叶绿素的合成，光合作用降低，进而对烟株正常生长发育产生消极影响。

c

c

b

a

30

25

20

总叶绿素含量

Chl content SPAD

15

10

5

0

ck 0.25 0.50 1.00

根系分泌物浓度g/mL RE concentration

图13 根系分泌物对烤烟幼苗总叶绿素含量的影响

Fig. 13 Effect of root exudates on Chl content（SPAD）

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=3. 不同小写字母表示不同浓度处理间SPAD值差异达5%显著水平(*p* <0.05)，字母相同表示差异不显著(p> 0.05). Data are means±standard deviation of three replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level among treatments (*p* <0.05).

#### 5.2.2.2 根系分泌物对根系活力的影响

红大幼苗根系活力随根系分泌物作用浓度的增加而逐渐下降（图14），且各处理浓度间差异显著（*p*＜0.05）。在低浓度（0.25g/mL）时较对照降幅较小，为10.63%，高浓度（1.00 g/mL）时较对照降幅最大，为71.59%。说明根系分泌物中自毒物质严重影响了根系代谢功能，脱氢酶活性下降。

300.0

d

根系活力

root activity(µg-1h-1,FW)

250.0 c

200.0

b

150.0

100.0 a

50.0

ck 0.25 0.50 1.00

根系分泌物浓度g/mL RE concentration

图14 根系分泌物对烤烟幼苗根系活力的影响

Fig. 14 Effect of root exudates on root activity

#### 5.2.2.3 根系分泌物对叶片和根际pH值的影响

根系分泌物显著降低了红大根际pH值，且随作用浓度的增加而逐渐降低，各处理间差异显著（*p*＜0.05）（图15）。根系分泌物对叶片pH值的影响呈随作用浓度增加先减小后增加趋势，浓度为0.50g/mL时pH值最小，较对照下降8.34%，之后稍有上升但依然显著小于对照（*p*＜0.05）。

7.2 d 7.0

6.8 c

6.6

6.4

pH值

pH value

6.2 b

6.0 a

5.8

5.6

5.4

5.2

叶片pH根际pH



b

a

a

a

ck 0.25

0.50 1.00

根系分泌物浓度

RE concentration(mg/mL)

图15 根系分泌物对烤烟幼苗叶片和根际pH值的影响

Fig. 15 Effect of root exudates on pH value in leaves and rhizosphere

#### 5.2.2.4 根系分泌物对叶片和根系电导率的影响

红大幼苗叶片和根系相对电导率在根系分泌物作用下均随作用浓度的增加而出现上升趋势

（图16）。且幼苗叶片和根系各处理间均差异显著（*p*＜0.05）。其中叶片相对电导率较对照分别提高了36.43%、56.62%和75.52%，根系较对照分别提高了32.13%、64.70%和76.19%。说明根系分泌物中自毒物质导致幼苗质膜过氧化水平提高，细胞膜透性受到严重破坏。



叶片

d

c

根系

b

a

d

b

c

a

50.2

45.2

40.2

35.2

相对电导率

Relative conductivity (%)

30.2

25.2

20.2

15.2

10.2

5.2

ck 0.25 0.50 1.00

根系分泌物浓度g/mL

RE concentration

图16 根系分泌物对烤烟幼苗叶片和根系相对电导率的影响

Fig. 16 Effect of root exudates on relative conductivity in leaves and root

### 5.2.3 根系分泌物对烤烟幼苗保护酶活性和膜脂过氧化物的影响

#### 5.2.3.1 根系分泌物对POD活性的影响

红大幼苗叶片和根系POD 活性在根系分泌物作用下呈现不同变化（图17）。幼苗叶片POD活性随根系分泌物浓度增加一直保持上升趋势，较对照分别提高了40.74%、44.33%和57.04%，且均显著高于对照（*p*＜0.05）；幼苗根系POD活性随根系分泌物浓度增加呈先增加后减小趋势，但始终高于对照，较对照分别提高19.55%、35.71%和7.30%。说明在根系分泌物作用下幼苗体内活性氧和膜透性增加，诱导了POD活性的提高。

根系



c

叶片

c

b

a

b

b

a

a

90

80

POD活性(Ug· -1min-1,Fw)

POD activity

70

60

50

40

30

ck 0.25 0.50 1.00

根系分泌物浓度g/mL RE concentration

图17 根系分泌物对烤烟幼苗叶片和根系POD活性的影响

Fig. 17 Effect of root exudates on POD activity in leaves and root

#### 5.2.3.2 根系分泌物对SOD活性的影响

在根系分泌物作用下红大幼苗叶片和根系SOD活性随作用浓度增加呈先增加后减小趋势（图

18）。幼苗根系SOD活性在浓度（0.25g/mL）以后开始下降，高浓度（1.00 g/mL）时活性最低，较对照下降7.31%，且显著低于其他处理（*p*＜0.05）；幼苗叶片SOD活性在终浓度（0.50g/mL）开始下降，但各处理浓度活性均显著高于对照（*p*＜0.05）。以上结果进一步说明根系分泌物对质膜产生消极影响，诱导了SOD活性的增加。

根系



160

叶片

150 c

SOD活性(Ug· -1min-1,Fw)

SOD activity

b

140 b b

130 c

b

120 a a

110

100

90

ck 0.25 0.50 1.00

根系分泌物浓度g/mL RE concentration

图18 根系分泌物对红大叶片和根系SOD活性的影响

Fig. 18 Effect of root exudates on SOD activity in leaves and root

#### 5.2.3.3 根系分泌物对CAT活性的影响

红大幼苗叶片和根系CAT 活性在根系分泌物作用下呈先增加后减小趋势（图19）。低浓度

（0.25g/mL）以前叶片和根系活性均显著高于对照（*p*＜0.05），之后均呈下降趋势，根系较对照下降14.68%和24.85%，且达显著水平（*p*＜0.05），叶片较对照下降了4.37%和7.55%。说明在低浓度时根系分泌物可以诱导CAT活性提高以降低自由基伤害，但随处理浓度增加，这种保护机制被削弱或丧失。

170

150 c

CAT活性(Ug· -1min-1,Fw)

CAT activity

b

130

d

根系叶片



ab a

110 c

90 b

a

70

50

ck 0.25 0.50 1.00

根系分泌物浓度g/mL RE concentration

图19 根系分泌物对烤烟幼苗叶片和根系CAT活性的影响

Fig. 19 Effect of root exudates on CAT activity in leaves and root of tobacco

#### 5.2.3.4 根系分泌物对MDA含量的影响

红大幼苗叶片和根系MDA含量在根系分泌物作用下均随作用浓度增加而增大（图20）。其中叶片MDA含量较对照分别增加7.73%、26.00%和39.34%，根系MDA含量较对照分别增加20.92%、

55.89%和65.69%，且与对照均达显著水平（*p*＜0.05）。说明根系分泌物导致幼苗叶片和根系活性氧剧增，质膜受到损坏，且随作用浓度增加伤害程度增大。

根系



叶片

c

b

a

a

c

c

b

a

8

7

丙二醛含量(µmolg-1,Fw)

MDA content

6

5

4

3

2

ck 0.25 0.50 1.00

根系分泌物浓度g/mL

RE concentration

图20 根系分泌物对烤烟幼苗叶片和根系MDA的影响

Fig. 20 effect of root exudates on MDA content in leaves and root of tobacco

## 5.3 讨论与小结

连作障碍的形成是植物土壤系统内多种因素综合作用的结果，其中，自毒作用是植物化感作用的一种特殊作用方式，其一个非常重要的特点是依赖植物根系分泌到环境中感的化学物质起作用（张晓玲等，2007）。根系分泌物与连作障碍的关系已经在多种作物上得到证明和验证，并且已经分离出一些自毒物质（周艳丽等，2011；张重义等，2011；喻景权等，1999）。已有研究表明根系分泌物中的自毒物质通过影响植物生长发育必须的酶类活性，细胞的分裂和伸长，细胞膜透性，对营养元素的吸收和利用，病虫害特别是土传病害抗性等方面来抑制植物正常生长发育（邱立友等, 2010; Gattas Hallak等, 1999）。烤烟是忌连作作物，但随着烤烟种植规模的逐年扩大，致使我国大部分烟区连作现象普遍。据统计，我国烤烟连作面积占烤烟总种植面积的30%～60%，经济损失严重（时鹏等，2011）。烤烟长期连作造成土壤理化性状变差，养分失衡，烟叶产质量下降， 病虫害特别是土传病虫害抗性降低（张科等，2010；邓阳春等，2010；于方玲等，2010），严重制约了我国烟叶生产的可持续发展。至今有关烤烟根系分泌物与烤烟产生连作障碍方面的研究甚少， 因此本研究对进一步研究烤烟连作障碍机理具有一定参考价值。

本试验中，根系分泌物对自身种子萌发和幼苗的生长均有明显的抑制作用，且抑制强度随作用浓度的增加而增大，表现出了明显的浓度效应。这与郭亚丽等（2007）研究结果相似。同时也进一步佐证了烤烟根系分泌物中含有自毒物质。根系分泌物对幼苗根系鲜重的抑制作用最大，这可能是因为根系是最直接接触自毒物质的器官，王进闯等（2005）研究也表明根系较其他生理指标对自毒物质的响应更加灵敏。本试验还表明，根系分泌物影响了红大幼苗正常的生理代谢过程： 叶绿素合成受抑，pH值降低，根系活力降低，离子渗透量加大。这些结果说明根系分泌物中的自毒物质致使植株质膜系统受到严重破坏，胞内毒性物质产生与清除机制受损，导致光合作用减弱、 根系还原能力较低，离子渗透量加大等不良反应，从而共同造成了幼苗正常生长代谢受到严重抑

制。据报道，自毒物质可能通过影响类囊体膜的稳定性，导致叶绿素的含量降低，从而降低了叶绿体对光能的吸收，影响了光能在两个光系统之间的合理分配，进而降低光合速率（Aro等，1993；

Downton等，1998）。相似的结果也在其他植物上有过报道（覃逸明等，2009；刘易等，2009；周凯等，2009）。试验结果显示，根系分泌物对幼苗体内保护酶系统造成破坏，SOD、POD和CAT为植株体内重要的保护酶，起到稳定氧代谢平衡的作用。根系分泌物诱导了SOD、POD和CAT活性的增加以减轻氧化伤害。除幼苗叶片POD活性一直保持较高水平外，随着作用浓度增加，其他SOD、POD和CAT活性均呈先增加后减小趋势，这是因为随着根系分泌物作用浓度增大，幼苗体内氧代谢严重失衡，导致一些酶功能受抑，活性降低，各种酶对这种逆境的耐受力不同进而导致各种酶活性降低时的根系分泌物作用浓度不同。同时，幼苗叶片和根系MDA含量随作用浓度增加而升高，也进一步说明质膜系统受到严重破坏。相似的研究结果亦有过报道（李振方等，2010；甄文超等，2004）。

由以上分析可知，烤烟根系分泌物中确实存在某些自毒物质，这些物质的量或者累加含量产生的自毒作用使植株细胞分裂和伸长、光合作用、根系活力等受到抑制，保护酶系统受到破坏导致细胞膜系统紊乱。这些不利影响综合起来造成了烤烟体内生物合成和代谢过程破坏和紊乱，进而出现所谓自毒作用症状。这也很好解释了随着烤烟连作年限的提高，烟株产质量出现大幅下降， 病虫害加剧等现象（张科等，2010；刘国顺等，2003）。

# 第六章 不同酚酸对烤烟幼苗Th长的影响

## 6.1 材料与方法

### 6.1.1 供试材料

供试品种同5.1.1

### 6.1.2 试验设计及指标测定

根据前期根系分泌物酚酸组分分析结果，确定烤烟根系分泌物中含有4种酚酸，分别为对羟

基苯甲酸、香草酸、丁香酸和香豆酸，因此，本试验以添加4种酚酸及其混合物作为试验处理，以蒸馏水处理为对照，每个处理设定4个浓度梯度：0g/L(CK)、0.50g/L、0.10g/L和0.50g/L，3次重复。

实验用土壤为已灭菌的烤烟育苗基质，每盆装基质50g，含水量为60%，将生长均匀一致的烟苗定植于盆中，定期浇Hoagland培养液，置于气候培养箱中培养5天后按各处理浓度每盆100ml均匀加入盆中，定期浇Hoagland培养液和Amon微量元素营养液，30d后测量幼苗生长指标和生理指标。

#### 6.1.2.1 生物性状和总叶绿素测定同5.1.3.2

#### 6.1.2.2 根系活力、pH值及相对电导率测定

同5.1.3.4

#### 6.1.2.3 根系SOD、POD、CAT活性及丙二醛（MDA）含量测定同5.1.3.5

### 6.1.3 数据处理和统计方法

同5.1.3

## 6.2 结果与分析

### 6.2.1 不同酚酸对烤烟幼苗Th长的影响

不同酚酸对烤烟幼苗对幼苗发芽率、株高、地上部和地下部鲜重影响不同（表23）。以对照相比，不同酚酸在不同作用浓度下均显著抑制了烤烟种子发芽率（*p*＜0.05），且随作用浓度增加抑制作用增大。其中作用浓度0.05g/L时混合物和对羟基苯甲酸对发芽率的抑制作用最大，较对照分别下降16.20%和15.05%，香豆酸抑制作用最小，较对照下降10.51%；作用浓度0.10g/L时混合酚酸和对羟基苯甲酸抑制作用最大，较对照下降27.34%和33.03%，香豆酸抑制作用相对较小，较对照下降12.68%，高浓度0.50g/L对羟基苯甲酸和丁香酸抑制作用较大，较对照分别下降

57.32%和48.53%，香豆酸抑制作用相对较小，较对照分别下降22.73%和21.83%。不同酚酸在不同浓度下除香豆酸在低浓度（0.05g/L）促进了株高增长外基本上抑制了幼苗株高，其中低浓度

（0.05g/L）时各酚酸对株高增长抑制作用较小，较对照下降2.83%~5.67%，中浓度（0.10g/L）和高浓度（0.50g/L）时以丁香酸抑制作用最大，且均显著低于对照（*p*＜0.05）。不同酚酸在不同浓度下对地上部鲜重的影响差异较大，丁香酸、香豆酸和混合物在各浓度下均表现为促进地上部鲜重增加，且均表现为随浓度增大促进作用减弱且处理间均无显著差异（*p*＞0.05），香草酸和对羟基苯甲酸表现为“先促后抑”，低浓度（0.05g/L）时促进地上部鲜重增加，中浓度（0.10g/L）以后则表现为抑制作用，香草酸则在高浓度（0.05g/L）表现为抑制作用，同时在不同浓度条件下不同酚酸对幼苗地下部鲜重的影响也存在差异，但各酚酸均无显著差异（*p*＞0.05），对羟基苯甲酸和混合物表现为“先促后抑”，低浓度（0.05g/L）时促进地上部鲜重增加，中浓度（0.10g/L）以后则表现为抑制作用，其他酚酸均表现为抑制作用，且随作用浓度增加抑制增强。以上说明，添 加外源酚酸抑制了种子发芽率，基本上抑制了株高增长，同时，酚酸对地上部和地下部鲜重的影 响依酚酸种类和浓度存在差异。

表23 不同酚酸对烤烟幼苗Th长的影响

Table 23 Effect of different phenolic acids on growth of flue-cured tobacco

| 酚酸  Penolic acids | 浓度(g/L)  concertration | 发芽率(%)  Germination | 株高(cm)  Plant height | 地上部鲜重(g)  Above-ground FW | 地下部鲜重(g)  Under-ground FW |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0.05 | (81.25±0.98)c | (3.33±0.71)a | (7.05±0.34)c | (0.54±0.25)a |
| 对羟基苯甲酸  ρ-hydrobenzoic acid | 0.10 | (64.05±3.30)b | (3.13±0.12)a | (5.85±0.31)ab | (0.49±0.24)a |
| 0.50 | (40.82±3.53)a | (2.80±0.17)a | (5.35±0.30)a | (0.32±0.07)a |
|  | CK | (95.64±0.81)d | (3.53±0.06)a | (6.39±0 .84)bc | (0.50±0.11)a |
|  | 0.05 | (83.19±1.14)c | (3.33±0.25)a | (7.29±0.79)ab | (0.46±0.12)a |
| 香草酸  Vanillic acid | 0.10 | (76.59±1.04)b | (3.13±0.50)a | (6.41±0.90)ab | (0.37±0.13)a |
| 0.50 | (70.15±3.86)a | (3.00±0.53)a | (5.42±1.62)a | (0.27±0.08)a |
|  | CK | (95.64±0.81)d | (3.53±0.06)a | (6.39±0.84)b | (0.50±0.11)a |
|  | 0.05 | (83.19±3.12)c | (3.40±0.17)b | (6.76±0.60)a | (0.42±0.21)a |
| 丁香酸  Syringic acid | 0.10 | (72.08±5.34)b | (2.80±0.35)a | (6.73±0.52)a | (0.38±0.03)a |
| 0.50 | (49.23±5.18)a | (2.57±0.21)a | (6.69±0.25)a | (0.30±0.07)a |
|  | CK | (95.64±0.81)d | (3.53±0.06)b | (6.39±0.84)a | (0.50±0.11)a |
|  | 0.05 | (85.59±3.24)b | (3.87±0.42)a | (7.33±1.03)a | (0.37±0.13)a |
| 香豆酸  Coumaric acid | 0.10 | (83.51±1.95)b | (3.50±0.17)a | (7.14±1.07)a | (0.37±0.05)a |
| 0.50 | (74.76±3.46)a | (3.13±0.15)a | (6.51±0.81)a | (0.35±0.10)a |
|  | CK | (95.64±0.81)c | (3.53±0.06)a | (6.39±0 .84)a | (0.50±0.11)a |
|  | 0.05 | (80.15±1.98)b | (3.43±0.35)a | (7.01±0.21)a | (0.54±0.07)a |
| 混合物  Mixture | 0.10 | (69.49±3.08)a | (3.33±0.23)a | (6.83±0.86)a | (0.44±0.25)a |
| 0.50 | (66.76±1.60)a | (3.17±0.29)a | (6.74±0.84)a | (0.44±0.17)a |
|  | CK | (95.64±0.81)c | (3.53±0.06)a | (6.39±0.84)a | (0.50±0.11)a |

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=3. 不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间差异达5%显著水平（*p*＜0.05，字母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic.

### 6.2.2 不同酚酸对烤烟幼苗Th理指标的影响

#### 6.2.2.1 不同酚酸对烤烟幼苗叶绿素总量（SPAD）的影响

不同酚酸在不同浓度间对幼苗叶绿素总量的影响无显著差异（*p*＞0.05）（图21），对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸和混合物均抑制了幼苗总叶绿素含量，且随作用浓度增大抑制作用增加，低浓度时（0.05g/L）对羟基苯甲酸抑制作用最大，较对照下降8.22%，混合物抑制作用最小，较对照下降1.42%，中浓度时对羟基苯甲酸抑制作用最大，较对照下降10.00%，香豆酸抑制作用最小，较对照下降2.35%，高浓度时香草酸抑制作用最大，较对照下降15.58%，香豆酸抑制作用最小，较对照下降6.71%。香豆酸对总叶绿素影响则表现为“低促高抑”，在低浓度（0.05g/L）促进总叶

绿素，中浓度以后则表现为抑制作用（0.10g/L）。说明不同酚酸基本抑制了幼苗叶绿素的合成，抑制作用强弱因作用浓度大小存在一定差异。

45.00

40.00

35.00

30.00

25.00

20.00

15.00

10.00

5.00

0.00

ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L



NS

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸混合

ρ-hydrobenzoic acid Vanillic acid Syringic acid Coumaric acid mixture

酚酸Phenolic acid

图21 不同酚酸对幼苗叶绿素总量（SPAD）的影响

Fig. 21 Effect of phenolic acid on Chl content(SPAD) of flue-cured tobacco

注(Note): 数据为平均数±标准差n=3, NS表示在0.05水平无显著差异。Data are means±standard deviation of three replicates. NS indicate no-significant different at 5% level.

#### 6.2.2.2 不同酚酸对烤烟幼苗叶片pH值的影响

不同酚酸对幼苗叶片pH值的影响不同（图22），除混合物在低浓度（0.05g/L）时显著低于对照外（*p*＜0.05），均在不同程度提高了幼苗叶片pH值。对羟基苯甲酸pH值随作用浓度增加而升高，且高浓度时显著高于对照（*p*＜0.05）；香豆酸pH值随作用浓度增加而不断降低，且低浓度时显著高于对照（*p*＜0.05），香草酸、丁香酸和阿魏酸pH值随作用浓度呈先增加后减小趋势，高浓度（0.05g/L）时稍有升高；混合物pH值随作用浓度呈先减小后增加趋势，高浓度时稍有下降。以上说明添加不同酚酸导致叶片pH值升高，但升高幅度因酚酸种类和作用浓度存在差异。

b

6.10

6.00

5.90

5.80

5.70

5.60

5.50

5.40

5.30

5.20



ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

b

b

a

a

a

ab

a

a

ab

b

b

a

a

a

a

a

a

a b

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸混合

ρ-hydrobenzoic acid Vanillic acid Syringic acid Coumaric acid mixture

酚酸Phenolic acid

图22 不同酚酸对幼苗叶片pH的影响

Fig. 22 Effect of phenolic acid on Chl content(SPAD) of flue-cured tobacco

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=3，不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间差异达5%显著水平（*p*＜0.05）母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic.

#### 6.2.2.3 不同酚酸对烤烟幼苗相对电导率的影响

不同酚酸在不同作用浓度下均促进了电导率的增加，且随作用浓度增加促进作用增大（图

23）。但不同酚酸对相对电导率的影响存在差异，香豆酸对电导率促进作用最大，各浓度较对照分别增加55.12%、69.89%和82.44%，且各浓度均达显著差异（*p*＜0.05）。说明添加酚酸能导致幼苗根系细胞离子渗透量加大，膜系统受到破坏。

不同酚酸对幼苗叶片相对电导率的影响差异较大（图24），但各处理各浓度间无显著差异（*p*

＞0.05）。香草酸和香豆酸均促进了叶片相对电导率的提高，但与浓度不成比例；丁香酸在各浓度下均减小了叶片相对电导率。香豆酸在各浓度下对幼苗相对电导率的影响较大，较对照分别提高

22.80%、20.98%和42.65%。说明不同酚酸对幼苗叶片相对电导率的影响不很明显，对其影响也因酚酸种类及浓度存在差异。

50.00

45.00

40.00

35.00

30.00

25.00

20.00

15.00

10.00

5.00

0.00



ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

d

b b

b

c

b

b bc

c

b

b

b

a

b

a

a

a

a

a

a

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸混合

ρ-hydrobenzoic acid Vanillic acid Syringic acid Coumaric acid mixture

酚酸Phenolic acid

图23 不同酚酸对幼苗根系相对电导率的影响

Fig. 23 Effect of phenolic acid on relative conductivity of root in flue-cured tobacco

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=3，不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间差异达5%显著水平（*p*＜0.05）母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic.



ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

NS

30.00

25.00

20.00

15.00

10.00

5.00

0.00

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸混合

ρ-hydrobenzoic acid Vanillic acid Syringic acid Coumaric acid mixture

酚酸Phenolic acid

图24 不同酚酸对幼苗叶片相对电导率的影响

Fig. 24 Effect of phenolic acid on relative conductivity of leaves in flue-cured tobacco

注(Note): 数据为平均数±标准差，n=3，NS表示在0.05水平无显著差异。Data are means±standard deviation of three replicates. NS indicate no-significant different at 5% level.

#### 6.2.2.4 不同酚酸对烤烟幼苗根系活力的影响

添加不同酚酸对根系活性的影响存在差异（图25）。对羟基苯甲酸处理在低浓度（0.05g/L）时对根系活性有促进作用，但促进作用不显著（*p*＞0.05），随作用浓度增加抑制作用加强，且均显著低于对照（*p*＜0.05）；香草酸在各浓度条件下均抑制了根系活力，且抑制作用在各作用浓度下均最小，较对照分别下降1.19%、3.62%和22.77%；丁香酸、香豆酸和混合物均显著抑制了根系活力（*p*＜0.05），其中丁香酸在各浓度抑制作用均最大，较对照分别下降10.36%、35.00%和

54.91%。说明添加不同酚酸降低了根系活力，根系还原能力下降。



ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

c

c

c bc b

d

d

c

d

c

b

b

a

a

b

a

a

c

b

a

300.00

250.00

200.00

150.00

100.00

50.00

0.00

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸混合

ρ-hydrobenzoic acid Vanillic acid Syringic acid Coumaric acid mixture

酚酸Phenolic acid

图25 不同酚酸对幼苗根系根系活力的影响

Fig. 25 Effect of phenolic acid on root activity in flue-cured tobacco

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=3，不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间差异达5%显著水平（*p*＜0.05）母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small letters

Indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic.

### 6.2.3 不同酚酸对烤烟幼苗根系防御酶活性的影响

#### 6.2.3.1 不同酚酸对幼苗根系POD活性的影响

不同酚酸不同作用浓度作用下，幼苗POD 活性随作用浓度增加均呈先增加后减小趋势（图

26），其中混合物和对羟基苯甲酸在低浓度（0.05g/L）时POD活性达到最大值，较对照分别增加

43.76%和15.20%，之后混合物POD活性迅速降低，高浓度（0.50g/L）时最低且低于其他酚酸和对照，其余酚酸在浓度为0.10g/L达到峰值，其中香豆酸上升幅度最大，较对照增加47.94%，之后POD活性迅速下降，对羟基苯甲酸和丁香酸下降幅度最大，较对照分别下降27.08%和17.94%。说明添加酚酸致使细胞膜系统受损，活性氧增加从而诱导POD活性增加，当酚酸超过一定浓度后，

POD酶合成受到干扰致使活性迅速降低。

对羟基苯甲酸

香草酸

丁香酸

香豆酸

混

合

80.00

75.00

70.00

65.00

POD 活性[U ·(gFw·min)-1] POD activity

60.00

55.00

50.00

45.00

40.00

35.00

30.00

ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

图26 不同酚酸对幼苗根系过氧化物酶的影响

Fig. 26 Effect of phenolic acid on POD activity of root in flue-cured tobacco

#### 6.2.3.2 不同酚酸对幼苗根系SOD活性的影响

添加酚酸对根系SOD活性的影响存在一定差异（图27），添加香草酸处理根系SOD活性随作用浓度一直呈增加趋势，低浓度（0.05g/L）时与对照相差不大，之后迅速升高，较对照分别提 高13.15%和17.37%；香豆酸随作用浓度增加呈先增加后减小再升高趋势；丁香酸随作用浓度增加基本呈下降趋势，且SOD活性均小于其他处理；对羟基苯甲酸随作用浓度增加缓慢上升，至浓度为0.10g/L时到达峰值，之后稍有下降；混合物随作用浓度增加呈先增后减趋势，低浓度达到峰值，较对照增加10.56%，之后缓慢下降。

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸混合

130.00

125.00

120.00

115.00

SOD活性[U ·(gFw·min)-1] SOD activity

110.00

105.00

100.00

95.00

90.00

85.00

ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

图27 不同酚酸对幼苗根系超氧化物歧化酶的影响

Fig. 27 Effect of phenolic acid on SOD activity of root in flue-cured tobacco

#### 6.2.3.3 不同酚酸对幼苗根系CAT活性的影响

不同酚酸对幼苗根系CAT活性的影响存在差异（图28），丁香酸CAT活性随作用浓度增加呈先减小后增加再减小趋势，但各浓度CAT活性均小于对照；混合物在浓度为0.10g/L以前均呈上升趋势，且保持较高活性，之后迅速下降，高浓度（0.50g/L）时达最低点且均小于其他酚酸处理，较对照下降11.01%；香草酸低浓度（0.05g/L）时CAT活性变化不大，随后大幅增加且一直保持较高活性，高浓度时达到峰值，较对照增加7.30%；对羟基苯甲酸在低浓度时即达到峰值，之后持续下降；香豆酸随作用浓度增加呈先减小后增加再减小趋势。说明添加不同酚酸对幼苗根系CAT活性的影响不同。

对羟基苯甲酸香草酸丁香酸香豆酸混合

130.00

125.00

120.00

CAT活性[U ·(gFw·min)-1] CAT activity

115.00

110.00

105.00

100.00

95.00

ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

图28 不同酚酸对幼苗根系过氧化氢酶的影响

Fig. 28 Effect of phenolic acid on CAT activity of root in flue-cured tobacco

#### 6.2.3.1 不同酚酸对幼苗根系MDA含量的影响

不同酚酸在各处理浓度下均使丙二醛含量升高，对羟基苯甲酸、丁香酸和混合物各处理间均存在显著差异（p＜0.05）（图29），混合物在各浓度下对丙二醛的影响均最大，各浓度较对照分别增加71.83%、129.34%和237.16%；香豆酸在各浓度下对丙二醛影响较小，较对照分别增加13.35%、

12.84%和29.27%。说明添加酚酸对细胞质膜产生较大破坏作用，且酚酸混合物对丙二醛的影响要大于添加单一酚酸。



ck 0.05g/L 0.10g/L 0.50g/L

d

d

c

b

d

c

a

b

c

a

a

a

b b

c

b

a

c

b

a

20.00

18.00

16.00

14.00

12.00

10.00

8.00

6.00

4.00

2.00

0.00

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 对羟基苯甲酸 | 香草酸 | 丁香酸 | 香豆酸 | 混合 |
| ρ-hydrobenzoic acid | Vanillic acid | Syringic acid  酚酸 Phenolic acid | Coumaric acid | mixture |

图29 不同酚酸对幼苗根系丙二醛的影响

Fig. 29 Effect of phenolic acid on MDA of root in flue-cured tobacco

注（Note）：数据为平均数±标准差，n=3，不同小写字母表示同一酚酸不同浓度间差异达5%显著水平（*p*＜0.05）母相同表示差异不显著（*p*＞0.05）。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small letters indicate significant different at 5% level with T-test among different phenolic concentration in same phenolic.

## 6.3 讨论与小结

土壤中自毒物质积累是连作障碍发生的重要因素（代丽等，2006；郑良永等，2005；高志华等，2008；吴凤芝等，2001）。研究表明大多素酚酸类物质具有化感活性，酚酸类物质也是植物化感研究最多的一类物质（Rimando等, 2001; Tsutomu等, 2001）。大量研究表明，酚酸类物质在土壤中积累会导致多重影响，比如抑制植物自身种子萌发、幼苗生长、养分吸收，改变根际微生物群落结构导致病原菌大量繁殖等，并最终表现为作物减产、病虫害加重等连作障碍。黄瓜连作土壤中酚酸类物质明显积累，连作5~9年的土壤酚酸类物质含量显著高于连作1~3年的土壤（马云华等，2005）。杉木林地土壤酚类物质的积累可抑制林木生长，直致死亡（何光训等，1995）。大豆土壤和根系浸提液中酚酸物质的含量时表明，重茬土壤中对羟基苯甲酸和香草酸的含量极显著大于正茬土壤，重茬大豆根系水浸提液中对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸、香草醛、香豆素含量均高于正茬（张淑香等，2000）。不同浓度的对羟基苯甲酸、阿魏酸和邻香草醛等酚酸对杉木种子的促进或抑制作用取决于酚酸种类及作用浓度（李传涵等，2002）；香草醛和对羟基苯甲酸会降

低杉木幼苗叶绿素a、b的含量，并且随着浓度升高，这种趋势更加明显（陈龙池等，2002）；低浓度对羟基苯甲酸会提高甜樱桃组培苗根和茎叶的SOD、POD及CAT活性，且随浓度升高活性逐渐增强，但浓度过高会降低这些酶的活性（秦嗣军等，2008）。酚类物质对黄瓜根系抗病性相关酶影响时发现，低浓度的酚类物质有利于增强抗病性相关酶活性，高浓度会抑制酶的活性，使酶系统防御功能迅速丧失（马云华等，2005）。

本研究中，外源酚酸抑制了烤烟自身种子萌发及株高的增长，对地上部和地下部鲜重的影响则因酚酸种类及作用浓度不同而存在差异。酚酸对种子萌发及幼苗生长的抑制或促进作用也在多种作物上有个报道，结论也基本一致。阿魏酸和肉桂酸对绿豆、大豆、黄瓜和玉米的种子发芽和生长起到抑制作用，并且随着浓度的升高，抑制作用逐渐增强（曹光球等，2003）。对羟基苯甲酸和苯甲酸是抑制草莓生长的主要自毒物质，对草莓根系生长有明显的抑制作用（Kitazawa等，

2005），重茬大豆根际土壤中含有有机酸类、醛类、苯类、酚类等有机化合物对大豆种子萌发和幼苗生长均产生了显著的抑制作用（韩丽梅等，2000）。3-硝基邻苯二甲酸、邻甲氧基苯甲酸、3, 4-二氯苯甲酸、肉桂酸等四种有机酸均抑制了大豆种子的萌发；3-硝基邻苯二甲酸、邻甲氧基苯甲酸、3, 4-二氯苯甲酸、肉桂酸、邻苯二甲酸等五种有机酸不同程度地抑制了水培大豆幼苗的生长发育（王树起等，2002）。

幼苗生长受抑是各酚酸处理反应在植株上的外在表现，添加外源酚酸影响了烤烟幼苗正常生理代谢过程：叶绿素合成受抑，根系活力降低、离子渗透量加大。叶绿素含量能够反映植物的光合效率和生长水平，同时还可以作为植物抗性指标用于评价环境有毒物质对植物的影响。植物根系是活跃的吸收器官和合成器官，根的生长情况和活力水平直接反映植物体的营养状况及产量水平(Huan等, 2004; Yu等, 1997)。不同浓度的香草醛和对羟基苯甲酸抑制了杉木幼苗的光合作用，降低了净光合速度、蒸腾速率、气孔导度等生理指标，抑制杉木幼苗的光呼吸，并且随着浓度的增加，抑制作用增强（陈龙池等，2002）。香草醛对叶绿素的合成存在抑制作用（马越强等，1998）。另外，本研究中得出酚酸各处理均提高了幼苗叶片pH值，这与前期试验得出根系分泌物降低了叶片pH值的结果相反，有关根系分泌物或酚酸对叶片pH值的影响尚未见报道，英国Lancaster大学科研人员发现，pH升高为早期的逆境胁迫信号、木质部汁液高pH与汁液中低浓度ABA联合关闭气孔以及pH升高本身对植物具有潜在危害。分析其原因可能是因为根系分泌物中除酚酸外，还含有其他机酸类、醛类、苯类、氨基酸类、糖类等物质，其综合作用导致叶片pH值出现下降，具体原因还有待于进一步研究。本研究中，添加酚酸类物质致使植株质膜系统受到严重破坏，细胞内有毒物质清除系统受损，光合作用减弱，根系还原能力降低，离子渗透量加大，这些消极影响不可逆的造成幼苗生长受阻。

SOD是植物体内活性氧酶促防御系统内的重要保护酶，氧化激增“(oxidative burst)植物抗病的最早期反应之一，活性氧的积累诱发了植物抗病反应(Ingeborg等, 2003)。POD是植物体内重要的活性氧清除酶类，其作用是将H2O2降解成为无毒害的H2O和O2(Joseph等, 1998)。MDA是植物体内膜脂过氧化物，具有很强的细胞毒性，对膜和细胞中的许多生物功能分子如蛋白质、核酸和酶等均具有很强的破坏作用，并参与破坏生物膜的结构与功能，其含量反映着细胞活性氧引起膜过氧化导致细胞伤害的程度（周瑞莲等，2002）。本研究中，添加不同酚酸对POD活性的影响

均呈先增加后减小趋势。添加不香草酸处理SOD活性随作用浓度SOD活性持续上升，对羟基苯甲酸和混合物随作用浓度呈先增加后减小趋势，丁香酸呈持续下降趋势。添加混合物处理CAT活性在中等浓度以前一直保持较高活性，之后迅速下降且高浓度时均小于其他处理，香草酸低浓度时变化不大，中等浓度之后迅速上升且保持较高活性，对羟基苯甲酸在低浓度有小幅增加，之后持续下降。添加不同酚酸促进了根系丙二醛含量的升高且随作用浓度增大促进作用增加。说明酚酸对质膜防御酶系统具有重要影响且不同酚酸种类对酶活性的影响不同，植株受到外界胁迫后，自身产生抵御外界胁迫的能力以减轻伤害，但其自身的调节能力有限，当浓度增大到一定值时，受胁迫程度已大于自身的调节能力，从而导致酶活性大幅下降。低浓度对羟基苯甲酸会提高甜樱桃组培苗根和茎叶的SOD、POD及CAT活性，且随浓度升高活性逐渐增强，但浓度过高会降低这些酶的活性（秦嗣军等，2008）。酚类物质对黄瓜根系抗病性相关酶影响时发现，低浓度的酚类物质有利于增强抗病性相关酶活性，高浓度会抑制酶的活性，使酶系统防御功能迅速丧失（马云华等，2005）。苯甲酸、肉桂酸对大豆根细胞CAT和POD酶活性有抑制作用（Baziramakenga等, 1995）。外源水杨酸能显著抑制稗草SOD、POD和CAT酶活性（Fang等, 2009）。

# 第七章 不同烤烟品种根际微Th物数量及多样性差异

## 7.1 材料方法

### 7.1.1 供试材料

供试烤烟品种：云85（HR），为高抗黑胫病烤烟品种；K326（MR），为中抗黑胫病烤烟品种；净叶黄(MS)，为中感黑胫病烤烟品种；红花大金元（HS），为高感黑胫病烤烟品种。试验前按照国家行业标准YC/T39-1996和YC/T41-1996对各品种进行抗性评价，结果见表2。

试验采用温棚土壤盆栽，土壤来源于云南农业大学后ft农场未种植过茄科作物地块的耕作层 土壤。土壤经自然风干过筛，每盆装土20Kg。每株烤烟施纯氮7.0g, 采用烤烟专用肥

（N: P2O5: K2O=12:12:24），一次性基施。供试病原菌为烤烟黑胫病菌，菌株由云南农业大学烟草学院赵正雄教授惠赠，菌株经PDA斜面活化后，转入适于黑胫病菌生长的燕麦培养基（OA，1000mL培养基中含燕麦片30.0g,琼脂20.0g）进行纯培养，27℃黑暗培养10d后备用。

### 7.1.2 植株培养及试验设计

采用常规烤烟漂浮育苗，种子表面消毒、侵种和催芽后播于育苗盘上，于2009年5月8日进

行移栽（苗龄60d）。每个品种种植60株，其中用于测定不同生育期微生物数量的各20株（HR、MR、MS和HS），接种处理各20株（HR、MR、MS和HS），接种处理对照各20株（HR-CK、MR-CK、MS-CK和HS-CK），完全随机摆放，每隔20天变换一次位置。移栽后于团棵期（6月7日）、旺长期（6月23日）、现蕾期（7月9日）和成熟期（8月10日）按品种采用抖动法采集根际土壤，每品种3次重复，测定根际土壤可培养细菌、真菌和放线菌数量。

于团棵期采用浇根法接种黑胫病菌，病原菌经致病力检测为强致病菌株，接种浓度为

1×10 7CFU/mL，每株接种10mL菌液，对照接种10mL蒸馏水。于接种前，接种后2d、4d、6d 和

8d采集各品种根际土样，每品种3次重复，共采集5次，分别按品种采用抖动法采集根际土壤，测定根际土壤可培养细菌、真菌和放线菌数量。

### 7.1.3 试验方法

#### 7.1.3.1 土壤稀释液制备

采用抖动法采集土壤作为处理根际土，抖动法具体操作步骤：将根系从土壤中小心取出，置 于干净塑料布上，用手轻轻抖动，出去容易抖落下来的土壤，然后将带土根系移至另一块干净塑 料布上抖动多次，分离出松散附着于根表面的土壤，这部分即为根际土壤。

取根际土10.00g，用无菌水定容至100mL，摇床振荡20min，用移液枪从中吸取1ml土壤悬

液加入盛有9ml无菌水的试管中，充分均匀，无菌水稀释，浓度为：细菌10-5、10-6、10-7，真菌10-2、10-3、10-4，放线菌10-3、10-4、10-5，具体操作步骤参见参考文献（中国科学院南京土壤研究所微生物室，1985）。采用涂布方法进行微生物培养，细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基，37℃培养

2d～3d，真菌和放线菌培养基分别采用马丁氏和高氏1号培养基，分别于28℃培养3d～5d，计数采用平板菌落计数法计数（沈萍，1999）。

#### 7.1.3.2 培养基制备

细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基，真菌采用马丁氏培养基，放线菌采用高氏1号培养基，各培养基配方见表19-21。按照配方准确称取各种物质，加热溶解；用1mol/LNaOH或1mol/LHCl 调

PH值；121℃灭菌，20min；在无菌条件下在培养基冷却至45℃～50℃时将培养基倾入灭菌平皿，厚度为3mm～4mm；将灭菌培养基放入37℃光照培养箱中培养24h，以检查灭菌是否彻底。

表24 牛肉膏蛋白胨培养基（细菌）

Table 24 Beef-protein medium (bacteria)

| 配方 Formula | 含量 Content |
| --- | --- |
| 牛肉膏 Beef extract | 3.00g |
| 蛋白胨 Peptone | 10.00g |
| NaCl | 5.00g |
| 琼脂 Agar | 10.00g |
| pH | 7.0~7.2 |
| 蒸馏水 distilled water | 1000mL |

表25 马丁氏培养基（真菌）

Table 25 Martin medium(fungi)

| 配方 Formula | 含量 Content |
| --- | --- |
| KH2PO4 | 1.00g |
| MgSO4·7H2O | 0.50g |
| 蛋白胨 Peptone | 5.00g |
| 葡萄糖 Glucose | 10.00g |
| 琼脂 Agar | 20.00g |
| 1%孟加拉红水溶液 Rose bengal | 每 1000ml 溶液加 3.3ml |
| 蒸馏水 distilled water | 1000mL |
| 链霉素 Streptomycin | 由于链霉素受热容易分解，所以临用时，将培养基溶化后待温度降至 45℃左右时才能加入。可先将链霉素配成 1%的溶液，在 100ml 培养基中加 1%链霉素液 0.3ml，使每毫升培养  基中含链霉素 30μg |

表26 改良高氏1号培养基（放线菌）

Table 26 Improve Gao number one medium (actinomyces)

| 配方 Formula | 含量 Content |
| --- | --- |
| KNO3 | 1.00g |
| FeSO4·7H2O | 0.01g |
| K2HPO4 | 0.50g |
| MgSO4·7H2O | 0.50g |
| 淀粉 Starch | 20.0g(面粉先加少量冷水成糊状加入) |
| 琼脂 Agar | 18.00g |
| NaCl | 0.50g |
| pH | 7.4～7.6 |

#### 7.1.3.3 根际土壤微生物功能多样性分析

采用Biolog ECO板研究不同烤烟品种根际土壤微生物多样性，操作步骤参照姚槐应等（2006）的方法。微生物对碳源的利用采用培养72 h时Biolog ECO微平板每孔颜色平均变化率（Average well color development, AWCD）描述，应用Shannon、Simpson和McIntosh多样性指数计算土壤微生物碳源利用的多样性（袁英英等，2011；李娟等，2008）。

### 7.1.4 数据处理和统计方法

实验数据采用Excel 2003进行初步处理和作图，统计分析采用SPSS13.0统计分析软件对数据进行方差分析(one-way ANOVA)，再利用Duncan's新复极差法进行多重比较分析。

## 7.2 结果分析

### 7.2.1 不同品种烤烟不同Th育时期根际可培养微Th物变化

#### 7.2.1.1 不同品种根系可培养细菌数量差异



HR

MR MS

NS

Bb Bb

NS

Aa Aa

Bb Bb

Aa Aa

25

HS

20

15

Bacteria(cfu/g dry soil)×10 6

可培养细菌数量

10

5

0

团颗期旺长期现蕾期成熟期

Rosette stage

Rapid growing stage

Flower budding M ature stage

生育期stage

图30 不同烤烟品种不同Th育时期根际可培养细菌数量差异

Fig. 30 Quantity variance of culturable bacteria in rhzosphere of different resistant varieties at different growth stages

注（Note）：图中数据为平均数±标准差，n=3. 不同小写和大写字母分别表示相同生育时期内不同品种根际可培养细菌数量在0.05（*p*＜0.05）和0.01水平（*p*＜0.01）有显著差异，字母相同表示差异不显著。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small and capital letters respectively indicate significant difference at 5 %

And 1% level among different cultivar at same growth stage.

不同品种在不同生育时期根际可培养细菌数量趋势较为明显，各品种根际可培养细菌数量在烤烟移栽后呈现先增加后减少趋势，至现蕾期达到最大，之后稍有下降，其中团棵期到旺长期增幅最大，各品种较团棵期分别增加149.70%、149.46%、166.09%和187.45%。不同抗性品种在不同生育时期也表现出一定差异，团棵期和旺长期抗病品种根际可培养细菌均极显著大于感病品种， 且均表现为高抗＞中抗＞中感＞高感，但抗病品种之间和感病品种之间无显著差异。各品种现蕾期和成熟期没有明显差异，但现蕾期中感品种，成熟期中感和高感品种均大于抗病品种。以上说明不同品种随生育期进程根际环境促进了可培养细菌数量的增加，且不同抗性品种根际可培养细菌数量存在差异且在团棵期和旺长期较为明显。

#### 7.2.1.2 不同品种烤烟根系可培养真菌数量差异



HR

MR

MS

Bb Bb

Aa

Aa

NS

NS

NS

10

HS

9

8

7

Fungi (cfu/g dry soil)×103

可培养真菌数量

6

5

4

3

2

1

0

团颗期旺长期现蕾期成熟期

Rosette stage

Rapid growing stage

Flower budding stage Mature stage

生育期stage

图31 不同烤烟品种不同Th育时期根际可培养真菌数量差异

Fig. 31 Quantity variance of culturable fungi in rhizosphere at different growth stage in different resistant varieties

注（Note）：图中数据为平均数±标准差，n=3。不同小写和大写字母分别表示相同生育时期内不同品种间在0.05

和0.01水平有显著差异，字母相同表示差异不显著。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small and capital letters respectively indicate significant difference at 5% and 1% level among different cultivar at same growth stage, the same below.

各品种根际可培养真菌在烤烟移栽后大体呈现先减少后稍有增加趋势。团棵期最大，之后持续下降至现蕾期最小，成熟期再稍有增加，其中团棵期至旺长期降幅最大，较团棵期分别下降

34.58%、36.11%、44.86%和40.05%，之后各时期之间相差不大。不同抗性品种在不同生育时期也表现一定变化，团棵期和旺长期抗病品种（HR和MR）真菌数量均小于感病品种（MS和HS），团棵期抗病品种与感病品种达到极显著水平，且MS＞HS＞MR＞HR，现蕾期和成熟期真菌数量没有显著差异。表明移栽后各品种根际环境不利于土壤真菌生长发育，且对抗病品种在生长前期

（团棵期和旺长期）影响较大。

#### 7.2.1.3 不同品种烤烟根系可培养放线菌数量差异



HR

MR MS

NS

NS

NS

NS

6

HS

5

4

Actinomycete(cfu/g dry soil)×10 4

可培养放线菌数量

3

2

1

0

团颗期旺长期现蕾期成熟期

Rosette stage

Rapid growing stage

Flower budding stage Mature stage

生育期stage

图32 不同抗性品种不同Th育时期根际可培养放线菌数量差异

Fig. 32 Quantity variance of culturable actinomyces in rhizosphere at different growth stage in different resistant varieties

注（Note）：图中数据为平均数±标准差，n=3。不同小写和大写字母分别表示相同生育时期内不同品种间在0.05

和0.01水平有显著差异，字母相同表示差异不显著。Data are means±standard deviation of three replicates. Different small and capital letters respectively indicate significant difference at 5% and 1% level among different cultivar at same growth stage, the same below.

不同抗性品种根际可培养放线菌数量随生育进程变化不大，成熟期稍有增加，各生育期均无显著差异。除成熟期感病品种大于抗病品种外，其余各时期均表现为抗病品种放线菌数量大于感病品种。其中整个生育期MS放线菌数量均大于HS，HR在团棵期和旺长期放线菌数量大于MR，而现蕾期和成熟期刚好相反。说明烤烟根际环境对可培养放线菌数量影响不大，且抗性差异主要表现在团棵期和旺长期。

#### 7.2.1.4 不同抗性烤烟品种根际微生物功能多样性差异

整体上各品种随生育进程AWCD值均呈缓慢增加趋势，现蕾期后增幅较小，其中HR和MR品种在团棵期和旺长期均显著大于MS和HS，且整个生育期HR均显著高于其他品种。功能多样性Shannon指数随生育进程均呈先增加后减小趋势，其中MS旺长期最大，其他品种现蕾期最大；除成熟期外HR和MR品种Shannon指数均大于MS和HS，且R品种整个生育期Shannon指数均

显著高于其他品种。Simpson指数随生育进程呈波动变化且无明显规律。Mclntosh指数随生育进程均呈先增后减趋势，其中旺长期HR和MR品种Mclntosh指数大于MS和HS。从AWCD值和多样性指数可以看出，不同品种根际微生物对碳源总体利用能力及功能多样性存在一定差异；在烤烟生育前期（团棵期和旺长期），AWCD值、Shannon和Mclntosh指数与品种抗性存在较好相关性，即抗病品种土壤微生物活性及多样性高于感病品种。

表27 不同烤烟品种根际微Th物AWCD值和多样性指数的差异(72 h)

Table 27 Differences of AWCD value and diversity indexes of rhizosphere microbial community

| 多样性指标  Diversity index | 品种  Varieties | 团棵期  Rosette stage | 旺长期  Rapid growing stage | 现蕾期  Flower budding stage | 成熟期  Mature stage |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | HR | 0.248 c | 0.342 b | 0.422 b | 0.428 b |
| AWCD 值  AWCD value | MR | 0.223 b | 0.301 b | 0.342 a | 0.341 a |
| MS | 0.178 a | 0.248 a | 0.331 a | 0.340 a |
|  | HS | 0.197 a | 0.240 a | 0.353 a | 0.368 a |
|  | HR | 1.053 b | 1.259 b | 1.612 c | 1.365 b |
| Shannon 指数  Shannon index | MR | 0.853 a | 0.924 a | 1.045 b | 0.830 a |
| MS | 0.842 a | 0.908 a | 0.798 a | 0.893 a |
|  | HS | 0.782 a | 0.826 a | 1.029 b | 0.938 a |
|  | HR | 23.199 a | 31.668 c | 26.304 a | 31.748 a |
| Simpson 指数  Simpson index | MR | 25.508 a | 26.494 b | 40.109 b | 43.086 b |
| MS | 24.48 a | 30.042 c | 39.675 b | 30.249 a |
|  | HS | 22.894 a | 15.952 a | 25.160 a | 44.368 b |
|  | HR | 3.242 a | 5.388 c | 4.349 a | 4.370 b |
| Mclntosh 指数  Mclntosh index | MR | 3.228 a | 6.313 d | 5.374 b | 4.353 b |
| MS | 3.259 a | 4.344 b | 4.305 a | 3.500 a |
|  | HS | 3.189 a | 3.313 a | 4.398 a | 3.411 a |

注（Note）：表中数据为3次重复的平均值。不同小写字母表示相同指标不同品种间在0.05水平有显著差异。Data are means of three replicates. Different small letters indicate significant differences between different cultivars for the sa me index at the

5% level.

### 7.2.2 不同品种烤烟接种后根际可培养微Th物差异

#### 7.2.2.1 不同品种接种后可培养细菌数量变化趋势

HR-CK HR M R-CK MR



M S-CK MS HS-CK HS



11

10

Bacteria(cfu/g dry soil)×106

可培养细菌数量

9

8

7

6

5

4

3

2

0 2 4 6 8

接种后天数Day afte inoculation(d)

图33 不同抗性品种接种后可培养细菌数量变化趋势

Fig. 33 Trend of culturable bacteria post inoculation of different resistant varieties

接种黑胫病后抗病品种根际可培养细菌数量迅速上升，并一直保持较高水平，在0～8d内抗病品种细菌数量明显高于对照及感病品种。接种后感病品种在0～8d内均小于对照，其中高感病品种接种后根际细菌出现大幅下降，并于第2d达至最低，之后迅速增加至接种前水平且第4d后变化不大，中感品种接种后0～8d内细菌数量变化不大。说明接种处理能刺激抗病品种根际环境可培养细菌数量的生长，而相对抑制了感病品种根际细菌的生长。

#### 7.2.2.2 不同品种接种后可培养真菌数量变化趋势

HR-CK HR M R-CK MR



M S-CK MS HS-CK HS



11

10

9

Fungi(cfu/g dry soil)×103

可培养真菌数量

8

7

6

5

0 2 4 6 8

接种后天数Day afte inoculation(d)

图34 不同抗性品种接种后可培养真菌数量变化趋势

Fig. 34 Trend of culturable fungi post inoculation of different resistant varieties

接种黑胫病后各品种根际真菌数量较各对照均出现不同程度增加，且均为高感＞中感＞中抗

＞高抗。接种后高感品种真菌数量迅速增加且一直保持较高水平，中感品种在0d～4d内变化不大，但第6天出现一个高峰且保持较高水平，高抗品种在0d～8d内没有明显的增长高峰，较为平稳，中抗品种在0d～2d内变化不大，但第4天出现一个高峰但之后迅速降低并保持稳定。说明接种后烤烟根际环境促进了可培养真菌数量的增加，且品种抗性与根际真菌数量负相关。

#### 7.2.2.3 不同品种接种后可培养放线菌数量变化趋势

HR-CK HR M R-CK MR



M S-CK MS HS-CK HS



8

7

Actinomycete(cfu/g dry soil)×10 4

可培养放线菌

6

5

4

3

2

0 2 4 6 8

接种后天数Day afte inoculation(d)

图35 不同抗性品种接种后可培养放线菌数量变化趋势

Fig. 35 Trend of culturable actinomycete post inoculation of different resistant varieties

接种黑胫病菌后各品种在0d～8d内均明显高于对照，且第4d后均表现为高抗＞中感＞高感

＞中抗。接种后，高抗、中感和高感品种根际可培养放线菌在0d～4d内迅速增加，且在第4天达到高峰，之后又持续下降，中抗品种在第2天即出现增长高峰，之后迅速下降，第4天后保持稳定但低于其他品种。以上说明接种处理刺激了根际放线菌数量的增加，但放线菌数量和品种抗性 无明显相关性。

#### 7.2.2.4 接种后不同抗性烤烟品种根际微生物功能多样性差异

表28 接种后第8 d不同品种根际微Th物AWCD值和多样性指数的差异(72 h)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 品种  Varieties | AWCD 值  AWCD value | Shannon 指数  Shannon index | Simpson 指数  Simpson index | Mclntosh 指数  Mclntosh index |
| HR | 0.253 e | 1.091 b | 25.742 b | 3.395 b |
| HR-CK | 0.237 d | 1.115 b | 25.436 b | 3.427 b |
| MR | 0.205 c | 1.001 b | 27.044 c | 3.655 d |
| MR-CK | 0.230 d | 1.045 b | 27.932 c | 3.600 cd |
| MS | 0.171 a | 0.887 a | 24.525 ab | 3.184 a |
| MS-CK | 0.188 b | 1.087 b | 24.892 ab | 3.501 bc |
| HS | 0.165 a | 0.777 a | 23.748 a | 3.443 b |
| HS-CK | 0.193 bc | 0.875 a | 23.968 a | 3.465 b |

Table 28 Differences of AWCD and diversity indexes of rhizosphere microbial community after inoculating Phytophora parasitica var. nicotiana

注（Note）：表中数据为3次重复的平均值。不同小写字母表示相同指标不同品种间在0.05水平有显著差异。Datas are means of three replicates. Different small letters indicate significant differences between different cultivars for the same index at the 5% level.

相比各品种对照，接种8 d后R品种AWCD值显著高于其他品种及对照，而其他品种均显著低于各对照，且HR和MR品种AWCD值显著高于MS和HS。接种后各品种Shannon指数均在一定程度上低于各对照，其中HR和MR显著高于MS和HS。接种后各品种Simpson指数除HR品种高于对照外，其余品种均小于对照，其中HR和MR品种Simpson指数大于MS和HS. Mclntosh指数除MR品种接种后高于对照外，其余品种均小于对照。从AWCD值和多样性指数可以看出，接种黑胫病8 d后不同品种根际微生物对碳源总体利用能力及功能多样性存在一定差异，接种处理降低了感病品种碳源总体利用能力及功能多样性。

## 7.3 讨论与小结

以往对水稻（Neal 等, 1970）、小麦（孙晓璐等，2000）、棉花（李洪连，1998, 1999）、大豆（陈宏宇等，2005）、黄瓜（苗则彦等，2004）、番茄（刘琼光等，2006）和西瓜（雷娟利等，

2008）等作物根际微生物与土传病害发生关系的研究表明，植物对土传病害的抗性除形态和生理生化机制外（Broadbent 等, 1971;赵蕾等, 2000），还与植物根际微生物种类和数量有着密切关联。

本试验结果证实了不同烤烟品种根际微生物是存在差异的，且这种差异与品种抗性密切相关。 试验中可培养细菌和放线菌数量与品种抗性正相关，真菌数量也基本呈负相关关系，并且这种差异主要表现在生长前期（团棵期和旺长期）。这与烤烟黑胫病发病规律基本一致，烤烟黑胫病发病主要集中在现蕾期以前，现蕾后茎基部已木质化而不易感病（王志愿等，2010）。团棵期和旺长期抗病品种根际环境更适宜细菌和放线菌生长而相对抑制了真菌生长，这与李洪连等的研究结果略有出入，其认为抗棉花黄萎病品种根际真菌、放线菌数量多于感病品种，而细菌无明显差异（李

洪连等，1998），这可能是作物和病害差异造成的，从以往研究结果来看，不同植物种类根际微生物数量变化规律相对独立（范玉贞，2010；张美俊等，2008；苗果园等，2004；周陈等，2008），结果不一，但也有共识，即品种抗病性差异可以通过微生物种类、数量、分布和多样性差异体现出来，抗病性高的品种根际土壤微生物群落结构越丰富，物种越均匀，多样性越高时，表明土壤微生态系统较为稳定和平衡，有利于作物的生长和抵御病害（朱丽霞等，2003；Prosser，2002；蔡燕飞等，2003；李红丽等，2006）。本研究结果也证实了这一点，在烤烟生长前期（主要为团棵期和旺长期）AWCD值、Shannon和Mclntosh指数与品种抗性存在较好相关性，抗病品种土壤微生物活性及多样性高于感病品种。雷娟利等（2008）通过研究抗感枯萎病西瓜根际细菌群落多样性发现，抗病西瓜根际可培养细菌的多样性要高于感病西瓜，且细菌分布的均匀度也高于感病西瓜。李洪连等（1998）对不同抗性棉花品种根际微生物研究也证实，抗病品种根际微生物要多于感病品种，区系组成也更为复杂。

业已证明，病原物侵入寄主过程中和侵入后，植物碳水化合物、氨基酸、蛋白质、脂类和核酸等物质代谢都会发生变化，这势必会引起根系分泌物的改变，也就相应影响了根际周围微生物群落结构（Dutta 等, 1979;韩雪等, 2006）。人工接种黑胫病菌条件下抗病品种根际环境刺激了细菌的生长，而相对抑制了感病品种细菌生长；不同品种均促进了根际真菌和放线菌的生长，且真菌数量与品种抗性呈负相关。徐瑞富等（2004）研究土壤微生物群落对棉花黄萎病的影响也得出相似结论。烤烟黑胫病菌可能诱导了根际环境发生相应变化以应对病原物的生长和侵染，抗病品种通过刺激细菌大量生长来抑制病原物的入侵。抗感品种根际真菌和放线菌数量均出现增加，这与在玉米（陆宁海等，2003）、黄瓜（苗则彦等，2004）和人参（于慧瑛等，2007）]等作物上的研究结果基本一致，放线菌能产生多种抗生素类物质，它的增多有利于抑制病原物的传播和侵染。从接种黑胫病8 d后AWCD值和多样性指数也可以看出，接种处理降低了感病品种碳源总体利用能力及微生物多样性。黑胫病菌在根际环境大量繁殖，抑制了其他微生物生长和代谢，微生物群落结构趋于单一，有益菌种类减少或代谢降低，整个微生物区系从―正常生理组合‖向―病理组合‖转化，最终导致感病品种迅速感病。健康玉米植株根际真菌种类呈多样性，根系微群落保持正常的生理组合，感病玉米植株根际真菌区系病原菌占绝对优势，其他种真菌很少，根系微群落已转化为病理组合（陆宁海等，2003）。另外，接种后抗病品种特别是高抗品种多样性指数在一定程度上并未明显减小，还有小幅度增加趋势。这可能是因为黑胫病的入侵改变了根际微生物群落结构分布，抗病品种通过增加微生物多样性来抵御病原物入侵，但具体原因还有待进一步研究。另外，根系分泌物的差异是导致不同抗性品种抗性差异的重要原因，因此有必要对根系分泌物与根际微生物的相互关系以及根系分泌物对黑胫病的影响等方面进行进一步研究。

# 第八章 结论与展望

## 8.1 主要结论

### 8.1.1 利用反相色谱法以30%甲醇-0.2%乙酸体系和磷酸盐体系为分析条件可以同时进行烤烟根系分泌物中酚酸和有机酸组分定性和定量研究，此法操作简单、准确度高、重现性好。

### 8.1.2 不同烤烟品种根系分泌物主要检出对羟基苯甲酸和丁香酸，抗病品种对羟基苯甲酸较少分泌 或不分泌，整个生育期酚酸分泌总量与病情指数显著正相关。人工接种黑胫病菌后酚酸分泌量加大，且感病品种分泌量大于抗病品种，对羟基苯甲酸、丁香酸和酚酸总量与病情指数正相关。

### 8.1.3 不同烤烟品种根系分泌物有机酸主要检出草酸、乳酸和马来酸，抗病品种主要分泌马来酸， 而感病品种主要分泌乳酸，感病品种有机酸分泌总量大于抗病品种；人工接种黑胫病菌促进了有机酸的分泌，接种后整个时期感病品种有机酸分泌总量均大于抗病品种。

### 8.1.4 添加有机酸和酚酸纯品对黑胫病菌生长及孢子囊产生和游动孢子释放的影响亦存在差异，其 作用方式及强度取决于作用浓度大小。

### 8.1.5 添加不同烤烟品种根系分泌物对黑胫病菌生长及孢子囊产生和游动孢子释放的影响存在差异，且与品种抗性密切相关，抗病品种对黑胫病菌生长繁殖的抑制和感病品种的促进作用最大的时期集中在旺长期或现蕾期。

### 8.1.6 证实烤烟根系分泌物具有化感自毒作用，自毒物质的释放和积累是造成烤烟连作障碍的重要 因素。根系分泌物对幼苗生长及防御酶活性均有不同不利影响。添加外源酚酸对烤烟生长及代谢 产生重要影响，且证实酚类物质具有化感自毒作用，酚酸物质积累是造成烤烟连作障碍的重要原 因。

### 8.1.7 不同烤烟品种根际可培养微生物数量存在差异且与品种抗性密切相关，烤烟生长前期（团棵 期和旺长期）品种抗性差异较明显。人工接种黑胫病后抗病品种根际细菌数量增加，而感病品种 细菌数量减少，真菌数量增加且与品种抗性负相关，放线菌数量增加。不同品种碳源总体利用能力及功能多样性存在一定差异，团棵期和旺长期抗病品种碳源总体利用能力及功能多样性大于感病品种，接种降低了感病品种碳源总体利用能力及功能多样性。

## 8.2 主要创新点

### 8.2.1 从根系分泌物角度研究不同烤烟品种根系分泌物中酚酸和有机酸种类和含量差异及其与品种抗性的相关性；

### 8.2.2 设计并优化了烤烟根系分泌物提取方法及定性和定量检测条件；

### 8.2.3 较系统研究了根系分泌物及其有机酸和酚酸组分对黑胫病菌生长和繁殖的影响。

## 8.3 展望

### 8.3.1 目前常用的收集方法为溶液培养法、土培法以及原位收集等较先进的收集方法，各种方法各有优缺。一般认为溶液法操作简单，但与植株生长土壤环境差别较大，根系分泌物组分相对较少， 而土培法很难避免根际微生物的影响。所以单独采取一种收集方法确定的根系分泌物组分可能跟真实根系分泌物组分存在较大差异，那么怎样最大程度确定出烤烟根系分泌物组分的种类和含量？怎样最大程度剔除由于不同收集方法导致的分析鉴定结果的差异？这些都需要进一步的研究。

### 8.3.2 本研究得出不同烤烟品种根系分泌物中酚酸和有机酸种类和含量存在差异，且这种差异与品种抗病性存在一定联系，那么这种关联性能否在大田中试验中体现出来还需要我们进一步验证。本研究根系分泌物及其酚酸和有机酸对黑胫病菌生长的影响存在差异，那么在正常植株生长过程中通过添加某些对黑胫病菌具有抑制作用的物质能否降低黑胫病发病率，也同样值得进一步研究。

### 8.3.3 通过研究发现，根系分泌物组分在土壤中的释放和积累是造成烤烟连作障碍的一个重要因素，但自毒物质在土壤中是以什么形式积累，这种积累对连作年限增加变化趋势如何，烤烟前茬作物根系分泌物对烤烟生长有何影响，不同的前茬作物对烤烟连作障碍发生程度是否存在差异，需要我们进一步对烤烟根系分泌物与连作障碍发生关系进行系统研究。

### 8.3.4 从根系分泌物角度研究烤烟生长发育及相关生理生化研究较少，烤烟生长发育过程与根系分 泌物分泌特性有何关系，根系分泌物与烤烟根际环境、养分吸收等有何联系等等，因此有必要对烤烟根系分泌物及其相关因素进行较系统的研究。

参考文献

蔡燕飞，廖宗文，章家恩，等. 生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(3)：349–353.

曹光球，林思祖，杜玲，等. 阿魏酸与肉桂酸对杉木化感作用的生物评价[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(2)：8-10.

曹永胜， 张雪松， 戴素英. 胡萝卜特产区连作障碍原因调查分析[J]. 华北农学报, 2006, 21（增刊）：

148-150.

柴强，黄高宝. 根系分泌物在不同播种模式中的化感效应研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39（2）：

163-167.

陈宏宇，李晓鸣，王敬国. 抗病性不同大豆品种根面及根际微生物区系的变化Ⅰ.非连作大豆（正茬）根面及根际微生物区系的变化[J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(6)：804-809.

陈凯，马敬，曹一平. 磷亏缺下不同植物根系有机酸的分泌[J]. 中国农业大学学报, 1999, 4(3)：58-62.

陈龙池，廖利平，汪思龙，等. 香草醛和对羟基苯甲酸对杉木幼苗生理特性的影响[J]. 应用生态学

报, 2002, 13(10): 1291-1294.

陈瑞泰，朱贤朝，王智发，等. 全国16个主产烟省（区）烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学, 1997, 1(4)：1-7.

陈中宽，黄复民，郭桂清，等. 大豆连作土壤肥力变化与有害生物发生的关系[J]. 中国农学通报，

2006, 22(7): 373-376.

陈宗泽，殷勤燕，王旭明，等. 土壤病原菌对连作大豆的致病性初探[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(1)：29-32.

陈宗泽，殷勤燕. 大豆连作对土壤微生物生物量的影响[J]. 大豆通报, 1997(6)：15。

程智慧，耿广东， 张素勤， 等. 辣椒对莴苣的化感作用及其成分分析[J]. 园艺学报, 2005，（1）：100。

代丽，赵红梅， 甄文超. 草莓再植病害中的化感作用研究[J]. 科技导报, 2006, 24(6)：52-54.

邓阳春，黄建国. 长期连作对烤烟产量和土壤养分的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16（4）：

840-845.

董章杭，林文雄. 作物化感作用研究现状及前景展望[J]. 中国生态农业学报, 2001, 9(1)：80-83.

杜英君，靳月华. 连作大豆植株化感作用的模拟研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(2)：209-212.

杜昱光，白雪芳，张宝琛. 生化他感效应对土壤氮素影响的研究[J]. 草业科学, 1996, 13(5)：652-671.

范俊岗，范国儒. 植物根系分泌及其在林业中的意义[J]. 辽宁林业科技, 1995，（1）：50-52, 60.

范玉贞. 白三叶草不同生长期根际微生物的变化[J]. 江苏农业科学, 2010，（5）：459–460.

房保海，张广民，迟长凤，等. 烟草低头黑病菌毒素对烟草丙二醛含量和某些防御酶的动态影响[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1)：27-31．

高正良，周本国，雷艳丽. 黑胫病菌在烟草品种间的侵染差异及I-S关系研究[J]. 中国烟草学报，

2004, 10(4): 31-34.

高志华，张学英，葛会波，等. 草莓根系分泌物障碍效应的模拟研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(1)：189-193.

高子勤，张淑香. 连作障碍与根际微生态研究Ⅰ.根系分泌物及其生态效应[J]. 应用生态学报, 1998，

9(5): 549-554.

郭瑞英，陈清， 李晓林. 土壤微生物-抑病性与土壤健康[J]. 中国蔬菜, 2005，（增刊）：78-82.

郭亚利，李明海，吴洪田，等. 烤烟根系分泌物对烤烟幼苗生长和养分吸收的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(3)：458-463.

韩丽梅，王树起，鞠会艳，等. 大豆根分泌物的鉴定及其化感作用的初步研究[J]. 大豆科学, 2000, 19(2)：119-125.

[韩丽梅，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e9%9f%a9%e4%b8%bd%e6%a2%85%22%2BDBID%3aWF_QK)[阎飞，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e9%98%8e%e9%a3%9e%22%2BDBID%3aWF_QK)[王树起，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e7%8e%8b%e6%a0%91%e8%b5%b7%22%2BDBID%3aWF_QK)等. 重迎茬大豆根际土壤有机化合物的初步鉴定及对大豆种子萌发的化感

作用[J]. [应用生态学报,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-yystxb.aspx) 2000, 11(4): 582-586.

韩雪，潘凯，吴凤芝. 不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌的影响[J]. 中国蔬菜, 2006(5)：14-15.

韩雪， 吴凤芝， 潘凯. 根系分泌物与土传病害关系之研究综述[J]. 中国农学通报, 2006, 2（22）：

316-318.

郝文雅，冉炜，沈其荣，等. 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[J]. 中国农业科学, 2010, 43(12)：2443-2452.

何光训. 杉木连栽林地土壤酚类物质降解受阻的内外因[J]. 浙江林学院学报, 1995, 12(4)：434-439.

何海斌，陈祥旭，林瑞余，等. 化感水稻PI312777 苗期根系分泌物中化学成分分析[J]. 应用生态学报, 2005, 16(12): 2383-2388.

何海斌，何华勤，林文雄，等. 不同化感水稻品种根系分泌物中萜类化合物的差异分析[J]. 应用生态学报, 2005, 16 (4)：732-736.

何海斌，王海斌，陈祥旭，等. 化感水稻苗期不同器官水浸提液及根系分泌物对稗草的化感作用[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(2)：14-17.

贺丽娜，梁银丽，高静，等. 连作对设施黄瓜产量和品质及土壤酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版）, 2008, 36(5)：155-159.

胡锋，李辉信，史玉英，等. 两种基因型小麦根际土壤生物动态及根际效应[J]. 土壤通报, 1998, 29(3)：133- 135.

[胡开辉，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e8%83%a1%e5%bc%80%e8%be%89%22%2BDBID%3aWF_QK) [罗庆国，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e7%bd%97%e5%ba%86%e5%9b%bd%22%2BDBID%3aWF_QK) [汪世华，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e6%b1%aa%e4%b8%96%e5%8d%8e%22%2BDBID%3aWF_QK) 等. 化感水稻根际微生物类群及酶活性变化[J]. [应用生态学报,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-yystxb.aspx) [2006,](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/yystxb/2006-6.aspx)

[17(6)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/yystxb/2006-6.aspx): 1060-1064.

[胡元森，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e8%83%a1%e5%85%83%e6%a3%ae%22%2BDBID%3aWF_QK)[刘亚峰，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%88%98%e4%ba%9a%e5%b3%b0%22%2BDBID%3aWF_QK) [吴坤，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%90%b4%e5%9d%a4%22%2BDBID%3aWF_QK) 等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究[J]. [土壤通报,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-trtb.aspx) [2006, 37(1)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/trtb/2006-1.aspx)：126-129.

[胡元森，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e8%83%a1%e5%85%83%e6%a3%ae%22%2BDBID%3aWF_QK)[吴坤，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%90%b4%e5%9d%a4%22%2BDBID%3aWF_QK)[刘娜，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%88%98%e5%a8%9c%22%2BDBID%3aWF_QK)等. 黄瓜不同生育期根际微生物区系变化研究[J]. [中国农业科学,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zgnykx.aspx) [2004,](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/zgnykx/2004-10.aspx) [37(10)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/zgnykx/2004-10.aspx)：1521-1526.

化党领，杨秋云，刘世亮，等. 不同有机酸对不同成熟度烟叶内在化学成分的影响[J]. 江苏农业科

学, 2011(1): 114-115.

黄成江，李天福，卢向阳，等. 抗黑胫病烤烟品种资源的筛选[J]. 烟草农业科学, 2006, 2(3)：255-259.

贾新民，姜述君，殷奎德，等. 重迎茬条件下大豆根系分泌物对根腐病病原菌的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1997, 9(3)：12-15.

江彤，杨建卿，高明，等. 不同抗病性烟草罹黑胫病后几种酶的活性及丙二醛含量的变化[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(2)：218-221.

蒋道伟，司龙亭. 不同抗性黄瓜自交系接种白粉病原菌后生理特性的变化[J]. 西北农业学报, 2010, 19(8)：161-165．

晋艳，杨宇虹，段玉琪，等. 烤烟连作对烟叶产量和质量的影响研究初报[J]. 烟草科技, 2002，（1）：412-451.

晋艳，杨宇虹，段玉琪，等. 烤烟轮作、连作对烟叶产量质量的影响[J]. 西南农业学报，2004（增刊）：

267-271.

靳志丽，李雪利，刘国顺，等. 腐殖酸对烤烟生理代谢的影响[J]. 河南农业大学学报, 2000, 34(1)：44-46.

靳志丽，刘国顺，梁文旭.腐殖酸对烤烟根系生长和生理活性的影响[J]. 烟草科技, 2002(7)：36-38.

鞠会艳，韩丽梅，王树起，等. 连作大豆根分泌物对根腐病病原菌的化感作用[J]. 应用生态学报, 2002, 13(6)：723-727.

康萍芝，白小军，沈瑞清，等. 不同作物根系分泌物对小麦全蚀病菌的影响[J]. 内蒙古农业科技，

2006, (4): 37-38

康业兵，毛军雷. 豫西烟草根结线虫与黑胫病相继发生的原因及防治措施[J]. 烟草科技, 1990，（2）：

47-48.

孔垂华，徐效华，梁文举，等. 冰稻化感品种根分泌物中非酚酸类化感物质的鉴定与抑草活性[J]. 生态学报, 2004, 24(7)：1317-1322.

孔凡玉，朱贤朝，石金开，等. 我国烟草侵染性病害发生趋势及防治对策[J]. 中国烟草, 1995，（1）：31-34.

雷娟利，寿伟松，董文其，等. 抗感枯萎病西瓜根际微生物比较研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35（7）：

1034-1038.

李传涵，李明鹤，何绍江，等. 杉木林和阔叶林土壤酚含量及其变化的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(2)：9-14.

[李春格，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e6%9d%8e%e6%98%a5%e6%a0%bc%22%2BDBID%3aWF_QK) [李晓鸣，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e6%9d%8e%e6%99%93%e9%b8%a3%22%2BDBID%3aWF_QK) [王敬国，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e7%8e%8b%e6%95%ac%e5%9b%bd%22%2BDBID%3aWF_QK) 等. 大豆连作对土体和根际微生物群落功能的影响[J]. [生态学报,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-stxb.aspx) [2006,](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/stxb/2006-4.aspx)

[26(4)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/stxb/2006-4.aspx): 1144-1150.

李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京：高等教育出版社, 2000

李红丽，李清飞，郭夏丽，等. 调节土壤微生态防治烟草青枯病[J]. 河南农业科学, 2006，（2）：57–60.

李洪连，王烨， 袁红霞，等. 根际微生物多样性与棉花品种对黄萎病抗性的关系研究I. 根际微生

物数量与棉花品种对黄萎病抗性的关系[J]. 植物病理学报, 1998, 28(4)：341-346.

李洪连，袁红霞，王烨，等. 根际微生物多样性与棉花品种对黄萎病抗性的关系研究II.不同抗性品种根际真菌区系分析及其对棉花黄萎病菌的抑制作用[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3)：242-246.

李洪连. 棉花抗黄萎病生化机制研究[J]. 化学生态学, 1998，（2）：177-180.

李娟，赵秉强，李秀英，等. 长期不同施肥制度下几种土壤微生物学特征变化[J]. 植物生态学报，

2008, 32(4): 891–899.

李梅云，王革， 李天飞， 等. 烟草黑胫病木霉生防菌株的筛选[J]. 中国烟草科学, 2001，（2）：43-46.

李梅云. 不同培养基对烟草黑胫病菌生长的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(7)：434-436

[李琼芳.](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e6%9d%8e%e7%90%bc%e8%8a%b3%22%2BDBID%3aWF_QK) 不同连作年限麦冬根际微生物区系动态研究[J]. [土壤通报,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-trtb.aspx) [2006, 37(3)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/trtb/2006-3.aspx)：563-565.

李天福，王彪，王树会. 云南烤烟轮作的现状分析与保障措施[J]. 中国烟草科学, 2006，（2）：482-511.

李廷轩，马国瑞，张锡洲，等. 籽粒苋不同富钾基因型根系分泌物中有机酸和氨基酸的变化特点[J].

植物营养与肥料学报, 2005, 11(5): 647-654.

李小娟，刘二明，谭小平，等. 3种防御酶在水稻抗稻曲病中的活性变化[J]．植物保护，2010, 36(1)：91-94．

李勇，刘时轮，黄小芳，等. 人参(Panax ginseng)根系分泌物成分对人参致病菌的化感效应[J]. 生态学报, 2009, 29(1):161-168.

李振方，齐晓辉，李奇松，等. 地黄自毒物质提取及其生物指标测定[J]. 生态学报, 2010, 30(10)：2576-2584.

李振高，李良谟，潘映华，等. 小麦苗期根系分泌物对根际反硝化细菌的影响[J]. 土壤学报, l995，

32(4): 408-4l3.

梁春启，甄文超，张承胤，等. 玉米秸秆腐解液中酚酸的检测及对小麦土传病原菌的化感作用[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2)：210-213.

梁元存，刘延荣，王玉军，等. 烟草黑胫病菌致病性分化和烟草品种的抗病性差异[J].植物保护学报, 2003, 30(2)：143-147.

廖利平，邓仕坚，于小军，等. 不同连载代数杉木人工林细根生长、分布与营养物质分泌特征[J]. 生态学报, 2001，（21）：569-574.

林代福，孙辉，夏永坤. 根结线虫与黑胫病发生关系的研究[J]. 云南农业大学学报, 1998, 13(1)：15-19.

林敏，平淑珍，尤崇杓. 粪产碱菌对水稻根质子分泌作用及根际微生态的影响[J]. 植物生理学报，

1992, 18(3): 233-238.

林群慧，何华勤， 林文雄. 水稻化感物质作用特性的研究[J]. 中国生态农业学报, 2001, 9(1)：84-85.

刘博，李亚东，吴林，等. 不同基质条件下越橘根系分泌物中有机酸组分与含量的分析[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5)：581-583, 594.

刘国顺. 烟草栽培学[M]. 北京：中国农业出版社, 2003。

刘军，温学森，郎爱东. 植物根系分泌物成分及其作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(3)：63-65.

刘琳，侯喜林，王利英，等. 不结球白菜感染芜菁花叶病毒后4种防御酶活性变化及其抗病相关性

[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(3): 14-18.

刘琼光，杨艳. 番茄品种抗性与青枯菌和土壤微生物的关系[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2006, 19(3)：31-34.

刘世亮，杜君，化党领，等. 不同有机酸对烤烟不同成熟度烟叶香气质量的影响[J]. 华北农学报，

2010, 25(1): 131-135.

刘世亮，杜君， 化党领， 等. 不同有机酸对烤烟品质和产值的影响，作物学报, 2008, 34(5)：851-858.

刘世亮，杨振民，化党领，等. 不同有机酸对烤烟生长发育和生理生化特性的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5)：248-252.

刘素萍，王汝贤，张荣，等. 根系分泌物中糖和氨基酸对棉花枯萎菌的影响[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(6)：30-35.

刘素萍，杨之为. 根系分泌物[J]. 生态农业研究，1998, 6(2)：34-36.

刘文静，潘葳. 采用反相高效液相色谱法同时测定杨梅果实中的有机酸[J]. 热带作物学报2011, 32(1)：172-175.

刘秀芬，胡晓军. 化感物质阿魏酸对小麦幼苗内源激素水平的影响[J]. 中国生态农业学报, 2001，

9(1): 86-88.

刘秀芬，马瑞霞，袁光林，等. 根际化感化学物质的分离、鉴定与生物活睦的研究[J]. 生态学报, 1996, 16(1)：1-10.

[刘亚锋，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%88%98%e4%ba%9a%e9%94%8b%22%2BDBID%3aWF_QK)[孙富林，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%ad%99%e5%af%8c%e6%9e%97%22%2BDBID%3aWF_QK)[周毅，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%91%a8%e6%af%85%22%2BDBID%3aWF_QK)等. 黄瓜连作对土壤微生物区系的影响Ⅰ.基于可培养微生物种群的数量

分析[J]. [中国蔬菜,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zgsc.aspx) [2006, (7)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/zgsc/2006-7.aspx): 4-7.

刘易，蒋桂英，简健平，等. 加工番茄根系分泌物自毒效应的研究[J]. 西北农业学报, 2009, 18(4)：106-112.

刘毅胜，周必文， 潘家荣. 油菜对毒素草酸的吸收代谢与抗性机理[J]. 植物病理学报, 1998, 28（1）：

33-37.

刘颖坤，蔡莎艺，喻卫武，等. 超高效液相色谱测定铝胁迫下水培毛竹根系分泌物中有机酸浙江农林大学学报, 2011, 28(4)：534-537.

陆宁海， 吴利民. 健康与罹病玉米根际微生物数量及真菌区系研究[J]. 玉米科学, 2007, 15（5）：

136-138.

陆文龙，王敬国，曹一平，等. 低分子量有机酸对土壤磷释放动力学的影响[J]. 土壤学报, 1998, 35(4)：493-500.

马春红， 郑秋玲， 张凤莲， 等. 玉米新改良群体多酚氧化酶活性变化[J]. 玉米科学, 2011, 19（2）：

70-72.

马春梅，唐远征，季尚宁. 作物定位轮作体系长期试验研究-土壤微生物在作物可生育期间的数量变化（Ⅰ）[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35 (2)：135-139.

马国胜，高智谋， 陈娟. 烟草黑胫病菌研究进展(一)[J]. 烟草科技, 2003, 189(4): 35-41.

马国胜，高智谋. 烟草黑胫病菌培养性状的研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(3)：512-517

马敬. 磷胁迫下植物根系有机酸的分泌及其对土壤难溶磷的活化[D]. 北京：北京农业大学, 1994。

马瑞霞，冯怡，李管. 厌氧条件下化感物质对枯草杆菌生长及反硝化作用的影响[J]. 化学生态学, 1998，（2）：187-193.

马越强， 廖利平， 杨跃军， 等. 香草醛对杉木幼苗生长的影响[J]. 应用生态学报, 1998, 9（2）：

128-132.

马云华，王秀峰，魏珉，等. 黄瓜连作土壤酚酸类物质积累对土壤微生物和酶活性的影响[J].应用生态学报, 2005, 16(11)：2149-2153.

毛玮，侯英敏，刘志文. 核盘菌和草酸诱导下的油菜几种酶活力的变化分析[J]. 大连工业大学学报，

2011, 30(1): 39-42.

苗果园，贾志红，杨珍平，张永清. 不同作物根际微生物差异的研究[J]. ft西农业大学学报, 2004, 93–96.

苗淑杰，乔云发，刘晓冰. 氮磷比对大豆生物学性状和根系分泌有机酸量的影响[J]. 中国生态农业

学报, 2011, 19(3): 594-596.

苗则彦，赵奎华，刘长远，等. [不同抗、感枯萎病黄瓜品种不同生育时期根际微生物数量消长动态分析](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_synydxxb200401005.aspx)[J][. 沈阳农业大学学报,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-synydxxb.aspx) 2004, 35(1)：13-15.

苗则彦，赵奎华，刘长远，等. 健康与罹病黄瓜根际微生物数量及真菌区系研究[J]. [中国生态农业学报,](http://acad.cnki.net/kns55/oldNavi/Bridge.aspx?LinkType=BaseLink&amp;DBCode=cjfd&amp;TableName=cjfdbaseinfo&amp;Field=BaseID&amp;Value=ZGTN&amp;NaviLink=%e4%b8%ad%e5%9b%bd%e7%94%9f%e6%80%81%e5%86%9c%e4%b8%9a%e5%ad%a6%e6%8a%a5) 2004, 12(3)：156–157.

潘凯，姚友. 不同黄瓜品种根系分泌物对根际土壤微生物及土壤养分的影响[J]. 北方园艺, 2008(8)：18-20.

盘莫谊，张杨珠，肖嫩群，等. 烟草连作对旱地土壤微生物及酶活性的影响[J]. 世界科技研究与发

展, 2008, 30 (3): 295-297.

[庞欣，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%ba%9e%e6%ac%a3%22%2BDBID%3aWF_QK)[张福锁，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%bc%a0%e7%a6%8f%e9%94%81%22%2BDBID%3aWF_QK)[王敬国.](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e7%8e%8b%e6%95%ac%e5%9b%bd%22%2BDBID%3aWF_QK) 不同供氮水平对根际微生物量氮及微生物活度的影响[J]. [植物营养与肥料学报,](http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zwyyyflxb.aspx) 2000, [6(4)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/zwyyyflxb/2000-4.aspx)：476-480.

彭少麟，邵华. 化感作用的研究意义及发展前景[J]. 应用生态学报, 2001, 12(5)：780-786.

齐泽民，卿东红. 根系分泌物及其生态效应[J]. 内江师范学院学报, 2005, 20(2)：68-73.

秦嗣军，吕德国，赵德英，等. 本溪ft樱桃根系酚酸类分泌物及其化感效应研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(2)：156-160.

邱立友，戚元成，王明道，等. 植物次生代谢物的自毒作用及其与连作障碍的关系[J]. 土壤, 2010, 42(1)：1-7.

全国自然科学名词审定委员会. 植物学名词[S]. 北京：科学出版社, 1992, 83。

阮维斌，刘默涵，潘洁，等. 不同饼肥对连作黄瓜生长的影响及其机制初探[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12)：1519-1524.

阮维斌， 王敬国， 张福锁. 连作障碍因素对大豆养分吸收和固氮作用的影响[J]. 生态学报, 2003，

23(1): 22-29.

尚志强. 烟草黑胫病病原，发生规律及综合防治研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(2)：73-76.

沈宏，曹志洪. 几种植物对低磷胁迫的生理反应[J]. 南京师范大学学报, 1999, 22(3)：214-217.

沈萍，范秀容， 李广武. 微生物学实验（第三版）[M]. 高等教育出版社，北京：1999。

沈其益. 棉花病害基础研究与防治[M]. 北京：科学出版社, 1995.69-187.

时鹏，张继光，王正旭，等.烟草连作障碍的症状・机理及防治措施[J]. 安徽农业科学2011, 39(1)：120-122.

宋勇春，冯固， 李晓林. 泡囊丛枝菌根对三叶草根际土壤磷酸[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6（2）：

171-175.

孙文浩，余叔文. 相生相克作用及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(2)：81-87.

孙晓璐，杨海莲，陈志和，等. 两个品种水稻植株根面细菌的区系组成研究[J]. 植物病理学报, 2000, 30(2)：284-285.

孙志高，刘景双，李新华. 三江平原不同土地利用方式下土壤氮库的变化特征[J]. 农业系统科学与

综合研究, 2008, 24(3): 270-274.

台莲梅，张红梅，闫风云，等. 重迎茬对大豆根际土壤微生物数量的影响[J]. 土壤肥料, 2003，（6）：41-42.

覃逸明，聂刘旺，黄雨清，等. 凤丹(*Paeonia ostii* T.)自毒物质的检测及其作用机制[J]. 生态学报，

2009, 29(3): 1154-1161.

田永强，张作刚，张正，等. 根系分泌物对西瓜枯萎病菌的影响[J]. ft西农业大学学报（自然科学版）, 2008, 28(4)：436-438.

涂书新，孙锦荷，郭智芬，等. 植物根系分泌物与根际土壤营养关系评述[J]. 土壤与环境, 2000, 9(1)：64-67.

汪立刚，沈阿林， 孙克刚， 等. 大豆连作障碍及调控技术研究进展[J]. 土壤肥料, 2001(5)：3-7.

王才斌，吴正锋，成波，等. 连作对花生光合特性和活性氧代谢的影响[J]. 作物学报, 2007, 33(8)：1304-1309.

王大力，祝心如. 豚草的化感作用研究[J]. 生态学报, 1996, 16(1): 11-19.

王芳. 茄子连作障碍机理研究[D]. 中国农业大学博士论文, 2003, 46-51.

王革，郑小波，陆家云，等. 烟草黑胫病菌厚垣孢子和菌丝体在土壤中的存活状态[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(1)：41-45.

王光华，金剑，潘相文，等. 不同茬口大豆根圈土壤pH值和氮营养分布的变化[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(1)：55-59.

王光华，于广武，许艳丽. 大豆根残体对大豆生长的影响[A]. 见: 许艳丽，韩晓增主编. 大豆重迎茬研究[C]. 哈尔滨：哈尔滨工程大学出版社, 1995。

王家和. 烤烟根部真菌区系及其致病性研究[J]. 云南农业大学学报, 1994, 9(2)：95-100.

王进闯，潘开文， 吴宁， 等. 花椒品种间化感效应的差异[J]. 生态学报, 2005, 25(7): 1592-1598.

王君，王东升. 大豆、小麦根系分泌物中低分子量有机酸分析方法[J]. 辽宁工程技术大学学报（自然科学版）, 2009, 28增刊：240-242.

王俊儒，安保珠，尉庆丰. 油菜、荞麦根系分泌物中糖及有机酸组分的研究[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(6)：42-46.

王平，周荣. 高效液相色谱法测定植物根系分泌物中的有机酸色谱[J]. 2006, 24(3): 239-242.

王倩，李晓林. 苯甲酸和肉桂酸对西瓜幼苗生长及枯萎病发生的作用[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(1)：83-86.

王桥美，范静华，果志华，等. 烟草黑胫病菌毒素对烟草防御性相关酶的诱导作用[J]. 云南农业大

学学报, 2011, 26(1): 20-25．

王瑞新. 烟草化学[M]. 中国农业出版社, 2003。

王树起，韩丽梅， 杨振明. 不同有机酸对大豆生长的化感效应[J]. 大豆科学, 2002, 21(4)：267-273.

王树起，韩晓增，乔云发. 根系分泌物的化感作用及其对土壤微生物的影响[J]. 土壤通报, 2007, 38(6)：1119-1127.

王水良，王平，王趁义. 铝胁迫下马尾松幼苗有机酸分泌和根际pH值的变化[J]. 生态与农村环境

学报, 2010, 26(1): 87-91.

王万能，全学军， 肖崇刚. 烟草疫霉的产孢和接种方法研究[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1)：18-22.

王万能，肖崇刚. 烟草黑胫病的综合防治及其研究进展[J]. 广西农业科学, 2003, （2）：42-43．王震宇，王英祥， 陈祖任. 重茬大豆生长发育障碍机制初探[J]. 大豆科学, 1991, 10(1)：31-36.

王志愿，姜清治， 霍沁建. 烟草黑胫病的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(21)：250–255.

王智发，刘延荣，谢成颂，等. ft东省烟草黑胫病菌生理小种初步鉴定[J]. 植物保护学报, 1985, 12(1)：51-55.

魏相峰，汤会君. 不同抗性烟草品种感染*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*病菌后几种酶活性测定[J].

检验检疫科学, 2006, 16(2): 17-19．

吴凤芝，黄彩红，赵凤艳. 酚酸类物质对黄瓜幼苗生长及保护酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7)：821-825.

吴凤芝，孟立君， 文景芝. 黄瓜根系分泌物对枯萎病菌丝生长的影响[J]. 中国蔬菜, 2002(5)：26-27.

吴凤芝，王伟， 栾非时. 土壤灭菌对大棚连作黄瓜生长发育影响[J]. 北方园艺, 1999，（5）：1-2.

[吴凤芝，](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%90%b4%e5%87%a4%e8%8a%9d%22%2BDBID%3aWF_QK)[赵凤艳](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e8%b5%b5%e5%87%a4%e8%89%b3%22%2BDBID%3aWF_QK)，[刘元英.](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?f=detail&amp;q=%e4%bd%9c%e8%80%85%3a%22%e5%88%98%e5%85%83%e8%8b%b1%22%2BDBID%3aWF_QK) 设施蔬菜连作障碍原因综合分析与防治措施[J]. 东北农业大学学报, [2000, 31(3)](http://c.wanfangdata.com.cn/periodical/dbnydxxb/2000-3.aspx)：241-247.

吴启堂. 根系分泌物对镉生物有效性的影响[J]. 土壤, 1993，（5）：257-259.

谢成颂，王智发， 刘延荣. 国内外烟草黑胫病菌生理小种鉴定评介[J]. 中国烟草, 1987(1)：12-17.

熊明彪，何建平，宋光煜. 根分泌物对根际微生物生态分布的影响[J]. 土壤通报, 2002, 33(2)：145-148.

徐凤花， 汤树德， 孙冬梅， 等. 重迎茬对大豆根际微生物的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报，

1998, 10 (1): 5-8.

徐瑞富，陆宁海，李小丽，等. 土壤微生物群落对棉花黄萎病的影响[J]. 棉花学报, 2004, 16(6)：357-359.

许美玲， 张绍芬， 段玉琪. 烤烟品种资源抗黑胫病综合评价[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18（1）：

42-47.

许学明. 烟草黑胫病菌对六种杀菌剂的抗性测定及抗甲霜灵机制的初步研究[C]. ft东农业大学，2007: 17-18．

许艳丽，王光华，韩晓增. 连、轮作大豆土壤微生物生态分布特征与大豆根部病虫害关系的研究[J]. 农业系统科学与综合研究, 1995，（4）：311-314.

许艳丽，王光华， 韩晓增. 连作大豆生物障碍研究[J]. 中国油料, 1997, 19 (3): 46-491.

许艳丽，张红骥，张匀华，等. 施用根腐病生防颗粒剂对大豆田土壤微生物区系的影响[J]. 大豆科学, 2007, 26(2)：198-203.

严小龙，张福锁. 植物营养遗传学[M]. 北京：中国农业出版社, 1997。

阎飞，杨振明，韩丽梅. 植物化感作用(Allelopathy)及其作用物的研究方法[J]. 生态学报, 2000, 20(4): 692-695.

杨家学， 高微微. 酚酸类化感物质对两种西洋参病原真菌的作用[J]. 中国农学通报, 2009, 25（9）：

207-211.

杨建峰，贺立源，左雪冬，等. 有潜在性的大孔吸附树脂模拟植物根系分泌有初酸吸附的方法[J]. 华北农学报, 2007, 22(3)：127-131, 31.

杨建卿. 江彤. 陈学平. 烟草疫霉菌的培养及大量产生游动孢子囊和游动孢子方法的研究[J]. 植物

保护, 2001, 27(4):12-14

杨世超，李孙荣， 杨学君. 小麦对白茅化感作用影响研究[J]. 杂草科学, 1992, 6(2)：23-27.

杨之为，王汝贤，宗兆峰，等. 棉花枯萎病抑菌土成因初探I棉根系分泌物对棉花枯萎菌的影响[J]. 西北农业学报, 1995, 4 (4)：63-68.

姚革. 烟草黑胫病流行因素及防治[J]. 西南农业学报. 1996, 9(1)：76-80.

姚槐应，黄昌勇. 土壤微生物生态学及其试验技术[M]. 北京：科学出版社, 2006: 166–169.

于方玲，孙冰玉，元野，等. 连作对烤烟叶片淀粉和还原糖含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4)：1824-1825.

于慧瑛， 吕国忠， 孙晓东， 等. 病健人参根际土壤真菌种类及数量的研究[J]. 安徽农业科学, 2007，

35(26): 8279-8291.

喻景权， 杜尧舜. 蔬菜设施栽培可持续发展中的连作障碍[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31（1）：

124-126.

喻景权，松井佳久. 豌豆根系分泌物自毒作用的研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(3)：175-179.

袁光林，马瑞霞， 刘秀芬， 等. 化感物质对土壤脲酶活性的影响[J]. 环境科学, 1998, 19(2)：55-57.

袁虹霞，李洪连，王烨，等. 棉花不同抗性品种根系分泌物分析及其对黄萎病菌的影响[J]. 植物病理学报, 2002, 32 (2)：127-131.

袁英英，李敏清，胡伟，等. 生物有机肥对番茄青枯病的防效及对土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(7)：1344–1350.

曾任森，林象联. 蟛蜞菊根分泌物的异种克生作用及初步分离[J]. 生态学杂志, 1994, 13(1)：51-56.

曾任森，骆世明. 三叶鬼针草水提物化感作用与降水量的关系[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16（4）：

69-72.

甑文超，王晓燕，孔俊英，等. 草莓根系分泌物和腐解物中的酚酸类物质及其化感作用[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(4)：74-78.

战秀梅，韩晓日，杨劲峰，等. 大豆连作及其根茬腐解物对大豆根系分泌物中酚酸类物质的影响[J]. 土壤通报, 2004, 35(5)：632-635.

湛方栋，陆引罡，关国经，等．烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究[J]．土壤学报，2005，

42(3): 488-494.

张福锁. 根分泌物及其在植物营养中的作用：Ⅰ. 缺锌对双子叶植物根系分泌物的影响[J]. 北京农业大学学报, 1991, 17(2)：63-67.

张福锁. 根分泌物及其在植物营养中的作用：Ⅱ. 缺锌对禾本科植物根系分泌物的影响[J]. 北京农业大学学报, 1991, 17(4)：67-70.

张福锁. 根分泌物与禾本科植物对缺铁胁迫的适应机理[J]. 植物营养与肥料学报, 1995, 1(1)：17-

23.

张福锁. 根系分泌物及其在植物营养中的作用（综述）[J]. 北京农业大学学报, 1992, 8(4)： 353-358.

张福锁. 环境胁迫与植物根际营养[M]. 北京：中国农业出版社. 1997.

张高峡，卢振祖. 从作物根际分离的多粘芽孢杆菌固氮作用的研究[J]. 武汉大学学报（自然科学版）, l998, 44(6): 745-748.

张怀予， 毕阳， 李云华， 等. 采后苹果酸处理对苹果梨青霉病的抑制[J]. 甘肃农业大学学报, 2009，

44(1): 138-142.

张建成. 苹果幼树根系分泌物含量变化研究[D]. 太谷：ft西农业大学, 2000。

张晶，张惠文，李新宇，等.土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性[J]. 应用生态学报, 2006, 17(6)：1129-1132.

张俊英，王敬国，许永利. 不同大豆品种根系分泌物中有机酸和酚酸的比较研究[J]. 安徽农业科学，

2007, 35(23): 7127-7129, 7131.

张俊英，王敬国，许永利. 大豆根系分泌物中氨基酸对根腐病菌生长的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(2)：308-315.

张俊英. 不同抗性大豆品种根系分泌物的化感作用及其组分分析[C]. 中国农业大学博士论文, 2007。

张科，袁玲，施娴，等. 不同植烟模式对烤烟产质量、土壤养分和酶活性的影响[J]. 植物营养与肥

料学报, 2010, 16(1): 124-128.

张利，何新华，陈虎. 铅胁迫下杨梅根系分泌有机酸的研究[J]. 浙江林学院学报, 2009, 26(5)：664-666.

张美俊，杨武德，李燕娥. 不同生育期转Bt基因棉种植对根际土壤微生物的影响[J]. 植物生态学

报，2008, 32(1)：197–203.

张庆平，刘中兴. 荞麦根系分泌物对小麦全蚀病菌的抑制及根际微生物种群数量观察[J]. 内蒙古农业科技, 1994，（1）：8-9.

张淑香，高子勤，刘海玲. 连作障碍与根际微生态研究Ⅲ.土壤酚酸物质及其生物学效应[J]. 应用生态学报, 2000, 11(5)：741-744.

[张淑香，](http://www.cqvip.com/Main/Search.aspx?w=%e5%bc%a0%e6%b7%91%e9%a6%99)[高子勤.](http://www.cqvip.com/Main/Search.aspx?w=%e9%ab%98%e5%ad%90%e5%8b%a4)连作障碍与根际微生态研究Ⅱ.根系分泌物与酚酸物质[J]. 应用生态学报, 2000, 11(1)：152-156.

张小冰. 根系分泌物及其作用[J]. 生物学教学, 2004(11)：6-8.

张晓玲，潘振刚， 周晓锋， 等. 自毒作用与连作障碍[J]. 土壤通报, 2007, 38(4): 781-784.

张修国，罗文富，苏宁，等. 烟草黑胫病发生动态与黑胫病菌全基因组(DNA)遗传分化关系的研究

[J]. 中国农业科学, 2001, 34(4): 379-384.

张重义，尹文佳， 李娟， 等. 地黄连作的生理生态特性[J]. 植物生态学报, 2010, 34(5): 547-554.

张子龙， 王文全. 植物连作障碍的形成机制及其调控技术研究进展[J]. 生物学杂志, 2010, 27（5）：

69-72.

赵大君，郑师章. 凤眼莲根分泌物氨基酸对根际肠杆菌属F2细菌降酶的影响[J]. 应用生态学报, 1996, 7(4)：435-438.

赵蕾， 粱元存， 刘延荣. 壳聚糖对烟草抗黑胫病的作用[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6（5）：

436-439.

赵晓芳. 鸭梨果实抗性物质与轮纹病菌互作关系研究[D]. 郑州：河南农业大学, 2008。

甄文超，曹克强，代丽，等.连作草莓根系分泌物自毒作用的模拟研究[J]. 植物生态学报, 2004, 28(6)：828-832.

郑良永，胡剑非， 林昌华， 等. 作物连作障碍的产生及防治[J].热带农业科学, 2005, 25(2)：58-62.

郑师章，何敏. 水葫芦根部分泌物对若干细菌作用的研究[J]. 生态学杂志, 1990, 9(5)：56-57.

中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 科学出版社，北京：1985。

周宝利，姜荷，赵鑫. 不同砧木嫁接茄子抗黄萎病特性及其与根系分泌物关系[J]. 阳农业大学学报, 2001, 32(6)：414-417.

周宝利，尹玉玲，李云鹏，等. 嫁接茄根系分泌物与抗黄萎病的关系及其组分分析[J]. 生态学报，

2010, 30(11): 3073-3079.

周陈，李许滨，杨明开，等. 冬小麦不同生育期土壤微生物及养分动态变化[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3)：113–116, 128.

周飞，陈士银，钟来元，等. 区域土地利用与生态系统服务价值变化研究[J]. 农业系统科学与综合

研究，2007, 23 (4)：394–398.

周冀衡，[李永平，](http://www.cqvip.com/Main/Search.aspx?w=%e6%9d%8e%e6%b0%b8%e5%b9%b3)[杨虹琦，](http://www.cqvip.com/Main/Search.aspx?w=%e6%9d%a8%e8%99%b9%e7%90%a6)等. 不同基因型烟草根系分泌物对难溶性磷钾的活化效应[J]. 湖南农业大学学报（自然科学版）, 2005, 31(3): 276-280.

周凯，郭维明，王智芳，等. 菊花不同部位及根际土壤水浸液处理对光合作用的自毒作用研究[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(2)：318-322.

周瑞莲，赵哈林. 高寒ft区草本植物的保护酶系统及其在低温生长中的作用[J]. 西北植物学报, 2002, 22(3)：566-573.

周艳丽，王艳，李金英，等. 大蒜根系分泌物的化感作用[J]. 应用生态学报, 2011, 22(5)：1368-1372.

周志成. 烟草黑胫病菌产孢性状的研究[J]. 湖南农业科学, 2005，（2）：60-62.

周志红. 番茄的化感作用研究[J]. 应用生态学报, 1997, 8(4): 446-450.

朱丽霞，章家恩，刘文高. 根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述[J]. 生态环境, 2003, 12(1)：102-105.

朱贤朝，郭振业， 刘保安. 中国烟草黑胫病菌生理小种研究初报[J]. 中国烟草, 1987(4)：1-3.

朱贤朝. 烟草黑胫病菌生理小种研究概况和鉴定技术[J]. 中国烟草, 1982，（1）：23-26.

朱贤朝. 中国烟草病害[M]. 中国农业出版社, 2002。

邹莉，袁晓颖，李玲，等. 连作对大豆根部土壤微生物的影响研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2)：27-30.

左豫虎，薛春生，刘惕若. 杀菌剂对大豆疫霉生长的抑制作用[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2002，

19(1):106-108.

Abdul R A, Habib S A. Allelopathic effect of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on bladygrass(Imperata cylindrica)[J]. Journal of Chemical Ecology, 1989, 16: 2289-2300.

Aro E M, Mccaffery S, Anderson J M. Photoinhibition and DI protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances[J]. Plant Physiology, 1993, 103: 835-843.

Asao T, Kitazawa H, Tomita K *et al*. Mitigation of cucumber autotoxicity in hydroponic culture using microbial strain[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 99(3): 207-214.

Baziramakenga R, Leroux G D, Simard R R. Effects of benzoic and cinnamic acid on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean[J]. J. Chem. Ecol., 1995, 20: 2821-2833.

Baziramakenga R, Simard R R, Leroux G D. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition, and chlorophyll content of soybean[J]. J. Chem. Ecol., 1994, 20(11): 2821-2833.

Birkett M A, Chamberlain K, Hooper A M *et al*. Does allelopathy offer real promise for practical weed

Management and for explaining rhizosphere interactions involving higher plants[J]. Plant Soil, 2001, 232: 31-39.

Blum U, Shafer R, Lehman M. Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: Concepts vs. an experimental model[J]. Critical Review in Plant Science, 1999, 18: 673-693.

Booker F L, Blum U, Fiscus E L. Short-term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings[J]. Journal of Experimental Botany, 1992, 43(250): 649-655.

Brusetti L, Francia P, Bertolini C. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (Zea mays) and its non transgenic counterpart[J]. Plant Soil, 2004, 266(1- 2): 11-21.

Buxton E W. Root exudates from banana and their relationship to strains of the Fusarium causing Panama wilt[J]. Ann. Appl. Biol, 1962, 50:269-282.

Callaway R M, Aschehoug E T. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion[J]. Science, 2000, 290(5491): 521-523.

Cartwright D K, Spurr H W. Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianaeon* Tobacco Seedlings with Non-pathogenic Binucleate *Rhizoctonia fung*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(14): 1879-1884.

Cawthray G R. An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1011: 233-240.

Chaboud A. Isolaiton, Puriifcaiton and chemical composition of maize root cap slime[J]. Plant and Soil, 1983, 73: 395-404.

Chen D Q, Chen R M, Pan R C. The new promotive allelopathy substance-Lepidimoide[J]. Plant Physiology Communications, 1998, 34(6): 455-457.

Chon C H. Allelopathy in relation to agricultural productivity in Taiwan: problems and prospects.

Allelopathy: Basic and applied aspects[R]. London: Chapman and Hall, 1992: 179-203.

Chou C H, Leu L L. Allelopathy substances and activities of Delonix regia Raf [J]. Journal of Chemical Ecology, 1992 (18): 353-367.

Chou C H, Wauer G R. Phytochemical ecology: allelochemicals, mycotoxing and insect pheromohes and allomones, Taiperi: Institute of Botany, Academia Sinica, 1989, 504.

Cieslinski G. Low-molecular-weight organic acidsin rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation[J]. Plant and Soil, 1998, 203(1): 109-117.

Cruz R, Anaya A L, Hernandez B E *et al*. Effects of allelochemical stress produced by Sicyos deppei on seedling root ultrastructure of Phaselus vulgaris and Cucurbita ficifolia[J]. J. ChemEcol., 1998, 24(12): 2039-2057.

Darcy L A. Study of soybean and lentil root exudates influence of soybean isofavonoids on the growth of rhizobia and some rhizospheric microorganisms[J]. Plant and Soil, 1987, 101: 267-272.

Darrah P R, Jungk A. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus[J]. Biol. Fertil. Soil, 1991, 3: 199-204.

David L J, Peter R D. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere[J]. Plant and Soil, 1994, 166(2): 247-257.

Downton W J S, Loveys B R, Grant W J R. Stomatal closure fully accounts for the inhibition of photosynthesis by abscisic acid[J]. New Phytologist, 1988, 108(3): 263-266.

Duniway J M. Role of physical factors in the development of phytophthora disease[M]. phytopathora, 1983, 175-188.

Dutta B K, Isaac I. Effects of inorganic amendments (N, P and K) to soil on the rhizosphere microflora of antirrhinum plant infected with *Verticillum dahliae* Kelb[J]. Plant Soil, 1979, 52(4): 561-569.

Earl K D, Syers J K, Mclaughlin J R. Origin of the effect of citrate, tartrate, and acetate on phosphate sorption by soils and synthetic gels[J]. Soil Sci. Am. J., 1979, 43(4): 674-678.

English J T, Mitchell D J. Influence of an introduced composite of microorganism on infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Phytopathology, 1988, 78: 1484-1490.

English J T, Mitchell D J. Relationship between the development of root systems of tobacco and infection by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Phytopathology, 1988, 78: 1478-1483.

Erwin D C. Variability within and among species of Phytophthora[A]. phytopathol, 1983,:149-165.

Fang C X, Xiong J, Qiu L *et al*. Analysis of gene expressions associated with increased allelopathy in rice (*Oryza sativa* L·) indu ced by exogenous salicylic acid[J]. ·Plant Growth Regul, 2009, 57: 163-172.

Fox T, Comerford N, Mcfee W. Kinetics of phosphorus release from spodozols[J]. Soil Sci. Soc. Am. J., 1990, 56: 290-294.

Fox T, Comerford N, Mcfee W. Phosphorus and aluminum release from a spodic horizon mediated by organic acids[J]. Soil Sci. Soc. Am. J., 1990, 54(6): 1763-1767.

Francisco J P. Root exudates of wild oats: allelopathic effect on spring wheat[J]. Phytochem, 1991, 30(7): 2199-2201.

Galindo J, Hernandez A, Dayan F E *et al*. Dehydrozaluzanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage[J]. Phytochemistry, 1999, 52(5): 805-813.

Garbeva P, van Veen J A, van Elsas J D. Microbial Diversity in Soil: Selection of Microbial Populations by Plant and S oil Type and Implications for Disease Suppressiveness[J]. Annual Review. Phytopathol., 2004, 42: 243-270.

Gardner W K, Barber D A, Parbery D G. The acquisition of phosphorus by Lupinus albus L. Ⅲ. The

Probable mechanism by which phosphorus movement in soil/root interface is enhanced[J]. Plant and Soil, 1983, 70(1): 107-124.

Gattas Hallak A M, Davide L C, Souza L F. Effects of sorghum(Sorghub bicolor L) root exudates on the cell cycle of the bean plant(Phaselus vulgaris.) root[J]. Genetics and Molecular Biology, 1999, 22(1): 95-99.

Graham R D. Genotypic differences in tolerance to manganese difficiency [A]. In: Graham R D, Hannam R J, Uren N C. Managese in soil and plant[C]. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988: 75- 85.

Graham T L. Flavonoid and Isoflavonoid distribution in developing soybean seeding tissues and in seed and root exudates[J]. Plant Physiol., 1991, 95: 594-603.

Grifiths B S, Ritz K, Ebblewhite N *et al*. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates[J]. Soil Biol Biochem., 1999, 31: 145-153.

Gu Y H, Mazzola M, Modification of fluorescent pseudomonad community and control of apple replant disease induced in a wheat cultivar-specific manner[J], Applied Soil Ecology, 2003, 24(1): 57-72.

Hartung A C, Putnam A R, Stephens C T. Inhibitory activity of asparagus root tissue and extracts on asparagus seedlings[J]. Journal of American Society for Horticultural Science, 1989, 114: 144-148.

Harwing U A. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in rhizosbium meliloti[J]. Plant Physiol, 1990, 92: 116-122.

Hasegawa K, Mizutani J, Kosemura S *et al*. Isolation and identification of lepidimoide, a new allelopathic substance from mucilage of germ inatedcress seeds[J]. Plant Physiology, 1992, 100(2): 1059-1061.

Hejl A M, Einhellig F A, Rasmussen J A. Effects of juglone on growth, photosynthesis, and respiration[J]. J. Chem. Ecol., 1993, 19(3): 559-568.

Higuchi K, Kanazawa K, Nishizawa N K. Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots[J]. Plant and Soil, 1994, 165(2): 173-179.

Ho H H. Keys to the species of Phytophthora in Taiwain[J]. Plant Pathology Bulletin, 1992, (1): 104-109.

Hoffland E, Findenegg G R, Nelmans J A. Solubilization of rock phosphate by rape.Ⅱ. Local root

Exudation of organic acids as a response to Pstarvation[J]. Plant and Soil, 1989, 113(2): 161-165.

Hoffland E, Findenegg G R, Nelmans J A. Solubilization of rockphosphate by rape.ⅠEvaluation of the role of the nutrient uptake pattern[J]. Plant and Soil, 1989, 113(2): 155-160.

Hollapa L D, Blum U. Effects of exogenously applied ferulic acid, a potential allelopathic compound, on leaf growth, water utilization, and endogenous abscisic acid levels of tomato, cucumber and bean[J]. J. Chem. Ecol., 1991, 17: 865-886.

Huan X D, EI-Alawi Y, Penrose D M *et al*. Responsesof three grass species to creosote during phytoremediation[J]. Environmental Pollution, 2004, 130: 453-464.

Ingeborg T, Christiane L, Alok K S, Cyclopentenone Isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in p lants[J]. The plant J., 2003, 34(3): 363-368.

Jones D L, Peter R D. Role of root drived organic acids in the mobilization of nutr ients from the rhizosphere[J]. Plant Soil, 1995, 166: 247-257

Joseph L M, Tan T K, Wong S M *et al*. Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelial grow of Pseudocercospora species[J]. Canadian Journal of Botany, 1998, 76 (12): 2119-2124.

Juan C G G, Antonio H, Frank E *et al*. Dehydrozaluzanin C: a natural sesquiterpenoide, causes rapid plasma membrane leakage[J]. Phytochemistry, 1999, 52: 805-813.

Katanelson H. Liberation of amino-acids by plant roots in relation to dessicution[J]. Nature, 1954, 174: 110-1111.

Kihara T, Wada T, Suzuki Y *et al*. Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white lupin[J]. Plant Cell Phusiol, 2003, 44(9): 901-908.

Killham K. Soil Ecology[M]. Canhrge: Cambridge University Press, 1994.

Kim Y S, Kil B S. Biossay on susceptivity of selected species to phytotoxic substance from tomato plants[J]. Krean J. Bot., 1987, 30: 59-67.

Kitazawa H, Asao T, Ban T *et al*. Autotoxicity of root exudates from strawberry in hydroponic culture [J].

Journal of Horticultural Science&Biotechnology, 2005, 80(6): 677-680.

Klein K, Blum U. Inhibition of cucumber leaf expansion by ferulic acid in split -root experiments[J]. J. Chem. Ecol., 1990, 16(2): 455-463.

Kumari A, Kohli R K. Autotoxicity of ragweed parthenium (Parthenium hysterophorus)[J]. Weed Sci., 1987, 35(5): 629-632.

Larkin R P. Effect of successive watermelon plantings on Fusarium oxysporum and other microorganisms in soils suppressive and conductive to Fusariu m Wilt of water melon[J]. Phytopathology, 1993, 83: 1097-1104.

Lehman M E, Blum U, Gerig TM. Simultaneous effects of ferulic and *p-* coumaric acids on cucumber

Leaf expansion in split-root experiments[J]. J. Chem. Ecol., 1994, 20(7): 1773-1782.

Lehman M E, Blum U. Influence of pretreatment stress on inhibitory effects of ferulic acid, an allelopathic phenolic acid[J]. J. Chem. Ecol., 1999, 25(7): 1517-1529.

Lichtenthaler H K, Rohmer M, Schwender J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants[J]. Physiologia Plantarum, 1997, 101(3): 643-652.

Liljeroth E, Baath E, Mathlasson M. Root exudation and rhizosphere bacterial abundance of barely in relation to nitrogen fertilization and root growth [J]. Plant Soil, 1990, 127: 81-89.

Lipton, D S, Blandchar R W, Blevins D G. Citrate, malate and succinate concent ration in exudation from Psufficient and P-stressed Medicago sativa L. seedlings[J]. Plant Physiol., 1987, 85(2): 315-317.

Liu D L, Lovett J V. Biologically active secondary metabolites of barley.Ⅱ. Phytotoxicity of barley

Allelochemicals[J]. J. Chem. Ecol., 1993, 19(10): 2231-2244.

Lynch J M, Whipps J M. Substrate flow in the rhizosphere[J]. Plant and Soil, 1990, 129: 1-10.

Lyu S W, Bum U. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on net P, K, and water uptake by cucumber seedlings in a split root system[J]. J. Chem. Ecol., 1990, 16(8): 2429-2439.

Ma R X, Fen Y. Effect of allelopathic chemical on growth and denitrification of Bacillus subtitis under anaerobic condition[J]. Chem. Ecol., 1998, 24: 187-193.

Maneechote C, Krasaesinhu P. Allelopathic effects of some up land and wild rice genotypes in Thailand.

Paper in the First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future1 Cadiz, Spain, 1996.

Marschner P, Crowley D E, Higashi R M. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Plant Soil, 1997, 189:

11-20.

Martinei-toledo M V．Root exudates of zea mays and production of auxins. Gibberellins and cytokinins by Azotobacter chroococcum[J]. Plan t and Soil, 1988, 110: 149-155.

Matsuyama N. Time-course alteration of lipid peroxidation and the activities of supero-xide dismutase, catalase and peroxidase in blast-infected rice leaves[J]. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 1983, 49(2): 270-273.

Meyer S L F, Huettel R N. Application of a sex pheromone, pheromone analogs, and *vertillium lecanii*

For management of *Heterodera glycines*[J]. Journal of Nematology, 1996, 28 (1): 36-42.

Miller D A. Allelopathic effects of alfalfa[J]. Journal of Chemical Ecology, 1983, 9: 1059-1072. MithÖfer A. Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis[J]. Trends in Plant Science,

2002, 7(10): 440-444.

Miyamoto K, Ueda J, Yamada K *et al*. Inhibitory effect of lepidimoide on senescence in Avena leaf segments[J]. Journal of Plant Physiology, 1997, 150(1～2): 133-136.

Montalbini P, Buonaurio R. Effect of tobacco mosaic virus infection on leaves of soluble superoxide dismutase(SOD) in Nicotiana tabacum and Nicotiana glutinosa leaves[J]. Plant Sci., 1986, 47 (2): 135-143.

Muarray A H. Effect of simple phenolic compounds of heather (Calluna vulgaris) on rumen microbial activity in vitro[J]. J. Chem. Ecol., 1996, 22: 1493-1505.

Neal J L, Atkinson T G, Larson R I. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome[J]. Can. J. Microbiol.,1970, 16(3): 153- 157.

Nelson L S. Isolating potential allelochemicals from soybeanrr soil residues[D]. Iowa: Iowa State University, 1985.

Neumann G. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development on white lupin[J]. Planta, 1999, 208: 373-382.

Ofosu-budu K G, Fuita K. Excretion of ureide and other nit rogenous compounds by the root system of soybean at different growth stage[J]. Plant and Soil, 1987, 128(2): 135-142.

Pandey D K, Kauraw L P, Bhan V M. Inhibitory effect of parthenium(*Parthenium hysterophorus*

L.) resudue on growth of water hyacinth.Ⅰ. Effect of leaf resudue[J]. J Chem. Ecol., 1993, 19 (11): 2651-2662.

Pandey D K, Kauraw LP, Bhan V M. Inhibitory effect of parthenium(*Parthenium hysterophorus* L.) resudue on growth of water hyacinth.Ⅰ. Effect of leaf resudue [J]. J. Chem. Ecol., 1993, 19(11): 2651-2662.

Patel. D N, Patel B N. Evaluation of plant extracts and *Trichoderma harzianum* rifai against

*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Tobacco Research, 1999, 25(1): 4-8.

Pateron R P. Growth and specific nodule activity of soybean during application and recovery of leaf mousture stress[J]. Plant Physiol., 1997, 64: 551-556.

Penuelas J, Ribas-Carbo M, Giles L. Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase[J]. J. Chem. Ecol., 1996, 22(4): 801-805.

Perez P J. Root exudates of wild oats: Allelo pathic effect on spring wheat[J]. Phytochemistry, 1991, 30(7): 2199-2202.

Perez P J. Root exudates of wild oats: Allelopathic effect on spring Politycak B.1997. Free and glucosylated phenol-beta-glucosyltranserase activity and membrane Pennability in cucumber roots affected by derivatives of cinnamon and benzoic acid[J]. Acta Physiologies Plantarum, 1991, 19(3): 311-317.

Phillips D A, Fox T C, King M D *et al*. Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots[J]. Plant Physiol, 2004, 136: 2887-2894.

Politycka B, Kubis J. Changes in free polyamine level and diand polyamine oxidase activity in cucumber roots under allelochemical stress conditions[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2000, 22(1): 11-16.

Politycka B. Free and glucosylated phenolics, phenol-beta-glu-cosyltransferase activity and membrane permability in cucumber roots affected by derivatives of cinnamic and benzoic acids[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 1997, 19(3): 311-317.

Politycka B. Peroxidase activity and lipid peroxidation in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 1996, 18(4): 365-370.

Politycka B. Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase, phenol-beta-glucosyltransferase and beta-glucosidase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 1998, 20(4): 405-410.

Prasad G, Mchrotra R S. Rcsistance of *Phytophthora nicotianae* var. *parasiticain* artificially infested soil at different inoculum levels and in dead host tissues[J]. India J. of Mycol. and Pathol, 1985, 15(3): 279-282.

Prikry L Z. Root exudates of plant[J]. Plant Soil, 1980, 57: 69-83.

Prosser J I. Molecular and functional diversity in soil microorganisms[J]. Plant Soil, 2002, 244(1 -2): 9-17.

Qasen J R, Foy C L. Weed allelopathy, its ceologicla impacts and future prospects: A review[J]. Journal

Of Crop Production, 2001, 4(2): 43-1l9.

Rice E L. Allelopathy[M]. 2nd ed. New York: Academic Press Inc., 1984. 1-5, 309-315.

Rimando A M, Olofsdotter M, Duke S O. Searching for rice allelochemicals. An example of bioassays-guided isolation[J]. Agric. J., 2001(93):16-20.

Romagni J G, Allen S N, Dayan F E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant[J]. J. Chem Ecol., 2000, 26(1): 303-314.

Rovira A D. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect[J]. Plant and soil, 1956, 36(2): 178-194.

Rovira, A D *et al*. Plant root exudates[J]. Bot. Rev., 1969, 35-57．

Saeki Y T, Yamakawa M, Ikeda J *et al*. Effects of root exudates of Rj2Rj3-and Rj4-genotype soybean on growth and chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum*[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1996, 42(2):413-417.

Samuels A L, Fernando M, Glass A D M. Immunofluorescent localization of plasma membrane

H+-ATPase in barley roots and effects of K nutrition[J]. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1509-1514.

Sandnes A, Toril D E, Gro W. Organic acids in root exudates and soil solution of Norway spruce and silver birch[J]. Soil Biol Biochem, 2005, 37: 259-269.

Sasser J N, Lucas G B. Powers H. R. The relationship of root-knot nematodes to black shank resistance in tobacco[J]. Phytopatho., 1990, (2): 47-48.

Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutase[J]. Plant Physiology, 1993, 101(1): 7-12.

Seheffknecht S, Mammerler R, Steinkellner S, Vierheilig H. Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. Iycopersici than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. Mycorrhiza, 2006, 16: 365-370.

Shen J, Li H, Neumann G. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in Lupinus albus as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system[J]. Plant Sci, 2005, 168(3): 837 -845.

Shen J, Zhang F, Huang Q *et al*. Determination of organic acids in root exudates by high performance liquid chromatography: Ⅰ. Development and assessment of chromatographic conditions [J]. Pedosphere, 1998, 8(2): 97-104.

Sood S G. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants[J]. Fems Microbiology Ecology, 2003, 45: 219- 227.

Sreeramulu K R, Onkarappa T, Swamy H N. Biocontrol of damping-off and black shank disease in tobacco nursey[J]. Tobacco Research, 1998, 24(1): 1-4.

Srniley R W, Cook R J. Relationshipe between take-off of wheat an d rhizsophere pH in soils fertliized

With arnmonium vs. nitrate nitrogen[J]. Phytopothol, 1973, 63: 882-890

Stamps D J, Waterhouse G M, Newhook F J. Revised tabular key to the species of Phytophthora[J].

Mycological Papers, 1990, (162): 1-28.

Strom L, Owen A G, Godbold D L *et al*. Organic acid behavior in a calcareous soil: sorption reaction and biodegradation rates[J]. Soil Biol. Biochem., 2001, 33: 2125-2133.

Takahashi A, Kawasaki T, Henmi K, *et al*. Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense[J]. The Plant Journal for Cell and Molecular Biology, 1999, 17(5): 535-545.

Tang C S, Young C C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of Bigaltalimpograss(Hemart hriaaltissima)[J]. Plant Physiol., 1982, 69(1):155-160.

Tsao R, Eto M. Light-activated plant growth inhibitory activity of cisdehydromat ricaria ester, rose bengal and fluren-9-one on lettuce (L actuca sativa L.)[J]. Chemosphere, 1996, 32(7): 1307-1317.

Tsutomu O. Oxidation of phenolic acid derivatives by soil and its relevance to allelopathic activity[J]. J Environ Qual, 2001, (30): 1631-1635.

Tyler G., Strom L. Differing organic acid exudation pat tern explains calcifuge and acidfuge behavior of plants[J]. Annals of Botany, 1995, 75: 75-78.

Vancura, V. Root exudates of plants[J]. Plant and Soil, 1964,21: 231-248．

Wojcik-wojtkowiak D, Politycka B, Schneider H *et a1*. Phenolic substances as allelopathic agents arising

During the degradation of rye(*Secale ceteale*) tissues[J]．Plant and Soil, 1990, 124(1): 143-l47.

Wu H S, Raza W, Liu D Y *et al*. Allelopathic impact of artificially applied coumarin on Fusarium oxysporum f. sp. niveum[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(8): 1297-1304.

Wu H W, Haig T, Pratley J *et al* Allelochemicals in wheat(*Triticum aestivum* L.):production and exudation of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one[J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 27(8): 1691-1700.

Wyman-Simpson C L, Waller G R, Jurzysta M *et al*. Biological activity and chemical isolation of root saponins of six cultivars of alfalfa(*Medicago sativa* L.)[J]. Plant Soil, 1991, 135: 83-94.

Yamada K, Anai T, Hasegawa K. Lepidimoide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds[J]. Phytochemistry, 1995, 39(5): 1031-1032.

Yamada K, Anai T, Yokotani-tomita K *et al*. Physiological function of lepidimoide[J]. Plant cell physiology, 1996, 37: 150

Yang C H, Crowley D E, Menge J A. 16SrDNA finger printing of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and phytophora infected avocadotoots[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(2): 129-136.

Yang Z W, Sivaguru M, Horst W J. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citr ic acid from roots of soybean (Glycine max)[J]. Physiologia Plantarum, 2000, 110: 72-77.

Ye S F, Yu J Q, Peng Y H, Zheng J H, Zou L Y. Incidence of Fusarium wilt in Cucumis sativus Lis promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates[J]. Plant and Soil, 2004, 263:143-150.

Yoruk R, Balabanm O, Marshalm R *et al*. The inhibitory effect of oxalic acid on browning of banana slices[C]. California: Annual Meeting and Food Expo, 2002.

Yoshitomi K J, Shann J R. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on 14C-pyrene mineralization[J]. Soil Biol Biochem, 2001, 33: 1769-1776.

Yu J Q, Yoshihisa M. Extraction and identification of phytotoxic substances accumulated in nutrient solution for hydroponic culture of tomato[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1993, 39 (4): 691-700.

Yu J Q, Matsui Y. Phytotoxic substances in root exudates of cucumber(Cucumis sativus L.)[J]. J. Chem.

Ecol., 1994, 20(1): 21-32.

Yu J Q, Mstsui Y. Effect of root exudates of cucumber(Cucum is sativus) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings[J]. Journal of ChemicalEcology, 1997, 23(3): 817-827.

Yu J Q, Shou S Y, Qian Y R *et al*. Autotoxic potential in cucurbit crops[J]. Plant Soil, 2000, 223: 147-151.

Zhang F S, Marschner H, Romheld V. Role of root apoplasm for iron acquisition by wheat plants[J]. J. Plant Physiol., 1991, 97(4): 1302-1305.

Zheng X Y, Sinclair J B. Chemotactic response of Bacillus megaterium strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996, 48(1): 21 -35.

致 谢

六年时光，转瞬即逝！值此论文完成之际，回首往事，感慨良多。。。。。。首先要衷心感谢恩师杨焕文教授，六年来杨老师对我学习和生活给予的深切关怀与帮助，学生铭记在心。从论文选题、 实验设计、试验开展和论文撰写都倾注了杨老师大量心血，在实验开展过程中悉心教授了学生分析问题和解决问题的思路及方法，让学生受益匪浅。同时，在生活上得到了杨老师亲人般的关心和爱护，让我时刻感受到温暖和幸福，另外，杨老师的高尚人品及处事之道也值得学生一辈子去学习和感悟！谢谢您！

感谢赵正雄教授和李佛琳教授在论文立题和试验开展过程中给予的宝贵意见和无私帮助，感谢丁金玲高级实验师在实验分析过程中给予学生的莫大帮助，同时也要感谢烟草学院的各位老师在实验过程中的大力支持，谢谢您们！

感谢郭华春教授、谭学林教授和陈丽娟教授对学生论文开题给予的中肯建议和指导，感谢郑毅教授对论文提出的宝贵意见，感谢杨清辉教授和李富生教授一直以来对学生学习和生活上无私的关心和帮助，谢谢您们！感谢在农大十年求学生涯中，所有帮助和关心过我的老师们！感谢云南省出入境检验检疫局检疫技术中心丁元明老师，旦有明老师，吕平老师在样品检测方面给予的便利条件及悉心指导。

感谢易建华和吴涛师兄在学习和生活中给予我真诚的关心和帮助，感谢易建华师兄在实验分析上给予的无私帮助及便利，谢谢你们！同时还要感谢同门师兄弟李觅、杨懿德、王铎、林江、 王默浪、牛小强、杨坤、王博、肖华贵、蔡永占、杨顺强等，感谢你们在学习和生活上的帮助和 关心！感谢硕博阶段的同窗好友，这份珍贵友谊我会铭记在心！在此还要谢谢一直陪在我身边的 知己好友，谢谢你们的理解和支持。

感谢我的父母和哥嫂多年来对我学业的理解和支持，让我在求学过程中没有后顾之忧，感谢你们在我最困难的时候给予的最无私帮助；还要特别感谢我的爱人朱媛一直默默陪在我身边并给 予我最强大的支持，才使得我能顺利完成学业。

一直以来给予我帮助的人实在太多太多，无法一一言表，谨以此文献给所有关心过、帮助过我的师长、同学、朋友和亲人！谢谢你们！

**王戈**

二零一二年五月于昆明

# 作者简历

**个人情况**

姓名：**王戈**性别：**男**

出生年月：**1982年9月**籍贯：**云南曲靖**

最后学历（学位）：**研究生（博士学位）**毕业院校：**云南农业大学**

**学习经历**

2002-2006云南农业大学农学与生物技术学院农学专业（本科）

2006-2012云南农业大学农学与生物技术学院作物遗传育种（硕博）

发表的学术论文及著作

[1] 王戈, 杨焕文\*, 赵正雄, 李佛琳, 易建华. 不同抗性烤烟品种根际微生物数量及多样性差异研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(2): 451-458.

[2] 王戈, 杨焕文\*, 赵正雄, 李佛琳, 易建华. 不同烤烟品种防御酶活性对黑胫病菌响应差异[J]. 云南农业大学学报, 2012, 27(3): 321-326.