

硝态氮抑制尖孢镰刀菌侵染促进黄瓜生长的内在生理机制

王 敏, 周 犇, 曾吉兴, 王瑞瑞, 朱林星, 沈其荣, 郭世伟*

(南京农业大学资源与环境科学学院/江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要: 【目的】连作障碍严重影响设施农业的发展。不同形态氮素可影响黄瓜土传枯萎病的发生, 然而其内在生理机制尚不明确。通过氮素营养调控植物-微生物互作关系, 为防控土传病害的发生提供理论依据。【方法】以黄瓜品种津春 2 号和尖孢镰刀菌黄瓜专化型菌(FOC)为试材, 进行温室营养液培养试验。设营养液中添加铵态氮不接菌(A)、硝态氮不接菌(N)、铵态氮接菌(AI)和硝态氮接菌(NI)共 4 个处理。尖孢镰刀菌侵染 8 天后进行植株样品的采集及测定, 包括株高、根长、生物量、病情指数、叶绿素含量、光合特性、叶片温度, 并进行了叶肉细胞超微结构的观察, 测定了植物全氮、可溶性蛋白及可溶性糖含量。【结果】与铵态氮相比, 硝态氮营养显著抑制了黄瓜植株枯萎病的发病率, 并显著促进了植株的生长以及植株生物量的增加。未接菌条件下, 供应铵态氮的植株光合速率、气孔导度、蒸腾速率、羧化效率及表观量子效率均显著高于供应硝态氮的植株; 尖孢镰刀菌的侵染导致供应铵态氮的植株叶绿体结构受损, 显著降低了其光合速率、气孔导度、蒸腾速率、细胞间隙 CO₂ 浓度、羧化效率及表观量子效率, 而病原菌侵染对供应硝态氮的植株叶片光合特性无显著影响。未接菌条件下, 供应铵态氮的植株叶片温度及水分利用效率显著低于供应硝态氮的植株; 尖孢镰刀菌侵染后, 供应铵态氮的植株叶片温度及水分利用率显著增加, 而病原菌侵染对供应硝态氮的植株无显著影响。叶片温度与蒸腾速率呈显著负相关关系, 而与水分利用率呈显著正相关关系。供应铵态氮的植株根系全氮、可溶性蛋白及可溶性糖含量均显著高于供应硝态氮的植株, 从而促进病原菌对供应铵态氮的植株的侵染。尖孢镰刀菌侵染后, 供应铵态氮的植株根系可溶性蛋白含量显著增加, 可溶性糖含量降低, 而尖孢镰刀菌侵染对供应硝态氮的植株可溶性蛋白及可溶性糖含量无显著影响。【结论】硝态氮能够有效地抑制黄瓜枯萎病的发生, 维持叶绿体结构的完整性, 保持黄瓜植株正常的光合作用及生长, 并减少碳水化合物向根系的运输, 从而抑制病原菌的侵染及病害的发生。在黄瓜的设施栽培中, 可适当增加硝态氮肥的施用而减少铵态氮肥的投入, 以抑制土传枯萎病发生。

关键词: 氮素形态; 黄瓜; 枯萎病; 光合特性; 叶片温度

Inherent physiological mechanism of nitrate nitrogen in suppressing *Fusarium oxysporum* infection and increasing growth of cucumber plants

WANG Min, ZHOU Ben, ZENG Ji-xing, WANG Rui-rui, ZHU Lin-xing, SHEN Qi-rong, GUO Shi-wei*

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University/
Jiangsu Provincial Key Lab for Solid Organic Waste Utilization, Nanjing 210095, China)

Abstract: 【Objectives】Continuous cropping obstacles seriously impact the development of facility agriculture. Nitrogen forms affect the occurrence of *Fusarium wilt* of cucumber, the inherent physiological mechanism is studied in the paper. 【Methods】A hydroponic experiment was conducted using cucumber cultivar of Jinchun 2 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (FOC) as materials. Four nutrient solution treatments included ammonium-N supply and without or with FOC inoculation in the grown plants, nitrate-N supply and without or with FOC inoculation in the grown plants. The plant height, root length, biomass, disease index, chlorophyll content, photosynthetic characteristics, leaf temperature were measured at 8 days after inoculation. The ultrastructure of mesophyll cells were observed, and plant total N, soluble protein and soluble sugar content were

收稿日期: 2020-05-05 接受日期: 2020-07-09

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0200305); 中央高校基本科研业务费专项资金(KYGD202007)。

联系方式: 王敏 E-mail: minwang@njau.edu.cn; * 通信作者 郭世伟 E-mail: sguo@njau.edu.cn

analyzed. 【 **Results** 】 The nitrate-N nutrition significantly suppressed the disease index of cucumber Fusarium wilt as compared to ammonium-N nutrition. Plant growth and biomass production were markedly increased in nitrate nutrition. Without FOC inoculation, the plants supplied with ammonium-N had higher net photosynthesis rate, stomatal conductance, transpiration rate, carboxylation efficiency and apparent quantum yield as compared to those in plants supplied with nitrate-N. With ammonium-N nutrition, the infection of FOC resulted in damage to the chloroplast structure, which significantly reduced the photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration rate, intercellular CO₂ concentration, carboxylation efficiency and apparent quantum efficiency. However, the photosynthetic characteristics of nitrate supplied plants were not affected by FOC infection. Under non-inoculation of FOC, the leaf temperature and water use efficiency (WUE) of ammonium nutrition plants were significantly lower than those of nitrate nutrition plants. FOC infections markedly increased the leaf temperature and WUE of ammonium nutrition plants, while had no effects on nitrate nutrition plants. Leaf temperature was significantly and negatively correlated with transpiration rate, and positively correlated with WUE. The contents of total N, soluble protein and soluble sugar in the root of ammonium supplied plants were significantly higher than those of nitrate supplied plants, thus inducing the pathogen infection in ammonium nutrition plants. After FOC infection, the soluble protein content in the root of ammonium supplied plants was significantly increased, while the soluble sugar content was decreased. FOC infection had no significant effect on the soluble protein and soluble sugar content of nitrate supplied plants. 【 **Conclusions** 】 Nitrate nutrition can effectively suppress the disease index of cucumber Fusarium wilt, maintain the integrity of the chloroplast structure, keep the normal photosynthesis and growth of cucumber plants, and reduce the transport of carbohydrates to the root, thereby inhibit the infection of pathogens and the occurrence of diseases. In the facility cultivation of cucumber, we should appropriately increase the application of nitrate fertilizer and decreased the input of ammonium fertilizer to suppress the occurrence of soil-borne wilt.

Key words: nitrogen forms; cucumber; Fusarium wilt; photosynthesis; leaf temperature

作物连续种植会引起土壤板结, 土传病害不断发生, 造成作物的减产。黄瓜是设施栽培的主要蔬菜作物, 枯萎病是黄瓜生长中的主要连作障碍, 严重影响了黄瓜的产量和品质, 造成经济上的极大损失。黄瓜枯萎病又称黄瓜萎蔫病、蔓割病、死秧病, 是一种世界性的土传病害, 其病原菌为半知菌亚门镰孢属的尖孢镰刀菌黄瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, FOC)^[1], 病原菌由土壤传染, 从植株根或根基部侵入, 在维管束内寄生的导管型枯萎病。

氮素是植物生长所必需的重要营养元素之一, 是植物体内多种重要化合物的组分, 能够影响植株生长发育及生理代谢活动。氮素营养与植物病害密切相关, 其不仅为植物和微生物的生长发育提供营养, 还能影响植物-微生物互作关系的建立, 从而影响病害的发生^[2-4]。植物氮素供应可增加细胞中含氮代谢物的含量, 使病原菌获取更多营养; 一般而言, 高浓度的氮素能提高寄主植物对活体营养和半活体营养病原菌的敏感性, 而降低对死体营养病原菌的敏感性^[5-7]; 其主要原因是死体营养型病原菌可

通过杀死植物以获得更广谱的氮源, 而活体营养型病原菌只能利用寄主质外体中有限的氮源^[8]。然而, Veresoglou 等^[9]通过 Meta 分析表明, 氮肥投入不仅能增加活体及半活体营养型真菌病害的发生, 同时也能增加死体营养型真菌病害的发生。由此可见, 受植物种类、病原菌类型、氮素形态、施肥时期及施肥量等因素的影响, 氮素在病害中发挥着不同的作用。

氮素营养不仅能够改变植物形态结构及生理生化代谢过程, 还能影响病原菌养分吸收及其生长, 进而影响病原菌的侵染及病害的发生^[6, 10]。铵态氮 (NH₄⁺) 与硝态氮 (NO₃⁻) 是植株吸收和利用的主要无机氮素形态, 不同形态氮素营养也能影响病害的发生。研究表明, 硝态氮能够有效防控番茄和豌豆根腐病、甜菜冠腐病等的发生; 而铵态氮则能防控烟草和草莓黑根腐病、水稻稻瘟病及小麦全蚀病等^[6]。病原菌侵染过程中, 植物通过病原菌识别及信号传导过程演变出各种复杂的防御反应去对抗病原菌。不同形态氮素可影响根际环境^[6]、土壤微生物区系特征^[7]、植物物质代谢^[3, 11]、根系分泌物产生^[12]及植物抗

性响应^[4,13-14],进而影响病害的发生。

光合作用是植物最重要的基础生命活动之一,可为植物生长发育提供所需的物质和能量。植物光合产物可为微生物的生长提供养分,从而影响植物-微生物互作关系。病原菌侵染可破坏植物叶片结构,降低叶绿素含量及光化学效率,诱导气孔关闭,抑制光合速率^[15-16]。虽然大量研究探讨了氮素营养对病害发生的影响,然而其对光合特性的影响及其影响枯萎病发生的机制研究尚不系统。本研究拟采用营养液培养的方法,比较尖孢镰刀菌侵染后不同形态氮素营养下的黄瓜植株生长及发病率的差异,探究不同形态氮素营养对黄瓜植株光合特性及同化物产生的影响及其调控过程,旨在揭示不同形态氮素营养影响黄瓜土传枯萎病的生理机制,以期为土传枯萎病的防控以及黄瓜设施栽培与水肥管理提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄瓜品种选用津春2号,黄瓜枯萎病病原菌选用尖孢镰刀菌黄瓜专化型菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, FOC),来自于南京农业大学植物营养系菌种保藏室。

1.2 试验设计

黄瓜种子用温水浸泡2 h后,播种于含有石英砂的育苗盘中,待第一片真叶展开时移栽到500 mL的塑料杯内,每杯种植1株。先用1/4浓度的Hoagland营养液缓苗3天,之后再移入1/2浓度的Hoagland营养液中,培养3天后再移入全营养液中培养。待第3片真叶完全展开时进行不同形态氮素营养处理,供氮形态分别为铵态氮 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 和硝态氮 $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$,供氮浓度为5 mmol/L。此外,在营养液中添加适量的 CaCO_3 粉末以维持营养液的pH在 6.80 ± 0.20 ,并补充营养液中的Ca。营养液每3天更换一次,且营养液24 h维持通气。待黄瓜植株长到3~4叶期时进行尖孢镰刀菌接菌处理,接菌时,将黄瓜根系浸在浓度为 10^6 个孢子/mL的悬液中2 h,其后再将黄瓜植株转移到上述的塑料杯中进行培养。试验分为:铵态氮不接菌(A)、硝态氮不接菌(N)、铵态氮接菌(AI)、硝态氮接菌(NI),共4个处理,每个处理重复15次,试验重复3次。

1.3 测定项目

尖孢镰刀菌侵染8天后进行样品的采集及测

定,每重复选取长势一致的10株先测定活体指标(株高、根长、病情指数、叶绿素含量、光合特性、叶片温度);其后采集植株样品,每个重复5株鲜样用于叶肉细胞超微结构的观察及可溶性蛋白含量的测定,另选取5株烘干后用于测定生物量、全氮及可溶性糖含量。

1.3.1 枯萎病病情指数调查 病原菌侵染8天后进行病情指数调查,每个重复调查10株。根据病害的发展将发病程度分为0~4个级别:0级,无发病症状;1级,<25%的叶片出现萎蔫症状;2级,25%~50%的叶片出现萎蔫症状;3级,50%~75%的叶片出现萎蔫症状;4级,75%~100%的叶片出现萎蔫症状。

病情指数通过以下公式计算:

病情指数 = $100 \times \frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{各级代表值})}{(\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值})}$ 。

1.3.2 生物量及叶绿素含量测定 植株分叶、茎和根三部分进行采集,去离子水清洗干净后,立即于105℃烘箱中杀青30 min,再降温至70℃烘至恒重,测定其干重。

叶绿素含量用SPAD-502型叶绿素仪进行测定,取新完全展开叶,每片叶测定6次求其平均数,以SPAD值表示。

1.3.3 光合参数的测定 叶片的净光合速率(P_n)、蒸腾速率(E)、气孔导度(G_s)和胞间二氧化碳浓度(C_i)均采用Li-Cor 6400型光合作用测定仪进行测定。取新完全展开叶片,测定时间为9:00—12:00,叶室内光照强度为 $1000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, CO_2 浓度为 $400 \sim 420 \mu\text{mol}/\text{mol}$,叶片温度为 $25^\circ\text{C} \sim 28^\circ\text{C}$,相对湿度维持在45%左右。将叶片夹入叶室后,待数据稳定时(约10 min)记录数据。水分利用率(WUE)通过叶片净光合速率与蒸腾速率的比值计算。

光响应曲线测定:叶室内光强梯度设定为2000、1500、1200、1000、800、600、400、200、150、100、50和 $0 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,以光合速率为纵坐标,光强为横坐标绘曲线,曲线的初始斜率($\text{PPFD} \leq 200$ 时)为量子产率。

CO_2 响应曲线测定:叶室内 CO_2 采用 CO_2 注入系统供应,首先将叶室内 CO_2 浓度调至 $400 \mu\text{mol}/\text{mol}$,10 min后将叶室内 CO_2 浓度设定为以下梯度:1500、1200、1000、800、600、400、200、150、100和 $50 \mu\text{mol}/\text{mol}$ 。以光合速率为纵坐标,细胞间隙内 CO_2 浓度为横坐标绘曲线,曲线的初始斜率($C_i < 200$ 时)为羧化效率。

1.3.4 叶肉细胞超微结构的观察 选取新完全展开叶, 用双面刀将叶片切成 1~2 mm² 的片段, 用 2.5% 戊二醛 (溶解在 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液中, pH 为 7.4) 在 4℃ 下固定 6 h, 同时抽气直到切块下沉为止。用透射电镜观察前, 先用 2% 四氧化锇进行再固定, 再用各级丙酮脱水, Epon812 树脂包埋样品, Tome-XL 超薄切片, 经 2% 醋酸铀染色后, 于 H-7650 型透射电镜下观察。

1.3.5 叶片温度测定 叶片温度通过红外热像仪 (SC 620, FLIR Systems, Inc., USA) 进行测定, 红外热像仪的参数如下: 测量红外波长范围为 7.5~13 μm; 空间分辨率为 0.65 mrad; 探测器为非制冷 640 × 480 像素红外探测器; 视场角/最小聚焦距离为 24° × 18°/0.3 m; 热灵敏度为 0.065℃ (环境温度为 30℃ 时)。红外照片通过 ThermaCAM Researcher Professional 2.9 (FLIR Systems) 软件分析后, 可获得叶片的平均温度。

1.3.6 植株全氮、可溶性蛋白及可溶性糖含量的测定 称取烘干植物组织 0.05 g 于消煮管中, 采用 H₂SO₄-H₂O₂ 方法于 260℃~270℃ 消化, 并用流动分析仪 (BRAN + LuEBBE) 测定消化液中的氮素含量。

植株可溶性蛋白含量采用考马斯亮兰 G-250 染色法测定^[17]。剪取新鲜植物组织 0.5 g 左右, 加 5 mL 蒸馏水冰浴研磨成匀浆, 离心。将上清液酌情稀释后, 取 1 mL 稀释液, 加入 5 mL 考马斯亮兰 G-250 溶液, 充分混匀, 放置 2 min 后于 595 nm 处比色, 测定其吸光值。

植株可溶性糖含量采用蒽酮法进行测定^[17]。取烘干植物组织 0.03 g, 加 5~10 mL 蒸馏水后沸水浴 30 min (提取 2 次), 冷却后过滤并定容至 20 mL。将上清液酌情稀释后, 取 2 mL 稀释液, 加入 0.5 mL 的

蒽酮乙酸乙酯试剂和 5 mL 浓硫酸, 充分混匀后立即沸水浴 1 min, 冷却至室温后于 630 nm 处比色, 测定其吸光值。

1.4 数据统计

数据运用 IBM SPSS 20.0 和 Microsoft Excel 2016 进行统计分析, 采用最小显著差异法 (least significant difference, LSD) 进行多重比较 ($P < 0.05$ 为显著)。

2 结果与分析

2.1 不同形态氮素及尖孢镰刀菌侵染对黄瓜植株生长及枯萎病发生的影响

在不接菌情况下, 供应硝态氮的植株株高、根长以及叶、茎、根的干重均显著高于供应铵态氮的植株 (表 1); 尖孢镰刀菌侵染显著降低了供应铵态氮的植株的生长, 而对供应硝态氮的植株无显著影响。在不接菌条件下, 供应铵态氮的植株 SPAD 值显著高于供应硝态氮的植株; 尖孢镰刀菌侵染后, 供应铵态氮的植株 SPAD 值显著降低, 而供应硝态氮的植株无明显变化。尖孢镰刀菌侵染黄瓜植株 8 天后, 供应铵态氮的植株病情指数达到 78.3, 而此时供应硝态氮的植株仍未表现出发病症状。

2.2 不同形态氮素及尖孢镰刀菌侵染对黄瓜植株光合特性的影响

在不接菌条件下, 供应铵态氮的植株净光合速率、气孔导度、蒸腾速率及羧化效率均显著高于供应硝态氮的植株, 而细胞间隙 CO₂ 浓度和表观量子效率则与供应硝态氮的植株无显著差异 (表 2)。在供应铵态氮的植株中, 尖孢镰刀菌侵染使其净光合速率、气孔导度、细胞间隙 CO₂ 浓度、蒸腾速率、羧化效率及表观量子效率显著降低; 而在供应硝态氮

表 1 不同处理黄瓜植株生长指标及病情指数
Table 1 Cucumber growth indices and disease index under different treatments

处理 Treatment	株高 (cm) Plant height	根长 (cm) Root length	叶干重 (g) Leaf dry weight	茎干重 (g) Stem dry weight	根干重 (g) Root dry weight	叶绿素含量 SPAD value	病情指数 Disease index
A	59.25 ± 4.35 b	26.75 ± 2.22 b	1.35 ± 0.13 b	0.69 ± 0.10 b	0.21 ± 0.02 b	45.75 ± 2.31 a	0
N	86.00 ± 3.16 a	44.25 ± 4.92 a	1.89 ± 0.26 a	1.04 ± 0.08 a	0.33 ± 0.09 a	37.33 ± 0.89 b	0
AI	49.75 ± 4.03 c	18.50 ± 2.08 c	0.86 ± 0.15 c	0.51 ± 0.06 c	0.13 ± 0.02 c	34.28 ± 1.76 c	78.3 ± 10.2
NI	81.00 ± 4.32 a	39.50 ± 6.24 a	1.68 ± 0.10 a	1.00 ± 0.06 a	0.29 ± 0.02 a	37.25 ± 1.10 b	0

注 (Note): 表中数据为平均值±标准差 Data in the table is mean ± SD; A—铵态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with ammonium-N; N—硝态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with nitrate-N; AI—FOC inoculation and supplied with ammonium-N; NI—硝态氮接菌 FOC inoculation and supplied with nitrate-N; 同列数据后不同字母表示处理间在 5% 水平差异显著 Values followed by different letters in a column mean significant difference among treatments at the 5% level.

表 2 不同处理黄瓜植株的光合特性

Table 2 Photosynthetic parameters of cucumber plants under different treatments

处理 Treatment	净光合速率 P_n [$\text{CO}_2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	气孔导度 G_s [$\text{H}_2\text{O mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	胞间 CO_2 浓度 C_i ($\text{CO}_2 \mu\text{mol}/\text{mol}$)	蒸腾速率 E [$\text{H}_2\text{O mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	羧化效率 CE	表观量子效率 α
A	17.26 ± 1.48 a	0.70 ± 0.14 a	341 ± 15 a	7.91 ± 0.70 a	0.061 ± 0.004 a	0.044 ± 0.004 a
N	14.79 ± 1.44 b	0.42 ± 0.06 b	325 ± 22 ab	6.13 ± 0.56 b	0.051 ± 0.004 b	0.047 ± 0.004 a
AI	10.47 ± 3.16 c	0.13 ± 0.06 d	254 ± 31 c	2.74 ± 1.01 d	0.037 ± 0.002 c	0.025 ± 0.005 b
NI	12.83 ± 2.22 b	0.27 ± 0.09 c	301 ± 26 b	4.52 ± 0.95 c	0.053 ± 0.006 b	0.044 ± 0.003 a

注 (Note): CE—Carboxylation efficiency 表中数据为 Mean $\pm$ SD Data in the table is mean $\pm$ SD; A—铵态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with ammonium-N; N—硝态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with nitrate-N; AI—铵态氮接菌 FOC inoculation and supplied with ammonium-N; NI—硝态氮接菌 FOC inoculation and supplied with nitrate-N; 同列数据后不同字母表示处理间在 5% 水平差异显著 Values followed by different letters in a column mean significant difference among treatments at the 5% level.

的植株中, 尖孢镰刀菌侵染仅显著降低了气孔导度和蒸腾速率, 而对其它光合参数无显著影响。

在相同光照强度下, A、N 及 NI 处理的净光合速率无显著差异, 却显著高于 AI 处理 (图 1)。在相同胞间 CO_2 浓度下, A 处理的净光合速率显著高于 N 处理; 尖孢镰刀菌侵染后 AI 处理的净光合速率显著降低, 而 NI 处理无显著变化 (图 1)。

在不接菌条件下, 供应铵态氮的植株叶绿体呈梭型, 且富含淀粉粒 (图 2); 而供应硝态氮的植株叶绿体呈椭圆型, 含淀粉粒较少。尖孢镰刀菌侵染后, 供应铵态氮的植株叶绿体体积变小, 叶绿体松散变形, 积累较多淀粉粒 (图 2); 而尖孢镰刀菌的侵染对供应硝态氮的植株叶绿体结构无显著影响。

2.3 不同形态氮素及尖孢镰刀菌侵染对黄瓜植株叶片温度的影响

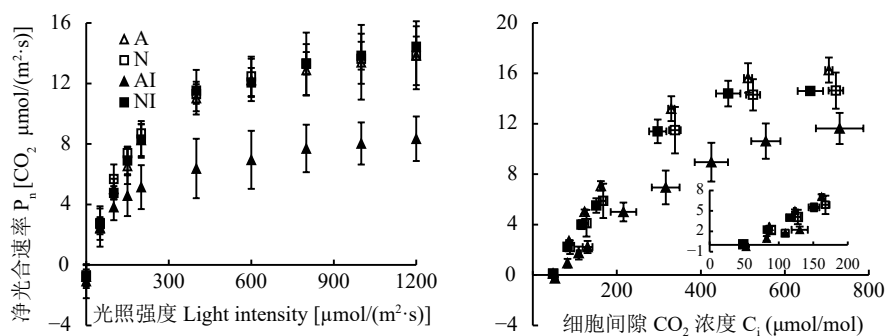
在不接菌条件下, 供应铵态氮及硝态氮的植株叶片温度均维持在稳定水平, 且供应铵态氮的植株叶片温度显著低于供应硝态氮的植株 (图 3)。尖孢镰

刀菌侵染后, 供应铵态氮的植株叶片温度在侵染后第 5 天开始呈现上升趋势, 且随着接菌后时间的延长, 温度逐渐上升; 在接菌后第 8 天, 叶片温度比不接菌的铵态氮处理植株大约高 4°C 。然而, 尖孢镰刀菌侵染却对供应硝态氮的植株叶片温度无明显影响, 仅在接种后第 8 天叶片温度才有小幅度上升。

尖孢镰刀菌侵染后, 供应硝态氮的植株蒸腾速率显著高于供应铵态氮的植株, 而叶片温度及水分利用率显著低于供应铵态氮的植株 (图 4); 且叶片温度与蒸腾速率呈显著负相关关系, 而叶片温度与水分利用率呈显著正相关关系。

2.4 不同形态氮素及尖孢镰刀菌侵染对黄瓜植株全氮、可溶性蛋白及可溶性糖含量的影响

表 3 表明, 在不接菌条件下, 供应铵态氮的植株根系中氮含量显著高于供应硝态氮的植株, 而茎和叶的氮含量与硝态氮植株无显著差异。在供应铵态氮的植株中, 尖孢镰刀菌的侵染使茎中氮含量显著升高, 而对根和叶的氮含量无显著影响; 在供应

图 1 不同处理黄瓜植株的光响应曲线和 CO_2 响应曲线Fig. 1 Light response curves and CO_2 response curves of cucumber seedlings under different treatments

[注 (Note): A—铵态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with ammonium-N; N—硝态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with nitrate-N; AI—铵态氮接菌 FOC inoculation and supplied with ammonium-N; NI—硝态氮接菌 FOC inoculation and supplied with nitrate-N.]

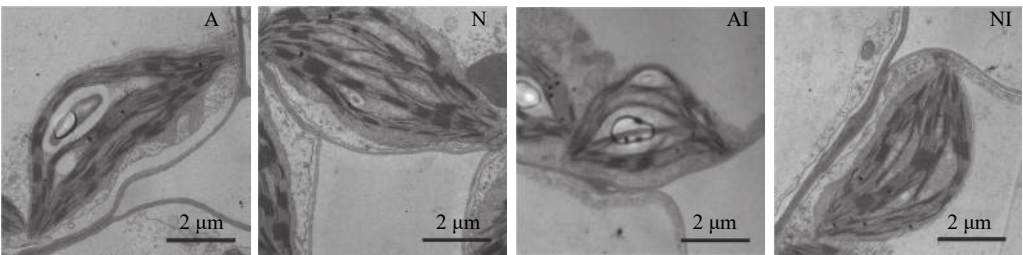


图 2 不同处理黄瓜植株叶片叶绿体超微结构

Fig. 2 Chloroplast ultrastructures of leaves in cucumber seedlings under different treatments

[注 (Note): A—铵态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with ammonium-N; N—硝态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with nitrate-N; AI—铵态氮接菌 FOC inoculation and supplied with ammonium-N; NI—硝态氮接菌 FOC inoculation and supplied with nitrate-N.]

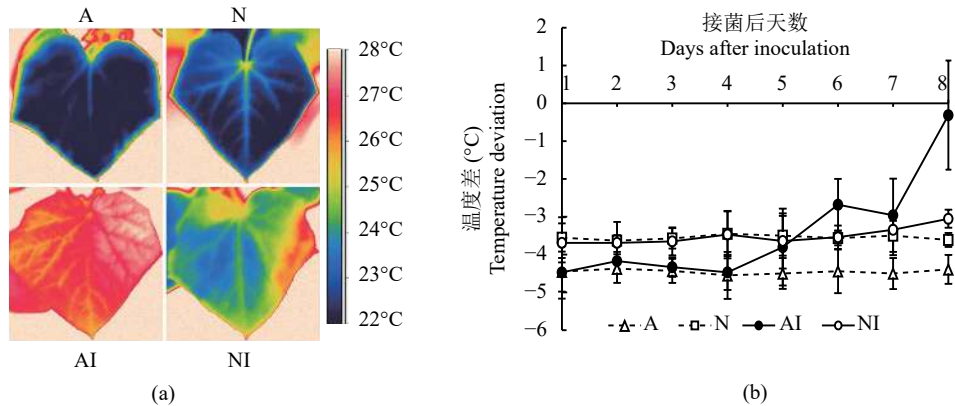


图 3 不同处理黄瓜植株叶片温度

Fig. 3 Leaf temperature of cucumber seedlings under different treatments

[注 (Note): a—尖孢镰刀菌侵染 8 天时黄瓜植株的叶片温度分布 Thermal image of cucumber plants in 8 days after inoculation; b—尖孢镰刀菌侵染后黄瓜植株叶片温度的动态变化 Dynamic of leaf temperature in cucumber seedlings after FOC inoculation; A—铵态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with ammonium-N; N—硝态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with nitrate-N; AI—铵态氮接菌 FOC inoculation and supplied with ammonium-N; NI—硝态氮接菌 FOC inoculation and supplied with nitrate-N.]

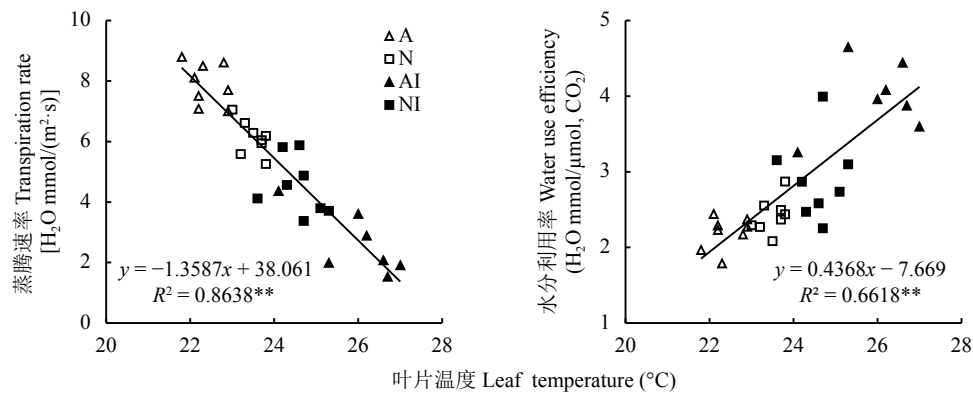


图 4 叶片温度与蒸腾速率及水分利用率的相关性分析

Fig. 4 Correlation between leaf temperature and transpiration rate or water use efficiency of leaves

[注 (Note): A—铵态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with ammonium-N; N—硝态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with nitrate-N; AI—铵态氮接菌 FOC inoculation and supplied with ammonium-N; NI—硝态氮接菌 FOC inoculation and supplied with nitrate-N.]

硝态氮的植株中, 尖孢镰刀菌的侵染对根、茎和叶的氮含量均无显著影响。

在不接菌条件下, 供应铵态氮的植株根系中可溶性蛋白含量显著高于供应硝态氮的植株, 而茎和

表 3 不同处理黄瓜植株全氮、可溶性蛋白及可溶性糖含量

Table 3 Nitrogen, soluble protein and sugar content of cucumber seedlings under different treatments

处理 Treatment	全氮 Total N (mg/g, DW)			可溶性蛋白 Soluble protein (mg/g, FW)			可溶性糖 Soluble sugar (%)		
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
A	51.7 ± 12.7 ab	27.7 ± 6.6 b	50.3 ± 11.1 a	1.22 ± 0.18 b	0.50 ± 0.13 b	4.76 ± 0.69 a	2.16 ± 0.57 a	2.84 ± 0.57 a	4.24 ± 0.26 b
N	36.7 ± 8.8 c	23.2 ± 4.0 b	44.4 ± 12.2 a	0.70 ± 0.13 c	0.51 ± 0.09 b	4.57 ± 0.76 a	1.44 ± 0.31 b	2.11 ± 0.31 b	3.19 ± 0.20 c
AI	55.8 ± 2.3 a	43.3 ± 2.2 a	41.6 ± 12.0 a	1.49 ± 0.12 a	1.85 ± 0.56 a	2.62 ± 0.41 b	1.32 ± 0.34 b	1.45 ± 0.34 c	4.93 ± 0.17 a
NI	41.1 ± 4.1 bc	28.4 ± 6.5 b	45.4 ± 5.0 a	0.66 ± 0.07 c	0.86 ± 0.21 b	3.97 ± 0.74 a	1.15 ± 0.16 b	2.11 ± 0.16 b	3.00 ± 0.09 c

注 (Note) : A—铵态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with ammonium-N; N—硝态氮不接菌 No FOC inoculation and supplied with nitrate-N; AI—铵态氮接菌 FOC inoculation and supplied with ammonium-N; NI—硝态氮接菌 FOC inoculation and supplied with nitrate-N; 同列数据后不同字母表示不同处理间在 5% 水平差异显著 Values followed by different letters in a column mean significance among treatments at the 5% level.

叶中可溶性蛋白含量与硝态氮植株无显著差异。在供应铵态氮的植株中, 尖孢镰刀菌侵染使根和茎中可溶性蛋白含量显著升高, 而使叶中可溶性蛋白含量显著降低; 在供应硝态氮的植株中, 尖孢镰刀菌侵染对根、茎和叶中可溶性蛋白含量均无显著影响。

在不接菌条件下, 供应铵态氮的植株根、茎和叶中可溶性糖含量均显著高于供应硝态氮的植株。在供应铵态氮植株中, 尖孢镰刀菌侵染使根和茎的可溶性糖含量显著降低, 却使叶中可溶性糖含量显著上升; 在供应硝态氮的植株中, 尖孢镰刀菌侵染对根、茎和叶中可溶性糖含量均无显著影响。

3 讨论

氮 (N) 素是植物生长所必需的营养元素, 在调节植物抗病性方面有着十分重要的作用^[18]。受植株种类及病原菌类型的影响, 不同形态氮素营养在病害抑制中发挥着不同的作用, 硝态氮 (NO₃⁻) 能够抑制由 *Fusarium oxysporum* 引起的番茄和豌豆的根腐病, 及由 *Rhizoctonia solani* 引起的甜菜冠腐病等; 铵态氮 (NH₄⁺) 则能抑制由 *Thielaviopsis basicola* 引起的烟草黑根腐病, *Rhizoctonia fragariae* 引起的草莓黑根腐病, *Magnaporthe grisea* 引起的水稻稻瘟病, *Gaeumannomyces graminis* 引起的小麦全蚀病, *Pseudomonas syringae* 引起的番茄叶斑病及烟草野火病等^[4, 6, 13]。不同形态氮素营养能够调节植株的代谢过程, 影响病原菌的生长发育及其毒素分泌, 改变根际环境, 最终影响病害的发生^[3, 6-7, 11-12]。本研究, 尖孢镰刀菌侵染后, 硝态氮植株的病情指数明显低于铵态氮植株 (表 1), 硝态氮能抑制黄瓜枯萎病的发生。以往的研究表明, 不同形态的氮素营养能调节根际的 pH, 从而影响病害的发生^[19]。硝态氮可显著

增加黄瓜根际土真菌丰富度及多样性, 有利于维持微生物区系稳定性, 抑制病原菌侵染及枯萎病发生^[7]。一般而言, 植株根系吸收硝态氮后会导致根际 pH 升高, 从而促进一些喜中性或喜碱性微生物病害的发生; 反之, 植株根系吸收铵态氮后会导致根际环境的酸化, 从而促进喜酸性微生物病害的发生。在本研究中, 当硝态氮营养液和铵态氮营养液的 pH 都保持一致时 (均为 6.80 ± 0.20), 硝态氮营养下生长的黄瓜植株仍然表现出更强的抗病性。因此, 不同形态氮素营养对病害的影响不是简单的某一个因素作用, 而是多种因素共同作用的结果。

不同氮素营养能够影响植株的生理代谢过程, 如氮素代谢、光合作用、呼吸作用及矿质元素的吸收, 从而对植株的生长产生不同的效应。同时, 不同形态氮素对植物生长的影响因作物种类而异, 硝态氮能够促进菜豆^[20]、草莓^[21]、油菜^[22]、甜菜^[23]、烟草^[24]、番茄^[25]等植物的生长, 而铵态氮能够促进水稻^[26]、蓝莓^[21]等植物的生长。本研究中, 硝态氮显著促进了黄瓜植株生长, 尖孢镰刀菌侵染显著抑制了铵态氮植株生长, 却对硝态氮植株生长无显著影响 (表 1)。因此, 硝态氮更有利于黄瓜植株的生长, 进而更有助于抵抗病原菌的侵染。此外, 硝态氮可诱导一氧化氮 (NO) 和水杨酸 (SA) 的产生, 并促进多胺的生物合成, 从而增强烟草对丁香假单孢杆菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) 的抗性^[4], 以维持植物的正常生长及代谢活动。

不同形态氮素可影响植株的光合特性, 进而影响植物的生理代谢过程。在本研究中, 铵态氮下生长的黄瓜植株净光合速率、气孔导度及蒸腾速率均显著高于硝态氮植株 (表 2)。通过测定光响应曲线及 CO₂ 响应曲线 (图 1) 可见, 铵态氮下生长的黄瓜

植株羧化效率显著高于硝态氮下生长的黄瓜植株, 而氮素形态对表观量子效率无显著影响。大量研究表明, 铵态氮下生长的植株的叶面积较小^[24], 叶片比面重较大^[27], 叶片氮素含量和 Rubisco 酶含量较高^[23], 叶绿素含量较高^[28], 叶绿体体积较大^[23]; 因此, 铵态氮植株的光合速率高于硝态氮植株。尖孢镰刀菌侵染后, 铵态氮下黄瓜植株的净光合速率显著降低, 然而在硝态氮植株中, 尖孢镰刀菌的侵染对净光合速率无显著影响 (表 2)。以往研究表明, 病原菌侵染后叶片气孔导度降低^[29], 叶绿素含量及 Rubisco 酶的含量和活性降低^[30], 最终导致光合速率降低。在铵态氮植株中, 尖孢镰刀菌的侵染严重破坏了叶绿体结构 (图 2), 叶绿素含量降低 (表 1), 气孔导度和胞间 CO₂ 浓度降低 (表 2), 从而导致光合速率的下降。在不接菌条件下, 铵态氮植株的叶片温度显著低于硝态氮植株 (图 3), 这主要是因为铵态氮植株叶片的蒸腾速率高于硝态氮植株, 蒸腾速率与叶片温度呈显著负相关关系 (图 4)。尖孢镰刀菌侵染后, 铵态氮下黄瓜植株的叶片温度及水分利用率显著增加, 而尖孢镰刀菌的侵染对硝态氮植株的叶片温度及水分利用率无显著影响 (图 3、图 4)。尖孢镰刀菌的侵染能够诱导黄瓜植株叶片中脱落酸 (ABA) 合成, 从而促进叶片气孔关闭和蒸腾速率降低, 最终导致叶片温度上升^[31]。由此可见, 病原菌侵染后, 硝态氮可稳定叶绿体结构, 进而保持较高的光合速率和蒸腾速率, 维持黄瓜叶片温度的稳定及植物的正常生长; 然而病原菌侵染后光合速率的变化与寄主植物抗性之间的关系尚不明确, 还有待进一步研究。

植物氮素营养可影响植株生理代谢, 进而诱导植株的抗性响应^[11]。在本研究中, 铵态氮下黄瓜植株的根系中全氮含量显著高于硝态氮下黄瓜植株 (表 3), 说明铵态氮更有利于黄瓜植株根系中氮素积累。根系中氮含量的增加将促进氮同化, 在本研究中, 铵态氮显著增加了黄瓜植株根系中可溶性蛋白的含量 (表 3)。Setién 等^[32]的研究也表明, 与硝态氮相比, 铵态氮能够增加小麦根系中可溶性蛋白含量; 植物吸收的铵态氮绝大部分在根系中同化为氨基酸, 其中一部分将储存在根系中, 从而导致铵态氮下植株根系中可溶性蛋白含量的增加。与硝态氮相比, 铵态氮营养显著增加了黄瓜植株叶片、茎和根中可溶性糖含量 (表 3)。黄瓜植株在铵态氮下光合速率显著增加, 从而促进碳水化合物合成, 最终导致铵态氮下黄瓜植株体内可溶性糖含量的显著增加。在铵态氮植株中, 根系中较高的可溶性蛋白含量及可溶性

糖含量将为尖孢镰刀菌生长提供养分, 从而促进其侵染和定殖, 导致铵态氮下黄瓜植株发病率增加。于虹漫等^[33]对水稻秧苗抗立枯病性与主要生化指标的相关分析发现, 可溶性蛋白含量与发病率呈显著正相关关系。此外, 病原菌的侵染可诱导糖代谢过程基因的表达, 如糖酵解、磷酸戊糖途径及 TCA 循环等, 进而影响植物的防御反应, 如活性氧 (ROS) 的产生及病程相关蛋白 (PR) 的基因表达^[34]。Wang 等^[3]的研究也表明, 铵态氮可诱导黄瓜植株碳氮代谢相关基因的表达, 促进植物体内氨基酸的合成, 进而增加病原菌的孢子萌发及毒素产生; 不同形态氮素可影响植株体内碳氮代谢, 进而影响病害的发生。

4 结论

不同形态氮素营养可调控植物病害的发生, 与铵态氮相比, 硝态氮能够有效地抑制黄瓜枯萎病的发生。病原菌侵染条件下, 硝态氮可维持叶绿体结构的完整性, 保持黄瓜植株光合速率的稳定及植物的正常生长, 并减少碳水化合物向根系的运输, 从而抑制病原菌的侵染及定殖。在黄瓜的设施栽培中需要投入大量的氮肥, 通过合理的氮肥供应来增强黄瓜抗枯萎病的能力, 对于黄瓜的栽培和生产具有重要意义。因此, 在黄瓜的栽培中, 应适当增加硝态氮肥的施入而减少铵态氮肥的施用以抑制枯萎病的发生。

参考文献:

- [1] Owen J H. Fusarium wilt of cucumber[J]. *Phytopathology*, 1955, 45: 435–439.
- [2] Hoffland E, Jeger M J, Beusichem M L. Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen[J]. *Plant and Soil*, 2000, 218(1–2): 239–247.
- [3] Wang M, Gu Z, Wang R, *et al.* Plant primary metabolism regulated by nitrogen contributes to plant–pathogen interactions[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(2): 329–342.
- [4] Gupta K J, Brotman Y, Segu S, *et al.* The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(2): 553–568.
- [5] Berger S, Sinha A K, Roitsch T. Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(15–16): 4019–4026.
- [6] Huber D M, Thompson I A. Nitrogen and plant disease[M]. St. Paul MN: American Phytopathological Society, 2007.
- [7] Gu Z, Wang M, Wang Y, *et al.* Nitrate stabilizes the rhizospheric fungal community to suppress fusarium wilt disease in cucumber[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2020, 33(4): 590–599.

- [8] Snoeijs S S, Perezgarcia A, Joosten M H A J, *et al.* The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106(6): 493–506.
- [9] Veresoglou S D, Barto E K, Menexes G, *et al.* Fertilization affects severity of disease caused by fungal plant pathogens[J]. *Plant Pathology*, 2013, 62(5): 961–969.
- [10] Marschner P. Marschner's mineral nutrition of higher plants[M]. London: Academic Press, 2012.
- [11] Fagard M, Launay A, Clement G, *et al.* Nitrogen metabolism meets phytopathology[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(19): 5643–5656.
- [12] Wang M, Sun Y, Gu Z, *et al.* Nitrate protects cucumber plants against *Fusarium oxysporum* by regulating citrate exudation[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(9): 2001–2012.
- [13] Fernandez-Crespo E, Scalschi L, Llorens E, *et al.* NH_4^+ protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by activation of systemic acquired acclimation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(21): 6777–6790.
- [14] Sun Y, Wang M, Mur L A J, *et al.* Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 572.
- [15] Wang M, Sun Y, Sun G, *et al.* Water balance altered in cucumber plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 7722.
- [16] 杨志晓, 丁燕芳, 张小全, 等. 赤星病胁迫对不同抗性烟草品种光合作作用和叶绿素荧光特性的影响[J]. *生态学报*, 2015, 35(12): 4146–4154.
Yang Z X, Ding Y F, Zhang X Q, *et al.* Impacts of *Alternaria alternata* stress on characteristics of photosynthesis and chlorophyll fluorescence in two tobacco cultivars with different resistances[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(12): 4146–4154.
- [17] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
Li H S. The principle and technology of plant physiology and biochemistry experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.
- [18] 段旺军, 杨铁钊, 戴亚, 等. 植物氮素营养与病害发生关系研究进展[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(10): 2139–2146.
Duan W J, Yang T Z, Dai Y, *et al.* Advances in the relationships between nitrogen nutrition and disease development in plant species[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(10): 2139–2146.
- [19] Ghorbani R, Wilcockson S, Koocheki A, *et al.* Soil management for sustainable crop disease control: A review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2008, 6(3): 149–162.
- [20] Guo S W, Brück H, Sattelmacher B. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants[J]. *Plant and Soil*, 2002, 239(2): 267–275.
- [21] Claussen W, Lenz F. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry[J]. *Plant and Soil*, 1999, 208(1): 95–102.
- [22] 刘梅, 郑青松, 刘兆普, 等. 盐胁迫下氮素形态对油菜和水稻幼苗离子运输和分布的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(1): 181–189.
Liu M, Zheng Q S, Liu Z P, *et al.* Effects of nitrogen forms on transport and accumulation of ions in canola (*B. napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) under saline stress[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 21(1): 181–189.
- [23] Raab T K, Terry N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L.[J]. *Plant Physiology*, 1994, 105(4): 1159–1166.
- [24] Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, *et al.* Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(343): 227–237.
- [25] 徐新娟, 李庆余, 孙瑞, 等. 不同形态氮素对樱桃番茄果实发育和品质的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(6): 1425–1432.
Xu X J, Li Q Y, Sun R, *et al.* Effects of nitrogen forms on the development and quality of cherry tomato fruit[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2009, 15(6): 1425–1432.
- [26] Li Y, Gao Y X, Ding L, *et al.* Ammonium enhances the tolerance of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) to drought condition[J]. *Agricultural Water Management*, 2009, 96(12): 1746–1750.
- [27] Bowler J M, Press M C. Effects of elevated CO_2 , nitrogen form and concentration on growth and photosynthesis of a fast- and slow-growing grass[J]. *New Phytologist*, 1996, 132(3): 391–401.
- [28] Guo S W, Zhou Y, Li Y, *et al.* Effects of different nitrogen forms and osmotic stress on water use efficiency of rice (*Oryza sativa*)[J]. *Annals of Applied Biology*, 2008, 153(1): 127–134.
- [29] Meyer S, Saccardy-Adji K, Rizza F, *et al.* Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2001, 24(9): 947–956.
- [30] Tang X, Rolfe S A, Scholes J D. The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1996, 19(8): 967–975.
- [31] Wang M, Ling N, Dong X, *et al.* Thermographic visualization of leaf response in cucumber plants infected with the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 61: 153–161.
- [32] Setién I, Fuertes-Mendizabal T, González A, *et al.* High irradiance improves ammonium tolerance in wheat plants by increasing N assimilation[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(8): 758–771.
- [33] 于虹漫, 樊连梅, 刘更森, 等. 水稻秧苗抗枯萎病性与主要生化指标的相关分析[J]. *农业科技通讯*, 2004, (2): 26–27.
Yu H M, Fan L M, Liu G S, *et al.* Correlation analysis between resistance to bacterial wilt and main biochemical indexes of rice seedlings[J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2004, (2): 26–27.
- [34] Rojas C M, SenthilKumar M, Tzin V, *et al.* Regulation of primary plant metabolism during plant–pathogen interactions and its contribution to plant defense[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 17.