

OS—诱抗剂诱导植物抗病性的作用探讨

孙明娜, 张 勇, 马严明, 王 梅, 高同春*

(安徽省农作物品质改良重点实验室, 安徽省农业科学院植物保护研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要 用 PDA 培养基平板法测定了 0.4%OS—诱抗剂水剂对水稻纹枯病菌、小麦纹枯病菌、油菜菌核病菌、辣椒立枯病菌、瓜类绵腐病菌、黄瓜枯萎病菌的生物活性,其 EC_{50} 值分别为 34.56、59.33、33.17、85.92、91.91、122.87 μ g/mL, OS—诱抗剂对水稻纹枯病、油菜菌核病较好。高效液相色谱分析表明,经 OS—诱抗剂处理后的植物提取液中酚类物质的种类和含量相对于对照有明显的变化,说明 OS—诱抗剂对植物的防病作用可能是促使植物体内产生了酚类抗病物质。

关键词 植物免疫学; OS—诱抗剂; 抗菌活性

中图分类号 S 432.2

Induction of plant resistance by OS-elicitor

SUN Ming-na, ZHANG Yong, MA Yan-ming, WANG Mei, GAO Tong-chun*

(Key Laboratory of Crop Quality Amelioration in Anhui Province, Institute of Plant Protection, Anhui Academy Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract The antagonistic experiments on PDA showed that OS—elicitor(0.4% Water) caused various phytotoxicity to different fungi such as *Rhizoctonia solani* Kühn, *R. cerealis* Vander Hoeven, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp. and *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum*. The extracts of cucumber leaves treated with OS—elicitor showed inhibitory effects on the growth of *F. oxysporum* f.sp *cucumerinum* spore. A HPLC analysis demonstrated that the phenolic contents in the extract of cucumber leaves treated with OS—elicitor were different from that in the extract of untreated leaves.

Key words plant immunology; OS—elicitor; fungistasis

植物诱导抗病性是由生物或非生物因子诱导产生的一种非遗传性的植物抗病类型,对植物病原菌具有系统免疫作用^[1]。寡糖类植物诱抗剂作为一种生物源激发子能够诱导植物产生抗病性^[2]。OS—诱抗剂是由来源于海洋生物丰富的甲壳质经工业降解得到的小分子几丁寡糖类生物源农药。据报道几丁寡糖可提高植物免疫力,促进植保素合成^[3]。本试验主要通过研究 OS—诱抗剂对病原真菌的抑菌活性及其处理植物前后体内次生代谢酚类物质的差异,进一步探讨植物在几丁质寡糖作用下产生的一些生理变化反应,初步阐明此类诱抗剂的作用机制,为更深入

地研究诱导植物产生抗病性的机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试药剂

0.4%OS—诱抗剂水剂,广东原沅生物工程有
限公司提供。

1.1.2 供试菌株

水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)、小麦
纹枯病菌(*R. cerealis* Vander Hoeven)、油菜菌核病
菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]、辣椒立

枯病菌 (*R. solani*)、瓜类绵腐病菌 (*Pythium aphanidermatum*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp *cucumerinum*), 由安徽省农科院植保所分离并保存。

1.1.3 马铃薯琼脂培养基(PDA)

马铃薯 200.0 g, 蔗糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 6.5~7.0。

1.1.4 植物材料

黄瓜品种为津研四号, 无种衣剂包衣, 大棚土壤栽培, 常规管理, 试验期间未使用与试验无关的农药。

1.2 试验方法

1.2.1 OS-诱抗剂水剂对植物病原菌生物活性

(1)待测菌种的制备 取灭菌培养皿($d = 9$ cm)6 套, 依次倾入 10 mL PDA 培养基制成平板。将 6 种供试菌种依次在无菌条件下挑取一小块放入上述培养皿中, 置于 25℃ 恒温箱内培养 3 d 备用。

(2)含药培养基平板的制备 取 0.4% OS-诱抗剂水剂, 用 PDA 培养基依次配成药剂含量为 180、90、45、22.5、11.25、5.625 $\mu\text{g/g}$ 的含药培养基平板, 每平板培养基 10 mL, 每个处理 3 个重复。

(3)生物活性毒力测定 在刚培养好菌种的菌落边缘用灭菌打孔器打取 5 mm 直径的菌丝块, 菌丝面朝上接种于已配置的含药 PDA 平板中央, 每平板 1 块, 25℃ 培养 5 d, 测量菌落生长直径。按浓度对数与机率值回归法求得 OS-诱抗剂对不同病原菌的毒力方程, 并计算出 OS-诱抗剂对病原菌的 EC_{50} 、 EC_{90} 值和相关系数 R 。

1.2.2 OS-诱抗剂抗病机理测试

(1)喷施药剂 在大棚黄瓜幼苗第 4 片真叶充分展开时(6 月 5 日), 分别用 0.4% OS-诱抗剂 800 倍液(1.0 mg/kg)、400 倍液(2.0 mg/kg)和清水对其进行喷雾, 每隔 3 d 喷一次, 直至果实陆续成熟时

(7 月 10 日)为止。
(2)取样 喷药 4 次后开始取样。每处理取植株由上往下数第 4 至第 8 片叶, 共 5 片, 以确保所取样品充分经过药剂诱导处理。

(3)提取 将上述经不同处理的新鲜黄瓜叶片各 130 g 研磨, 用 150 mL 石油醚浸泡 2 h, 经滤纸过滤后用 25 mL 石油醚转移。将滤液过颗粒状活性炭 20 g 层析柱(200 mm $\times$ 20 mm), 在 35℃ 水浴锅中真空旋转浓缩滤液, 用石油醚定容至 10mL^[4]。

(4)叶内多酚类物质的检测 根据多酚类物质的分离测定方法^[4], 在 280 nm 波长下, 以 $\varphi_{\text{甲醇}}:\varphi_{\text{水}} = 75:25$ 为混合流动相, 1 mL/min 流速, 恒温 28℃, 对目标物提取液进行高效液相色谱(HPLC)测定。HPLC 色谱仪为日立 L-7100 型, UV 检测器, C18 分析柱。

(5)提取液对孢子萌发的影响 分别取经不同处理的黄瓜叶片提取液及溶剂和清水各 0.2 mL 加入凹玻片中, 待其溶剂挥发干后, 加入孢子浓度为 2 000 个/mL 的黄瓜枯萎菌孢子悬浮液 0.16 mL。盖上盖玻片, 放入具湿润滤纸的培养皿中, 25℃ 恒温培养, 3 个重复。6 h 后于 100 倍显微镜检查, 以萌发的芽管长度达到孢子直径的 1/2 时作为萌发标准。

2 结果与分析

2.1 OS-诱抗剂对 6 种植物病原菌的毒力活性测定

对不同植物病原菌的离体毒力测定结果表明: 0.4% OS-诱抗剂对水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌、小麦纹枯病菌、黄瓜枯萎病菌、辣椒菌核病菌和瓜类绵腐病菌都具有一定的抑菌活性(表 1)。其 EC_{50} 分别为 34.56、33.17、59.53、122.87、85.92、91.91 $\mu\text{g/mL}$, 从中可以看出, 0.4% OS-诱抗剂对水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌效果最好, 对黄瓜枯萎菌的活性较低。

表 1 0.4% OS-诱抗剂水剂对 6 种植物病原菌的毒力活性测定

病原菌	培养时间(h)	$\text{EC}_{50}(\mu\text{g/mL})$	$\text{EC}_{90}(\mu\text{g/mL})$	R 值	毒力方程($Y=$)
水稻纹枯病菌	24	34.56	484.07	0.9779	$1.4307X + 2.7987$
油菜菌核病菌	36	33.17	201.64	0.9868	$2.0924X + 1.8179$
小麦纹枯病菌	120	59.53	571.23	0.9847	$1.6699X + 2.0364$
黄瓜枯萎病菌	168	122.87	527.97	0.7614	$2.5902X - 0.4121$
辣椒立枯病菌	144	85.92	197.42	0.8714	$4.5395X - 3.7799$
瓜类绵腐病菌	120	91.91	595.42	0.9696	$2.0211X + 1.0318$

2.2 OS 诱导后黄瓜叶片内酚类物质含量变化分析

对 OS-诱抗剂诱导后黄瓜叶片提取液的 HPLC 分析谱图显示(图 1): 在石油醚浸出液谱图中: α 峰位置上, 对照峰响应值为 0.2 mv, 两种喷雾处理皆为 0.04 mv, 占对照的 1/4; β 峰位置上, 对照

峰响应值为 0.18 mv, 两种不同浓度喷雾处理则皆为 0.5 mv, 是对照的 2.5 倍多。根据积分的峰高外标法计算原理, 物质的量与峰高呈正比例关系^[5], 可见, 经过 OS-诱抗剂处理后, 保留时间在 1.1 min 的这种酚(将其命名为 α -酚)的含量减少, 为处理

前的 25%;保留时间在 1.7 min 的另一种酚(命名为 β - 酚)含量明显提高,为处理前的 2.5 倍。检测结果表明,通过 OS- 诱抗剂喷施诱导后黄瓜植株内部植色素类似物质中两种酚类物质的含量发生了明显的变化。这种通过 OS- 诱抗剂诱导产生的叶片内多酚类物质含量变化不是一种简单地沿着同一趋势增高或降低,而是一种物质增加(β - 酚),另一种物质减少(α - 酚),并且他们各自变化的数量绝对值是不同的。分析结果表明,通过 OS- 诱抗剂诱导确实引起黄瓜植株体内植色素类似物质含量发生变化。植色素是植物启动自身防卫体系抵御病原入侵的首要因子^[6],说明生物源农药 0.4% OS- 诱抗剂的抗病作用机理与诱导植物产生抗性之间有着密切的关系。

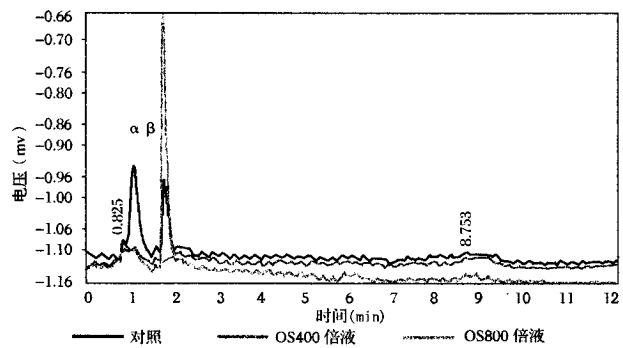


图 1 0.4%OS- 诱抗剂诱导后黄瓜叶片提取液的 HPLC 检测结果

2.3 OS- 诱抗剂诱导后黄瓜叶片提取液对黄瓜枯萎菌孢子萌发的影响

将经 0.4% OS- 诱抗剂水剂诱导后的黄瓜叶片提取液对黄瓜枯萎菌进行分生孢子萌发抑制试验。其结果表明,喷施 OS- 诱抗剂后的叶片提取液与未处理叶片相比,对枯萎菌孢子萌发有一定的抑制作用,抑制率达 61.8% 以上;400 倍液和 800 倍液不同处理之间抑制率差别不大(表 2)。

表 2 OS- 诱抗剂诱导后黄瓜叶片提取液对黄瓜枯萎菌孢子萌发的影响¹⁾ %

处理	萌发率 ²⁾	校正抑制率	溶剂校正抑制率	施药校正抑制率
400 倍液	9.3 cC	85.5	84.4	65.8
800 倍液	10.4 cbCB	83.8	82.6	61.8
不施药对照	27.2 bAB	57.6	54.4	—
溶剂对照	59.6 aA	7.0	—	—
清水对照	64.1 abB	—	—	—

1)同一列字母相同者表示 5% (小写字母)和 1% (大写字母)水平上差异不显著; 2)黄瓜枯萎菌孢子经提取液处理 6 h 后的孢子萌发率。

3 结论与讨论

植物保卫素的合成和积累是一种典型的植物防卫反应^[2]。本试验结果表明,0.4% OS- 诱抗剂水剂可以诱导植物体内的植色素类似物质(酚类)产生变化。几丁寡糖作为激发子的作用机理是通过诱导植物抗性来抵御病原菌侵染^[8]。结果还表明,OS- 诱抗剂对病原菌的抑制作用不如化学药剂显著。喷施 OS- 诱抗剂后的黄瓜植株叶片提取液对枯萎菌的孢子萌发有一定的抑制作用,说明该类农药的作用机理是通过诱导抗性实现的。应用生物源农药氨基寡糖素控制植物病害,是近年来研究的热点。由于该类药剂的来源丰富,制作工艺简单,无毒无害亦无残留等优点,得到众多农药企业的青睐。因此,研究其独特的作用机理对于寻求优质高效的生物农药,减少常规化学农药的使用,保持农业产业的可持续发展具有重要意义。本试验只是一个初步研究,搞清楚 0.4% OS- 诱抗剂诱导后植物体内发生变化的是何种物质,影响这种变化的控制因素是什么以及诱导后植株体内生理生化变化是怎样,将是下一步继续研究的焦点。

参考文献

[1] Michael G H. Microbial elicitors and their receptors in plants[J]. Annu Rev Phytopathol, 1996, (34): 387-412.

[2] 赵继红,孙淑君,李建中. 植物诱导抗病性与诱抗剂研究进展[J]. 植物保护, 2003,29(4):7-10.

[3] 张敏恒,邓忠贤,徐江. 甲壳质在农业上的开发及应用[J]. 农药, 2000, 40(4): 3-5.

[4] 徐任生. 天然产物化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.

[5] 张玉奎,张维冰,邹汉法. 分析化学手册(液相色谱分册)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

[6] 董汉松. 植物诱导抗病性原理和研究[M]. 北京: 科学出版社, 1995.

[7] Ebel J, Mithofer A. Early events in the elicitation of plant defence[J]. Planta, 1998, (206): 335-348.

[8] 李学荣,刘志恒. 壳聚糖控制工厂化蔬菜病害的研究[J]. 农药, 2002, 43(9): 38-42.

[9] 武予清,郭予元. 棉株中抗虫物质黄酮类化合物的高效液相色谱分析[J]. 植物保护, 2002, 26(5): 1-3.

[10] 孟昭礼,吴献忠. 银杏提取液对四种植物病原菌的抑菌作用[J]. 植物病理学报, 1995, 25(4): 357-360.

[11] 陈尚武,张维一,李学文. 预合成抗菌物质抑制甜瓜的两种病害的侵染[J]. 植物病理学报, 2000, 30(2): 189.