李堆淑. 寡糖诱导桔梗抗根腐病的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):65-68. doi:10.15889/j. issn. 1002-1302.2018,01.017

# 寡糖诱导桔梗抗根腐病的研究

#### 李堆淑

(商洛学院生物医药与食品工程学院,陕西商洛726000)

摘要:为开发一种低毒高效的新型抗桔梗根腐病的抑制剂,将桔梗苗浸泡于腐皮镰刀菌的孢子悬浮液 (10° CFU/mL)3 d后,水培养桔梗苗 10 d,再用腐皮镰刀菌酸降解的寡糖溶液 (0、5、10、15、20 μg/mL)诱导桔梗叶片 3 d,以蒸馏水为对照(CK),研究抗桔梗根腐病的药效。结果表明,在同一时间,随着寡糖质量浓度的增大,桔梗根腐病的病情指数不断减小,当寡糖质量浓度增加到 10 μg/mL 时,桔梗根腐病的病情指数最小,防治效果达 36.36%。用不同质量浓度的寡糖诱导桔梗叶片,与 CK 相比,均提高了桔梗叶片抗氧化酶 SOD(超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)、CAT(过氧化氢酶)的活性,降低了桔梗叶片细胞内 MDA(丙二醛)的含量,并且 10 μg/mL 寡糖诱导抗病性的效果最佳。桔梗叶片的 POD、CAT、SOD 活性均两两呈显著正相关性,MDA 含量分别与 POD、CAT、SOD 活性呈显著负相关性。

关键词:桔梗;腐皮镰刀菌;诱导抗病性;寡糖;抗氧化酸;丙二醛

中图分类号: S435.672 文献标志码: A 文章编号:1002-1302(2018)01-0065-03

桔梗「Platycodon grandiflorus (Jacp. ) A. DC. ] 为桔梗科 (Campanulaceae)多年生草本植物,在我国主要分布于东北、 华北、华中、华南等地区。其根可入药,是我国传统的中药材, 具有较高的食用价值[1]。近年来,由于大片种植桔梗,管理 粗放,桔梗的根腐病、枯萎病、根结线虫病、紫纹羽病、斑枯病、 白粉病等病害越来越严重,直接影响了桔梗的生长发育,还影 响了桔梗入药的品质和质量。桔梗根腐病发病比较频繁,根 腐病是由半知菌类镰刀菌引起的根部病害,是一种土传病害, 土壤湿度大或作物连作易发病,比较难防治。利用诱抗剂诱 导植物产生抗性来防治病害,在许多植物上均有较好的防治 效果[2]。植物的诱导抗病性作为一种后天免疫功能可以降 低植物的受害程度[3]。局部抗性伴随着植保素的积累、细胞 壁的加强[4],而系统抗性的获得以病程相关蛋白作为重要生 化标记。寡糖(oligosaccharide)是经酸水解、碱水解或酶水解 而制得2~10个单糖分子组成的低聚合度水溶性的糖类。寡 糖可以促进植物生长和发育,诱导激活植物体内合成抗性相关 酶及增加基因表达量,促使植保素合成、木质素积累,提高植物 的抗病能力[5]。因此,本研究用腐皮镰刀菌酸水解的寡糖诱导 已感病的桔梗苗,研究桔梗抗根腐病(腐皮镰刀菌)的能力。

## 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

桔梗苗高 20 cm 左右,盆栽;腐皮镰刀菌(Fusarium solani),由商洛学院生物与食品工程学院微生物实验室分离并保存。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:200 g 马铃薯,20 g 葡萄糖,18 g 琼脂, $1\ 000 \ \text{mL}$  蒸馏水。

收稿日期:2016-08-22

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划(编号:16JK1239)。

作者简介:李堆淑(1977—),女,宁夏隆德人,硕士,副教授,主要从事植物逆境生理学及微生物研究。E-mail:422599591@qq.com。

马铃薯葡萄糖(PD)培养基: 200 g 马铃薯, 20 g 葡萄糖, 1 000 mL 蒸馏水。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 寡糖的制备 先将腐皮镰刀菌在 PDA 培养基上培养3 d,然后将直径为5 mm 的菌饼接入 PDA 培养基的三角瓶中,放在摇床(25 ℃、130 r/min)上培养5 d。分成2 份,一份将菌丝体用蒸馏水洗3次,低温烘干、粉碎过100 目筛,称取10 g菌丝粉,用1.0 mol/L HCl 酸解1 h,调节 pH 值为7;再加入90% 乙醇,进行分级沉淀,4 000 r/min 离心15 min 得到浅棕色的多糖粉末;配制成浓度分别为0、5、10、15、20 μg/mL 的寡糖溶液,备用。另一份配成10° CFU/mL 孢子悬浮液,备用。

1.2.2 桔梗苗的处理 将桔梗苗浸泡于腐皮镰刀菌的孢子 悬浮液(10° CFU/mL)3 d后,水培养桔梗苗10 d,再用不同浓度的寡糖溶液对桔梗苗的叶面进行喷施(喷至溶液不流为止),以喷施蒸馏水作为对照(CK),每组设3个重复,每天喷1次,连续处理3d后分为2份,一份从第3天开始每天采样1次,到第8天,测定其生理生化指标;另一份分别在第0、第3、第6、第8天观察并统计桔梗苗根腐病的病情指数和防治效果,每次调查15株。

1.2.3 病情调查 病情分级标准:0级为桔梗苗根部未发病,1级为病斑面积占根部总面积的5%及以下,3级为病斑面积占根部总面积的6%~10%,5级为病斑面积占根部总面积的11%~25%,7级为病斑面积占根部总面积的26%~50%,9级为病斑面积占根部总面积的51%及以上(叶片枯萎或叶柄折断)<sup>[6]</sup>。

病情指数 =  $100 \times \Sigma$ (各级病根数 × 各级代表值)/(调查总根数 × 最高级代表值);

防治效果 = (对照病情指数 - 处理病情指数)/对照病情指数×100%。

1.2.4 桔梗生理生化指标测定 过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法,测定 470 nm 处的吸光度,以 1 min 吸光度的变化值表示酶活力<sup>[7]</sup>。过氧化氢酶(CAT)活性的测

定采用高锰酸钾滴定法<sup>[8]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用四氮唑蓝光还原法,测定560 nm 处的吸光度<sup>[9]</sup>。丙二醛(MDA)含量的测定采用硫代巴比妥酸比色法,分别测定600、532、450 nm 处的吸光度<sup>[10]</sup>。

# 2 结果与分析

#### 2.1 桔梗苗的病情指数调查

由表1可知,不同浓度的寡糖溶液对桔梗苗抗根腐病的 诱导效果不同。在同一时间,随着寡糖溶液浓度的增大,桔梗 苗根腐病的病情指数不断减小,当寡糖溶液的浓度增加到 10 μg/mL 时,桔梗苗根腐病的病情指数最小,再增大寡糖溶液的浓度,桔梗苗根腐病的病情指数逐渐增大。随着寡糖溶液诱导桔梗苗时间的延长,只有 10 μg/mL 寡糖溶液诱导的防治效果一直增大,其余处理浓度诱导的防治效果均是先增大后减小。随着诱导时间的延长,CK 处理的桔梗苗根腐病的病情指数逐渐升高,且高于寡糖溶液处理的病情指数。当寡糖溶液浓度为 10 μg/mL 时,防治桔梗苗根腐病的效果最好,且在第 8 天桔梗苗根腐病的防治效果为 36.36%,分别比5、15、20 μg/mL 寡糖溶液诱导的防治效果高 217.83%、61.24%、525.82%。

表 1 桔梗苗根腐病的病情指数及防治效果

寡糖溶液浓度	第0天	第3天		第6天		第8天	
$(\mu g/mL)$	病情指数	病情指数	防治效果(%)	病情指数	防治效果(%)	病情指数	防治效果(%)
CK	18.51	36.59		39.97		41.59	
5	18.51	35.13	4.07	34.83	12.85	36.83	11.44
10	18.51	29.08	20.58	26.90	32.71	26.83	36.36
15	18.51	31.44	14.15	30.62	23.39	32.21	22.55
20	18.51	35.74	2.04	37.54	6.07	39.17	5.81

#### 2.2 寨糖溶液对桔梗苗叶片生理特征的影响

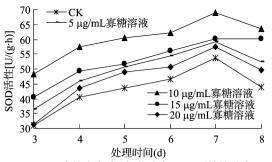


图1 寡糖溶液对桔梗苗叶片 SOD 活性的影响

2.2.2 寡糖溶液对桔梗苗叶片 POD 活性的影响 POD 作为生物体一种重要的氧化还原酶,能促进杀菌效果及木质素和木栓质的合成,从而杀灭病原菌或阻止病原物质入侵,POD活性与抗病性密切相关[11]。由图 2 可知,桔梗苗经不同浓度的寡糖溶液诱导处理后,桔梗苗叶片 POD 活性呈先升高后降低的变化趋势,其中,CK 处理的桔梗苗叶片 POD 活性总是明显低于寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片的 POD 活性。5、15、20 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 POD 活性的升降

幅度均较稳定,10 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 POD 活性的升降幅度较大。10 μg/mL 寡糖溶液在诱导处理第5天时,桔梗苗叶片的 POD 活性达到峰值,且明显高于其他处理的桔梗苗叶片 POD 活性的峰值。5、10 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 POD 活性的峰值均出现在第5天,CK 和15 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 POD 活性的峰值出现在诱导处理的第6天,20 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 POD 活性的峰值出现在诱导处理的第7天,要增强桔梗叶片抗根腐病的能力,必须通过提高 POD 的活性才能抵抗病害带来的影响。可见,10 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗叶片 POD 活性最大,表明一定浓度的寡糖对桔梗抗根腐病的诱导有一定的效果。

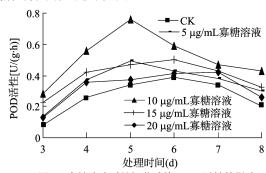
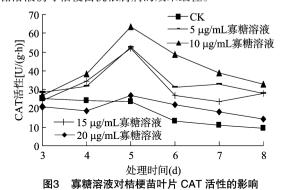


图2 寡糖溶液对桔梗苗叶片 POD 活性的影响

2.2.3 寡糖溶液对桔梗苗叶片 CAT 活性的影响 CAT 作为一种诱导酶,可以催化木质素的形成,促进细胞壁木质化来抵抗病原菌的侵染[11]。由图 3 可知,经不同浓度的寡糖溶液诱导处理的桔梗叶片 CAT 活性均发生了变化。CK 处理的桔梗苗叶片 CAT 活性均发生了变化。CK 处理的桔梗苗叶片 CAT 活性均先升高后降低,在诱导处理第5 天时,桔梗苗叶片 CAT 活性均先升高后降低,在诱导处理第5 天时,桔梗苗叶片 CAT 活性均达到峰值,10 μg/mL 寡糖溶液诱导处理从第4 天至第8 天桔梗苗叶片的 CAT 活性明显高于其他3 种浓度处理的桔梗苗叶片的 CAT 活性转明显高于其他3 种浓度处理的桔梗苗叶片的 CAT 活性较明

显,20 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 CAT 活性的变化较平缓。10 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 CAT 活性的峰值分别比 CK、5、15、20 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗叶片 CAT 活性的峰值高 153. 20%、20. 12%、20. 44%、137. 08%。可见,一定浓度的寡糖溶液诱导处理桔梗苗,其叶片的 CAT 活性增强,可抵御病原菌的侵害,且 10 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的效果最明显,说明 10 μg/mL 寡糖溶液诱导性种苗抗根腐病的效果最佳。



2.2.4 寡糖溶液对桔梗苗叶片 MDA 含量的影响 由图 4 可知,用不同浓度的寡糖溶液诱导处理桔梗苗,其叶片 MDA 的含量均有不同程度的变化。在第 3 天至第 8 天,CK 处理的桔梗叶片 MDA 含量一直上升,说明随着时间的延长腐皮镰刀菌不断地入侵桔梗细胞。用不同浓度的寡糖溶液诱导处理桔梗苗,其叶片的 MDA 含量变化趋势总体上是先下降后上升,5、10 μg/mL 寡糖溶液诱导处理的桔梗苗,其叶片 MDA 含量变化较明显,均在诱导处理的第 6 天达到最低值,且在整个诱导过程中 10 μg/mL 寡糖溶液处理的桔梗叶片 MDA 含量比其他处理的桔梗苗叶片 MDA 含量低。可见,一定浓度的寡糖溶液能够有效降低桔梗苗叶片中 MDA 的含量,从而降低了对植物膜质的伤害程度。表明 10 μg/mL 寡糖溶液诱导桔梗苗抗根腐病有较好的效果。

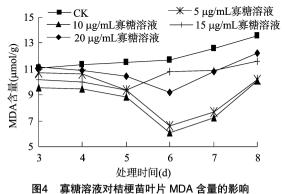


图4 券储价权对价使用引力 WIDA 占重的影响

2.3 寡糖溶液对桔梗苗叶片各生理指标相关性的影响

由表2可知,经不同浓度的寡糖溶液诱导处理已感根腐病的桔梗苗,从第3天至第8天桔梗苗叶片的POD、CAT、SOD活性与MDA的含量均两两相关。POD活性与CAT、SOD活性在0.001水平上显著正相关,CAT活性与MAD含量在0.001水平上显著负相关,CAT活性与SOD活性在0.05水平上显著正相关,MDA含量与POD、SOD活性在0.01水平上显著负相关。

表 2 桔梗苗叶片各生理指标的相关性

指标	POD 活性	CAT 活性	SOD 活性
CAT 活性	0.674 ***		
SOD 活性	0.765 ***	0.400 *	
MDA 含量	-0.549 **	-0.682 ***	-0.490 **

注: "\*" \*\*" \*\*\* "分别表示在 0.05、0.01、0.001 水平上显著相关。

## 3 结论与讨论

植物可以改变细胞代谢和激发不同的防御机制来调节外界的各种胁迫。利用植物诱导剂可以诱导水稻、烟草、蔬菜等植物的抗病性[12-14]。寡糖作为植物诱导剂,具有环保、安全、稳定等特点,寡糖可以参与植物的抗病、抗逆反应,它能够快速诱导脂质过氧化并激活抗病基因的表达,降低脂质过氧化物水平.减轻植物的伤害。

本研究用不同浓度的寡糖溶液诱导处理已经感染根腐病 3 d 的桔梗苗,在同一时间,随着寡糖溶液浓度的增加,桔梗 苗根腐病的病情指数不断减小, 当寡糖溶液的浓度增加到 10 ug/mL 时, 桔梗苗根腐病的病情指数最小, 再增加寡糖溶 液的浓度, 桔梗苗根腐病的病情指数逐渐增大。 随着处理时 间的延长,经10 µg/mL 寡糖溶液诱导的防治效果一直增大, 其他浓度的寡糖溶液处理,桔梗苗根腐病的防治效果先增大 后减小。经10 μg/mL 寡糖溶液诱导的桔梗苗的防治效果最 好, 目在第8天桔梗苗根腐病的防治效果为36.36%。不同 浓度的寡糖溶液诱导桔梗苗叶片,与 CK 相比,均能提高桔梗 苗叶片 SOD、POD、CAT 等抗氧化酶的活性,降低桔梗苗叶片 细胞内 MDA 的含量, 目 10 ug/mL 寡糖溶液诱导的效果最 佳。桔梗苗叶片的 POD、CAT、SOD 活性均两两呈显著正相 关,MAD 含量分别与 POD、CAT、SOD 活性呈显著负相关。谭 姣姣等的研究表明,0.5% 南极菌β-3 胞外寡聚糖能够显著 降低黄瓜白粉病的病情指数,防治效果达24.49%,能提高黄 瓜幼苗 POD 的活性[15]。用不同浓度的堆肥菌液诱导处理的 桔梗幼苗,其SOD活性、POD活性、叶绿素含量与CK相比均 有明显的升高,而 MDA 含量则有明显的下降趋势[16]。孙翠 红等的研究表明, 壳寡糖对烟草花叶病毒的抑制率为 66.39%, 还可以提高烟草叶片中 SOD、POD、CAT、PAL 的活 性[17]。本研究的结果与这3个研究的结果基本一致。

#### 参考文献:

- [1] 贺学礼. 植物学[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [2]李堆淑,胡景江. 低聚壳聚糖诱导大叶黄杨抗白粉病的组织病理学机制[J]. 西北林学院学报,2009,24(5):106-109.
- [3]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.
- [4]李 金,臧 威,孙剑秋,等. 植物诱导抗病性研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(18):7745-7746,7755.
- [5]张付云,赵小明,白雪芳,等. 壳寡糖诱导植物抗病性研究进展 [J]. 中国生物防治,2008,24(2):174-178.
- [6]王 雅,田 芳,谭小艳,等. 枯草芽孢杆菌菌株 Bv10 对大叶黄杨 白粉病的防治效果[J]. 南阳师范学院学报,2013,12(3);26-27,40.
- [7]钱玉梅,高贵珍,张兴桃,等. 3 种酢浆草过氧化物酶的研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(23):6102-6104.

徐 华,程顺成,周红军,等. 毒死蜱羧甲基纤维素钠接枝聚丙烯酸酯纳米粒子水分散剂的制备与表征[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):68-71. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.018

# 毒死蜱羧甲基纤维素钠接枝聚丙烯酸酯纳米粒子 水分散剂的制备与表征

徐 华,程顺成,周红军,周新华,林冠权,陈铧耀 (仲恺农业工程学院化学化工学院,广东广州510225)

摘要:利用甲基丙烯酸甲酯和丙烯酸丁酯为混合接枝单体,采用自由基共聚方法制备羧甲基纤维素钠接枝聚丙烯酸酯共聚物(CMC-g-PAE),采用傅氏转换红外线光谱分析仪和差示扫描量热法(differential scanning calorimeter,简称 DSC)对其结构进行表征。以 CMC-g-PAE 为载体,以毒死蜱(chlorpyrifos,简称 CH)为模型农药,利用 CH 在载体大分子自组装形成的胶束中的增溶作用,制备 CH/CMC-g-PAE 纳米粒子水分散剂;采用扫描电镜、粒度分析仪、DSC 对其形态结构、粒径大小及分布、农药的相态进行研究,探讨载体浓度和药物浓度对其粒径及载药率的影响。结果表明,纳米粒子呈现规则的球形,其平均粒径为 200~240 nm,粒径分布较窄;毒死蜱以非晶体相存在于纳米粒子中:纳米粒子的粒径及其对药物的载药率可以通过改变 CH 和 CMC-g-PAE 溶液的浓度进行有效调控。

关键词:毒死蜱;羧甲基纤维素钠接枝聚丙烯酸酯共聚物;纳米粒子;结构表征;丁达尔现象;粒度分布;载药率;纳 米农药

中图分类号: TQ450.6<sup>+</sup>3 文献标志码: A 文章编号:1002-1302(2018)01-0068-04

常规剂型农药成分释放速度快,容易流失或淋溶,利用率低,会对环境造成污染<sup>[1]</sup>。高效、环境友好、缓释是当前农药制剂发展的主要目标,能起到减施增效的目的。纳米农药制剂是一种新型农药制剂,相对于传统农药,纳米农药制剂不仅可以实现缓释,还可以增大农药制剂与作物叶片和害虫的接触面积,提高农药的有效利用率。国内外研究者对纳米农药制剂产生了浓厚的兴趣,目前已有的纳米制剂所用微胶囊壁材研究集中在壳聚糖及其衍生物<sup>[2-3]</sup>、聚乳酸及其共聚物<sup>[4-6]</sup>及其他一些载体<sup>[7-8]</sup>,而以羧甲基纤维素钠(carboxy

收稿日期:2016-08-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:21576303);广东省科技计划 (编号:2014A020208126、2015A020209197、2015A020209185);广 东省教育厅特色创新项目(编号:2015KTSCX064、 2014KQNCX163)。

作者简介:徐 华(1983—),男,湖北洪湖人,博士,讲师,主要从事农 药缓释制剂的制备与应用等研究。E-mail:dlutxuhua@163.com。通信作者:周新华,博士,教授,主要从事绿色精细化学品研究。E-mail:cexinhuazhou@163.com。

- [8] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [9] Stewart R R, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes [J]. Plant Physiology, 1980, 65 (2):245-248.
- [10]高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006:210.
- [11]程小龙. 外源水杨酸诱导烟草抗青枯病的作用及机理研究 [D]. 重庆:西南大学,2014.
- [12]朱振元. 寡糖激发子的化学合成及诱导烟草对黑胫病抗性的研究[D]. 杭州:浙江大学,2003.

methyl cellulose,简称 CMC)为载体制备纳米农药制剂的报道较少。CMC 是一种水溶性较好的聚阴离子化合物,广泛应用在食品、医药等领域<sup>[9]</sup>,将 CMC 与单体共聚接枝提高其疏水性,将接枝共聚物用于吸水性树脂、表面活性剂、吸附剂及涂料等领域的应用已有一些研究<sup>[10-13]</sup>,但将其用在农药载体领域还鲜见报道。本试验以亲水性的羧甲基纤维素钠为基体,以丙烯酸酯为单体,运用自由基聚合机制,采用无皂乳液聚合方法,合成双亲性的羧甲基纤维素钠接枝丙烯酸酯共聚物(CMC-g-PAE)。将 CMC-g-PAE 作为载体,以毒死蜱为模型农药,利用胶束增溶作用,制备农药纳米粒子水分散剂,并对其结构进行表征,以期为开发价廉、环境友好的新型纳米农药水分散剂提供理论基础与技术指导。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

1.1.1 试验试剂 羧甲基纤维素钠、丙烯酸丁酯(butylacrylate,简称 BA)、甲基丙烯酸甲酯(methyl methacrylate,简称 MMA)、过硫酸钾(KPS)均为分析纯,均购自阿拉丁试剂

- [13] 白春微, 蒋选利. 几种诱导因子对水稻纹枯病的诱导抗病性研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11):116-118.
- [14] 秋文伟. 壳寡糖在蔬菜生产上的应用[J]. 北方园艺,2016(8): 54-55.
- [15] 谭姣姣,李 江,何培青. 南极菌 $\beta$ -3 胞外寡聚糖对黄瓜的诱导抗病作用[J]. 安徽农业科学,2010,38(30):16903-16905.
- [16]李堆淑. 生活垃圾堆肥菌剂诱导桔梗抗腐皮镰刀菌研究[J]. 商洛学院学报,2016,30(6);58-62.
- [17]孙翠红,徐翠莲,赵铭钦,等. 壳寡糖及其衍生物抗烟草花叶病毒机理的初步研究[J]. 中国烟草科学,2015,36(2):87-92.