

朱 雷,黄 云,李洪浩,等. 离子钛对致病疫霉生物活性的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):117-120.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.021

# 离子钛对致病疫霉生物活性的影响

朱 雷<sup>1,2</sup>,黄 云<sup>2</sup>,李洪浩<sup>1</sup>,陶 向<sup>3</sup>,席亚东<sup>1</sup>,沈学善<sup>4</sup>

(1. 四川省农业科学院植物保护研究所/农业部西南作物有害生物综合治理重点实验室,四川成都 610066;

2. 四川农业大学农学院,四川成都 611130; 3. 四川师范大学,四川成都 610101;

4. 四川省农业科学院土壤肥料研究所,四川成都 610066)

**摘要:**为明确不同浓度钛离子对致病疫霉菌丝生长、孢子囊释放游动孢子、游动孢子萌发和致病力等方面的影响,通过在含有不同浓度钛离子的黑麦蔗糖琼脂培养基上培养致病疫霉,以及配置含不同浓度离子钛的致病疫霉孢子悬浮液,分析离子钛对致病疫霉生长和致病力的抑制效果。结果表明,16  $\mu\text{g/mL}$  钛离子处理对菌丝生长和孢子囊释放游动孢子具有较强的抑制作用,平均抑制率分别为 95.77%、99.04%,而 32  $\mu\text{g/mL}$  钛离子处理对游动孢子萌发和致病力具有较强的抑制作用,平均抑制率分别为 92.72%、91.11%。离子钛对致病疫霉菌丝生长、孢子囊释放游动孢子、游动孢子萌发和致病力等方面抑制效果与钛离子浓度成正比,这为马铃薯晚疫病环境友好型药剂的开发提供了理论依据。

**关键词:**离子钛;致病疫霉;生物活性;马铃薯晚疫病;抑制作用

**中图分类号:**S435.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)20-0117-04

由致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起的马铃薯晚疫病是对马铃薯生产极具毁灭性的病害<sup>[1]</sup>。目前,马铃薯晚疫病仍以化学农药防治为主,由此导致的环境污染、粮食安全、病原菌抗药性<sup>[2]</sup>等问题尤为突出。《到 2020 年农药使用量零增长行动方案》的提出进一步提升了环境友好型农药研发的重要性。钛是地球表面分布较为广

泛的元素之一,对促进植物生长,提高作物产量和品质有明显的作用<sup>[3]</sup>。钛元素通常以氧化物、硅酸盐结合态或钛铁矿存在,难以被植物吸收利用<sup>[4]</sup>。而由钛谷(天津)科技有限公司生产的离子钛(titanium ion of variable valence with light energy,简称 TIVL)中钛元素以离子的形式存在,溶于水中,对多种细菌的生长具有抑制作用<sup>[5]</sup>。探讨离子钛对致病疫霉生物活性的影响,可以为研究其抑菌机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

试验于 2019 年在四川省农业科学院植物保护研究所/农业部西南作物有害生物综合治理重点实验室完成。

收稿日期:2019-12-16

基金项目:四川省科技计划(编号:2016NYZ0053);国家现代农业产业技术体系四川创新团队项目(编号:川农函[2019]472号)。

作者简介:朱 雷(1993—),男,重庆云阳人,硕士,研究实习员,从事马铃薯晚疫病防治。Tel:(028)84590050;E-mail:nbweare@qq.com。

通信作者:李洪浩,博士,助理研究员,从事马铃薯病虫害防治研究。Tel:(028)84590050;E-mail:leehh071@126.com。

区油菜产量增加 20% 以上,二者差异显著。

试验药剂 50% 草除灵悬浮剂在推荐剂量 225 ~ 300  $\text{g/hm}^2$  (有效成分)下使用,可以安全、方便、高效地防除油菜田 1 年生阔叶杂草,建议施药适期为阔叶杂草出齐后 2 ~ 4 叶期茎叶喷雾法施药,用水量 600  $\text{L/hm}^2$  均匀喷雾。

## 参考文献:

[1] 刘 成,冯中朝,肖唐华,等. 我国油菜产业发展现状、潜力及对

策[J]. 中国油料作物学报,2019,41(4):485-489.

[2] 黄怡兵,胡宇舟,吴旦霓. 咸宁市 2015 年油菜菌核病发生特点及防治对策[J]. 湖北植保,2015(6):60-62.

[3] 唐建明,王 勇,方雅琴. 油菜田常用除草剂药害及规避措施[J]. 杂草科学,2010(1):64-66.

[4] 朱文达,魏守辉,张朝贤. 湖北省油菜田杂草种类组成及群落特征[J]. 中国油料作物学报,2008,30(1):100-105.

[5] 刘 学,吴新平,朱文达,等. 湖北移栽油菜田牛繁缕的发生规律及防除策略[J]. 植物保护学报,2006,33(1):104-108.

[6] 鲁军雄,陈社员,官春云,等. 稻茬油菜田杂草的发生规律及防除[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2013,39(4):393-400.

## 1.1 试验材料

1.1.1 供试试剂 离子钛由中国科学院成都生物研究所提供, 钛离子母液浓度为  $4 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ , 用无菌水梯度稀释到 320、160、80、40、20、10  $\mu\text{g/mL}$  备用。

1.1.2 供试菌株 马铃薯致病疫霉采自四川省、贵州省、云南省、湖北省和重庆市马铃薯主产区, 由四川省农业科学院植物保护研究所分离和保存, 纯化、保存 54 份马铃薯致病疫霉。

1.1.3 供试培养基 黑麦蔗糖琼脂 (rye sucrose agar, 简称 RSA) 培养基: 60 g 黑麦, 8 g 琼脂, 20 g 蔗糖, 蒸馏水定容至 1 L。

## 1.2 试验方法

1.2.1 致病疫霉分离培养 对分别采自四川省、贵州省、云南省、湖北省和重庆市马铃薯主产区的马铃薯晚疫病病叶进行消毒处理, 取病健部  $1 \text{ cm}^2$  叶片置于已消毒的新鲜马铃薯薯片下, 将放置有病样和薯片的培养皿置于  $18^\circ\text{C}$  黑暗条件下, 5 d 后挑取薯片上菌丝于黑麦蔗糖琼脂培养基上, 继续在  $18^\circ\text{C}$  黑暗条件下培养。

1.2.2 致病疫霉菌悬液的制备 取致病疫霉菌落边缘  $1 \text{ cm}^2$  菌块, 置于经消毒的新鲜马铃薯薯片下, 于  $18^\circ\text{C}$  黑暗条件下培养 5 d 后, 挑取薯片上菌丝于无菌水中, 振荡后经双层纱布过滤, 获得致病疫霉孢子囊悬浮液, 用血球计数板调整孢子囊浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL。将致病疫霉孢子囊悬浮液置于  $6^\circ\text{C}$  条件下 3 h 刺激孢子囊释放游动孢子, 获得致病疫霉游动孢子悬浮液, 并用血球计数板调整游动孢子浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL。

1.2.3 含钛平板和含钛菌悬液的制备 含钛黑麦蔗糖琼脂培养基平板的制备: 在 90 mm 培养皿中分别加入 160、80、40、20、10  $\mu\text{g/mL}$  离子钛 1.5 mL 与 13.5 mL 黑麦蔗糖琼脂培养基, 充分摇匀后冷凝, 使离子钛终浓度分别为 16、8、4、2、1  $\mu\text{g/mL}$ , 以不含离子钛的培养基为对照。

含离子钛菌悬液的制备: 在 60 mm 培养皿中先加入 9 mL 浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL 的致病疫霉孢子囊悬浮液, 再分别加入 1 mL 浓度为 160、80、40、20、10  $\mu\text{g/mL}$  的含离子钛溶液, 以不含离子钛的无菌水为对照, 分别获得离子钛浓度为 16、8、4、2、1、0  $\mu\text{g/mL}$  的致病疫霉孢子囊悬浮液 10 mL; 同样, 在 60 mm 培养皿中先加入 9 mL 浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的致病疫霉游动孢子悬浮液, 再分别加入 1 mL 浓度

为 320、160、80、40、20、10  $\mu\text{g/mL}$  的含离子钛溶液, 以不含离子钛的无菌水为对照, 分别获得离子钛浓度为 32、16、8、4、2、1、0  $\mu\text{g/mL}$  的致病疫霉游动孢子悬浮液 10 mL。

1.2.4 离子钛对生物学特性的影响测定 致病疫霉菌丝生长: 在含离子钛 16、8、4、2、1  $\mu\text{g/mL}$  和不含离子钛的黑麦蔗糖琼脂培养基平板中央接种直径为 5 mm 致病疫霉菌饼后, 经 2 500 lx 光照 2 h, 置于  $18^\circ\text{C}$ , 黑暗条件下, 每个处理重复 3 次, 7 d 后采用十字交叉法统计菌落直径。平板菌落直径用平均值  $\pm$  标准偏差表示, 抑菌率 = (对照组平均菌落生长直径 - 处理组平均菌落生长直径) / 对照组平均菌落生长直径  $\times 100\%$ , 以 t 检验分析组间差异,  $P < 0.05$  视为差异显著,  $P < 0.01$  视为差异极显著。

致病疫霉游动孢子释放: 将含离子钛 16、8、4、2、1、0  $\mu\text{g/mL}$  的致病疫霉孢子囊悬浮液经 2 500 lx 光照 2 h 后, 置于  $6^\circ\text{C}$ 、黑暗条件下培养 3 h, 统计每 20 个致病疫霉孢子囊中游动孢子的释放数, 每个处理重复 3 次。

致病疫霉游动孢子萌发: 将含离子钛 32、16、8、4、2、1、0  $\mu\text{g/mL}$  的致病疫霉游动孢子悬浮液经 2 500 lx 光照 2 h 后, 置于  $18^\circ\text{C}$ 、黑暗条件下培养 12 h, 统计每 20 个游动孢子的萌发数, 每个处理重复 3 次。

致病疫霉致病力: 将含离子钛 32、16、8、4、2、1、0  $\mu\text{g/mL}$  的致病疫霉游动孢子悬浮液接种于马铃薯组培苗离体叶片, 每张叶片接种 5  $\mu\text{L}$ , 每个处理 15 张叶片, 重复 3 次, 在  $18^\circ\text{C}$ 、光—暗条件为 16 h—8 h 条件下培养 5 d 后统计发病叶片数。

## 1.3 数据统计

利用 Microsoft Excel 2007 进行数据处理和图表制作, 利用 DPS v7.05 进行数据差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 离子钛对致病疫霉菌丝生长的抑制作用

由表 1 可知, 各浓度钛离子对致病疫霉菌丝生长的平均抑制率存在显著差异, 其中 16  $\mu\text{g/mL}$  离子钛处理对致病疫霉菌丝生长的平均抑制率最高, 为 95.77%。离子钛对不同省(市)致病疫霉的半最大效应浓度 ( $\text{EC}_{50}$ ) 差异较大, 最高为 15.007 3  $\mu\text{g/mL}$ , 最低为 2.396 8  $\mu\text{g/mL}$ , 平均  $\text{EC}_{50}$  为 5.3 321  $\mu\text{g/mL}$  (表 2)。

表 1 不同浓度离子钛对致病疫霉菌丝生长的抑制效果

| 钛离子浓度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 平均抑制率<br>(%)        |
|-------------------------------|---------------------|
| 1                             | 5.43 $\pm$ 10.32De  |
| 2                             | 10.91 $\pm$ 20.39Dd |
| 4                             | 22.20 $\pm$ 17.66Cc |
| 8                             | 53.51 $\pm$ 9.88Bb  |
| 16                            | 95.77 $\pm$ 4.98Aa  |

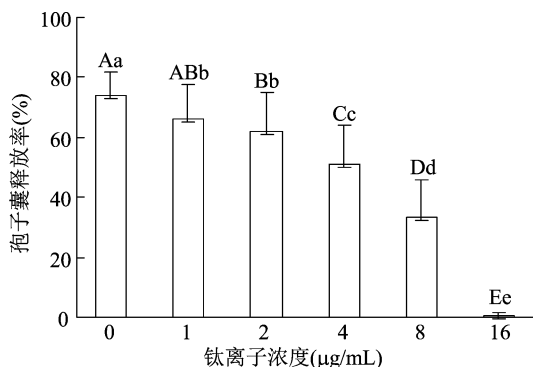
注:同列数据后不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

表 2 离子钛对不同省市致病疫霉的  $\text{EC}_{50}$ 

| 地点  | 菌株数<br>(株) | $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |         | 标准偏差    |
|-----|------------|---------------------------------------|---------|---------|
|     |            | 范围                                    | 平均值     |         |
| 贵州省 | 7          | 2.797 9 ~ 15.007 3                    | 6.704 0 | 4.164 4 |
| 湖北省 | 6          | 3.688 0 ~ 14.486 2                    | 5.995 2 | 4.184 6 |
| 四川省 | 29         | 2.396 8 ~ 13.192 2                    | 4.892 0 | 2.268 0 |
| 云南省 | 6          | 3.633 5 ~ 5.500 2                     | 4.544 6 | 0.652 7 |
| 重庆市 | 6          | 3.225 3 ~ 8.980 3                     | 5.982 8 | 2.308 9 |
| 合计  | 54         | 2.396 8 ~ 15.007 3                    | 5.332 1 | 2.720 0 |

## 2.2 离子钛对致病疫霉游动孢子释放的影响

由图 1 可知,致病疫霉孢子囊在钛离子浓度为 0、1、2、4、8、16  $\mu\text{g/mL}$  时的游动孢子平均释放率分别为 74.05%、65.95%、62.14%、51.19%、33.33%、0.71%。差异性分析结果表明,1  $\mu\text{g/mL}$  钛离子试验组的游动孢子释放率与对照组(0  $\mu\text{g/mL}$ )之间存在显著性差异( $P < 0.05$ ),而钛离子浓度为 2、4、8、16  $\mu\text{g/mL}$  的游动孢子平均释放率与对照组之间存在极显著差异( $P < 0.01$ ),其中,16  $\mu\text{g/mL}$  的离子钛对致病疫霉孢子囊游动孢子释放有明显的抑制作用,平均抑制率为 99.04%。



不同大、小写字母表示处理间在 0.01、0.05 水平上差异显著。下同

图1 不同浓度离子钛对致病疫霉孢子囊游动孢子释放的抑制作用

## 2.3 离子钛对致病疫霉游动孢子萌发的影响

由图 2 可知,致病疫霉游动孢子在钛离子浓度为 0、1、2、4、8、16、32  $\mu\text{g/mL}$  时的平均萌发率分别为 91.67%、86.67%、71.67%、51.67%、36.67%、25.00%、6.67%。差异性分析结果表明,含 2、4、8、16、32  $\mu\text{g/mL}$  钛离子的游动孢子平均萌发率与对照组(0  $\mu\text{g/mL}$ )之间存在极显著性差异( $P < 0.01$ ),游动孢子萌发率随钛离子浓度的增加而下降,说明离子钛对致病疫霉游动孢子萌发有一定的抑制作用,其中 32  $\mu\text{g/mL}$  离子钛处理的平均抑制率最高,为 92.72% (图 2)。

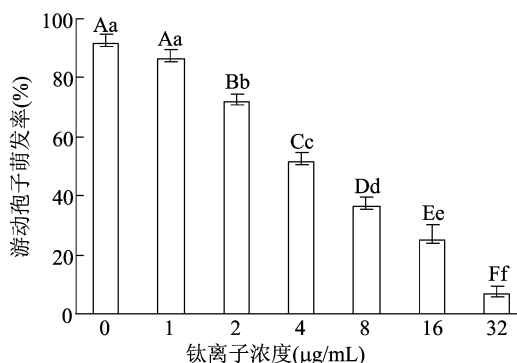


图2 不同浓度离子钛对致病疫霉游动孢子萌发的抑制作用

## 2.4 离子钛对致病疫霉致病力的影响

由图 3 可知,致病疫霉游动孢子在钛离子浓度为 0、1、2、4、8、16、32  $\mu\text{g/mL}$  时侵染马铃薯叶片,叶片平均发病率分别为 100.00%、100.00%、100.00%、100.00%、97.78%、84.44%、8.89%。差异性分析结果表明,试验组 16、32  $\mu\text{g/mL}$  离子钛处理的叶片发病率与对照组(0  $\mu\text{g/mL}$ )之间存在极显著性差异( $P < 0.01$ ),对致病疫霉致病力的平均抑制率分别为 15.56%、91.11%。

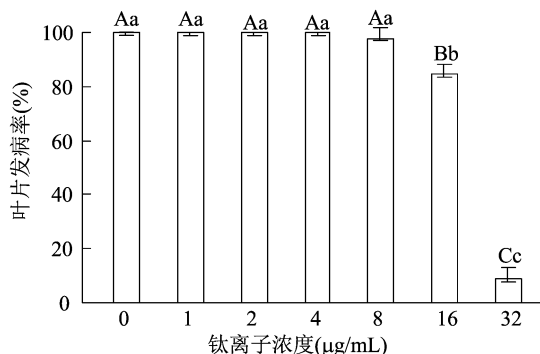


图3 不同浓度离子钛对致病疫霉侵染力的抑制作用

## 3 结论与讨论

我国作为全球第一马铃薯生产国,为保证粮

食安全,我国启动马铃薯主粮化战略,马铃薯成为继水稻、小麦、玉米之后的第四大主粮。而马铃薯晚疫病作为危害马铃薯生产的重要病害,每年造成数十亿美元的损失,其防治措施主要是喷施化学农药<sup>[6-9]</sup>。粮食安全和生态保护上升为国家战略,针对病虫害的绿色防控技术应用的呼声愈发高涨,结合农业供给侧改革,开发和使用高效低毒低残留药剂势在必行。离子钛利用钛具有外层电子活跃、对光敏感且发生化合价跳跃的特性,在促进植物养分的吸收和运转、提高植物体内多种酶的活性、增加叶片中叶绿素的含量、提高作物产量和品质<sup>[10-11]</sup>的同时,还具有提高植物抗逆性<sup>[12]</sup>和抑制细菌生长<sup>[5]</sup>等方面的作用,有望成为环境友好型农药。

致病疫霉是寄生性极强的兼性寄生菌,主要以游动孢子形成的休止孢产生芽管,自气孔或表皮直接侵入马铃薯块茎和叶片。本研究中离子钛对致病疫霉菌丝生长、孢子囊释放游动孢子、游动孢子萌发和致病力具有一定的抑制作用,其中 32  $\mu\text{g/mL}$  的离子钛处理对游动孢子萌发和致病力具有较强的抑制作用,而 16  $\mu\text{g/mL}$  的离子钛处理对致病疫霉菌丝生长和孢子囊释放游动孢子具有较强的抑制作用,但对致病疫霉致病力的平均抑制率较低,仅为 15.56%,这与致病疫霉致病力强有关,即使游动孢子浓度为 1 个/ $\mu\text{L}$ ,仍能成功感染叶片。同时,经 400 倍光学显微镜观察,未发现 32  $\mu\text{g/mL}$  的离子钛处理对菌丝生长端、孢子囊和游动孢子的形态产生明显影响。

目前,对离子钛的抑菌机制尚未见报道,但研究表明与离子钛相关的  $\text{TiO}_2$  对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、霉菌及单细胞藻类均具有良好的杀灭效果<sup>[13]</sup>,推测离子钛主要是通过破坏细胞壁和细胞膜的完整性、干扰代谢途径、抑制蛋白质和核酸的合成等方面体现抑菌作用<sup>[5]</sup>。钛作为一个变价元素,在太阳光的作用下,其化合价可在四价和三价间反复变化,使钛具有较强的氧化还原能力,参与植物

光合作用、生物固氮等重要生化过程的电子传递<sup>[7]</sup>。此外,离子钛对环境 and 生物友好,探讨离子钛对致病疫霉生物活性的影响,为进一步研究其抑菌机制和环境友好型药剂的开发提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1]李洪浩,淳俊,王克秀,等. CARAH 预警模型在马铃薯晚疫病防治药剂减量增效中的应用[J]. 中国植保导刊,2018,38(12): 33-37,13.
- [2]路粉,赵建江,刘晓芸,等. 马铃薯晚疫病菌对甲霜灵的抗性监测及替代药剂防治效果[J]. 中国农业科学,2018,51(14): 2700-2710.
- [3]Pais I. The biological importance of titanium[J]. Journal of Plant Nutrition,1983,6(1):3-131.
- [4]许国栋,王桂生. 钛金属和钛产业的发展[J]. 稀有金属,2009,33(6):903-912.
- [5]范延芬,魏春梅,李彩侠,等. 光能变价离子钛对多种细菌的抑制作用[J]. 应用与环境生物学报,2016,22(6):1150-1155.
- [6]Fry W E. *Phytophthora infestans*: new tools (and old ones) lead to new understanding and precision management[J]. Annual Review of Phytopathology,2016,54(1):529-547.
- [7]张建新,姚凤兰. 杀菌剂防治马铃薯晚疫病田间药效试验[J]. 农药,2018,57(7):532-535.
- [8]马永强,朱海霞,郭青云. 马铃薯晚疫病病害动态规律及药剂防治技术研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(20):123-125.
- [9]陈瑾,胡茜青,赖瑞联,等. 69% 代森锰锌·精苯霜灵水分散粒剂防治马铃薯晚疫病田间防效[J]. 农药,2019,58(1):65-66,75.
- [10]范秀菊. 钛的氧化还原特性及其在植物生化过程中的作用[J]. 中国土壤与肥料,2012(5):1-4.
- [11]曾艳玲,谭晓风,张斌,等. 钛离子注入对油茶种子生理生化反应及初期生长的影响[J]. 中国农学通报,2011,27(28): 53-57.
- [12]邢小军,张建慧,王勇. 离子钛对烟苗生长和烟叶产质量的影响[J]. 中国烟草科学,2010,31(6):38-40.
- [13]Vatansever F, de Melo W C, Avci P, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species: bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond [J]. FEMS Microbiology Reviews,2013,37(6):955-989.