

# 植物免疫诱抗剂研究进展 II

## ——商品化植物免疫诱抗剂特性及功效研究

阮松林 肖文斐 忻雅 裘劫人 柴伟国

(杭州市农业科学研究院生物技术研究所, 浙江 杭州 310024)

**摘要:** 本文主要介绍商品化植物免疫诱抗剂种类、特性及功效研究, 并对基于植物免疫诱抗剂的农药减施增效技术研究进行了讨论与展望。

**关键词:** 商品化植物免疫诱抗剂 特性 功效 农药减施增效

### 1 商品化植物免疫诱抗剂种类

近年来, 国内外相继开发出了商品化的植物抗病诱抗剂(见表 1)。美国 Eden Biosciences 公司的 Messenger 有效成分源于火疫病菌(Erwinia amylovory)中的 harpin 蛋白, 用于防治柑桔、胡椒、番茄、黄瓜、草莓等白粉病; Redox Chemicals 公司的 Oxycom 和 Morse 公司的 KeyPlex, 有效成分是某些有机酸和微肥, 用于防治柑桔和香蕉叶斑病; 瑞士先正达公司的植物抗病诱导剂 Actigard 可与杀菌剂混用防治西瓜霜霉病, 能够显著提高杀菌剂的效果, 大大降低化学农药的使用量; 韩国旭成化学公司的壳聚糖(Chitosan)来源于虾蟹等生物的外

壳, 用于处理小麦、水稻、大豆等种子, 具有防病增产作用, 还可用于蔬菜病害防治和果品保鲜。上述产品在一些国家市场上已经开始销售。目前国内已经在农业部药检所获得正式登记的植物免疫诱抗药物主要有康壮素(蛋白质激发子)、益微菌(枯草芽胞杆菌)、壳寡糖和脱落酸等共计 21 个品种。中国农业科学院植物保护研究所在植物免疫诱抗剂基础上又研制出我国第一个抗病毒蛋白质生物农药“阿泰灵(6%寡糖·链蛋白可湿性粉剂)”。田间试验结果表明, 该药剂对水稻条纹叶枯病的防治效果为 65%, 对番茄黄化曲叶病毒病的防治效果为 68%, 对烟草花叶病毒病的防治效果为 75%。

基金项目 杭州市农业与社会发展科研自主设计项目(20172015A02)和杭州市重大科技创新项目(20131812A02)

作者简介 阮松林(1969-)男, 浙江上虞人, 博士, 研究员, 主要研究方向为植物功能蛋白质组学。

Tel 0571-87093826 E-mail ruansl1@hotmail.com

表1 国际上已获得农药登记注册的植物免疫诱抗剂

种 类	生产公司	功能
Messenger	美国 EDENProduction company 公司	杀菌剂
苯并噻二唑(BTH)噻二唑 Benzothiadiazole	诺华(现瑞士先正达)公司	杀菌剂
KeyPlex 腐殖酸 KeyPlex humic acid	美国 KeyPlex 公司	植物生长调节剂
烯丙异噻唑噻菌灵 Oryzemat	日本明治制果公司	杀菌剂
Serenade Bacillus subtilis	美国 AgraQuest	杀菌剂
昆布素 Laminarin	法国 Goemar 公司	杀菌剂
Oxycom	美国 Redox Chemicals 公司	杀菌剂
壳聚糖 Chitosan	韩国旭成化学公司	生长调节剂、保鲜剂、杀菌
Actigard	瑞士先正达公司	杀菌剂
NCI	日本化药公司	杀菌剂
吡唑醚菌酯 Pyraclostrobin	德国巴斯夫有限公司	植物生长调节剂、杀菌剂
植物激活蛋白 Plant activate protein	丰汇华农(北京)生物科技股份有限公司(中国农业科学院植物保护研究所)	植物生长调节剂
S-ABA	中科院成都生物研究所	植物生长调节剂
寡糖链蛋白(阿泰灵)Oligosaccharide chain protein	中国农业科学院植物保护研究所	抗植物病毒剂
氨基寡糖素 Amino oligosaccharide	海南正业中农高科股份有限公司、大连凯飞化学股份有限公司	诱抗剂、杀菌剂
甲噻诱胺 thiazide induced amine	南开大学	激活剂、抗病毒剂
香菇多糖 Mushrooms polysaccharide	北京燕化永乐农药有限公司、山东圣鹏农药有限公司	植物生长调节剂、抗病毒剂
井冈霉素 Validamycin	浙江桐庐汇丰生物科技有限公司	杀菌剂
苦参碱 Matrine	北京三浦百草绿色植物制剂有限公司、内蒙古帅旗	杀虫剂

## 2 植物免疫诱抗剂特性及功效研究

### 2.1 植物激活蛋白

植物激活蛋白能诱导植物的信号传导,激活植物自身防卫系统和生长系统,显著提高植物抗病相关酶类的活性及其生长相关物质的积累,促进光合作用、生长发育、免疫反应、信号转导及翻译转录相关基因的上调表达,这些基因参与了植物的生物和非生物胁迫反应、外在及内在刺激的应激反应及生长发育相关过程。中国农业科学院植物保护研究所首次从极细链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)中分离获得了全新序列的激活蛋白 PeaT1 和 Hrip1,具有诱导烟草对 TMV 的抗性、提高水稻幼苗抗旱性和

促进小麦低温生长的功能。利用蛋白质沉淀技术和各种离子交换层析技术,从极细链格孢真菌菌丝体中分离纯化获得了激活蛋白 PeaT1。通过生物质谱获得该蛋白的氨基酸序列,设计引物克隆获得了该蛋白的基因序列(GenBank accession number: EF030819)。peaT1 基因编码 207 个氨基酸,蛋白分子量为 22.63 kDa<sup>[1-2]</sup>。生物信息学分析表明,peaT1 基因与所有已报道的基因序列同源性较低,是一个新蛋白。并发现了激活蛋白在烟草细胞膜上的结合蛋白,明确了激活蛋白是通过与烟草细胞膜上的蛋白结合,启动植株抗病信号的传导,引起抗性基因和抗病蛋白的上调表达,进而促进抗病相关物质积累,提高植物抗病性的。研究还发现激活蛋白能降

低烟草叶片中病毒 RNA 含量、干扰 TMV 外壳蛋白的体外聚合,阻碍病毒粒子的形成,从而减轻病毒病的发生。蛋白结构研究表明,PeaT1 单体中含有 NAC 结构域,两个 NAC 结构域互相交错形成的孔洞是蛋白稳定的耐热中心,此外,PeaT1 中  $\beta$  折叠和  $\alpha$  螺旋的相对稳定随温度改变的可恢复性变化,是维持蛋白质热稳定的结构基础,此研究结果为蛋白质农药的分子设计提供了理论依据<sup>[3]</sup>。赵利辉等利用酵母双杂交、免疫荧光和现代分子生物学技术,系统的研究了激活蛋白 PeaT1 诱导多种植物抗病、促生长的分子基础和信号传导途径。郑建华等<sup>[4]</sup>明确了 PeaT1 在烟草细胞膜上的蛋白结合位点,阐明了 PeaT1 诱导的烟草植物中 TMV 外壳蛋白基因转录水平下降、体外聚合受限,从而使病毒外壳蛋白含量降低,病毒粒子减少的机理,研究结果对进一步阐明植物与病毒间的互作机制具有一定的指导意义。过敏反应是植物抗病的重要特征之一。前人对过敏蛋白及其功能的研究主要集中在细菌产生的、能引起烟草过敏反应的蛋白及其基因特征。本研究团队以引起烟草叶片 HR 为示踪,从极细链格孢真菌代谢物中分离出另一种新蛋白激发子 Hrip1,并获得该编码的基因序列(GenBank accession number HQ713431),Hrip1 基因编码 163 个氨基酸,蛋白分子量 17.56kDa,等电点为 5.50。表达蛋白具有提高烟草抗 TMV 和促进小麦生长的双重功能。机理研究表明,激活蛋白能激发烟草细胞  $Ca^{2+}$  流变化,氧爆发、NO 产生、诱导蛋白激酶和防卫基因的上调表达,提高烟草对 TMV 的系统抗性<sup>[5-6]</sup>。

## 2.2 壳寡糖

壳寡糖是一类来源于甲壳动物外壳的具有生物调节功能的碳水化合物,可以增强植物抗病原微生物的能力,以其为诱导物使植物获得系统抗病性已成为有效的植物保护措施之一。壳寡糖对 TMV 侵染烟草具有良好的保护作用。商文静等<sup>[7-9]</sup>研究了壳寡糖诱导对烟草体内 TMV 增殖的影响,结果表

明,普通烟经 50 $\mu$ g/mL 壳寡糖溶液诱导处理后,其对 TMV 的侵染表现出高水平的系统抗病性,病毒病发病推迟 4~7d,平均严重度降低了 82.9%。壳寡糖和壳聚糖的区别在于聚合度和分子质量的不同,电镜观察结果表明,经壳寡糖诱导处理的烟草与未经处理的烟草相比,系统症状减轻,叶肉细胞和筛管中病毒粒体显著减少,叶肉中细胞器基本完好,液泡内和细胞间隙出现大量电子致密物质,这些差异是系统诱导抗病性在细胞和亚细胞水平的表现,从而在细胞水平上证实了壳寡糖可诱导烟草抵抗 TMV 的侵染。

## 3 展望

毋庸置疑,植物病虫害化学防治确保了我国粮食连年增产稳产,但由于化学农药的长期不合理使用,严重威胁了环境和农产品质量安全。据统计,我国现有农药品种 600 多个,年产量 200 多万吨(折纯),而靶标作物上的农药利用率仅为 35%,65% 农药飘失或流失到非靶标作物、土壤或水域中。如果将农药的有效利用率提高 10 个百分点,每年就可以节约农药 3 万吨(折纯)。2015 年 3 月农业部印发关于《到 2020 年农药使用量零增长行动方案》,提出到 2020 年,全国初步建立资源节约型、环境友好型病虫害可持续治理技术体系,科学用药水平明显提升,单位防治面积农药使用量控制在近三年平均水平以下,力争实现农药使用总量零增长。为此,中国农药发展与应用协会发出倡议,号召广大药企尽快顺应农业发展的新形势,调整产品结构,确保农药质量,积极参与到农药减量增效行动计划中来,大力倡导绿色防控,加大宣传、推广、生产和使用生物农药的力度,以实现全国用药零增长的目标。

植物免疫诱抗剂使用在一定程度上提高植物抗病效果,但是目前国内外使用的植物免疫诱抗剂存在诱导效果不高,病害防治谱窄的缺点,只能用于中等偏小程度病害防治。而且药剂剂型及使用方法

单一,常表现为实际使用效果不稳定,成为农业生产关注的热点和技术的难点,制约其在农业生产上的推广应用。针对上述存在的问题,杭州市农科院植物免疫诱抗剂研发团队利用含生物活性钾的免疫增效分子(IEM)与壳寡糖复成功研制出新型高效免疫诱抗剂保康灵1号。该制剂在水稻、玉米、葡萄、黄瓜、西瓜等作物上应用表现出抗病和促生长功效<sup>[9-12]</sup>,主要表现能够促进叶片生长,增加叶片面积和厚度,提高叶绿素含量,促进光合作用增强;提高抗病性相关酶如苯丙氨酸解氨酶活性,对靶标病原菌的防效达60%~95%;提高果实产量和品质;可减施农药量30%以上,促进品质提升和食用安全性提高。

尽管目前国内商业化应用的新型诱抗剂如寡糖链蛋白、氨基寡糖素等对作物诱导抗病促长及农药减施增效作用明显,但是其对作物的诱导抗病促长及与农药协同增效机制仍不清楚,而且一整套基于这些诱抗剂的农药减施增效技术尚未形成。因此,应从诱导抗病促长机理、与农药协同增效机制及农药减施增效技术等方面着力研究,找出免疫抗性的信号传导途径和关键节点,鉴定相应的关键基因功能,为其应用提供理论支撑。此外,研究其与农药混用协同控害增效机制,通过与农药现混即用,减少化学农药喷施次数,以达农药减量控害增效之目的,形成一套基于新型诱抗剂的农药减量控害增效技术。

#### 参考文献:

- [1] 张薇,杨秀芬,邱德文,等.激活蛋白 PeaT1 诱导烟草对 TMV 的系统抗性 [J]. 植物病理学报 2010,40(3): 290-299.
- [2] 刘权,李广悦,曾洪梅,等.微生物蛋白激发子 PeaT1 的获得及诱导水稻抗旱性的初步研究[J].中国农业科技导报, 2009,11(3): 51-55.
- [3] 刘权,李唐,曾洪梅,等.通过圆二色谱研究蛋白激发子 PeaT1 的耐热性 [J]. 农业生物技术学报 2010,18(3): 592 - 596.
- [4] 郑建华,杨秀芬,石庆华,等.激活蛋白 PeaT1 在烟草细胞膜上的结合位点及其特性[J].植物病理学报 2010,40(4): 364-372.
- [5] 赵利辉,邱德文,刘峥,等.植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响 [J]. 中国农业科学 2005,38(7): 1358-1363.
- [6] 陈梅,刘峥,杨秀芬,等.植物激活蛋白对烟草花叶病毒 RNA 复制及外壳蛋白合成的抑制作用[J].中国生物防治, 2006,1: 63-66.
- [7] 商文静.壳寡糖对烟草花叶病毒的诱导抗病作用和体外抑制作用[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,博士论文, 2006.
- [8] 商文静,吴云锋,赵小明,等.壳寡糖诱导烟草抗烟草花叶病毒的超微结构研究 [J]. 植物病理学报 2007,37(1): 56-61.
- [9] 肖文斐,裘劭人,阮松林,等.免疫诱抗剂“保康灵1号”浸种处理对水稻苗期生长的影响 [J], 杭州农业与科技, 2017,1: 28-31.
- [10] 胡伟民,肖文斐,忻雅,等.免疫诱抗剂保康灵1号对鲜食糯玉米产量和抗病性的影响 [J], 浙江农业科学, 2016,57(4): 604-606.
- [11] 沈国正,刘辉,肖文斐,等.免疫诱抗剂保康灵1号对葡萄促生长与抗病的效应[J],浙江农业科学 2016,57(8): 1193-1196.
- [12] 阮松林,肖文斐,忻雅,等.植物免疫诱抗剂保康灵1号在水稻等作物上的使用技术要点[J],杭州农业与科技, 2016,3: 46-47. ■