



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103483057 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201310386126. 2

(22) 申请日 2013. 08. 30

(71) 申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市玄武区卫岗 1 号

(72) 发明人 沈其荣 蔡枫 顾小龙 陈巍

黄启为

(51) Int. Cl.

C05G 3/00 (2006. 01)

A01N 43/08 (2006. 01)

A01P 21/00 (2006. 01)

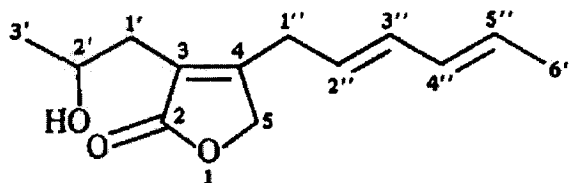
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种植物促生诱抗剂及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种植物促生诱抗剂及其制备和使用方法,属于生物技术领域。通过对哈茨木霉次生代谢物的分离纯化和活性研究,开发出一种可促进植物生长并可诱导植物产生系统抗性的液态制剂。该促生诱抗剂以木霉代谢物 Harzianolide(C₁₃H₁₈O₃) 为主要活性成分,含量 0.1 ~ 1mgkg⁻¹,辅以营养元素包括 Ca(NO₃)₂·4H₂O 200 ~ 250mgkg⁻¹、KNO₃ 150 ~ 160mgkg⁻¹、NH₄H₂PO₄ 25 ~ 30mgkg⁻¹、MgSO₄·7H₂O 120 ~ 130mgkg⁻¹、Fe-EDTA 4 ~ 5mgkg⁻¹、H₃BO₄ 0.3 ~ 0.5mgkg⁻¹、MnCl₄·4H₂O 0.2 ~ 0.3mg kg⁻¹而制成, pH6.3 ~ 6.8。该促生诱抗剂以灌根或喷施的方式施用,可显著提高番茄苗的生物量 30% 以上(干重计),促进番茄苗快速生长,同时能诱导和提高番茄苗活性氧有关的功能酶活性,增强相关防御基因表达量和番茄植株系统抗性。本发明具有制备简单、施用灵活、对环境友好、适于规模化生产等特点。



1. 一种植物促生诱抗剂产品,包括:

丁烯羟酸内酯类物质 Harzianolide ($C_{13}H_{18}O_3$), $0.1 \sim 1\text{mgkg}^{-1}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $200 \sim 250\text{mg kg}^{-1}$, KNO_3 $150 \sim 160\text{mg kg}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ $25 \sim 30\text{mg kg}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $120 \sim 130\text{mg kg}^{-1}$, Fe-EDTA $4 \sim 5\text{mg kg}^{-1}$, H_3BO_3 $0.3 \sim 0.5\text{mg kg}^{-1}$, $\text{MnCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \sim 0.3\text{mg kg}^{-1}$, Harzianolide 溶液为以甲醇为溶剂,浓度为 1000mg kg^{-1} 的溶液,以 1:1000 的体积比加入到营养液中,其余为水。

2. 权利要求 1 所述的植物促生诱抗剂的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将保藏号为 CGMCC NO. 3308 的哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) SQR-T037 菌株接种于液体马铃薯葡萄糖培养基中, $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 发酵 4 天获得木霉发酵液,用乙酸乙酯萃取发酵液中低极性部分,再用制备型液相色谱分离获得 Harzianolide 馏分;

(2) 配制各营养元素的 200 倍母液,各取一份稀释 200 倍后混匀,调节 pH 至 $6.3 \sim 6.8$,加入 Harzianolide 溶液混匀即可。

3. 权利要求 1 或 2 所述植物促生诱抗剂产品在促进植物生长方面的应用。

一种植物促生诱抗剂,包括哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) SQR-T037 促生诱抗活性物质的提取和制剂的制备。

4. 根据权利要求 3 所述植物促生诱抗剂产品在促进植物生长方面的应用,其特征在于:

将制成的促生诱抗剂以喷施或者灌根的形式于苗期施用 3 ~ 4 次,作为诱导植物产生系统抗性,同时提供植物生长所需营养的应用。

一种植物促生诱抗剂及其制备和使用方法

一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物促生诱抗剂及其制备和使用方法,属于生物技术领域。

二、背景技术

[0002] 化肥和农药是现代农业生产不可或缺的部分。长期以来,植物病害的防治主要依赖抗病品种的选育和化学农药的使用,但由于遗传育种的周期过长和转基因作物的潜在安全问题而不能得到很好的推广;且现如今社会对环境保护和生态安全问题的日益关注,限制和减少化学合成农药(肥料)被认为非常有必要。长期大量地施用化学合成肥料和农药已导致农业生态环境破坏、肥效药效降低及食品安全等诸多问题。因此,寻求一种作物增产和植物保护的新技术、新方法成为世界范围内农业科技工作者的重要研究方向。

[0003] 哈茨木霉是一种土壤习居菌,同时也是重要的促生菌和生防菌。有专家指出,开发活体微生物肥料或制剂虽可避免对环境的破坏问题,但由于其实际应用效果受环境条件影响太大而常常应用有限,而且活体菌剂的制备工序复杂,储备和运输条件较高,开发成本大。因此,研究开发由此类有益微生物产生的天然活性物质成为生物制剂研究领域的新热点,特别是集促生和抗病于一体的高效安全制剂的研究开发。现已鉴定的木霉产生的次生代谢产物达 200 多种,且其中很多都具有高活性,这为开发新型绿色肥料、农药及其他制剂提供了宝贵的天然活性资源。许多研究业已证明在植物生长发育过程中,根际促生菌(PGPR)或共生微生物可产生植物激素诸如 IAA、GAs、乙烯等影响植物生长。

[0004] 植物诱导系统抗性,是一种间接的抗病机理,是指经诱导物质处理后,植物自身产生的对多种病害具有免疫和抵抗能力而非专一的现象。植物诱导抗性具有抗病谱广、持续时间长和施用安全方便等特点,被认为是植物病害防治的新途径,近 20 年来国际上研究筛选的系统抗性诱导物质,现已发现如 2,6-二氯异烟酸(INA)、苯并噻唑类(BTH)及哈茨木霉产生的 6-戊基- α -吡喃酮(6PP)等可诱导植物对黄萎病、枯萎病和灰霉病的抗性。其中苯并噻唑类制剂(BTH)已商品化生产,但由于该诱导物为化学制剂对多种农作物有药害作用,因此开发应用程度一般;国内的其他一些诱抗剂发明专利,如申请号为 200710066038.9,发明名称为“一种诱导植物产生系统抗病性的有机无机复混肥及应用”公开了一种以工农业固体废弃物制得的具诱抗功能的复混肥,发明者将固体废弃物经物料混合和挤压造粒后生产复合肥,但固态诱导物与植物的接触面有限,不及液态制剂的流动性和易操作性,因此不能保证施用的有效性。

三、发明内容

[0005] 1、技术问题

[0006] 本发明目的在于通过对哈茨木霉次生代谢产物的分离纯化和活性研究,开发一种可促进植物生长并可诱导植物产生系统抗性的液态制剂及其制备和使用方法。

[0007] 2、技术方案

[0008] 一种植物促生诱抗剂,包括以下成分:木霉次生代谢分离物质、植物所需的大量元

素和微量元素。

[0009] 具体包括：

[0010] 木霉次生代谢分离物质为来自哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的丁烯羟酸内酯类物质 Harzianolide ($C_{13}H_{18}O_3$), $0.1 \sim 1\text{mg kg}^{-1}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $200 \sim 250\text{mg kg}^{-1}$, KNO_3 $150 \sim 160\text{mg kg}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ $25 \sim 30\text{mg kg}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $120 \sim 130\text{mg kg}^{-1}$, Fe-EDTA $4 \sim 5\text{mg kg}^{-1}$, H_3BO_4 $0.3 \sim 0.5\text{mg kg}^{-1}$, $\text{MnCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0.2 \sim 0.3\text{mg kg}^{-1}$, Harzianolide 溶液为以甲醇为溶剂, 浓度为 1000mg kg^{-1} 的溶液, 以 1:1000 的体积比加入到营养液中, 其余为水。

[0011] 所述的植物促生诱抗剂的制备方法, 其特征在于包括以下步骤：

[0012] (1) 将保藏号为 CGMCC NO. 3308 的哈茨木霉 SQR-T037 菌株 (见授权专利名称“连作黄瓜、西瓜枯萎病的生物防治菌株及其微生物有机肥料”, 专利号为 ZL200910233576) 接种于液体马铃薯葡萄糖培养基中, $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 发酵 4 天获得木霉发酵液, 用乙酸乙酯萃取发酵液中低极性部分, 再用制备型液相色谱分离获得 Harzianolide 馏分；

[0013] (2) 配制各营养元素的 200 倍母液, 各取一份稀释 200 倍后混匀, 调节 pH 至 6.3 ~ 6.8, 加入 Harzianolide 溶液混匀即可。

[0014] 所述植物促生诱抗剂产品可用在促进植物生长方面, 其特征在于：

[0015] 将制成的促生诱抗剂以喷施或者灌根的形式于苗期施用 3 ~ 4 次, 作为诱导植物产生系统抗性, 同时提供植物生长所需营养的应用。

[0016] 3、有益效果

[0017] (1) 于番茄苗期施用本发明产品 3 ~ 4 次, 可有效促进作物生长, 相比对照 (不施用该促生诱导剂) 生物量提高 30% 以上；

[0018] (2) 于番茄苗期施用本发明产品 3 ~ 4 次, 可有效诱导植物系统抗性, 植物体内防御酶活性增高、病原相关蛋白基因表达量增加、对各种病原菌的抵抗能力增强；

[0019] (3) 本发明产品以木霉发酵液的分离物为主要活性物质, 辅以植物营养元素, 制备简单, 简化了生产工艺流程, 成本低廉, 适于规模化生产；

[0020] (4) 本发明产品施用方便灵活, 可随灌溉水灌根用, 也可随药喷施, 且安全无毒, 对生态环境友好, 特别适于有机产品和无公害产品种植。

四、附图说明

[0021] 图 1 Harzianolide ($C_{13}H_{18}O_3$) 的化学结构式

[0022] 图 2 不同处理对番茄苗的促生效果 (左: 普通营养液对照; 中: 0.1mg kg^{-1} 促生诱抗剂处理; 右: 1mg kg^{-1} 生长素 IAA 处理)

[0023] 图 3 不同处理对诱导番茄苗抗菌核菌的效果 (左: 普通营养液对照; 中: 1mg kg^{-1} 促生诱抗剂处理; 右: 0.1mg kg^{-1} 促生诱抗剂处理)

[0024] 图 4 不同处理对盆栽番茄叶片功能酶活的影响

图 5 不同处理对番茄根系防御基因表达量的影响

五、具体实施方式

[0025] 1、哈茨木霉的发酵和活性物质的提取

[0026] 依照授权专利“连作黄瓜、西瓜枯萎病的生物防治菌株及其微生物有机肥料”, 专利号 ZL200910233576, 将保藏号为 CGMCC No. 3308 的哈茨木霉 SQR-T037 进行液体发酵生

产:将哈茨木霉菌株接种于液体马铃薯葡萄糖培养基(马铃薯 200g L^{-1} ,葡萄糖 20g L^{-1})中, $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 发酵4天获得木霉发酵液。

[0027] 用等体积乙酸乙酯萃取发酵液中低极性部分三次,通过无水 NaSO_4 干燥除去水分后 40°C 减压旋转蒸发获得粗提物。用适量甲醇将浆状粗提物溶解,再用制备型液相色谱分离获得Harzianolide馏分:流动相为甲醇:0.1%乙酸=60:40,流速 0.4ml min^{-1} ,色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C18($9.4\times 150\text{mm}$, $5\mu\text{m}$),紫外检测器 230nm ,柱温 30°C ,收集第19~20min的馏分,冷冻干燥获得Harzianolide纯化物(纯度 $> 95\%$)。

[0028] 2、促生诱抗剂的制备

[0029] 将提纯的Harzianolide用甲醇溶解获得浓度为 1000mg kg^{-1} 的Harzianolide溶液,再分别以1:1000和1:10000加入到配置好的营养液【 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200mg kg^{-1} 、 KNO_3 150mg kg^{-1} 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 25mg kg^{-1} 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 120mg kg^{-1} 、 Fe-EDTA 4mg kg^{-1} 、 H_3BO_4 0.3mg kg^{-1} 、 $\text{MnCl}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg kg^{-1} 】中,用KOH调节pH至6.5即为浓度分别为 1mg kg^{-1} 和 0.1mg kg^{-1} 的促生诱抗剂。

[0030] 3、促生诱抗剂的生物效应

[0031] (1) 水培试验

[0032] ①试验处理:阴性对照(CK)-普通营养液【 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200mg kg^{-1} 、 KNO_3 150mg kg^{-1} 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 25mg kg^{-1} 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 120mg kg^{-1} 、 Fe-EDTA 4mg kg^{-1} 、 H_3BO_4 0.3mg kg^{-1} 、 $\text{MnCl}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg kg^{-1} 】;处理1(1mg kg^{-1} P19)-普通营养液+ 1mg kg^{-1} Harzianolide甲醇溶液;处理2(0.1mg kg^{-1} P19)-普通营养液+ 0.1mg kg^{-1} Harzianolide甲醇溶液;阳性对照(IAA)-普通营养液+ 1mg kg^{-1} 生长素甲醇溶液。

[0033] ②试验方法:各取100ml上述4个处理的溶液加入到微型水培盒中,再将生长一致的番茄苗(胚根长 $5\sim 7\text{mm}$)通过脱脂棉塞入微型水培盒小孔中,每盒15株,于光照培养箱中培养15天,测各处理生物量。水培实验重复2次。

[0034] ③试验结果: 0.1mg kg^{-1} 和 1mg kg^{-1} 该促生诱抗剂相对阴性对照(CK)可分别提高番茄苗干重154.7%和30.9%,且 0.1mg kg^{-1} 该促生诱抗剂相对阳性对照(IAA处理)可提高番茄苗干重100.0%,促生效果十分明显(表1)。

[0035] 表1 不同处理对水培番茄苗的促生效果

[0036]

处理 ^a	株高(cm)	鲜重(mg)	干重(mg)
CK	4.47±0.15 c	265.77±9.70 c	9.79±0.51 c
1mg kg^{-1} P19	4.57±0.15 bc	334.30±20.66 bc	12.82±0.83 b
0.1mg kg^{-1} P19	5.17±0.15 a	595.67±68.45 a	24.94±0.81 a
1mg kg^{-1} IAA	5.17±0.45 a	342.30±12.16 b	12.47±0.75 bc

[0037] 注^a:数值间包含同一字母表示差异不显著($P < 0.05$),下同。

[0038] (2) 盆栽试验一

[0039] ①试验处理:对照(CK)-普通营养液【 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200mg kg^{-1} 、 KNO_3 150mg kg^{-1} 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 25mg kg^{-1} 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 120mg kg^{-1} 、 Fe-EDTA 4mg kg^{-1} 、 H_3BO_4 0.3mg kg^{-1} 、 $\text{MnCl}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg kg^{-1} 】;处理1(1mg kg^{-1} P19)-普通营养液+ 1mg kg^{-1} Harzianolide甲醇溶液;处理2(0.1mg kg^{-1} P19)-普通营养液+ 0.1mg kg^{-1} Harzianolide甲醇溶液;阳性对照(IAA)-普通营养液+ 1mg kg^{-1} 生长素甲醇溶液。

kg⁻¹】;处理 (P19)-普通营养液+1mg kg⁻¹Harzianolide 甲醇溶液;阳性对照 (IAA)-普通营养液+1mg kg⁻¹生长素甲醇溶液。每个处理设 3 个平行,重复 2 次。

[0040] ②试验方法:将 3 个处理溶液以灌根和叶面喷施的方式施用于盆栽番茄中,一周 3 次。每盆含 1kg 土,1 株/盆,于温室常规管理,30 天后测定番茄植株生物量及其叶片中三种活性氧有关的功能酶(苯丙氨酸解氨酶 PAL、超氧化物歧化酶 SOD 和过氧化氢酶 CAT)酶活,并通过反转录定量 PCR(qRT-PCR)检测番茄根系中 6 个防御基因(JERF3、PR1、POD、CHI-II、GLU 和 PGIP)的表达量,以磷酸甘油激酶 PGK 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

[0041] ③试验结果:生物量结果表明,促生诱抗剂处理 (1mg kg⁻¹P19) 相对于普通营养液对照 (CK) 可显著提高盆栽番茄植株生物量,番茄植株干重增加 34.2%,株高增加 14.8% (表 2);但相对于阳性对照 (IAA) 无显著差异。酶活测定结果表明,促生诱抗剂处理 (P19) 相对于对照 (CK) 可显著提高番茄叶片三种功能酶的活性,且酶活均显著高于阳性对照生长素处理 (图 4)。qRT-PCR 结果表明,促生诱抗剂处理 (P19) 相对于普通营养液对照 (CK) 可显著提高番茄根系 6 种防御基因的表达量,且其中对 PR1、POD、GLU 和 PGIP 的 4 个防御基因的诱导表达量显著高于阳性对照 (IAA),而对 CHI-II 的诱导表达量与阳性对照 (IAA) 无显著差异, JERF3 的表达量不及 IAA 处理 (图 5)。说明该促生诱抗剂能显著提高番茄苗的生物量,促进番茄幼苗快速生长,同时能诱导番茄苗活性氧有关的功能酶活性提高,相关防御基因表达量增加。

[0042] 表 2 不同处理对盆栽番茄苗的促生效果

[0043]

处理	株高(cm)	鲜重(g)	干重(g)
CK	14.17±0.71 c	3.82±0.35 b	0.38±0.03 b
P19	16.27±0.72 a	5.20±0.24 a	0.51±0.03 a
IAA	16.13±0.21 ab	5.24±0.28 a	0.51±0.03 a

[0044] (3) 盆栽试验二

[0045] ①试验处理:对照 (CK)-普通营养液【Ca(NO₃)₂·4H₂O 200mg kg⁻¹、KNO₃ 150mg kg⁻¹、NH₄H₂PO₄ 25mg kg⁻¹、MgSO₄·7H₂O 120mg kg⁻¹、Fe-EDTA 4mg kg⁻¹、H₃BO₄ 0.3mg kg⁻¹、MnCl₄·4H₂O 0.2mg kg⁻¹】;处理 1 (1mg kg⁻¹P19)-普通营养液+1mg kg⁻¹Harzianolide 甲醇溶液;处理 2 (0.1mg kg⁻¹P19)-普通营养液+0.1mg kg⁻¹Harzianolide 甲醇溶液。每个处理设 3 个平行,重复 2 次。

[0046] ②试验方法:将 3 个处理的溶液以灌根的方式施用于盆栽番茄中,一周 3 次。每盆含 1kg 土,1 株/盆,于温室常规管理,30 天后取各处理番茄的叶片 6 片(来自于同一处理 3 株不同的植株),每片叶子接种 6mm 的菌核菌 (Sclerotinia sclerotiorum) 菌块,置光照培养箱 48 小时后测量菌斑面积。抑制率计算公式如下:抑制率 (%)=(A-B) / A×100, A 为对照 (CK), B 为处理。

[0047] ③试验结果:该促生诱抗剂处理 (1mg kg⁻¹P19) 可有效降低菌核菌对叶片的侵染程度,1mg kg⁻¹P19 处理菌斑面积 (2.34cm²) 较对照 (3.27cm²) 缩小 28.5%,0.1mg kg⁻¹促生诱抗剂处理 (0.1mg kg⁻¹P19) 菌斑面积 2.27cm²,较对照缩小 30.7% (表 3)。说明该促生

诱抗剂能有效诱导番茄植株系统抗性的产生,提高其对病原菌(以菌核菌为例)的抵抗能力。

[0048] 表 3 不同处理对水培番茄苗的促生效果

[0049]

处理	菌斑面积(cm ²)	抑制率(%)
CK	3.27±0.22 a	-
1mg kg ⁻¹ P19	2.34±0.13 b	28.5%
0.1mg kg ⁻¹ P19	2.27±0.15 b	30.7%

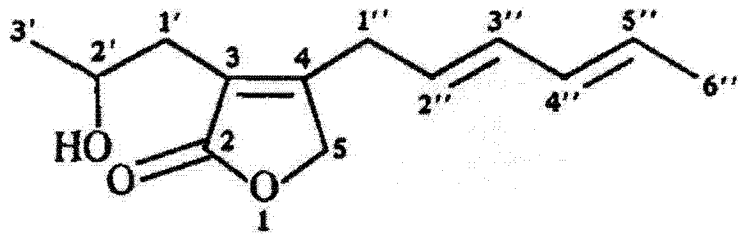


图 1

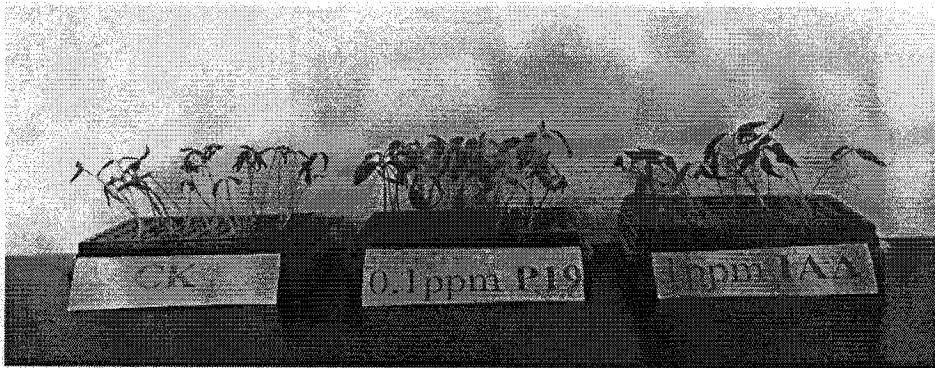


图 2

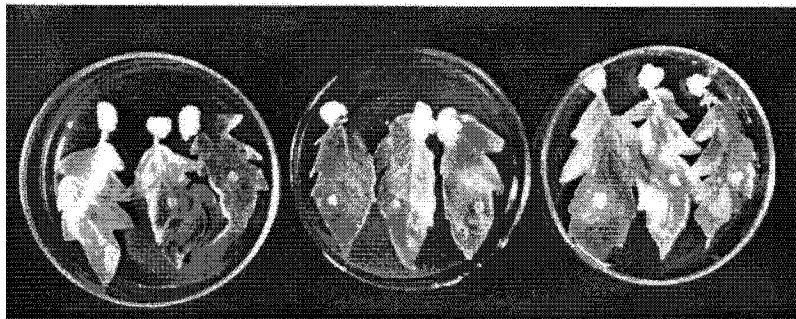


图 3

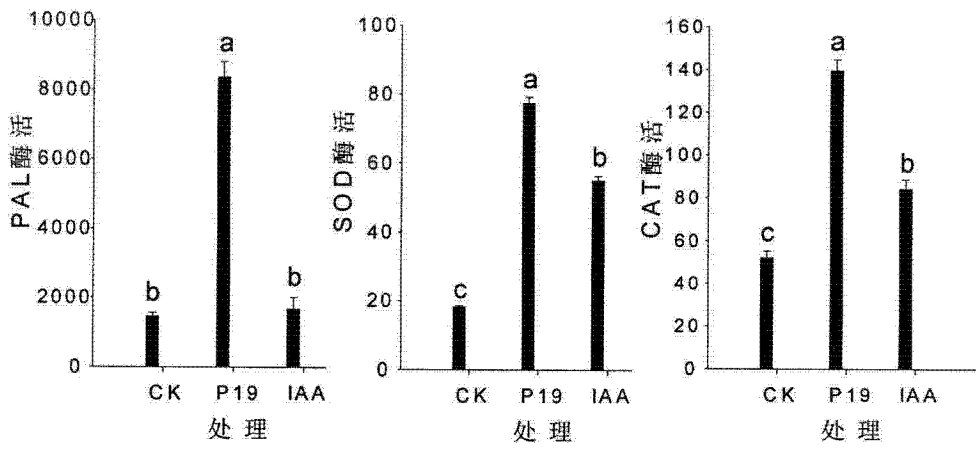


图 4

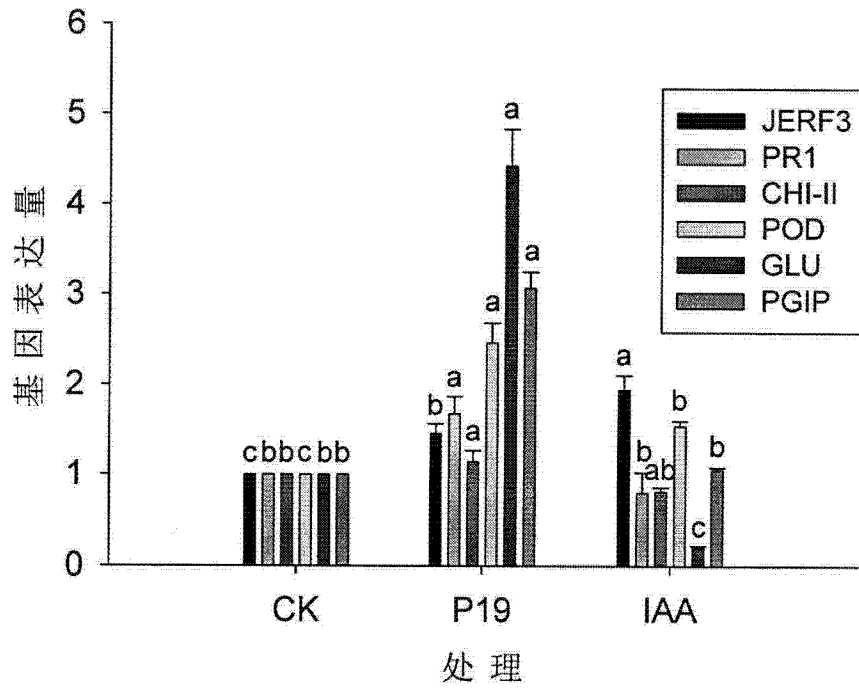


图 5