

壳聚糖诱导芦笋对茎枯病的抗性研究

秦 力¹, 蒲文磊¹, 崔日秀², 陈景丽¹, 卢 钢¹

(1. 浙江大学 农业与生物技术学院,浙江 杭州 310058;2. 朝鲜金日成综合大学 生命科学院,朝鲜 平壤 999093)

摘要:以芦笋为试材,对接种茎枯病病原菌后的芦笋在不同时期喷施壳聚糖处理,并研究了发病情况、叶片光合作用与抗氧化酶活性的变化。结果表明:喷施壳聚糖后,芦笋茎枯病发病率及发病指数均显著降低,且以接种病原菌后立即喷施壳聚糖效果最好,芦笋体内过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、愈创木酚过氧化物酶(G-POD)、多酚氧化酶(PPO)的活性升高,接种病原菌造成的拟叶光合速率和气孔导度下降现象也得到明显缓解。表明壳聚糖能诱导芦笋茎枯病抗性,降低病原菌对其造成的伤害。

关键词:芦笋;壳聚糖;茎枯病;抗性

中图分类号:S 644.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0121-05

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)属百合科天门冬属多年生宿根草本植物,又称石刁柏,其嫩茎富含多种营养成分,具有很高的食用和保健价值,素有世界十大名菜之美称。芦笋茎枯病(*Phomopsis stem blight*)是一种世界性分布的毁灭性病害。国内南北各地普遍发生,轻者生长发育不良,降低产量与品质,重者病株提前枯死,全田毁灭。近年来,随着芦笋国内外市场的扩大,芦笋栽培面积与日俱增,芦笋茎枯病已严重影响了芦笋的产量与质量。国内外学者在芦笋茎枯病的症状、病原、侵染循环、田间发生规律及防治方法等方面做了一些研究,但生产上尚无十分有效的防治方法^[1]。

壳聚糖(Chitosan)又称甲壳素、几丁质或甲壳质,它是许多低等动物(如虾、蟹和昆虫等)身体以及一些低等植物(如真菌和藻类)的重要成分。近年来研究证实壳聚糖对植物的生长、发育有调节作用,可以增强植物抗性、提高产量、改善农产品质量,还可用作果蔬保鲜、土壤改良剂,而且对环境不会造成任何污染。其在诱导植物抗性,抑制病菌生长方面具有很好的效果^[2-3]。甲壳素及其衍生物对多种细菌及病毒都有抑制作用^[4]。虽然壳聚糖对番茄根腐病^[5-6]、茎腐病^[6]、黑斑病^[7]与青枯

病^[8],苹果青霉菌^[9],香蕉枯萎病^[10],烟草黑胫病^[11],水稻稻枯病与叶斑病^[12-13]的防治作用有了一些研究,但至今对芦笋茎枯病的防治作用尚鲜见报道。

该研究在芦笋接种茎枯病病菌后,在不同时期喷施壳聚糖产品,调查芦笋茎枯病的发病情况,测定比较芦笋体内抗性酶活性的变化以及拟叶中的光合作用变化,旨在明确壳聚糖对芦笋茎枯病防治效果,并初步探索壳聚糖诱导抗病性的生理机制,以期为芦笋茎枯病的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试芦笋(*Asparagus officinalis* L.)品种为美国‘加州 UC308’F₁代杂交种,芦笋茎枯病病菌[*Phomopsis asparagi* (Sacc.)Bubak]采自富阳芦笋种植基地,在实验室进行培养分离。供试壳聚糖由浙江永隆山生物科技工程有限公司提供,脱乙酰度约85%,相对分子质量20万,壳聚糖用1%乙酸溶解,配成壳聚糖含量为1.0%的稀释液[含0.01%(v/v)Tween 20],备用。

1.2 试验方法

芦笋种子先在50~60℃温水中浸洗10 min,移入30℃水中浸种2 d,在25℃黑暗条件下催芽,等种子发芽后播种于蛭石中。出苗2周后,挑选生长一致健壮的幼苗移入装有草炭、蛭石和珍珠岩(1:1:2)的营养钵中,每周浇1次植物生长营养液。

分离芦笋茎枯病病菌。将取回的新鲜带病材料用0.1%升汞水溶液进行表面消毒,选择病健交界的分离材料,用小剪刀剪成3 mm²的小块投入0.1%升汞水中,表面消毒5 min,用无菌水冲洗3~4次。用无菌镊子把

第一作者简介:秦力(1989-),男,硕士研究生,研究方向为蔬菜栽培。E-mail:qinli19890720@163.com。

责任作者:卢钢(1968-),男,博士,教授,现主要从事蔬菜学等研究工作。E-mail:glu@zju.edu.cn。

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2011BAD12B04);国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003074-3);浙江省重点资助项目(2012C12012-3)。

收稿日期:2014-06-10

消毒后的病原组织,转移到固体 PDA 平板培养基上,将培养皿底部向上放置移入 25~28℃的恒温箱内暗培养。经 3~4 d 后观察,选择形态、菌落一致的并认为可能是致病菌的微生物,用接种环在无菌操作条件下移至新的 PDA 培养基上,以繁殖纯菌种。如在斜面上仍有杂菌时,可再转新培养基,以达到获得纯菌种的目的。观察菌丝生长情况,由浙江大学农业与生物技术学院张敬泽老师鉴定真菌种类。将所分离得到的纯菌种移入新的培养基中培养 1 周后放入 4℃冰箱中保存,并每隔 2 个月转接 1 次。

选取病菌培养基中长有孢子囊的培养基,将孢子囊挑入水中,并将其碾破使孢子散发出来,配制成浓度为低倍镜(10×10)下 50~60 个孢子/视野的孢子悬浮液,待用。

对 1 个月苗龄的美国加州‘UC308’F₁代芦笋幼苗进行壳聚糖诱导处理,试验设 Pa(接种后喷水)、Ch-2(接种前 2 d 喷施 1%壳聚糖溶液)、Ch+0(接种后马上喷施 1%壳聚糖溶液)、Ch+2(接种后 2 d 喷施 1%壳聚糖溶液)4 个处理,以不喷施壳聚糖不接种为对照(CK)。每个处理芦笋幼苗 20 株,3 次重复。均匀喷施各浓度壳聚糖溶液至叶片两面湿润。处理后的幼苗加盖小拱棚保湿,并在周围洒水,保持温度 23~27℃,以利于茎枯病病菌孢子的萌发。

在芦笋茎枯病病原菌接种 13 d 后观察各试验处理发病率和病情指数。发病等级根据发病程度分成 5 级^[14],即:0 级,幼苗植株无病斑;1 级,初显褐色病斑;2 级,病斑扩大,并有黑色分生孢子囊出现;3 级,病斑扩大到植株 30%~40%,且病斑上布满黑色分生孢子囊;4 级,植株枯萎,甚至死亡。

相对防治效果(%)=(对照病情指数-壳聚糖处理后病情指数)/对照病情指数×100%。

1.3 项目测定

1.3.1 抗氧化酶活性的测定 在病原菌接种后分别在第 4、7、11 天取不同处理的整株作为试验材料,液氮冷冻,-75℃保存。每个处理取 5 株样品混合,用于测定 CAT、POD、SOD、PPO 等酶的活性。CAT、POD、SOD、PPO 酶液的提取及测定方法^[15]:取 0.15 g 样品,加入 1.5 mL 50 mmol/L PBS 缓冲液(含 0.2 mmol/L EDTA,2%PVP,pH 7.8),在冰浴中匀浆,过 2 层纱布,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,上清液用于测定 CAT、POD、SOD、PPO 的活性。利用分光光度计 Ultrospec 2100 pro(Amersham Biosciences 生产)测定酶活性吸光度的变化及 OD 值。CAT 反应体系为:25 mmol/L PBS(pH 7.0)0.85 mL,0.05 mL 酶液和 0.1 mL 100 mmol/L 过氧化

氢测 A₂₄₀。G-POD 反应体系为:25 mmol/L PBS (pH 7.0)1.7 mL,0.1 mL 1%愈创木酚,0.1 mL 酶液,0.1 mL 20 mmol/L 过氧化氢,测 A₄₇₀。PPO 反应体系为:25 mmol/L PBS (pH 6.8) 1.6 mL,1.2 mL 0.20 mol/L 邻苯二酚,0.2 mL 酶液,测 A₄₂₀。SOD 反应体系为:3 mL NBT(pH 7.8),13 mmol/L 甲硫氨酸,63 μmol/L NBT,1.3 μmol/L 核黄素,0.1 mmol/L EDTA)0.05 mL 酶液,在 25℃下照光 25 min,测 A₅₆₀。

1.3.2 光合速率与气孔导度的测定 在芦笋茎枯病病菌接种 14 d 后进行光合速率测定。光合速率测定参照 Marty 等^[16]和 Guo 等^[17]的方法。采用 Li-6400 便携式光合测定仪。在 9:00—11:00 进行测定,测定芦笋第 2、6 个主侧枝,在主侧枝的 3/4 位置处,并用游标卡尺测量所测芦笋拟叶的直径(D)和长度(L),每株 10 次重复,取平均值为该株芦笋所测位置拟叶的直径与长度,记录每次光合速率(ΔPn)及气孔导度(Δgs)。所测面积(S)= $n\pi LD$;光合速率(Pn)= $\Delta Pn/S$;气孔导度(gs)= $\Delta gs/S$;式中,n 为所测芦笋拟叶数目,π 值取 3.14, ΔPn 为所测光合速率数值, Δgs 为所测气孔导度数值。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖对芦笋抗茎枯病发病指数的影响

喷施壳聚糖药剂处理病情指数明显低于不喷施壳聚糖药剂处理,说明喷施壳聚糖药剂可以防治芦笋茎枯病(表 1),但接种后马上喷施效果最好,相对防治效果达到 45.45%,在 Ch-2 处理效果最差,相对防治效果仅为 23.68%,但 Ch+2 处理与 Ch+0 处理效果之间无显著差异。

2.2 壳聚糖对芦笋体内抗氧化酶活性的影响

诱导接种后,芦笋体内 CAT 活性迅速升高;喷施壳聚糖处理明显比不喷施壳聚糖 CAT 的活性高。Ch+0 处理的芦笋体内 CAT 活性迅速升高,并在第 7 天达到峰值;随后 CAT 活性开始下降。但 Ch+2 处理的芦笋体内 CAT 活性在第 11 天超过其它时期喷施壳聚糖的处理(图 1A)。与对照相比,所有处理都使芦笋体内 CAT 活性提高。

诱导接种后,芦笋体内在第 4 天时,SOD 活力均高于对照,并且喷施壳聚糖处理的 SOD 活力明显高于不喷施壳聚糖的处理;与对照的动态变化曲线态势差异始终较大,说明芦笋在受到茎枯病菌的侵染后,芦笋体内细胞内酶防御系统发生紊乱,尤其是只接种不喷施壳聚糖处理 SOD 活力变化不稳定(图 1B)。但喷施壳聚糖后,壳聚糖可以调节芦笋体内 SOD 活力,Ch+2 处理的 SOD 活力先降低后升高,但 Ch-2、Ch+0 处理可以使芦笋体内 SOD 活力保持稳定,并且不断的提高,说明壳聚糖可以调节芦笋体内 SOD 的变化,并保持稳定的势态。

表 1

Table 1

喷施壳聚糖对芦笋茎枯病病情指数的影响

The effect of chitin on phomopsis stem blight disease index in asparagus

处理 Treatment	病情指数 Disease index	相对防治效果 Relative against efficiency/%
接种后喷水(Pa)	71.07±3.361 a	—
接种前2 d 喷施1%壳聚糖溶液(Ch-2)	54.24±3.974 b	23.68
接种后马上喷施1%壳聚糖溶液(Ch+0)	38.77±4.450 c	45.45
接种后2 d 喷施1%壳聚糖溶液(Ch+2)	43.12±9.263 c	39.33

注:不同字母表示 t 测验 $P=0.05$ 水平上的差异显著。下同。Note: Different letters show significant difference at 0.05 level according to t test. The same below.

诱导接种后,芦笋体内的 G-POD 活性均明显升高,并且在没有喷施壳聚糖时,Ch+2 处理、Pa 处理的 G-POD 活性变化没有明显差异,但在喷施壳聚糖后 G-POD 活性明显提高,说明喷施壳聚糖可以提高芦笋体内 G-POD 的活性(图 1C)。另外,Ch-2、Ch+0 处理,在接种后芦笋体内的 G-POD 活性明显高于只接种不喷壳聚糖的处理,并且 G-POD 活性在第 7 天达到峰值,Ch-2 处理的 G-POD 活性稍高于 Ch+0 处理,但无明显

差别。

在诱导接种后,与对照相比,其它处理的 PPO 活性均得到提高,并且在第 4 天时喷施壳聚糖处理的 PPO 活性均高于 Pa 处理;随后在接种前及接种后喷施壳聚糖的处理 PPO 的活性缓慢下降,在第 7 天达到最低峰,但 Ch+0 处理的 PPO 活性一直升高,并显著高于只接种不喷施壳聚糖的处理。说明诱导接种后喷施壳聚糖可以提高芦笋体内 PPO 的活性,并保持较稳定的状态(图 1D)。

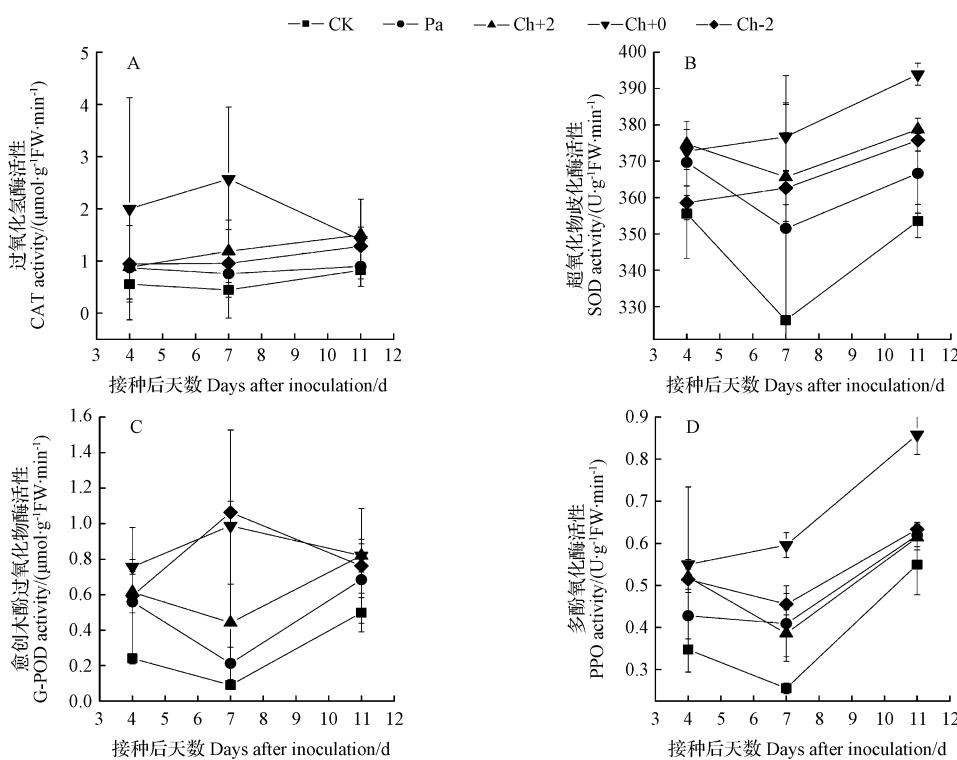


图 1 壳聚糖对芦笋叶片 CAT、SOD、G-POD、PPO 活性影响

Fig. 1 The effect of chitin on activities of CAT, SOD, G-POD, PPO in asparagus

2.3 壳聚糖对芦笋光合速率的影响

从表 2 可以看出,诱导接种 14 d 后,不论第 2 侧枝还是第 6 侧枝,不喷施壳聚糖处理的光合速率与对照之间存在着显著差异,而喷施壳聚糖可以提高芦笋的光合速率,但与对照之间无显著差异。说明诱导接种使芦笋拟叶的光合速率显著下降,喷施壳聚糖可以明显减少芦笋光合速率的下降幅度。

2.4 壳聚糖对芦笋气孔导度的影响

由表 3 可知,诱导接种 14 d 后,不论第 2 侧枝还是第 6 侧枝,不喷施壳聚糖处理,芦笋拟叶的气孔导度与对照之间存在显著差异;在第 2 侧枝,喷施壳聚糖接种也降低了芦笋的气孔导度,与不喷施仅接种的处理间存在显著差异,但第 6 侧枝上接种病菌后,喷施壳聚糖的处理比不喷施的处理气孔导度要高 57.19%,但二者间

表 2

Table 2

壳聚糖对芦笋光合速率的影响

The effect of chitin on photosynthetic rate in asparagus leaves

处理 Treatment	光合速率 Photosynthetic rate(Pn)/(μmol CO ₂ · m ⁻² · s ⁻¹)	
	第 2 侧枝 The second lateral fern	第 6 侧枝 The sixth lateral fern
CK	0.496±0.018 a	0.624±0.155 a
接种喷壳聚糖溶液(Ch+Pa+)	0.329±0.097 ab	0.451±0.021 ab
接种不喷壳聚糖溶液(Ch-Pa+)	0.239±0.163 b	0.268±0.113 b

表 3

Table 3

壳聚糖对芦笋气孔导度的影响

The effect of chitin on stomatal conductance of asparagus leaves

处理 Treatment	气孔导度 Stomatal conductance/(mmol · m ⁻² · s ⁻¹)	
	第 2 侧枝 The second lateral fern	第 6 侧枝 The sixth lateral fern
CK	4.922±0.545 a	6.030±1.620 a
接种喷壳聚糖溶液(Ch+Pa+)	3.178±0.121 b	4.755±0.052 ab
接种不喷壳聚糖溶液(Ch-Pa+)	1.812±0.292 c	3.025±0.0323 b

差异未达显著水平($P=0.05$)。以上结果说明,诱导接种使芦笋拟叶的气孔导度显著下降,喷施壳聚糖可以明显减少芦笋拟叶气孔导度的下降趋势。

3 讨论与结论

自 20 世纪 60 年代以来,壳聚糖的研究、生产及其衍生物的应用十分活跃,并于 20 世纪末,人们将壳聚糖用于农业方面的研究。在 1988 年,日本率先报道了甲壳素衍生物壳聚糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用,随后,有人进一步研究了这一现象^[18]。近几年,壳聚糖的抑菌性能在果蔬保鲜及植物防病方面开始应用^[19]。研究发现壳聚糖可以诱导植物体内抗性酶活性的升高。研究者关于壳聚糖的抑菌作用提出了 3 种机理:一是直接抑制病原菌的生长,对植物起到保护作用;二是诱导病程相关蛋白,即诱导植物产生类黄酮等植物抗毒素物质、木质素的积累及提高抗性酶的活性,使植物产生系统性获得抗病性;三是起到信号传导的作用^[20]。

该试验鉴于壳聚糖的抑菌作用,对诱导接种后的芦笋在不同时期进行喷施壳聚糖处理。结果表明,喷施壳聚糖后其植株芦笋茎枯病发病率及发病指数均显著低于对照,接种 2 d 后喷施壳聚糖,接种后马上喷施壳聚糖及接种前 2 d 喷施壳聚糖 3 种处理的相对防治效果分别为 39.33%、45.45%、23.68%,表明喷施壳聚糖药剂可以防治芦笋茎枯病,并且以接种后马上喷施壳聚糖效果最好。植物光合作用与叶片的气孔有密切的联系,气孔的大小及其数目限制了植物的光合作用,当植物受到病原物侵染后对植物叶片气孔造成了破坏,从而降低了植物的光合作用^[21]。该试验结果表明,对芦笋进行诱导接种后,芦笋拟叶的气孔导度显著下降,光合速率也随之下降,喷施壳聚糖处理可以降低芦笋拟叶气孔受损保持较

高的气孔导度值,光合速率下降也明显得到缓解,所以喷施壳聚糖可以保护芦笋拟叶,降低病原菌对拟叶细胞结构的破坏。

该研究还表明,当芦笋诱导接种后,芦笋拟叶的光合速率显著下降,喷施壳聚糖可以提高芦笋拟叶的光合速率,提高芦笋体内 CAT、SOD 活性,降低了活性氧等自由基对芦笋的伤害,提高芦笋体内 G-POD、PPO 活性。壳聚糖作为植物抗病的诱发子(Elicitor)可调节植物体内与抗病有关的酶活性变化,这些酶包括抗氧化酶,也可诱导产生植保素、酚类化合物等抗菌物质来抵抗病原菌的侵染,从而增强芦笋抗茎枯病能力。这与廖春燕^[20]在番茄上的研究结果一致。

喷施壳聚糖药剂可以防治芦笋茎枯病,并且接种病原菌后马上喷施壳聚糖效果最好。喷施壳聚糖处理提高了芦笋的光合速率与气孔导度,提高了芦笋体内 CAT、SOD、G-POD、PPO 的酶活性,诱导芦笋产生了抗病性,降低了病原菌对芦笋造成的伤害。

参考文献

- [1] 马利平,郝变青,秦曙,等.芦笋茎枯病的生物防治及机理研究[J].中国生态农业学报,2009,17(6):1229-1233.
- [2] 张怡,刘严,康静敏,等.壳聚糖诱导植物抗病机理的研究进展[J].广东农业科学,2011(14):82-85.
- [3] 陈惠萍,徐朗丽.壳聚糖调节植物生长发育及诱发植物抗病性研究进展[J].云南植物研究,2005,27(6):613-619.
- [4] Yalınca Z, Yilmaz E, Taneri B, et al. A comparative study on antibacterial activities of chitosan based products and their combinations with gentamicin against *S. epidermidis* and *E. coli* [J]. Polymer Bulletin, 2013, 70: 3407-3423.
- [5] Benhamou N, Lafontaine P J, Nicole M. Induction of systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan[J]. Phytopathology, 1994, 84(12):1432-1444.
- [6] Benhamou N, Thériault G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*

- f. sp. *radicis lycopersici*[J]. Physiology Molecular Plant Pathology, 1992, 41(1):33-52.
- [7] Reddy M V B, Angers P, Castaigne F, et al. Chitosan effects on black-mold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2000, 125(6):742-747.
- [8] Kuriika L M, Stahl F, Wydra K. Phenotypic and molecular characterization of resistance induction by single and combined application of chitosan and silicon in tomato against *Ralstonia solanacearum*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2013, 81:1-12.
- [9] 张维,周会玲,袁仲玉,等. β -氨基丁酸结合壳聚糖处理对苹果采后青霉病的防治效果与机理[J].西北农林科技大学学报,2013,41(10):149-156.
- [10] 占魏,张欣,吕延超,等.3种分子量的壳聚糖对香蕉枯萎病病原菌室内抑菌活性测定[J].热带作物学报,2012,33(1):132-136.
- [11] 赵蕾,梁元存,刘延荣.壳聚糖对烟草抗黑胫病的作用[J].应用与环境生物学报,2000,6(5):436-439.
- [12] Li B, Liu B, Shan C, et al. Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on rice bacterial leaf blight and leaf streak[J]. Pest Management Science, 2013, 69:312-320.
- [13] Liu H, Tian W X, Li B, et al. Antifungal effect and mechanism of chitosan against the rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*[J]. Bio-technology Letters, 2012, 34:2291-2298.
- [14] 方中达.中国农业植物病害[M].北京:中国农业出版社,1996:550-551.
- [15] Lu G, Jian W L, Zhang J J, et al. Suppressive effect of silicon nutrient on *Phomopsis* stem blight development in asparagus[J]. Hortscience, 2008, 43:811-817.
- [16] Marty J F, Warwick B S, Allan T G, et al. Photosynthetic characteristics of three asparagus cultivars differing in yield[J]. Crop Science, 1999, 39(4):1070-1077.
- [17] Guo J M, William A J, Matthew H T. Diurnal and seasonal photosynthesis in two asparagus cultivars with contrasting yield[J]. Crop science, 2002, 42(2):399-405.
- [18] Zheng L Y, Zhu J F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54:527-530.
- [19] Bautista-Banos S, Hernandez-Lauzardo A N, Velazquez-del Valle M G, et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities[J]. Crop Protection, 2006, 25:108-118.
- [20] 廖春燕.壳聚糖诱导植物抗病反应及机制研究[D].杭州:浙江大学,2002;9-14,72-73.
- [21] Bassanezi R B, Amorim L, Bergamin F A, et al. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage[J]. Plant Pathology, 2001, 50:443-452.

Study on Resistance of *Asparagus officinalis* L. Against Stem Blight Induced by Chitosan

QIN Li¹, JIAN Wen-lei¹, CHOE Il-su², CHEN Jing-li¹, LU Gang¹

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058; 2. College of Life Science, Kim Il-sung University, Pyongyang, Democratic People's Republic of Korea 999093)

Abstract: Taking *Asparagus officinalis* L. as material, the different asparagus cultivars were used and their seedlings were inoculated with *Phomopsis asparagi* (Sacc)Bubak. The chitosan were sprayed in different periods after inoculation. Morbidity and disease index were surveyed after the treatment. The changes of antioxidant enzyme activities were compared. The photosynthetic rate and stomatal conductance of intended leaves were also determined. The results showed that the disease index significantly reduced with chitosan-supply, and the best effect obtained by spraying chitosan immediately after inoculation. The activity of catalase(CAT), guaiacol peroxidase(G-POD), superoxide dismutase(SOD), polyphenoloxidase(PPO)activity of *Asparagus officinalis* L. increased. On the other hand, the decline of photosynthetic rate and stomatal conductance caused by inoculation was suppressed after supplied with the chitosan. It could be concluded that chitosan could induce systemic resistance on asparagus against stem blight, reduce the damage caused by pathogens, and resulted in beneficial effects on asparagus production.

Keywords: *Asparagus officinalis* L.; chitosan; stem blight; resistance