



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114176084 A

(43) 申请公布日 2022.03.15

(21) 申请号 202111476337.6

(22) 申请日 2021.12.06

(71) 申请人 南京天秣生物技术有限公司
地址 210000 江苏省南京市玄武区童卫路5号南理工科技创新园区

(72) 发明人 陈世国 王赫 王良省 房婉萍
郭爱平

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218
代理人 傅婷婷 徐冬涛

(51) Int. Cl.

A01N 37/44 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书19页

(54) 发明名称

2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的应用

(57) 摘要

本发明公开了2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的应用。将2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸作为天然活性物质开发为植物免疫诱抗剂可用于提高植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力,有效阻止真菌、病毒和细菌对植物的侵染和致病水平的降低;同时,能显著提高植物对高温、低温、干旱和盐胁迫的耐受能力。2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸具有安全、环保、高效的特点。

1. 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在制备植物免疫诱抗剂中的应用。

2. 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在提高植物对非生物胁迫和/或生物胁迫中的应用,所述的非生物胁迫选自高温、低温、干旱和/或盐胁迫中的任意一种或几种;所述的生物胁迫选自真菌、细菌、病毒胁迫中的任意一种或几种,所述的真菌性病害为小麦白粉病;所述的细菌性病害为丁香假单胞菌病害;所述的病毒性病害为番茄斑萎病。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述的植物,选自粮食作物、经济作物、蔬菜。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述的粮食作物为小麦,所述的经济作物为黑麦草、茶叶、棉花,所述的蔬菜为番茄。

5. 一种植物免疫诱抗剂,其特征在于,包含组分A:2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸中的任意一种或两种;组分B:表面活性剂。

6. 根据权利要求5所述的植物免疫诱抗剂,其特征在于,所述的表面活性剂为吐温20。

7. 根据权利要求6所述的植物免疫诱抗剂,其特征在于,吐温20在植物免疫诱抗剂中的浓度为0.01~0.05% (v/v),优选0.02% (v/v)。

8. 根据权利要求5所述的植物免疫诱抗剂,其特征在于,所述的植物免疫诱抗剂中2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的浓度为0.1-10000nM浓度。

9. 一种提高植物对生物和非生物胁迫抗性的方法,其特征在于向目标植物施加0.1-10000nM的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸,亦或权利要求5-8中任一项所述的植物免疫诱抗剂。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述的非生物胁迫选自高温、低温、干旱和/或盐胁迫中的任意一种或几种;所述的生物胁迫选自真菌、细菌、病毒胁迫中的任意一种或几种,所述的真菌性病害为小麦白粉病;所述的细菌性病害为丁香假单胞菌病害;所述的病毒性病害为番茄斑萎病。

2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的应用

技术领域

[0001] 本发明属于农业生物农药领域,涉及2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的应用。

背景技术

[0002] 植物免疫诱抗剂是一类新概念农药,其通过激活植物的免疫系统并调节植物的新陈代谢,从而增强植物抗病和抗逆能力。植物免疫诱抗剂本身没有杀虫、菌的活性,主要通过外源施用激发植物自身天然免疫系统来防治病虫害。因为不依赖外源农药直接杀死病原体,因此病虫不易对其产生抗药性,符合有效保护农业生物多样性的条件下实现绿色防控的思路。此外,在自然界,植物的生长通常并不只是受到单一胁迫,而是多种胁迫并存,如干旱和高温胁迫常常同时发生,对植物造成更严重的危害。植物自身虽然存在免疫系统,但其抵抗逆境胁迫的能力是有限的,通过植物免疫诱抗剂的使用能够增加植物的抗逆水平。植物免疫诱抗剂作为新兴农药的一类,为农业可持续发展和病害的有效绿色防治和提供了新的发展思路,是绿色植保未来发展的主要方向。

[0003] 当前,全球极端天气频现,每年由于高温、低温、干旱和盐等主要非生物胁迫给农业生产所造成的损失非常巨大。目前,全球干旱、半干旱地区面积约占总耕地面积的40%以上,干旱是影响农作物生产的最重要的逆境因素之一。其次,高温和低温严重影响植物的生长发育,进而影响植物的产量和品质。近年来,由于全球性气候恶化使得干旱、高低温农业灾害发生的频率越来越高,对粮食生产安全构成的威胁也越来越大。再者,土壤盐碱化是阻碍全球作物生长和生产力的主要非生物限制因素,中国盐碱地面积位居世界第三,占世界盐碱地面积的10%左右。因此,针对当前农业实际生产中不同作物面临的主要非生物胁迫状况,开发旨在减轻植物危害水平的绿色免疫诱抗剂产品对于保障农业安全生产显得尤为迫切。

[0004] 除了非生物逆境外,农作物在生长发育过程中也会不断受到各种病虫害的威胁,一些病害发生和流行,通常会造成作物大面积严重减产甚至绝收。因此,建立重要农业病虫害的综合治理体系显得尤为重要。当前,农业植物病虫害防治的主要措施是利用农药进行直接杀死,但长期、大量使用杀菌、杀虫剂,不仅带来了残留污染、抗药性发生、生物多样性降低、和食品安全性等一系列问题,也使传统植保的“杀灭”策略面临失效的风险,严重威胁粮食生产安全和农业可持续发展战略。所以,开发环保、高效、经济的植物免疫剂,在作物发病前或早期阶段通过增强植物自身的抵抗能力来降低或者抑制作物发病水平,从而实现少用或不用化学杀菌剂的目标,对于实现农业绿色生产具有十分重要的意义。

[0005] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸,分子式为: $C_5H_{11}NO_3$,分子量133克/摩尔,属于新型氨基酸类化合物,为无色透明针状晶体。目前对于该化合物的研究非常少,最早关于2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸的报道是1968年,科学家采用化学方法合成了该化合物,而且发现L-2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够抑制阿拉伯乳杆菌(*Lactobacillus arabinosus*)中缬氨酸的合

成 (Edwards&Minthorn, 1968)。2010年, Takumi 等人从一种蕈菌—贝形圆孢侧耳 (*Pleurocybella porrigens*) 中首次分离得到了2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸, 该化合物在 $10\mu\text{g mL}^{-1}$ 浓度下对大鼠大脑神经胶质细胞有弱毒性 (Takumi et al., 2010)。截至目前, 关于2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸的研究很少, 没有涉及植物免疫诱抗活性方面的相关研究、报道和专利。

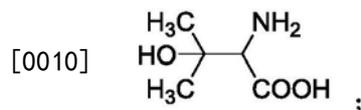
[0006] 2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸, 分子式为: $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$, 分子量195克/摩尔, 属于新型氨基酸类化合物, 为无色透明晶体。目前对于该化合物的报道较少, 最早关于2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸的报道是1989年, 采用化学合成的方法得到纯度较高的光学异构体 (Nicolas et al., 1989)。1999年, 有研究人员以苯酚、 α -酮丁酸和氨为底物, 利用弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 的酪氨酸酚裂解酶 (Tyrosine phenol-lyase, TPL) 通过体外催化反应获得了2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸 (Kim&Cole, 1999)。近年来, 对于该化合物的研究也仅限化学合成通路和手性拆分方面 (Peter et al., 1999, 2000; Grobuschek et al., 2002; Vékes et al., 2002; Péter&Tóth, 2015)。到目前为止没有关于该化合物为天然产物的报道。

发明内容

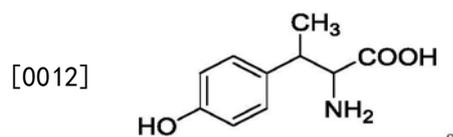
[0007] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足, 提供2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸的生物提取及作为植物免疫诱抗剂的应用。

[0008] 最近, 我们从腐生型植物病原真菌链格孢菌 (*Alternata alternata*) 中成功分离、纯化得到2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸。对其植物免疫、诱抗活性进行了系统的研究, 发现在抵抗生物胁迫方面, 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸能有效抑制病毒、真菌和细菌在植物叶片上的发生与扩散; 在诱导植物抗非生物胁迫方面2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸能有效缓解高温、低温、干旱和盐渍对植物的造成的伤害。本发明的目的可通过以下技术方案实现:

[0009] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸是从链格孢菌中分离得到的天然产物, 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸结构式如下:



[0011] 2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸结构式如下:



[0013] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸在制备植物免疫诱抗剂中的应用。

[0014] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸在提高植物对非生物胁迫和/或生物胁迫中的应用。

[0015] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基) 丁酸在提高植物对高温、低温、干旱和/或盐胁迫中的应用。

[0016] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在提高植物对真菌、细菌、病毒胁迫中的应用。

[0017] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和/或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在防治植物真菌性病害、细菌性病害和/或病毒性病害中的应用。

[0018] 所述的真菌性病害优选小麦白粉病;所述的细菌性病害优选丁香假单胞菌病害;所述的病毒性病害优选番茄斑萎病。

[0019] 所述的植物,选自粮食作物、经济作物、蔬菜。所述的粮食作物优选小麦,所述的经济作物优选黑麦草、茶叶、棉花,所述的蔬菜优选番茄。

[0020] 一种植物免疫诱抗剂,包含2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸。

[0021] 作为本发明的一种优选,所述的植物免疫诱抗剂,包含组分A:2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸中的任意一种或两种;组分B:表面活性剂。

[0022] 作为本发明的进一步优选,所述的表面活性剂为吐温20,吐温20在植物免疫诱抗剂中的浓度优选0.02% (v/v)。

[0023] 作为本发明的进一步优选,所述的植物免疫诱抗剂中2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸的浓度为0.1-10000nM浓度。

[0024] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的已有相关研究并未涉及天然微生物代谢产物和生物农药领域的报道。植物免疫诱抗剂属于新型农药,是未来植保领域绿色防控的主要发展方向。我国免疫诱抗剂的发展处于刚起步阶段,获得正式登记的产品屈指可数。因此,发展天然植物免疫诱抗剂,并推动其产业化,对于保障农业生产安全、提高农产品竞争力具有重要的意义。2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在相关诱导免疫抗逆性实验中表现良好,能够提高植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力。

[0025] 由链格孢菌中分离的天然代谢产物2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于防治病害的方法,其详细内容和实施方案如下:在0.1-10000nM浓度(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)范围,可有效抑制病毒、真菌和细菌在植物上的侵染和扩散,抑制病害的发生与蔓延,提高植物对高温、低温、干旱和盐胁迫的抵抗能力。

[0026] 一种提高植物对生物胁迫抗性的方法,包括提前向植物施加本发明所述的植物免疫诱抗剂;所述的生物胁迫选自真菌、细菌、病毒胁迫中的任意一种或多种。

[0027] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于防治番茄斑萎病的方法,在0.1-10nM浓度下(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20),可在烟草接种番茄斑萎病毒(TSWV)3天后显著抑制病毒的扩散。15天后调查烟草病害情况,发现2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理的烟草植株的病情指数显著降低。在低浓度10nM时,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸可有效抑制TSWV在烟草叶片上的表达,其病情指数、相对免疫效果和病毒含量分别为29.01、67.59%和0.13。在低浓度10nM时,2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸可有效抑制TSWV在烟草叶片上的表达,其病情指数、相对免疫效果和病毒含量分别为25.27、67.24%和0.24。

[0028] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于防治小麦白粉病的方法,其在浓度10-10000nM范围(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20),在小麦接种白粉病菌10天后进行调查,发现随着处理浓度的升高,小麦感染白粉病的病情指数

下降,相对免疫效果提高,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸在高浓度10000nM处理时,病情指数为30.89,相对免疫效果为65.68%。通过对小麦叶片上的菌丝分布情况进行观察,发现随着浓度的上升,菌丝数和分生孢子量显著下降。2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在高浓度10000nM处理时,病情指数为27.59,相对免疫效果为71.12%。通过对小麦叶片上的菌丝分布情况进行观察,发现随着浓度的上升,菌丝数和分生孢子量显著下降。

[0029] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸用在田间应用的药效结果表明,在1000nM处理浓度下小麦的病情指数,相对免疫效果和千粒重分别为48.64、38.74%和32.61g均明显好于阿泰灵处理和助剂对照组。2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用在田间应用的药效结果表明,在1000nM处理浓度下小麦的病情指数,相对免疫效果和千粒重分别为28.37、47.28%和37.92g均明显好于阿泰灵处理和助剂对照组。综上2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸对小麦白粉病的发生与扩散起到显著的抑制作用。

[0030] 综上2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸对小麦白粉病的发生与扩散起到显著的抑制作用。

[0031] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于防治细菌病害的方法,其在浓度为100-10000nM浓度范围(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20),随着处理浓度的提高,拟南芥叶片中细菌PstDC3000积累量逐渐下降,当2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理浓度为10000nM时,每毫克叶片中细菌个数为 3.81×10^5 ,与空白对照相比细菌个数减少了88.06%,病情指数为30.28。当2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸处理浓度为10000nM时,每毫克叶片中细菌个数为 2.77×10^5 ,与空白对照相比细菌个数减少91.37%,病情指数为27.17。这一结果说明,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够激发拟南芥自身免疫,抑制细菌在植物体内的繁殖,降低细菌积累量,延缓并抑制病害的发展。

[0032] 一种提高植物对非生物胁迫抗性的方法,包括向植物施加本发明所述的植物免疫诱抗剂;所述的非生物胁迫选自高温、低温、干旱和/或盐胁迫中的任意一种或多种。

[0033] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸用于提高植物对高温抵抗能力的方法,其浓度在10-10000nM之间的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)对苗期拟南芥进行处理诱导,发现处理组的植株经45℃高温处理12h后在室温恢复7d后,光合性能指数 PI_{ABS} 均高于对照组,热害指数均低于对照组。这一结果说明通过外源喷施2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液有效缓解了高温对幼苗造成的伤害水平。

[0034] 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于提高植物对高温抵抗能力的方法,其浓度在1-1000nM之间的2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸溶液(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)对苗期黑麦草进行处理诱导,发现处理组的植株经45℃高温处理12h后在室温恢复7d后,光合性能指数 PI_{ABS} 均高于对照组,热害指数均低于对照组。这一结果说明通过外源喷施2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸溶液有效缓解了高温对幼苗造成的伤害水平。

[0035] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸用于提高植物对低温的抵抗能力的方法,用10-10000nM浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)对茶叶幼苗进行叶面喷施处理,发现在-4℃低温胁迫24h后,经过10nM、100nM、1000nM和10000nM处理的茶叶幼苗的光合性能指数 PI_{ABS} 均显著高于对照组,冷害指数明显低于对照组,说明2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸有效缓解了低温对茶叶幼苗造成的伤害,提

高了茶叶对低温胁迫的抵抗能力。

[0036] 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于提高植物对低温的抵抗能力的方法,用1-1000nM浓度的2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸溶液(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)对茶叶幼苗进行叶面喷施处理,发现在-4℃低温胁迫24h后,经过1nM、10nM、100nM和1000nM处理的茶叶幼苗的光合性能指数 PI_{ABS} 均显著高于对照组,冷害指数明显低于对照组,说明2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸有效缓解了低温对茶叶幼苗造成的伤害,提高了茶叶对低温胁迫的抵抗能力。

[0037] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于提高植物对干旱胁迫的抵抗能力的方法,用100和1000nM的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸溶液(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)对两叶一心的水培小麦进行叶面喷施处理,发现在25%聚乙二醇-6000(PEG-6000)胁迫下,经过100nM和1000nM处理的小麦各生物量显著高于对照组,这一结果说明2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸提高了小麦对干旱胁迫的抗性。

[0038] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用于提高植物对盐胁迫的抵抗能力的方法,用1-1000nM浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸溶液(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)对两片真叶期的水培棉花进行叶面喷施处理,发现在100mM NaCl胁迫下,各喷施了2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的处理组,棉花死亡率及盐害指数均低于对照组,这一结果说明2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸提高了棉花对盐的耐性水平。

[0039] 技术先进性和有益效果

[0040] 本发明的主要优点和积极效果如下:

[0041] 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸均为天然产物,结构简单,生物提取方式简便。由于本发明确认了2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸均能够诱导植物对农业生产中存在的部分危害严重的病害产生免疫活性,以及能够诱导植物对于目前农业生产中所面临的主要的非生物胁迫产生抗逆性,具有开发成天然植物免疫诱抗剂的潜力。

[0042] 本发明发现了2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸均具有较高的广谱免疫诱导活性,在0.1nM的低浓度下就能诱导烟草产生免疫反应阻止番茄斑萎病的发生和蔓延;在浓度为1000nM时,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够诱导小麦对白粉病产生47.24%的相对免疫效果,2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够诱导小麦对白粉病产生57.40%的相对免疫效果;在浓度为100nM时,能够抑制丁香假单胞菌PstDC3000在拟南芥叶片中的积累,降低拟南芥的发病指数。在应对非生物胁迫方面,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸在浓度为10-10000nM时,能够诱导拟南芥提高对高温的抵抗能力,以及小麦对干旱和茶叶对低温的抵抗能力;2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在浓度为1-10000nM时,能够诱导拟南芥提高对高温的抵抗能力,以及小麦对干旱和茶叶对低温的抵抗能力。2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在浓度为100nM时,均能够显著提高棉花对盐渍的抵抗能力。2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用量低,无环境污染,是高效、环保的生物农药,这表明了该物质在农业生产上的巨大利用价值和广阔前景。

[0043] 本发明可以用于控制发生于农田主要的真菌性病害,如小麦白粉病;病毒性病害,

如番茄斑萎病;细菌性病害,如丁香假单胞菌引起的病害等。这表明该化合物能够诱导植物对多类型病害产生免疫反应。同时,其能够诱导植物抵抗自然界多种非生物胁迫,如高温、低温、干旱和盐胁迫,为缓解各类胁迫对植株产生的伤害提供技术参考。

[0044] 本发明发现了2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸或2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸做茎叶处理可以阻止多种农业生产中主要病害的发生和蔓延,能够减轻作物在生长发育过程中所受的多种非生物胁迫的抑制。2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸使用方便,可以起到提前预防的作用,降低多种生物和非生物胁迫所引起的植物的伤害水平,减少农药的使用量,节约生产成本。此外,由于2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸均为天然存在的一种结构简单的代谢产物,属于 α -氨基酸,具有很高的环境和生物安全性,属于绿色、高效的生物农药范畴。

具体实施方式

[0045] 发明人从链格孢菌中分离提纯得到了2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸,对其结构进行了鉴定。随后对其进行了生物活性、适用范围及作物安全性研究,发现该物质为天然植物免疫诱抗剂,具备开发为生物农药的潜力。同时,其研究思路为生物农药的发展以及病害的防治和非生物胁迫的缓解提供了新的发展方向。本发明的实质性特点可以从下述的实施方案和实施例中得以体现,但这些不应视为是对发明的任何限制。

[0046] 实施例1(本发明化合物的生物合成、提取方法及结构鉴定)

[0047] (1) 链格孢菌的培养

[0048] 葡萄糖硝酸钠培养基:葡萄糖,40.0g;NaNO₃,1.0g;NH₄Cl,0.25g;KH₂PO₄,1.0g;KCl,0.25g;NaCl,0.25g;MgSO₄·7H₂O,0.5g;FeSO₄·7H₂O,0.01g;ZnSO₄·7H₂O,0.01g;酵母提取物,1g,加水定容至1L,调pH到5.5。

[0049] 链格孢菌培养方法为:PDA培养基活化保存的菌株,7天后,选取生长一致的菌落,打取直径为5mm的菌饼,接种到500mL培养基内,接种量为每100mL一个菌饼。将接种菌块的培养基放置到恒温摇床内,培养条件为:140rpm,25℃,黑暗培养7天。

[0050] (2) 化合物的提取

[0051] 从培养7天后的发酵液中将菌丝分离出来。采用离心机进行分离,离心条件为10000rpm,5分钟。除去上清液,将菌丝从瓶底取出放入研钵中,用液氮快速将其研磨成均匀粉末。粉末装入离心管中,加5mL水后摇匀,静置萃取1小时。采用离心的方式去除沉淀,离心条件为10000rpm,5分钟。所得到的上清液即为氨基酸的粗提物。

[0052] (3) HPLC法分离提纯2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸:

[0053] 利用高效液相色谱对氨基酸粗提物进行分离提纯,采用双流动相法进行洗脱。洗脱条件为A:60%水(含0.1%甲酸),B:40%乙腈,紫外检测波长为210nm,流速2mL min⁻¹经过分离,可以除去粗提物中的杂质,得到单一组分的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸,出峰时间为3.5min,此方法可以有效的分离链格孢菌中的该化合物。

[0054] 分离得到的无色针状晶体利用核磁共振和质谱的方式对其结构进行鉴定。

[0055] 核磁结果如下:¹H NMR(500MHz,Deuterium Oxide) δ 3.49(s,1H,CHNH₂),1.33(s,1H,CCH₃),1.12(s,1H,CCH₃)。

[0056] ^{13}C NMR (125MHz, Deuterium Oxide) δ 173.86 (CHCOOH), 76.71 (CHNH₂), 69.79 (COH), 27.38 (CCH₃), 23.17 (CCH₃)。

[0057] 质谱显示该化合物的分子离子峰为:134.0814 [M+H]⁺, 确定其分子式为:C₅H₁₁N₃。结合核磁氢和碳谱的结果确定该化合物为2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸。

[0058] (3) HPLC法分离提纯2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸:

[0059] 利用高效液相色谱对氨基酸粗提物进行分离提纯, 采用双流动相法进行洗脱。洗脱条件为A:60%水(含0.1%甲酸), B:40%乙腈, 紫外检测波长为256nm, 流速2mL min⁻¹经过分离, 可以除去粗提物中的杂质, 得到单一组分的2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸, 出峰时间为8.7min, 此方法可以有效的分离链格孢菌中的该化合物。

[0060] 分离得到的白色晶体利用核磁共振和质谱的方式对其结构进行鉴定。核磁结果如下:

[0061] ^1H NMR (500MHz, Deuterium Oxide) δ 7.12-6.79 (m, 4H, Ph), 3.76-3.69 (dd, J₁=5Hz, J₂=10Hz, 1H, CH-NH₂), 3.12-3.09 (m, 1H, CHCH₃), 1.25-1.21 (dd, J₁=5Hz, J₂=10Hz, 3H, CHCH₃);

[0062] ^{13}C NMR (125MHz, Deuterium Oxide) δ 174.03 (CHCOOH), 155.01 (Ph), 129.24 (Ph), 129.14 (Ph), 115.93 (Ph), 115.78 (Ph), 61.08 (CHNH₂), 40.04 (CHCH₃), 14.28 (CHCH₃)。

[0063] 质谱显示该化合物的分子离子峰为:196.0967 [M+H]⁺, 确定其分子式为:C₁₀H₁₃N₃O。并结合核磁氢谱和碳谱的结果确定该化合物为2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸。实施例2 (2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导烟草抗番茄斑萎病毒侵染)

[0064] 番茄斑萎病毒取自中国云南省, 初始毒源放于-80℃冰箱进行保存, 采取摩擦接种的方法将其接种在本氏烟叶片上对病毒进行活化, 提取病毒质粒利用大肠杆菌感受态细胞进行转化, 涂布到抗性平板上培养, 挑取单菌落进行PCR筛选, 选取阳性菌落用于测序和后续的质粒提取, 将测序正常的质粒加入到农杆菌感受态细胞中, 采用电击法进行农杆菌转化, 取转化后的农杆菌菌液涂布于相应抗性的筛选平板上, 28℃ (±1) 培养48h。挑取转化平板上的农杆菌单菌落, 置于5mL含有相应抗性的LB培养基中, 28℃, 180rpm过夜培养。6000rpm离心2min收集菌体, 用处理缓冲液 (10mM MgCl₂, 10mM MES, 10μM Acetosyringone) 悬浮菌体, 使悬浮液的OD₆₀₀值为0.5, 28℃避光处理3h后待用。

[0065] 取2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸用蒸馏水溶解后再用蒸馏水梯度稀释成0nM、0.1nM、1nM和10nM的溶液。将本氏烟草种子播于小盆中, 24 (±1) °C, 12h/12h光照, 培养5周。挑选健康的烟草植株 (8-10片叶为宜) 用上述浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液对其行茎叶喷雾处理, 间隔24小时重复进行处理一次, 共进行两次处理。24小时后, 用1mL注射器抽取浓度均一的农杆菌菌液, 将注射器的注射口直接压在烟草叶片背面的小孔上, 缓慢推进菌液, 使整个叶片浸润。将浸润后的烟草移到24 (±1) °C, 12h/12h光照的条件下培养。3d后进行显微镜观察记录; 同时, 进行取样, 采用Western-blot结合Image J软件对蛋白条带的灰度进行分析, 测定叶片内病毒相对蛋白含量。15d后观察烟草叶片发病情况, 参照GB/T23222—2008《烟草病虫害分级及调查方法》, 记录病情指数, 公式如下:

$$[0066] \quad \text{病情指数} = \frac{\sum[(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})] \times 100}{\text{调查总叶数} \times 9}$$

$$[0067] \quad \text{相对免疫效果} = \frac{\text{空白对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{空白对照病情指数}} \times 100\%$$

[0068] 番茄斑萎病毒病分级标准(以株为单位分级调查):

[0069] 0级:全株无病;

[0070] 1级:心叶脉明或轻微花叶,病株无明显矮化;

[0071] 3级:三分之一叶片花叶但叶片不变形,或植株矮化成正常株高的四分之三以上;

[0072] 5级:三分之一至二分之一叶片花叶,或少数叶片变形,或主脉变黑,或植株矮化成正常株高的三分之二至四分之三;

[0073] 7级:二分之一至三分之二叶片花叶,或变形或少数主侧脉坏死,或植株矮化成正常株高的二分之一至三分之二;

[0074] 9级:全株叶片花叶,严重变形或坏死,或病株矮化成正常株高的二分之一以上。

[0075] 表1不同浓度2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸对番茄斑萎病毒侵染烟草的影响

	处理浓度	病情指数	相对免疫效果(%)	病毒蛋白含量
	0	89.51±1.75 a	0	0.58±0.031 a
[0076]	0.1 nM	58.64±2.31 b	34.48	0.41±0.029 b
	1 nM	40.74±3.02 c	54.48	0.30±0.012 c
	10 nM	29.01±2.87 d	67.59	0.13±0.005 d

[0077] 表1结果表明,在2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸浓度范围为0.1-10nM时,各处理均能显著降低番茄斑萎病毒对烟草的侵染,烟草感染番茄斑萎病毒的病情指数低于60,相对免疫效果为30%以上,且在本浓度范围内随着浓度的升高,烟草感染番茄斑萎病毒的病情指数显著降低,与对照相比相对免疫效果均显著提高,烟草叶片内病毒蛋白含量均显著下降。在处理浓度为10nM时,烟草对番茄斑萎病毒的免疫效果最佳,病情指数、相对免疫效果和病毒含量分别为29.01、67.59%和0.13。以上结果说明,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够提高烟草对番茄斑萎病毒的免疫能力,有效抑制番茄斑萎病毒在烟草中的扩散。

[0078] 采用相同方法考察2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导烟草抗番茄斑萎病毒侵染效果,结果如表2:

[0079] 表2不同浓度2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸对番茄斑萎病毒侵染烟草的影响

	处理浓度	病情指数	相对免疫效果 (%)	病毒蛋白含量
	0	77.16±5.31 a	0	0.54±0.025 a
[0080]	0.1 nM	36.62±0.87 b	52.54	0.34±0.004 b
	1 nM	29.83±2.31 c	61.34	0.28±0.012 c
	10 nM	25.27±3.49 c	67.24	0.24±0.019 d

[0081] 表2结果表明,在2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸在0.1nM就能显著降低番茄斑萎病毒对烟草的侵染,烟草感染番茄斑萎病毒的病情指数低于50,相对免疫效果为50%以上,且

在本浓度范围内随着浓度的升高,烟草感染番茄斑萎病毒的病情指数逐渐降低,与对照相比相对免疫效果均显著提高,烟草叶片内病毒蛋白含量均显著下降。在处理浓度为10nM时,烟草对番茄斑萎病毒的免疫效果最佳,病情指数、相对免疫效果和病毒含量分别为25.27、67.24%和0.24。以上结果说明,2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够提高烟草对番茄斑萎病毒的免疫能力,有效抑制番茄斑萎病毒在烟草中的扩散。

[0082] 实施例3(2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导拟南芥抗丁香假单胞菌侵染)

[0083] 取2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸用无菌水溶解后再用无菌水梯度稀释成100nM、1000nM和10000nM的溶液,另设空白对照,同时加入0.02%吐温20作为表面活性剂。将丁香假单胞菌PstDC3000涂布于LB平板上,28℃培养48h;挑取单克隆菌落接种到含有2mL培养基的50mL离心管中,28℃,250rpm在摇床上培养,每1-2h监测菌液OD₆₀₀值变化,在OD₆₀₀值达到0.8之前停止培养细菌;转移1mL菌液至无菌的1.5mL离心管中,8000rpm离心2min,收集沉淀;去掉上清,用10mM的氯化镁洗涤沉淀3次并离心,最后将PstDC3000重悬在10mM氯化镁,使其OD₆₀₀值达到0.001备用。将拟南芥种子用75%酒精浸泡3min,然后用无菌水洗涤4次,种在装有1/2MS培养基的培养皿中,每个培养皿播12颗种子,将带种子的1/2MS培养皿在4℃下春化3d以打破休眠,然后置于22℃、光照强度为100μE m⁻²s⁻¹(16h光/8h黑暗)的培养室中,幼苗生长2周时将上述不同浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸缓慢倒入培养皿中,直至淹没整个拟南芥幼苗,保持2-3分钟,然后将处理液从培养皿中倾倒干净,每隔24h处理一次,共处理2次,第2次处理24h后用同样的淹没方法将PstDC3000悬浮液(OD₆₀₀=0.01)接种到拟南芥叶片上,接种后用医用透气胶贴将培养皿封闭好,放置于培养室中继续培养。3d后测定不同处理细菌个数,并观察拟南芥发病情况,计算病情指数,计算方式与实施例2病情指数计算公式相同。

[0084] PstDC3000引起的病害分级标准(以叶片为单位):

[0085] 0级:叶面上无病斑;

[0086] 1级:病斑面积占整片叶面积的0%-10%;

[0087] 2级:病斑面积占整片叶面积的10%-25%;

[0088] 3级:病斑面积占整片叶面积的25%-50%;

[0089] 4级:病斑面积占整片叶面积的50%-75%;

[0090] 5级:病斑面积占整片叶面积的75%-100%。

[0091] 表3不同浓度2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸对叶片中细菌个数和病情指数的影响

处理浓度	CFU (mg)	病情指数
0	3.19×10 ⁶	72.22±0.98 a
[0092] 100 nM	9.46×10 ⁵	40.90±2.41 b
1000 nM	7.11×10 ⁵	38.90±1.96 b
10000 nM	3.81×10 ⁵	30.28±7.08 c

[0093] 表3结果表明,随着2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸浓度的上升,每毫克叶片中的细菌个数逐渐下降。处理浓度为100nM、1000nM和10000nM时,每毫克叶片中细菌个数分别减少了

70.34%、77.71%和88.06%，病情指数分别降低了43.22%、45.60%和58.07%。说明2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够激发植物产生对丁香假单胞菌的免疫能力，抑制细菌在植物叶片中的积累，降低植株发病水平。

[0094] 按照相同的方法考察2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导拟南芥抗丁香假单胞菌感染的效果，结果见表4：

[0095] 表4不同浓度2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸对叶片中细菌个数和病情指数的影响

	处理浓度	CFU/mg	病情指数
	0	3.21×10^6	81.94±1.96 a
[0096]	100 nM	4.43×10^5	40.06±0.98 b
	1000 nM	3.04×10^5	36.81±0.28 c
	10000 nM	2.77×10^5	27.17±1.70 d

[0097] 表4结果表明，随着2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸浓度的上升，每毫克叶片中的细菌个数逐渐下降。处理浓度为100nM、1000nM和10000nM时，每毫克叶片中细菌个数减少86.20%、90.53%和91.37%，病情指数分别降低51.11%、55.07%和66.84%。说明2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够激发植物产生对丁香假单胞菌的免疫能力，抑制细菌在植物叶片中的积累，降低植株发病水平。

[0098] 实施例4(2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导小麦抗白粉病菌感染)

[0099] 取2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸用蒸馏水溶解后再用蒸馏水梯度稀释成10nM、100nM、1000nM和10000nM的溶液，另设空白对照。小麦(NAU0686)种子催芽后，种于灭菌土培养钵中，放入23(±1)℃光照12h的温室中培养。当幼苗长至1叶1心期时，用上述浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液对小麦幼苗进行茎叶喷雾处理，间隔24小时重复进行处理一次，共进行两次处理，24h后将新鲜的小麦白粉菌孢子均匀的撒在小麦叶片上，每处理3盆，每盆20株。10d后调查各处理的小麦病情等级，按《农药田间药效试验准则》(一)中的小麦白粉病分级标准记载发病程度，并计算病情指数和相对免疫效果，计算方式与番茄斑萎病病情指数和相对免疫效果计算公式相同，结果如表5所示。

[0100] 小麦白粉病分级标准(以叶片为单位)：

[0101] 1级：病斑面积占整片叶面积的5%以下；

[0102] 3级：病斑面积占整片叶面积的6%-15%；

[0103] 5级：病斑面积占整片叶面积的16%-25%；

[0104] 7级：病斑面积占整片叶面积的26%-50%；

[0105] 9级：病斑面积占整片叶面积的50%以上。

[0106] 表5不同浓度2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸对小麦病情指数和相对免疫效果影响

	处理浓度	病情指数	相对免疫效果 (%)
	0	90.00±3.95 a	0
[0107]	10 nM	74.83±0.13 b	16.85
	100 nM	64.89±0.80 c	27.90
	1000 nM	47.48±3.19 d	47.24
	10000 nM	30.89±1.14 e	65.68

[0108] 表5的结果表明,随着2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸浓度的上升,易感病品种小麦的病情指数下降,相对免疫效果提高。各处理的病情指数均存在显著性差异。当浓度分别为10nM、100nM、1000nM和10000nM时,病情指数分别为74.83、64.89和47.48和30.89,相对免疫效果为16.85%、27.90%、47.24%和65.68%。当2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸浓度大于等于1000nM时,易感病品种小麦感染白粉病的病情指数低于50,而相对免疫效果超过40%,在浓度10000nM时效果最佳。以上结果说明2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够提高小麦对真菌病害白粉病的免疫能力,从而抑制白粉病菌在小麦叶片中的侵染和扩散,阻止小麦白粉病的发展与蔓延。

[0109] 按照相同方法考察2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导小麦抗白粉病菌侵染效果,结果如表6所示:

[0110] 表6不同浓度2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸对小麦病情指数和相对免疫效果的影响

	处理浓度	病情指数	相对免疫效果 (%)
	0	95.56±1.81 a	0
[0111]	10 nM	76.28±0.14b	20.17
	100 nM	62.19±0.43c	34.92
	1000 nM	40.70±3.19 d	57.40
	10000 nM	27.59±2.77 e	71.12

[0112] 表6的结果表明,随着2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸浓度的上升,易感病品种小麦的病情指数下降,相对免疫效果提高。各处理的病情指数均存在显著性差异。当浓度分别为10nM、100nM、1000nM和10000nM时,病情指数分别为76.28、62.19、40.70和27.59,相对免疫效果为20.17%、34.92%、57.40%和71.12%。当2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸浓度为1000nM时,易感病品种小麦感染白粉病的病情指数低于50,而相对免疫效果超过50%,在浓度10000nM时效果最佳。以上结果说明2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够提高小麦对真菌病害白粉病的免疫能力,从而抑制白粉病菌在小麦叶片中的侵染和扩散,阻止小麦白粉病的发展与蔓延。

[0113] 实施例5(2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导小麦抗白粉病菌侵染的田间试验)

[0114] 用1000nM浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液(加入体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20)在江苏省农科院田间进行茎叶喷雾处理,以喷施体积百分比为0.02%的表面活性剂吐温20为助剂对照,以喷施30g/亩的阿泰灵为阳性对照,每个处理三次重复。调查各处理的小麦病情等级,按《农药田间药效试验准则》(一)中的小麦白粉病分级标准记载发病程度,并计算病情指数和相对免疫效果,计算方式与番茄斑萎病病情指数和相对免疫效果计算公式相同。待收获的小麦种子晾干后,对不同处理小麦种子的千粒重进行测定。小麦白粉病分级标准(以叶片为单位):

[0115] 1级:病斑面积占整片叶面积的5%以下;

[0116] 3级:病斑面积占整片叶面积的6%-15%;

[0117] 5级:病斑面积占整片叶面积的16%-25%;

[0118] 7级:病斑面积占整片叶面积的26%-50%;

[0119] 9级:病斑面积占整片叶面积的50%以上。

[0120] 表7 1000nM浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸对小麦病情指数和相对免疫效果及千粒重的影响

	处理	病情指数	相对免疫效果(%)	千粒重 (g)
[0121]	助剂对照	79.41±2.82 a	0	24.75±0.37 c
	阿泰灵 (30g/亩)	55.17±0.78 b	30.52	29.75±0.31 b
	1000 nM	48.64±0.46 c	38.74	32.61±0.18 a

[0122] 表7结果可以看出,1000nM浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液处理可有效提高小麦对真菌病害白粉病的免疫能力,经过该浓度处理的小麦的病情指数显著低于助剂对照组,且小麦的相对免疫效果及千粒重显著高于助剂对照组;与阳性对照阿泰灵相比,1000nM浓度2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液处理的小麦相对免疫效果及千粒重更高。说明喷施2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够有效提高小麦对真菌病害白粉病的免疫能力。

[0123] 按照相同方法进行了2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导小麦抗白粉病菌侵染的田间试验,结果见表8:

[0124] 表8 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸对小麦病情指数和相对免疫效果及千粒重的影响

	处理	病情指数	相对免疫效果(%)	千粒重 (g)
[0125]	助剂对照	53.81±1.35 a	0	29.14±0.32 b
	阿泰灵 (30g/亩)	41.06±0.95 b	23.69	35.86±0.13a
	1000 nM	28.37±2.28 b	47.28	37.92±0.21 a

[0126] 由表8结果可以看出,1000nM浓度的2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸溶液处理可有效提高小麦对真菌病害白粉病的免疫能力,经过该浓度处理的小麦的病情指数显著低于助剂对照组。且小麦的相对免疫效果及千粒重显著高于助剂对照组和阳性对照阿泰灵组。说明喷施2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够有效提高小麦对真菌病害白粉病的免疫能力。

[0127] 实施例6 (2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导拟南芥抗高温胁迫)

[0128] 取2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸用蒸馏水溶解后再用蒸馏水梯度稀释成10nM、100nM、1000nM和10000nM的溶液,另设空白对照,同时加入0.02%吐温20作为表面活性剂。每个浓度设置4组重复,同时设置常温空白对照。拟南芥种子按照每盆50粒左右播种于直径8.5cm的盆钵中,在温度25℃、湿度60%-70%、光强 $200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (16h光照/8h黑暗)的温室中种植。在拟南芥苗期21d时开始进行处理,处理的方法为叶面喷施2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液,24h喷施两次。在第二次处理24h后,将其转移至温度45℃的光照培养箱进行高温胁迫处理,12h后常温下暗处理30min后用植物效率Handy-PEA测定拟南芥叶片的叶绿素荧光,然后将植株取出转移至25℃的温室恢复7d,观察统计植株的受害情况并计算热害分级。其中热害分级标准见表9,热害指数计算公式如下。热害及荧光参数结果见表6。

$$[0129] \quad \text{热害指数 (\%)} = \frac{\sum \text{级别株数} \times \text{级别数}}{\text{最高级别} \times \text{处理总株数}} \times 100$$

[0130] 表9热害分级标准

热害级别	伤害程度
0	植株生长正常
1	少于 1/4 的叶片表现萎蔫
[0131] 2	1/4-1/2 的叶片表现萎蔫或发黄
3	1/2-3/4 的叶片表现萎蔫或发黄
4	3/4 以上的叶片表现萎蔫或发黄
5	植株枯死

[0132] 表10 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸对高温胁迫下拟南芥的影响

处理浓度	PI _{ABS}	热害指数 (%)
空白对照	16.69±1.86a	0
[0133] 0	7.59±0.77d	80
10 nM	10.60±0.32c	60
100 nM	11.27±0.89c	45
[0134] 1000 nM	13.61±0.38b	20
10000 nM	15.60±0.78ab	15

[0135] 表10的结果表明,经过2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理的拟南芥在高温胁迫后的光合性能指数PI_{ABS}显著高于空白对照。热害指数随着处理浓度的增加而降低。其中10000nM的效果最好,该浓度处理下拟南芥的光合性能指数PI_{ABS}增加了106%,热害指数降低了

65%。可见,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够缓解高温胁迫对拟南芥植株光合系统的伤害,提高拟南芥对高温胁迫的抵抗能力。

[0136] 实施例7 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导黑麦草抵抗高温胁迫

[0137] 取2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸用蒸馏水溶解后再用蒸馏水梯度稀释成1nM、10nM、100nM和1000nM的溶液,另设空白对照,同时加入0.02%吐温20作为表面活性剂。每个浓度设置4组重复,同时设置常温空白对照。黑麦草种子按照每盆0.8g称重,并播种于直径8.5cm的盆钵中,在温度25℃、湿度60%-70%、光强 $200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (12h光照/12h黑暗)的温室中种植。黑麦草生长7d后开始进行处理,处理的方法为叶面喷施2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸溶液,24h喷施两次。在第二次喷施24h后,将其转移至温度45℃的光照培养箱进行高温胁迫处理12h,接下来常温暗处理30min后用植物效率Handy-PEA测定拟南芥叶片的叶绿素荧光,然后将植株取出转移至25℃的温室恢复7d,观察统计植株的受害情况并计算热害分级。其中热害分级标准见表9,热害指数计算公式如下。热害及荧光参数结果见表11。

$$[0138] \quad \text{热害指数 (\%)} = \frac{\sum \text{级别株数} \times \text{级别数}}{\text{最高级别} \times \text{处理总株数}} \times 100$$

[0139] 表11 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸对高温胁迫下黑麦草的影响

	处理浓度	PI _{ABS}	热害指数 (%)
	空白对照	10.07±1.46a	0
	0	0.56±0.16c	90
[0140]	1 nM	0.78±0.23bc	81
	10 nM	0.95±0.41bc	66.67
	100 nM	1.50±0.54b	55
	1000 nM	2.61±1.05ab	35

[0141] 表11的结果表明,经过2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸处理的黑麦草在高温胁迫后的光合性能指数PI_{ABS}显著高于空白对照。热害指数随着处理浓度的增加而降低。其中1000nM的效果最好,该浓度处理下黑麦草的光合性能指数PI_{ABS}升高了366%,热害指数降低了55%。可见,2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够缓解高温胁迫对黑麦草光合系统的伤害,提高黑麦草对高温胁迫的抵抗能力。

[0142] 实施例8 (2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导茶树抗低温胁迫)

[0143] 供试茶树为扦插苗白叶1号。选择长势较一致的茶苗移入直径18cm的塑料盆钵中,置于温度25℃,湿度60%-70%的温室使之适应生长一周左右进行实验。实验设置0、10、100、1000和10000nM,同时加入0.02%吐温20作为表面活性剂。其中喷雾处理方法与实施例6中拟南芥的处理方法相同,低温胁迫的时间为24h,温度设置为-4℃。胁迫完成后将茶苗取出,常温暗处理30min后用植物效率Handy-PEA测定茶苗顶部叶片的叶绿素荧光,随后置于25℃温室恢复3d,观察统计其冷害状况并进行分级。其中冷害指数统计分级标准见表12,计

算公式如下,结果如表13所示。

$$[0144] \quad \text{冷害指数 (\%)} = \frac{\sum \text{冷害级别} \times \text{相应冷害级株数}}{\text{最高冷害级别} \times \text{总株数}} \times 100$$

[0145] 表12冷害分级标准

冷害级别	伤害程度
0	植株生长正常
1	叶缘略失水
[0146] 2	叶缘严重失水
3	叶缘严重失水, 叶片有脱水斑
4	叶缘严重失水, 叶片脱水斑连接成片, 部分叶片皱缩
5	全叶失水皱缩, 萎蔫

[0147] 表13 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理对低温胁迫下茶叶的影响

处理浓度	PI _{ABS}	冷害指数 (%)
0	23.21±2.10d	75
[0148] 10 nM	28.35±1.66c	65
100 nM	30.67±2.07bc	45
1000 nM	35.23±1.96b	30
[0149] 10000 nM	40.16±2.15a	15

[0150] 表13的结果表明,在低温胁迫条件下,经过2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理的茶叶随浓度升高光合性能指数PI_{ABS}显著上升,冷害指数明显下降。10000nM浓度处理的效果最佳,该浓度处理下的茶叶PI_{ABS}提高了73%,冷害指数降低了60%。由此可见,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够缓解低温胁迫对茶叶幼苗光合系统造成的伤害,提高茶叶对低温胁迫的抵抗能力。

[0151] 按照相同方法考察2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导茶树抗低温胁迫效果,结果如14所示:

[0152] 表14 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸处理对低温胁迫下茶叶的影响

处理浓度	PI _{ABS}	冷害指数 (%)
0	20.21±0.99e	70
1 nM	28.10±3.10cd	60
10 nM	31.94±1.37bc	55
100 nM	34.67±3.27ab	35
1000 nM	38.56±2.23a	30

[0154] 表14的结果表明,在低温胁迫条件下,经过2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸处理的茶叶光合性能指数PI_{ABS}均显著上升,冷害指数明显下降。其中以1000nM的效果最佳,该浓度处理的茶叶PI_{ABS}提高了90.8%,冷害指数降低了40%。由此可见,2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够缓解低温胁迫对茶叶幼苗光合作用活性的伤害,提高茶叶对低温胁迫的抵抗能力。

[0155] 实施例9(2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导小麦抗干旱胁迫)

[0156] 用6目的网筛作为容器水培小麦,每筛50粒,每隔两天更换一次1/2Hoagland营养液,待小麦生长到两叶一心时期开始叶面喷施2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液,2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸浓度为0、100和1000nM,同时加入0.02%吐温20作为表面活性剂;连续喷施两天后,在第三天将水培营养液替换成含有25%PEG-6000的1/2Hoagland营养液进行胁迫处理,干旱胁迫6d后复水处理,在正常的营养液中恢复生长7d后观察测定旱害指数,并测定其根长和生物量。结果如表16所示。

[0157] 叶片旱害与盐害后的表现特征类似,借用盐害的评估指标引入旱害率及旱害指数,旱害指数公式如下,旱害分级标准见表15。

$$[0158] \quad \text{旱害指数} (\%) = \frac{\sum \text{旱害级别} \times \text{相应旱害株数}}{\text{总株数} \times \text{旱害最高级别}} \times 100$$

[0159] 表15旱害分级标准

旱害级别	伤害程度
0	无旱害症状
1	轻度旱害,有少部分叶片的叶尖、叶缘或叶脉变黄
2	中度旱害,有约 1/2 的叶尖、叶缘焦枯
3	重度旱害,大部分叶尖、叶缘焦枯或落叶

[0161] 表16 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理对干旱胁迫下小麦生物量与旱害指数的影响

处理浓度	鲜重 (g)		干重 (g)		根长 (cm)	旱害指数 (%)
	地上部	地下部	地上部	地下部		
[0162] 0	6.10±0.05c	2.89±0.02c	0.69±0.03c	0.32±0.01b	13.10±0.20b	77
100 nM	7.27±0.02b	3.65±0.01b	0.80±0.01b	0.33±0.01a	13.94±0.03a	45
1000 nM	8.84±0.09a	4.48±0.02a	0.92±0.05a	0.37±0.01a	14.58±0.01a	26

[0163] 表16的结果表明,随着处理浓度的增加小麦对干旱胁迫的抵御能力在逐步增强。两个处理浓度下小麦的鲜重、干重、根长均高于对照组,这使得小麦旱害指数明显降低。与对照相比,1000nM浓度的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理使小麦幼苗根长增加了11.30%,地上和地下部分鲜重分别提高了44.92%和55.02%,旱害指数降低了51%。这说明2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能提高小麦抗干旱胁迫的能力。

[0164] 按照相同方法考察了2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导小麦抗干旱胁迫效果,结果见表17:

[0165] 表17 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸处理对干旱胁迫下小麦生物量与旱害指数的影响

处理浓度	鲜重 (g)		干重 (g)		根长 (cm)	旱害指数 (%)
	地上部	地下部	地上部	地下部		
[0166] 0	6.11±0.08c	2.90±0.05c	0.71±0.02b	0.30±0.02b	13.16±0.21b	74
100 nM	7.34±0.18b	3.70±0.03b	0.83±0.01a	0.36±0.01a	14.02±0.03a	47
1000 nM	8.90±0.15a	4.58±0.01a	0.93±0.05a	0.39±0.01a	14.67±007a	25

[0167] 表17的结果表明,随着处理浓度的增加小麦对干旱胁迫的抵御能力在逐步增强。两个处理浓度下小麦的鲜重、干重、根长均高于对照组,这使得小麦旱害指数明显降低。与对照相比,1000nM浓度的2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸处理使小麦幼苗根长显著增长了11.47%,地上和地下部分鲜重分别增加了45.66%和57.93%,同时旱害指数降低了49%。这说明2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能提高小麦抗干旱胁迫的能力。

[0168] 实施例10(2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导棉花抗盐胁迫)

[0169] 实验材料为“泗抗一号”棉花,用500mL塑料杯进行水培,每隔两天更换一次1/2Hoagland营养液。当棉花幼苗生长至第二片真叶完全展开时用2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸溶液进行叶面喷施,实验设置0、1、10、100和1000nM浓度,同时加入0.02%吐温20作为表面活性剂。每24h喷施一次,共2次,处理后第二天向1/2Hoagland营养液加入NaCl使其终浓度为100mM,进行盐胁迫处理。每个处理三次重复。盐胁迫三天后复水处理,观察棉花的盐害症状,并计算盐害指数,计算公式如下:

$$[0170] \quad \text{盐害指数 (\%)} = \frac{\sum \text{各级记载的受害植株} \times \text{相应级数值}}{\text{调查总株数} \times \text{最高盐害级}} \times 100$$

[0171] 表18盐害分级标准

盐害级别	伤害程度
1	株高、叶片数与对照处理相当，植株健壮，叶片平展，绿色有光泽； 生长正常，没有受害症状。
2	株高为对照的 70%-100%，真叶比对照处理少 0.5 片-1.0 片，子叶平展， 盐害症状不明显，生长基本正常
3	株高为对照的 50%-70%，真叶比对照少 1.0 片，子叶边缘卷曲。
4	株高为对照的 50%以下，无真叶，只有心叶存活，生长点钝化，子叶 浓绿、皱缩，边缘卷曲。
5	子叶脱落，植株干枯，死亡。

[0173] 表19 2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸处理对盐胁迫下棉花的影响

处理浓度	盐害指数 (%)	死亡率 (%)
0	75	71
1 nM	66	51
10 nM	58	47
100 nM	54	34
1000 nM	48	30

[0176] 表19的结果表明，棉花的盐害指数随着2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸浓度的升高而下降，各处理的植株死亡率均低于对照。当浓度为1000nM时，盐害指数和死亡率均最低，分别为48%和30%。以上结果说明2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸能够诱导棉花对盐胁迫产生较好的抗性。

[0177] 按照相同的方法考察2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸诱导棉花抗盐胁迫的效果，结果如表20所示：

[0178] 表20 2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸处理对盐胁迫下棉花的影响

处理浓度	盐害指数 (%)	死亡率 (%)
0	78	70
1 nM	64	48
10 nM	56	45
100 nM	52	30
1000 nM	43	29

[0180] 表20的结果表明，棉花的盐害指数随着2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸浓度的升高而下降，各处理的植株死亡率均低于对照。当浓度为1000nM时，盐害指数和死亡率均最低，分别为43%和29%。以上结果说明2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸能够诱导棉花对盐胁迫产生较好的抗性。

[0181] 化学合成的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸也具有与生物提取的2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸相同的效果。2-氨基-3-羟基-3-甲基丁酸和2-氨基-3-(4-羟基苯基)丁酸的制备方法不影响其作为免疫诱抗剂的应用和效果。