

脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对诱导油菜抗性的影响

张学昆, 唐章林, 谌利, 郭益红, 陈云坪, 李加纳

(西南农业大学农学系, 重庆 470016)

摘要: 对甘蓝型油菜“西农长角”发芽 5d 的幼苗子叶进行涂抹抗性诱导效应及基机理的影响研究表明, 脱乙酰化几丁质对抗性的诱导与水杨酸(SA)相似, 但乙酰化程度对诱导效果有显著的影响并体现出一定的规律性。苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性随乙酰化程度增加而提高; 而几丁质酶活性则随乙酰化程度增加而下降, 只有完全脱乙酰化(D.A. 为 0%)的 10B 和 GC 能诱导酶活性提高, 而 D.A. 为 10%、20%、30% 的 7B、8B 和 9B 则表现出抑制作用; 过氧化物酶(POD)活性都能被诱导而比对照高, 但乙酰化程度的影响不显著。

关键词: 油菜; 脱乙酰化几丁质; 乙酰化程度; 抗病性

Effect of Partially N-acetylated Chitosans on Induction of Resistance in *Brassica napus* L.

ZHANG Xue-kun, TANG Zhang-lin, CHEN Li, GUO Yi-hong, CHEN Yun-ping, LI Jia-na

(Agronomy Department of Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

Abstract: The effects of four partially N-acetylated chitosan and Glycol chitosan on induction of resistance in Xinong Changjiao, a variety of *Brassica* were studied. Results showed that chitosan was similar to salicylic acid (SA) in induction of resistance, but the induction was influenced by the degree of acetylation of chitosan. Fully deacetylated chitosan, 10B and GC, induced high chitinase activity, but partially acetylated chitosan, 7B, 8B and 9B, inhibited chitinase activity. Phenylalanine ammoniolyase (PAL) was also induced and its activity increased with the increasing of acetylation, 7B induced highest PAL activity among all chitosans. All chitosans induced peroxidase (POD) in similar level.

Key words: *Brassica napus* L.; Chitosan; Degree of acetylation; Resistance reaction

许多研究表明, 在病原菌的感染、伤害和水杨酸等诱导下, 植物通过过敏反应(hypersensitive response, HR)和系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)等抗病机制, 诱导产生病程相关蛋白(PR)^[1-2], 如几丁质酶(chitinase)、 β -1, 3-葡聚糖酶、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)^[3-6]等, 这些酶类活性提高可以抵御病原真菌的入侵, 其活性的变化也是植物抗性的重要指标。脱乙酰化几丁质是几丁质脱乙酰化后的一类高分子多糖衍生物, 广泛存在于自然界中, 它也是真菌细胞壁中的重要结构组成物质。Bhaskara Reddy 等(1999a)^[7]、于汉寿等(1999a)^[8]研究发现, 脱乙酰化几丁质处理植物

的种子和叶片后, 能诱导一些 PR 活性提高, 并提高了其抗真菌病害的能力。

近年, 一些新的研究发现, 由于脱乙酰化几丁质的结构和理化性质不同, 不同的脱乙酰化几丁质对植物的诱导效应也有差异^[9, 10]。本文以甘蓝型油菜品种“西农长角”幼苗为材料, 利用乙酰水杨酸(salicylic acid, SA)为阳性对照, 对乙酰化程度不同的 5 种脱乙酰化几丁质对油菜抗性相关酶的诱导效应及其机理进行了系统研究。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2001-06-19

基金项目: 重庆市“十五”重点作物育种攻关项目

作者简介: 张学昆(1968-), 男, 云南昆明人, 副研究员, 在职博士生, 主要从事油菜品质和抗性遗传研究。Tel: 023-68251383; E-mail: zhxkun@online.cq.cn。李加纳为通讯联系人, Tel: 023-68251264; E-mail: ljn@swau.cq.cn

试验所用油菜材料西农长角由本校油菜研究室提供。菌核菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 由本校生物技术中心提供。主要化学试剂脱乙酰化几丁质: Chitosan 7B、8B、9B、10B(以下简称 7B、8B、9B 和 10B, 乙酰化程度 (degree of acetylation, D. A.) 分别为 30%, 20%, 10%, 0%) 购于 Funakoshi 公司(日本), 糖基脱乙酰化几丁质 (glycol chitosan, D. A. 为 0%, 聚合度 > 400, 以下简称 GC) 购于 Wako Junyuku 公司(日本), 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 诱导处理

将油菜种子用 2% 的次氯酸钠处理 15 min 表面杀菌后, 用无菌水洗净。将油菜种子在光照培养箱 (25°C) 下以全营养液进行培养, 发芽后第 5 天, 用 5% 水杨酸溶液 0.5% 的 5 种脱乙酰化几丁质 (pH6.0) 溶液涂在子叶两面, 对照为 20 mmol/L 醋酸缓冲液 (pH6.0)。涂抹后采用连续光照处理, 每隔 12h 取样测定几丁质酶、POD 和 PAL 的活性。每一处理重复 3 次。

1.3 几丁质酶底物特异性

油菜种子发芽 5d 后, 提取幼苗几丁质酶, 以不同的脱乙酰化几丁质为底物, 测定几丁质酶的活性。

1.4 生理生化测定

几丁质酶活性提取和测定: 几丁质酶的提取参照 Kato 等 (1996)^[11] 的方法: 称取幼苗 1.0g, 加入 20 mmol/L (pH6.0) 的磷酸缓冲液研磨为匀浆, 4°C 下 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH6.0, 4°C) 透析 24h, 然后转入 1.5 ml 的离心管中冰冻保存备用。采用 Shimozaki 等 (1995)^[12] 几丁质酶活性测定方法测定: 以 Chitosan 7B 为底物, $K_3[Fe(CN)_6]$ 为显色液, 于 420 nm 分光光度计比色。以 1 mg 蛋白质 1 min 水解几丁质产生 1 μ mol 还原性糖的酶量定义为 1 酶活力单位 (U), 以氨基葡萄糖制作标准曲线。

POD 提取和活性测定采用愈创木酚比色法^[13], 以 1 mg 蛋白质 1 min 分解 1 μ mol H_2O_2 的酶量定义为 1 酶活力单位 (U); PAL 提取和活性测定采用 Peter Vander 的方法^[9], 以 1 mg 蛋白质 1 min 催化苯丙氨酸产生 1 μ mol 肉桂酸的酶量定义为 1 酶活力单位 (U)。蛋白质含量测定采用 Bradford 的方法^[14], 以牛血清白蛋白作标准。

以上测定均为 3 次重复, 每次重复取样 1g, 每次重复设 3 个平行试验。取平均值进行分析。

1.5 离体叶菌丝体接种试验

离体叶菌丝体接种采用胡小加等^[15]的方法。

对生长至 6~8 片叶“西农长角”幼苗用 5% 水杨酸溶液 0.5% 的 5 种脱乙酰化几丁质 (pH6.0) 溶液喷施处理, 对照为 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH6.0)。48h 后采集叶片接种处理, 每个处理重复 3 次, 每一重复采集 10 株, 每株采 1 片叶龄和大小一致的叶片, 放入垫有纱布的搪瓷方盘中, 纱布湿润, 叶柄用湿纱布压住, 叶片用玻棒或试管垫起, 每盘相对放置 2 排叶片。接种用菌核菌在马铃薯琼脂平板培养基 (PDA) 培养 3~4d, 取菌落外周菌丝块 ($\varnothing=4$ mm), 贴于叶面。叶片接种后, 瓷盘置于 22~25°C, 光照保湿条件下培养, 48h 后开始测量病斑大小。

2 结果与分析

2.1 油菜几丁质酶对不同底物的分解特异性

从图 1 可以看出, 西农长角的几丁质酶对脱乙酰化几丁质 7B 的活性最高。而 8B、9B、10B 和 GC 的活性较低。这说明, 油菜几丁质酶对乙酰化程度较高的底物有较强的水解作用。

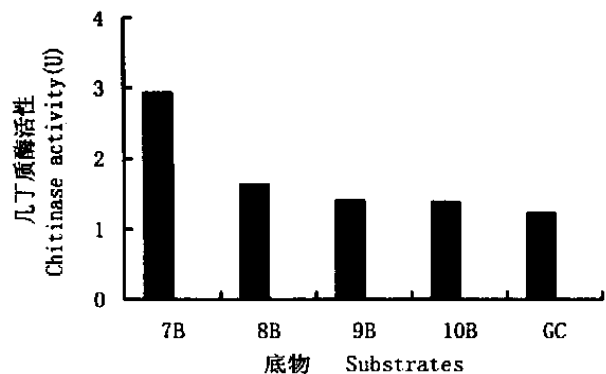


图 1 油菜几丁质酶对不同底物的分解特异性

Fig.1 Substrate Specificity of chitinase of Xinong Changjiao

2.2 脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对油菜几丁质酶诱导的影响

从图 2 可知, 乙酰化程度为 0% 的 GC 和 10B 表现出与 SA 相似的较强诱导作用, 其中 10B 在 60h 时几丁质酶达活性高峰, 比对照提高了 80.2%, 而 GC 则在 48h 时产生活性高峰, 比对照提高 92.5%。乙酰化程度 > 0% 的 9B、8B 和 7B 不但没有诱导作用, 相反, 8B 和 7B 表现出明显的抑制作用, 其中 7B 处理的几丁质酶活性比对照平均下降 42%, 8B 下降 25.8%, 9B 下降不明显, 为 7.4%。表明脱乙酰化几丁质的分子结构对油菜几丁质酶的影响十分显著, 乙酰化程度的增加不但会降低诱导效果, 甚至还产生抑制几丁质酶活性的作用。

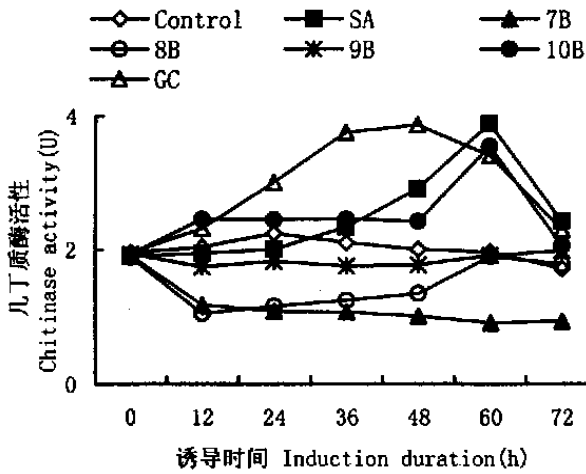


图 2 不同乙酰化程度对油菜几丁质酶诱导的影响

Fig.2 Effects of chitinase activity induction by partially N acetylate chitosan

2.3 脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对 POD 诱导的影响

脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对 POD 诱导的影响见图 3。6 种处理对 POD 均有明显的诱导作用,其活性从 12h 开始产生差异,而且都在 48h 时出现活性高峰,比对照提高 40%~50%,各处理之间的差异不明显。这表明,脱乙酰化几丁质对油菜 POD 活性的诱导影响是十分显著的,但诱导效果与其乙酰化程度的关系不大。

2.4 脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对 PAL 诱导的影响

测定 PAL 活性结果表明(图 4),SA 的诱导效应与脱乙酰化几丁质有所不同,其活性高峰出现在 48h,比对照活性提高了 422%。脱乙酰化几丁质诱导后,活性比 SA 较低,高峰一般出现在 60h,并表现出一定的规律性,即 PAL 活性与处理的乙酰化程度呈正比,其中 7B 诱导产生的 PAL 活性最强,比对照提高 333%,8B 次之,为 182%,9B 为 64.6%;而 10B 则表现出抑制效应,平均比对照下降 22.4%。结果还发现,虽然 GC 与 10B 的乙酰化程度都为 0%,但 GC 则表现出较强的诱导效应,60h 时,比对照活性提高 278%,这可能是 GC 的聚合度较低,而且修饰基团与脱乙酰化几丁质不同,造成诱导效应与 10B 产生了差别。

2.5 脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对油菜抗菌核病的影响

用脱乙酰化几丁质处理子叶后,能诱导油菜抗

性提高,病情指数有一定的下降,但除了 GC 和 SA 与对照的差异达到显著,诱导效果达 25.8% 和 20.6%,试验中另外 4 种脱乙酰化几丁质均未达到显著水平(表)。

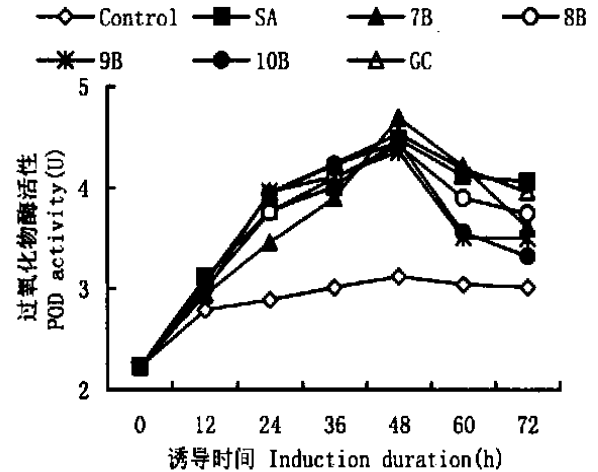


图 3 脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对 POD 诱导的影响

Fig.3 Effect of POD activity induction by partially N acetylate chitosan

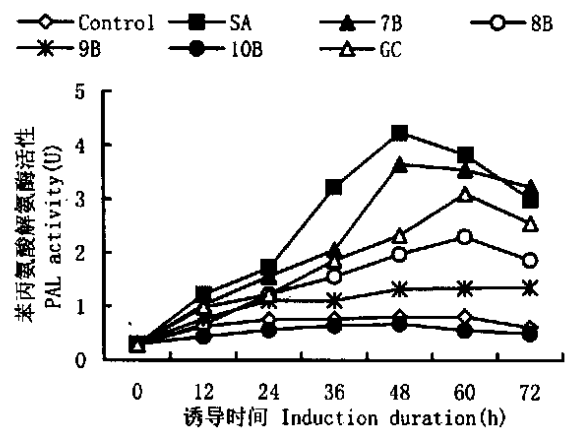


图 4 脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对 PAL 诱导的影响

Fig.4 Effects of PAL activity induction by partially N acetylate chitosan

表 脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对诱导油菜抗菌核病的影响¹⁾

Table Disease resistance of elicited Xinongchangjiao by partially N acetylate chitosan

处理 Treatment	SA	7B	8B	9B	10B	GC	Control
病斑直径(cm)	2.12*	2.44	2.55	2.50	2.32	1.98*	2.67
Diameter of disease lesion							
诱抗效果	20.6	8.6	4.5	6.4	13.1	25.8	0
Induced resistance (%)							

¹⁾ 表示 F 值达 0.05 显著水平 Means F value significant at 5% level

3 讨论

Schlumbaum 等(1986a)^[3]、Collinge 等(1993a)^[16]研究表明,植物几丁质酶可以水解真菌细胞壁中的重要结构组成物质-几丁质,而使真菌的细胞壁崩溃,抑制真菌的生长。油菜的主要真菌病原菌为菌核菌和霜霉菌,分属子囊菌和鞭毛菌亚门,其细胞壁中几丁质含量达 20% 以上,但不含脱乙酰化几丁质(Berkey, 1979a)^[17]。从本试验结果看,油菜几丁质酶对乙酰化程度较高的脱乙酰化几丁质的底物分解效率相对较高,可能与此有关,在长期的进化过程中,油菜形成了这种底物特异性较强的特点。

许多研究表明,SA 在植物抗病反应中作为信号分子,参与抗病反应信息传递,进而激发植物的防卫机制,表现为几丁质酶活性、POD 活性和 PAL 活性大幅度提高。脱乙酰化几丁质在本研究中也表现出类似于 SA 的诱导特点,这与于汉寿等^[10]的研究一致。Barber 等(1988a)^[10]提出脱乙酰化几丁质的乙酰化区域对诱导有活化的作用;Peter 等^[9]的研究发现,脱乙酰化几丁质的乙酰化程度对小麦叶片抗性诱导具有显著影响,乙酰化程度较高,诱导后的 POD 和 PAL 活性也高,这和我们的研究结果一致。但 Kauss 等^[18](1989a)对长春花诱导研究却正好相反,诱导活性随乙酰化程度的增加而下降。

对几丁质酶的诱导效应,乙酰化程度仍然起着非常重要的作用。从结果来看,只有乙酰化程度为 0% 的 Chitosan 10B 和 Glycol Chitosan 具有诱导作用,而具有乙酰化程度的脱乙酰化几丁质则没有作用,相反,随着乙酰化程度的增加还表现出抑制效应,这在几丁质对植物的诱导研究中还鲜见报道,其机理尚不清楚。我们在对曲霉和镰刀菌等真菌的几丁质酶诱导中也发现了类似的抑制效应,以 Chitosan 7B、10B 和胶体几丁质为诱导物都表现出强烈的抑制作用^[19]。这表明,脱乙酰化几丁质对生物体几丁质酶不仅具有诱导作用,同时也会产生抑制作用,对这一现象,我们将进一步深入研究。

References :

- [1] Mur L A, et al. Salicylic acid potentiates defense gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J.* 1996, 9: 559 - 571.
- [2] Zhang H M, et al. Elicitors and signal transduction of plant disease resistance. *Plant Physiology communications*, 1999, 35(3): 45 - 48. (in Chinese)
- [3] Schlumbaum A, et al. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 1986, 324: 365 - 367.
- [4] Jennifer S B, et al. Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol.* 1998, 116: 231 - 238.
- [5] Bin J H, et al. The relationship between methyl jasmonate induced anthracnose resistance of tobacco seedlings and phenylalanine ammonia-lyase activity and cell wall substances. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 2000, 26(1): 1 - 6. (in Chinese)
- [6] 宾金华,等. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗炭疽病与 PAL 活性及细胞壁物质的关系. *植物生理学报*, 2000, 26(1): 1 - 6.
- [7] Pan R Q, et al. Activity change in active-oxygen scavenging enzymes in cucumber infected by downy mildew. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1999, 29(3): 12 - 16. (in Chinese)
- [8] 潘汝谦,等. 活性氧清除酶类在黄瓜感染霜霉病过程中的活性变化. *植物病理学报*, 1999, 29(3): 12 - 16.
- [9] Bhaskara R MV, et al. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food. Chem.* 1999, 47(3): 1208 - 16.
- [10] Yu H S, et al. Rape chitinase purification and possible function in resistance to rape root rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22(3): 41 - 44. (in Chinese)
- [11] 于汉寿,等. 油菜几丁质酶的纯化及其在抗菌核病中的作用. *南京农业大学学报*, 1999, 22(3): 41 - 44.
- [12] Peter V, et al. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosan and chitooligosaccharides to elicit resistance reaction in wheat leaves. *Plant Physiol.* 1998, 118: 1353 - 1359.
- [13] Barber M S, et al. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 1988, 32: 185 - 197.
- [14] Kato J, et al. Electrophoretic analysis of chitinases in Gramineous plants. *Chitin and chitosan research*, 1996, 2(3): 210 - 216.
- [15] Shimozaka M, et al. Production of two chitosanases from a chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. Strain CHB 101. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 438 - 442.
- [16] Northwest Agricultural University. *Guide of basic biochemistry experiment*. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1985: 66 - 67. (in Chinese)
- [17] 西北农业大学. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985: 66 - 67.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantities of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248 - 254.
- [19] Hu X J, et al. Effect of rhizobacteria on controlling sclerotinia disease and oilseed rape growth promotion. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(Suppl): 103 - 106. (in Chinese)
- [20] 胡小加,等. 油菜根际细菌的防病促生作用研究. *中国农业科学*, 1999, 32(增刊): 103 - 106.
- [21] Collinge D B, et al. Plant chitinases. *Plant J.* 1993, 3: 31 - 40.
- [22] Berkley C R W. *Microbial polysaccharides and polysaccharases*. New York, 1979: 205 - 236.
- [23] Kauss H, et al. The degrees of polymer elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 1989, 178: 385 - 392.
- [24] Zhang X Y, et al. Purification and characters of Chitinase and Exo-Glucosaminidase from *Aspergillus oryzae* IAM2660. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64(9): 1896 - 1902.