

# 壳寡糖诱导和 TMV 侵染烟草防御酶活性的变化<sup>\*</sup>

惠娜娜, 郭成瑾, 商文静, 商鸿生

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 为了明确壳寡糖诱导烟草对 TMV 的抗病作用机理, 以普通烟为供试材料, 用壳寡糖 (Chito-oligo saccharide) 喷雾处理烟草叶片后再接种烟草花叶病毒 (TMV), 系统研究了壳寡糖处理对烟草防御酶活性变化的影响。结果表明, 壳寡糖喷雾处理普通烟草 24 h 后再接种 TMV, 烟草叶片中过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和多酚氧化酶 (PPO) 活性较对照都有明显增加, 最高活性高峰分别为空白对照的 162.3%, 118.4%, 265.4%, 162.3%, 其中 CAT 和 SOD 峰值提前。壳寡糖处理后, 随着酶活性增强, 对 TMV 的系统诱导抗病性得到表达, 其二者具有一定的相关性。

**[关键词]** 壳寡糖; 烟草花叶病毒; 防御酶; 诱导抗病性

**[中图分类号]** S432.2<sup>+</sup> 6

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)03-0213-04

## Changes of activities of defensive enzymes in tobacco leaves treated with chito-oligosaccharide and inoculated with TMV

HU INa-na, GUO Chen-jin, SHANG Wen-jing, SHANG Hong-sheng

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The changes of activities of defensive enzymes were tested systematically in tobacco leaves treated with chito-oligosaccharides and inoculated with TMV for 24 hours in order to confirm the resistant mechanism of tobacco to TMV. The result showed that the activities of Catalase (CAT), Peroxidase (POD), Superoxide dismutase (SOD) and Polyphenoloxidase (PPO) increased apparently compared with untreated plants, their highest point were 162.3%, 118.4%, 265.4% and 162.3% respectively, and the peaks of activities of CAT and SOD were earlier. So there was correlativity between the TMV resistance expression and the increase of activities of defensive enzymes.

**Key words:** chito-oligo saccharide; TMV; defensive enzymes; induced resistance

甲壳质 (Chitin) 广泛存在于昆虫、甲壳类动物外壳、真菌细胞壁及一些藻类中, 是由 N-乙酰氨基葡萄糖聚合而成的多糖。甲壳质经脱乙酰化处理得到壳聚糖 (Chitosan)。近十几年来, 国内外有关甲壳质、壳聚糖的研究较多, 但由于其不溶于水, 在开发应用上受到很大限制。为此, 通过适当方法将壳聚糖降解为壳寡糖 (Chito-oligo saccharide, 又称寡聚氨基葡萄糖、甲壳低聚糖), 即由 2~10 个氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接而成的低聚糖<sup>[1]</sup>。以壳寡糖为激发子, 可启动植物的防卫反应, 抑制病原物的扩展。壳

寡糖也是一种植物生长调节物质, 单独施用也有明显的生理效应。对许多植物-病原物系统的研究表明<sup>[2-3]</sup>, 激发子诱导植物防卫反应时伴随着防御酶活性的变化。关于壳寡糖诱导的植物防御酶活性的变化, 仅见于少数真菌和细菌病害<sup>[4-7]</sup>。本课题组的前期研究证明, 壳寡糖可诱导烟草对 TMV 的侵染产生系统诱导抗病性<sup>[8-10]</sup>。本文用壳寡糖喷雾处理普通烟叶片后再接种烟草花叶病毒 (TMV), 进一步探讨了其主要防御酶活性的变化, 为了解壳寡糖的诱导抗病机制及利用壳寡糖防治病害提供依据。

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2006-08-22

[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2001AA 625010); 西北农林科技大学创新团队资助项目

[作者简介] 惠娜娜 (1981-), 女, 陕西渭南人, 在读硕士, 主要从事植物病理学研究。

[通讯作者] 商鸿生 (1940-), 男, 辽宁大连人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病理学和植物免疫学研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试药剂: 聚合度(DP) 3~10、分子量 3 ku 的壳寡糖(质量分数 100%), 由中国科学院大连化学物理研究所糖工程研究室提供。

供试植物: 普通烟(*Nicotiana tabacum*) K326 品种, 为 TMV 的系统寄主。

供试毒源: TMV, 由西北农林科技大学植保学院植物病理研究所病毒研究室在 -20 °C 保存, 在普通烟上繁殖, 按 Gooding 等<sup>[11]</sup>的方法提纯, 经 200~300 nm 紫外扫描确定纯度和浓度。JEM-100E 透射电镜观察 TMV 粒体。接种枯斑寄主检测 TMV 的侵染活性。

### 1.2 方法

1.2.1 试验处理及采样方法 在 25 °C 温室中, 选用长势均一, 3~4 片真叶期的普通烟植株供试。用质量浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的壳寡糖溶液喷施供试植株下部第 3 片真叶, 24 h 后在喷药叶的上位叶片, 采用常规汁液摩擦法接种质量浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TMV (壳寡糖喷雾处理, T)。试验设空白对照(喷清水不接种病毒, CK1)、接种对照(不喷药, 只喷清水和接种病毒, CK2)和喷药对照(只喷壳寡糖溶液不接种, CK3)。各重复 3 次。于接种后 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 和 11 d 分别采收处理和对照的叶片样品供试。采样叶片为第 5 叶, 叶片样品装入自封袋中, 做好标记, 再放入 -80 °C 冰箱中保存供试。

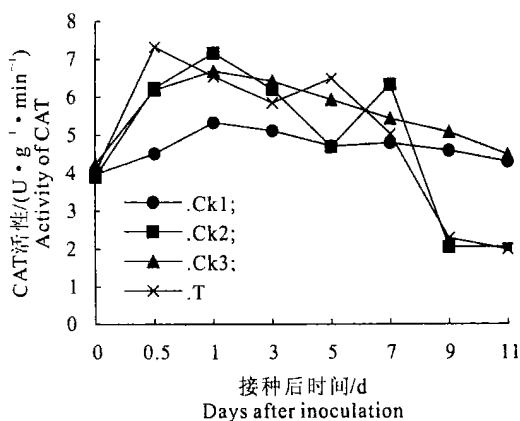


图 1 壳寡糖诱导对烟草叶片中 CAT 活性的影响

Fig. 1 Effect on activity of CAT in tobacco leaves by induction of chito-oligosaccharides

### 2.3 烟草叶片中过氧化物酶(POD)活性的变化

由图 2 可见, 壳寡糖喷雾处理烟草叶片中 POD 活性在接种后 0.5 d 达到峰值, 之后略有下降, 接种

1.2.2 酶活性的测定 过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照张志良<sup>[12]</sup>和高俊凤<sup>[13]</sup>的方法。多酚氧化酶(PPO)活性的测定参照李靖等<sup>[14]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 壳寡糖诱导烟草抗病性的表达

壳寡糖处理的烟草植株和接种对照的烟草植株均未发生过敏性坏死反应。接种对照的烟草植株接种后 5 d 即表现轻花叶, 9 d 后发展成重花叶, 植株矮小, 叶片皱缩, 平均严重度级别为 3.5。壳寡糖处理的烟草植株表现为, 显症延迟, 发展缓慢, 症状减轻, 严重度降低, 在接种后第 8 天才出现轻花叶, 平均严重度级别仅为 0.6, 比接种对照植株降低了 82.9%。

### 2.2 烟草叶片中过氧化氢酶(CAT)活性的变化

从图 1 可以看出, 壳寡糖喷雾处理和接种对照在测定时间内均呈现 2 个活性高峰, 峰值亦相同, 但峰值出现的时序有明显差异。壳寡糖喷雾处理烟草叶片中 CAT 活性在 1 d 内均高于其他对照, 在接种后 0.5 d 就达到第 1 个峰值, 为空白对照的 162.3%, 比接种对照提前了 12 h, 之后有所下降; 在接种后第 5 天达到第 2 个峰值, 比接种对照提前 2 d。可见, 壳寡糖喷雾处理可提高烟草叶片中 CAT 的活性, 且壳寡糖喷雾处理对烟草 CAT 活性的影响主要是提前了酶活性的时序。

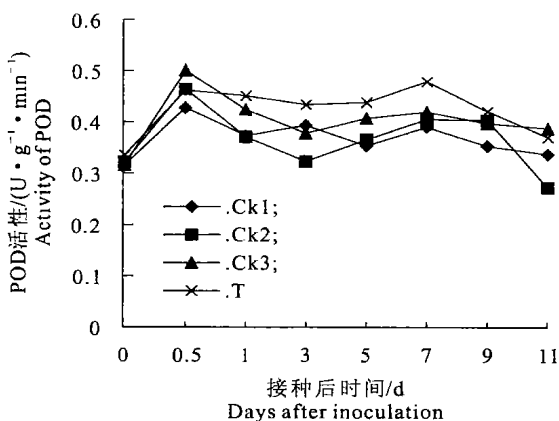


图 2 壳寡糖诱导对烟草叶片中 POD 活性的影响

Fig. 2 Effect on activity of POD in tobacco leaves by induction of chito-oligosaccharides

7 d 时达到第 2 个峰值, 其活性为空白对照的 118.4%, 后逐渐下降。壳寡糖喷雾处理烟草叶片中 POD 活性从第 1 天开始持续高于其他对照。以上结

果表明,壳寡糖处理后烟草叶片中POD活性明显增加,且酶活性达到峰值后可在较长时间内保持稳定。

#### 2.4 烟草叶片超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化

从图3可以看出,壳寡糖喷雾处理烟草叶片中,SOD活性在接种后3d内无明显变化,从第3天开始明显升高,第5天达到第1个高峰,其活性为空白对照的227.5%,较接种对照提前了4d,喷药对照虽在第5天也达到第1个峰值但活性略低;第9天达到第2个高峰,其活性为空白对照的265.4%,之后下降。壳寡糖喷雾处理烟草叶片中SOD活性在接种后3d较接种对照和喷药对照明显升高。以上结果表明,壳寡糖喷雾处理烟草叶片中SOD活性在接种后期大幅度提高。

#### 2.5 烟草叶片中多酚氧化酶(PPO)活性的变化

从图4可以看出,在接种后0~5d内,壳寡糖喷

雾处理和各对照烟草叶片中PPO活性基本未发生变化,在接种后第1天活性均有所降低,仅壳寡糖喷雾处理降低幅度较小。与空白对照相比,接种后1~3d,接种对照、喷药对照和壳寡糖喷雾处理烟草叶片中PPO活性均有提高,但提高幅度不大,壳寡糖喷雾处理略大于接种和喷药对照;3d后壳寡糖喷雾处理烟草叶片PPO活性持续保持升高状态,7d后大幅度升高,而接种和喷药对照PPO活性大幅度降低,第5天达到低谷,之后开始大幅度上升。壳寡糖喷雾处理烟草叶片中PPO活性在接种后第7天低于喷药对照,之后喷药对照酶活性急剧下降。壳寡糖喷雾处理烟草叶片中PPO酶活性前期略有降低,后期持续升高。以上结果表明,壳寡糖喷雾处理在接种后7d内提高了烟草叶片中PPO活性。

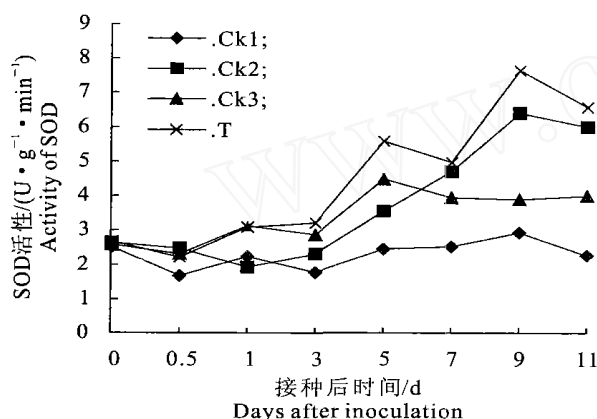


图3 壳寡糖诱导对烟草叶片中SOD活性的影响

Fig 3 Effect on activity of SOD in tobacco leaves by induction of chito-oligosaccharides

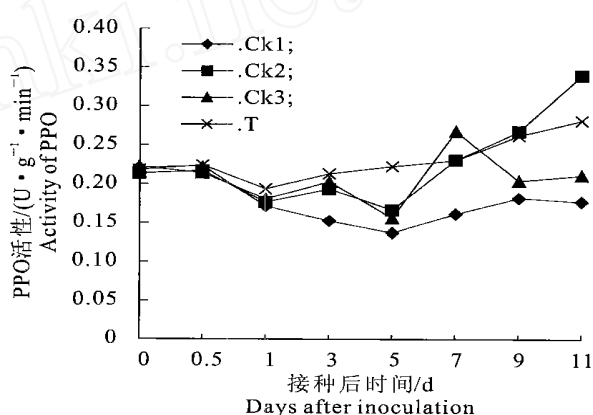


图4 壳寡糖诱导对烟草叶片中PPO活性的影响

Fig 4 Effect on activity of PPO in tobacco leaves by induction of chito-oligosaccharides

### 3 讨论

SOD是自然界惟一的以氧自由基为底物的酶,在活性氧中处于重要地位,可以淬灭超氧负离子 $O_2^-$ 系列自由基连锁反应所造成的生物毒损伤,为生物体内重要的活性氧自由基清除酶,因此SOD的活性和植物抗病性关系密切。过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)可进一步清除SOD催化形成的 $H_2O_2$ 。这3种酶相互协调可有效清除代谢过程产生的活性氧,使生物体内活性氧维持在一个低水平上,从而防止活性氧引起的膜脂过氧化及其他伤害过程。PPO主要是把酚类物质氧化为醌类,而各种醌类参与病原菌和寄主细胞壁的合成及代谢,能与蛋白质等大分子物质形成聚合物,从而将病原菌限制在侵染点,阻止其进一步扩展。

本研究表明,与各对照相比,壳寡糖喷雾处理均可不同程度提高CAT、POD、SOD和PPO活性。烟草经壳寡糖喷雾处理后,CAT、POD和SOD有2个活性高峰,且酶活性变化及升高幅度较接种或喷药对照更明显;PPO活性在接种后7d大幅度提高。这与杜昱光等<sup>[15]</sup>利用壳寡糖处理黄苗榆烟(*Nicotiana glauca* cv.)再接种TMV的研究结果一致。

纪明山等<sup>[6]</sup>研究认为,壳聚糖浸种可使玉米幼苗根系中POD和PPO防御酶活性升高。在壳聚糖浸种后接种囊腐霉(*Pythium inf latum* Math.),两种酶活性增强都较单独浸种或接菌更明显。李落叶等<sup>[7]</sup>研究表明,低聚糖诱导可以显著提高小麦POD和PPO活性。许艳丽等<sup>[16]</sup>研究发现,寡聚糖单独诱导或诱导后接种大豆花叶病毒(SMV),可提高

大豆叶片 POD 和 PPO 活性。上述结果与本文对烟草花叶病毒的研究结果一致。这表明壳寡糖诱导烟草对 TMV 的抗性,可能与植物体内活性氧代谢、酚类物质氧化及木质素合成有关。

壳寡糖具有诱导植物抗病性和调节植物生理活性的广泛作用,需要对其作用机制进行更深入的研究,并提出适宜的田间应用技术。

## [参考文献]

- [1] 胡志鹏 壳寡糖的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(4): 210-212
- [2] 黄艳青, 庄敬华, 高增贵, 等 木霉菌诱导甜瓜抗枯萎病相关防御反应酶系的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 546-549
- [3] 蒲金基, 刘晓妹, 曾会才, 等 2 种激发子对西瓜枯萎病的诱抗作用[J]. 热带作物学报, 2003, 24(3): 47-50
- [4] 胡 健, 姜涌明, 殷士学 壳聚糖抑制植物病原菌生长的研究[J]. 扬州大学学报: 自然科学版, 2000, 3(2): 42-44
- [5] Pospieszny H. Antiviral activity of chitosan[J]. Grop Protection, 1997, 16(2): 105-106
- [6] 纪明山, 陈 捷, 程根武, 等 壳聚糖浸种对玉米幼苗根系中几种防御酶活性的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3): 200-203
- [7] 李落叶, 郭 萍, 井金学, 等 低聚糖诱导小麦抗条锈性及相关酶活性变化研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(10): 1784-1787.
- [8] 商文静, 赵小明, 杜昱光, 等 壳寡糖诱导植物抗病毒病研究初报[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 73-75
- [9] 郭成瑾, 商文静, 商鸿生, 等 壳寡糖诱导对烟草花叶病病情发展的影响[J]. 西北农业学报, 2006, 15(4): 14-17.
- [10] 商文静, 吴云锋, 赵小明, 等 壳寡糖诱导烟草抑制 TMV 增殖的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(5): 88-92
- [11] Gooding G V, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. Phytopathol, 1998, 36: 453-483
- [12] 张志良 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003
- [13] 高俊凤 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000
- [14] 李 靖, 利容千, 袁文静 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 277-283
- [15] 杜昱光, 白雪芳, 赵小明, 等 壳寡糖对烟草防御酶活性及同工酶酶谱的影响[J]. 中国生物防治, 2002, 18(2): 83-86
- [16] 许艳丽, 李春杰, 李兆林, 等 寡聚糖对大豆防御酶活性的影响[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(4): 69-71

(上接第 212 页)

## [参考文献]

- [1] Wan A M, Zhao Z H, Chen X M, et al Wheat stripe rust epidemic and virulence of *Puccinia striiformis* sp. *tritici* in China in 2002[J]. Plant Disease, 2004, 88(8): 896-904
- [2] 万安民, 吴立人, 金社林, 等 1997~2001 年我国小麦条锈菌生理小种变化动态[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 261-266
- [3] 李 强, 王保通, 井金学, 等 2003 年陕西省小麦条锈菌生理小种鉴定分析[J]. 西北农业学报, 2004, 13(3): 43-47.
- [4] 万安民, 吴立人, 金社林, 等 中国小麦条锈菌条中 32 号的命名及其特性[J]. 植物保护学报, 2003, 30(2): 247-252
- [5] 吴立人, 杨华安, 陶碧华, 等 小麦条锈菌新小种流行预测研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24(5): 59-63
- [6] 杨家秀, 李 晓, 李云鹤, 等 四川小麦条锈菌生理小种监测及动态分析[J]. 西南农业学报, 1996, 10(增): 23-26
- [7] 王保通, 李高宝, 李 强, 等 2002 年陕西省小麦条锈病发生情况和生理小种监测结果[J]. 陕西农业科学, 2003(3): 1-3
- [8] 金社林, 贾秋珍, 曹世勤, 等 2000-2001 年甘肃省小麦条锈菌生理小种监测结果[J]. 甘肃农业科技, 2003(1): 48-50
- [9] 康振生, 李振岐, 商鸿生, 等 绵阳系统小麦条锈菌新菌系的发现[J]. 西北农业大学学报, 1994, 22(3): 7-11.
- [10] 万安民, 吴立人, 金社林, 等 小麦条锈菌鉴别寄主和小种命名现状[J]. 植物病理学报, 2003, 33(6): 481-486