

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.1731.011

网络出版时间:2011-10-25 17:31

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.1731.011.html>

不同平均聚合度低聚壳聚糖对毛白杨 相关酶活性的影响

张 锦,胡景江

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究不同聚合度低聚壳聚糖对毛白杨愈伤组织苯丙氨酸解氨酶(PAL)和几丁质酶活性的影响。【方法】采用 H_2O_2 氧化法分别降解壳聚糖 2,4,5,6 h,用乙酰丙酮法测定这几种产物的平均聚合度,通过检测不同质量浓度各种低聚糖处理后毛白杨愈伤组织 PAL 及几丁质酶活性的变化,确定各低聚壳聚糖处理的最佳质量浓度,比较最佳质量浓度下 4 种低聚壳聚糖处理对毛白杨愈伤组织 PAL 及几丁质酶活性的诱导效果。【结果】低聚糖的平均聚合度随降解时间的延长而不断减小,降解 2,4,5,6 h 时平均聚合度分别为 24.94,17.68,14.66 和 10.02,这 4 种低聚壳聚糖均能使毛白杨愈伤组织中的 PAL 及几丁质酶活性显著升高,且以质量浓度为 75 mg/L、平均聚合度为 10.02 的低聚壳聚糖的诱导效果最佳,由其诱导的毛白杨愈伤组织中的 PAL 活性及几丁质酶活性分别是对照的 4.31 和 3.11 倍。【结论】在设定的平均聚合度和质量浓度范围内,平均聚合度越低的低聚壳聚糖对毛白杨愈伤组织 PAL 和几丁质酶活性的诱导效果越好。

【关键词】 平均聚合度;低聚壳聚糖;毛白杨愈伤组织;苯丙氨酸解氨酶;几丁质酶

【中图分类号】 S792.117

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)12-0075-06

Effects of different average polymerization degree chitosan-oligosaccharides on related enzyme activities in *Populus tomentosa*

ZHANG Jin, HU Jing-jiang

(College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The experiment was done to study the effect induced by four chitosan-oligosaccharides of phenylalanine ammonia lyase(PAL) and chitinase activity on *Populus tomentosa* callus. 【Method】 The chitosan-oligosaccharides were made with H_2O_2 to decompose chitosan for 2,4,5 and 6 hours, and the average polymerization degree of these chitosan-oligosaccharides elicitors was determined by using the acetylacetone's method. The study determined the best inducing concentration of every elicitor by measuring the effect of PAL and chitinase activity on *Populus tomentosa* callus which was induced by four chitosan-oligosaccharides with different concentrations, and compared the effect of PAL and chitinase activity on *Populus tomentosa* callus induced by every elicitor with the best concentration. 【Result】 The average polymerization degree of chitosan-oligosaccharides decreased as degradation reaction continued, the average polymerization degree of the products was 24.94, 17.68, 14.66 and 10.02 when the decomposed time achieved 2,4,5 and 6 hours, these four chitosan-oligosaccharides elicitors could induce the increase of PAL

* 【收稿日期】 2011-05-19

【基金项目】 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0748)

【作者简介】 张 锦(1987—),女,陕西三原人,在读硕士,主要从事植物水分与抗旱分子生物学研究。

E-mail: ufwihcttdwm@163.com

【通信作者】 胡景江(1957—),男,陕西定边人,教授,硕士生导师,主要从事植物抗旱生理及分子生物学研究。

E-mail: jingjianghu@yahoo.com.cn

and chitinase activity notably, and the elicitor whose average degree of polymerization was 10.02 showed the best inductive effect when its concentration was 75 mg/L, PAL and chitosan achieved the highest activity which was 4.31 and 3.11 times as high as the each control enzyme activity. 【Conclusion】 Lower polymerization degree of chitosan-oligosaccharides had a better inductive effect when the concentration and polymerization degree were in the range of our research.

Key words: average degree of polymerization; chitosan-oligosaccharides; *Populus tomentosa* callus; PAL; chitosan

甲壳素是自然界中含量仅次于纤维素的碱性多糖,壳聚糖是甲壳素脱乙酰度达到 55% 以上时的产物。多年来,壳聚糖因其在食品、医药及农业方面的广泛应用而受到了普遍关注^[1]。低聚壳聚糖具有良好的水溶性及较强的生物活性,能增强多种植物的抗寒^[2]、抗病^[3]、抗旱和抗盐能力^[4],且其可以抑制多种植物病原菌的生长^[5-6],防治植物病毒病^[7],使植物体内的许多防御酶活性升高,引起一些次生代谢物和病程相关蛋白的积累。低聚壳聚糖在低浓度下就能发挥诱导活性,对环境的不良影响小。有关低聚壳聚糖能诱导增强棉花^[8]、黄瓜^[6]、水稻^[9]、烟草^[10]及番茄^[11]等作物对病毒病的抵抗力的研究已逐渐步入应用阶段,而关于低聚壳聚糖在林木上的应用研究相对较少。低聚壳聚糖可提高大叶黄杨对白粉病的抵抗力^[12];姜桥等^[13]的研究也表明,用低聚壳聚糖喷施冬枣树,可明显降低冬枣的发病率及发病指数。

苯丙氨酸解氨酶和几丁质酶是植物抗病代谢途径中的相关酶。有研究表明,低聚壳聚糖处理可使棉苗根、番茄叶片和烟草叶片中的苯丙氨酸解氨酶和几丁质酶活性升高^[8,11,14];一定聚合度范围的低聚壳聚糖可以作为激发子诱导植物的防御反应,从而提高植物的抗病能力^[15-16]。但目前对能有效诱导林木抗病能力的低聚壳聚糖的聚合度信息尚不明确。本试验拟通过控制壳聚糖降解时间及相关工艺得到平均聚合度不同的低聚糖,分析其对毛白杨愈伤组织中的苯丙氨酸解氨酶及几丁质酶活性的影响,以期确定诱导效果最佳的生物活性低聚壳聚糖的聚合度及其质量浓度,为以后研究低聚壳聚糖诱导毛白杨抗病相关酶活性的变化机理提供较明确的激发子信息。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖购于国药集团,脱乙酰度 $\geq 90.0\%$,黏度为 $50.0 \sim 800.0 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 。毛白杨(*Populus tomen-*

tosa)1 年生健康枝条,采自西北农林科技大学北校区,洗衣粉刷洗表面后用大量清水冲洗,经体积分数 70% 的酒精消毒 20 s,无菌水冲洗 3 遍,1 g/L 的 HgCl_2 消毒 15 min,无菌水冲洗 5 遍后,浸于无菌水中备用。

1.2 方法

1.2.1 低聚壳聚糖的制备 将 20 g 壳聚糖加入到 400 mL 体积分数 2% 的醋酸溶液中,搅拌至分散均匀,无团状物。再逐滴加入 10 mL 质量分数 30% 的 H_2O_2 (H_2O_2 与壳聚糖糖单元的物质之比为 4:5),在磁力搅拌器上于 60 °C 水浴中分别反应 2, 4, 5 和 6 h,用质量分数 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 至 8.5 左右,抽滤,向滤液中加入 3 倍体积的无水乙醇,沉淀 12 h,抽滤,所得沉淀用体积分数 75% 的酒精洗涤 1 遍,3 500 r/min 离心 15 min,沉淀用无水乙醇洗涤后于 4 000 r/min 离心 15 min,重复 3 次以脱去产物中的水,弃上清液后将沉淀冷冻干燥即得低聚壳聚糖样品。

1.2.2 聚合度的测定 参照韩宝芹等^[17]的方法,精密称取 0.05 g 壳聚糖降解 2, 4, 5 和 6 h 后的产物,每种产物称 2 份平行样。取其中 1 份溶解后调 pH 值至 7,定容到 100 mL,分别精密量取 3 mL 至具塞试管,加蒸馏水至 5.0 mL,加入体积分数 7% 的乙酰丙酮-碳酸钠溶液 1.0 mL,摇匀后于沸水浴中反应 25 min,流水冷却,加对二甲氨基苯甲醛(DMABA)溶液 1.0 mL,用无水乙醇定容至 10 mL,摇匀,至 60 °C 水浴保温 1 h,冷却后在 525 nm 处测定吸光值(调零管以蒸馏水代替壳聚糖),记为 A_0 。另 1 份样品加 6 mol/L 盐酸 5 mL,沸水浴 3.5 h,冷却后将试管中的溶液全部转移至小烧杯中,用 6 mol/L NaOH 溶液调 pH 值为 7.0,将烧杯中的溶液转入 100 mL 容量瓶中,定容至刻度备用。将上述溶液稀释 10 倍后分别量取 3.0 mL 至具塞试管中,加蒸馏水至 5.0 mL,按前 1 份样品的方法测定完全降解后的低聚糖样品的吸光值,记为 A_1 。重复 3 次,按“聚合度(n) = $10A_1/A_0$ ”计算所得产物的平

均聚合度。

1.2.3 毛白杨愈伤组织的培养 参照胡景江等^[18]的方法,毛白杨枝条去表皮后剖下韧皮部,切成 0.5 cm×0.5 cm 平放于培养基(MS+2,4-D 2.0 mg/L+KIN 0.5 mg/L)上,于 25℃ 黑暗培养。培养 30 d 后将愈伤组织分离成小块接种到继代培养基(MS+2,4-D 2.0 mg/L+KIN 0.5 mg/L)上,25℃ 黑暗培养,以后每 20 d 继代 1 次,待愈伤组织长至 1.5 cm³ 左右时开始处理。

1.2.4 低聚壳聚糖最佳质量浓度的筛选及激发子溶液的配制 用蒸馏水将 4 种低聚壳聚糖分别配制成质量浓度为 25,50,75,100 和 200 mg/L 的溶液,过滤除菌后向培养基中加入 1 mL,对照加入 1 mL 无菌水。间隔一定时间取样测定毛白杨愈伤组织中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)及几丁质酶活性。对每种低聚壳聚糖而言,在试验设定的 5 个质量浓度梯度内,使处理组 PAL 和几丁质酶活性较对照组增加倍数最大的质量浓度,即选定为该低聚壳聚糖的最佳质量浓度。然后将各种平均聚合度的壳聚糖按其最佳质量浓度配成相应激发子溶液用于后续研究。

1.2.5 PAL 活性的测定 参照高俊凤^[19]的方法,将 1 g 左右毛白杨的愈伤组织鲜样,经-15℃ 冷冻固定后,加入少量石英砂和少量预冷的 0.2 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.8,含 8 mmol/L 巯基乙醇、10 g/L PVP 及 1 mmol/L EDTA-Na₂),冰浴研磨匀浆,用硼酸缓冲液定容至 10 mL,混匀后于 4℃、10 000 r/min 离心 15 min,上清液转入干净的离心管中,4℃ 保存备用。酶检测反应液的组成为 1.0 mL 80 mmol/L 的 L-苯丙氨酸、3.0 mL 0.2 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 8.8)和 1 mL 酶液。摇匀后于 30℃ 恒温水浴保温 60 min,0.2 mL 6 mol/L HCl 终止反应。对照管不加 L-苯丙氨酸而代之以蒸馏水,其余组分与反应管相同。290 nm 处检测吸光度 A₂₉₀,以反应管 A₂₉₀ 增加 0.01 的酶量代表 1 个酶活单位(U),酶活性大小以 U/(g·h)表示。

1.2.6 几丁质酶活性的测定 将 1 g 左右的愈伤组织鲜样经-15℃ 冷冻固定后,加入少量石英砂和少量预冷的醋酸缓冲液(pH 4.5),冰浴研磨匀浆,定容至 5 mL,4℃、10 000×g 离心 15 min,上清液即为酶粗提液。参照 Boller 等^[20]的方法,取 0.5 mL 酶粗提液加入 0.5 mL 胶状几丁质(含 NaN₃)、2 mL 醋酸缓冲液(pH 4.5),于 37℃ 反应 2 h,对照用等体积缓冲液代替几丁质。反应完毕后沸水浴 5 min,3 000×g 离心 5 min,参照顾真荣等^[21]的方法

取 0.2 mL 上清液,加入 1.3 mL H₂O 和 2.0 mL 铁氰化钾-碳酸钠试剂,沸水浴 15 min,冷却后测定 OD₄₂₀,用对照管 OD 值减去反应管 OD 值再反查 NAG-ΔOD₄₂₀ 标准曲线,以每生成 0.1 mg N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)代表 1 个酶活单位(U),酶活性大小以 U/(g·h)表示。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 降解时间对壳聚糖平均聚合度的影响

从表 1 可以看出,在反应温度为 60℃,H₂O₂ 与壳聚糖糖单元的物质的量之比为 4:5 的条件下,低聚壳聚糖的平均聚合度随降解时间的延长而不断减小,降解反应 2,4,5,6 h 时,4 种壳聚糖的平均聚合度分别为 24.94,17.68,14.66 和 10.02。

表 1 降解时间对壳聚糖平均聚合度的影响
Table 1 Effects of degradation time on the average polymerization degree of products

降解时间/h Degradation time	平均聚合度 Average polymerization degree
2	24.94
4	17.68
5	14.66
6	10.02

2.2 不同平均聚合度低聚壳聚糖最佳质量浓度的确定及激发子溶液的配制

将各种低聚壳聚糖按照试验中设定的 5 种质量浓度处理毛白杨愈伤组织后,通过对 PAL 和几丁质酶活性变化的测定,得到平均聚合度为 10.02 和 14.66 的低聚糖的最佳诱导质量浓度为 75 mg/L,平均聚合度为 17.68 和 24.94 的低聚糖的最佳诱导质量浓度为 100 mg/L。将各种聚合度的低聚糖按各自的最佳质量浓度配成相应的激发子溶液,其中激发子 I 为 75 mg/L、平均聚合度为 10.02 的低聚壳聚糖;激发子 II 为 75 mg/L、平均聚合度为 14.66 的低聚壳聚糖;激发子 III 为 100 mg/L、平均聚合度为 17.68 的低聚壳聚糖;激发子 IV 为 100 mg/L、平均聚合度为 24.94 的低聚壳聚糖。

2.3 低聚壳聚糖聚合度对毛白杨愈伤组织 PAL 活性的影响

由图 1 可见,4 种低聚壳聚糖激发子对愈伤组织的 PAL 活性均产生了比较明显的影响,诱导时间达 48 h 时,与对照相比,各处理 PAL 活性变化幅度

达到最大。由表 2 可知,此时激发子 I、II、III、IV 处理毛白杨愈伤组织的 PAL 活性分别是对照的 4.31, 3.32, 2.80 和 2.15 倍。

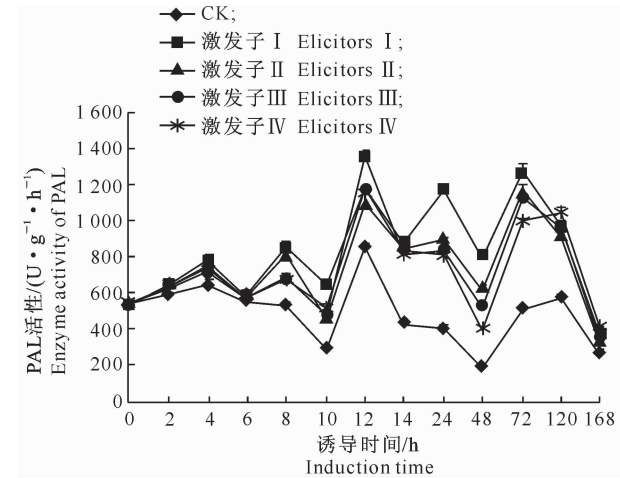


图 1 低聚壳聚糖聚合度对毛白杨愈伤组织 PAL 活性的影响

Fig. 1 Effects of different polymerization degree chitosan-oligosaccharides on PAL activity of poplar callus

表 2 不同聚合度低聚壳聚糖诱导 48 h 时毛白杨愈伤组织 PAL 活性的比较(平均值±SE,n=3)

激发子类型 Type of elicitors	PAL 活性/ (U · g ⁻¹ · h ⁻¹) PAL activity
CK	184.735±15.208 e
I	796.779±29.494 a
II	612.385±37.368 b
III	517.370±25.470 c
IV	397.688±22.297 d

注:同列数据后标不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note: Different letters showed in the same row mean significant difference($P<0.05$). The same as below.

从表 2 可以看出,4 种激发子处理对毛白杨愈伤组织 PAL 活性的诱导效果均显著优于对照,且 4 种激发子的诱导效果之间差异显著,其中以激发子 I 的诱导效果最佳,说明激发子 I 具有最佳的 PAL 活性诱导作用。

2.4 低聚壳聚糖聚合度对毛白杨愈伤组织几丁质酶活性的影响

从图 2 可以看出,用不同聚合度的低聚糖激发子处理 2 h 后,毛白杨愈伤组织中的几丁质酶活性开始明显上升,至 6 h 时几丁质酶活性的变化幅度与对照相比均达到最大。由表 2 可知,此时激发子

I、II、III、IV 处理毛白杨愈伤组织的几丁质酶活性分别是对照的 3.11, 2.81, 2.38 和 1.97 倍。

由表 3 可以看出,4 种激发子对毛白杨愈伤组织几丁质酶活性均有显著的提升作用,且 4 种激发子的诱导效果存在显著差异($P<0.05$),其中以激发子 I 的诱导效果最佳。

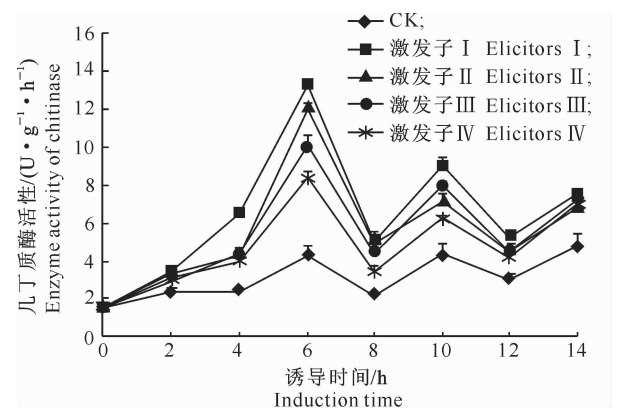


图 2 低聚壳聚糖聚合度对毛白杨愈伤组织几丁质酶活性的影响

Fig. 2 Effects of different polymerization degree chitosan-oligosaccharides on chitinase activity in poplar callus

表 3 不同聚合度低聚壳聚糖诱导 6 h 时毛白杨愈伤组织几丁质酶活性的比较(平均值±SE,n=3)

激发子类型 Type of elicitors	几丁质酶活性/ (U · g ⁻¹ · h ⁻¹) Chitinase activity
CK	4.257±1.209 e
I	13.257±0.309 a
II	11.981±0.464 b
III	10.138±0.364 c
IV	8.405±0.440 d

3 讨论与结论

植物的防卫反应主要表现在增强细胞壁结构及诱导产生或激活抗菌物质等方面^[22]。PAL 是植物体内苯丙烷类代谢途径的起始反应酶和关键酶,在该途径中产生的酚类物质和异黄酮类物质具有抑制病原菌生长的作用^[23];该途径产生的木质素能抵抗微生物的降解,且在受到病原物的侵染时可增加合成使细胞壁强度增强,以阻止菌丝进入细胞,有助于植物抵抗病菌的侵入^[24]。因此,PAL 的活性可在一定程度上反应植物的抗病能力^[23]。几丁质酶是重要的病程相关蛋白之一,目前还没有在植物中发现几丁质酶的作用底物^[22],而许多植物病原真菌细胞

壁的主要成分是几丁质,因此几丁质酶能通过降解病原真菌的细胞壁并释放降解过程所产生的片段,将其作为激发子诱导增强其他抗病相关反应^[22,25]来增强植物的抗病能力,几丁质酶几乎存在于所有的植物中,未受病虫害植物中的几丁质酶活性很低,病菌侵染后其活性迅速增强,因此几丁质酶活性的变化可以作为研究植物抗病性的生理指标之一。

聚合度、结构特性和脱乙酰度都是影响低聚壳聚糖生物学活性的重要因素。研究发现,聚合度为 4~11 的低聚壳聚糖能有效诱导植物的抗病反应^[15]。Augur 等^[26]认为,聚合度大于 4 的低聚糖有生物活性。但也有人认为,聚合度大于 7 的低聚壳聚糖才有生物活性^[27]。Roby 等^[28]认为,可以激活植物几丁质酶的低聚糖的最小活性单位分别为六聚和七聚糖。赵小明^[8]用 2~20 糖的混合物处理棉花苗及烟草,均诱导出了明显的抗病性。本试验中,平均聚合度分别为 24.94,17.68,14.66 和 10.02 的 4 种低聚壳聚糖均可诱导使毛白杨愈伤组织的 PAL 和几丁质酶活性显著升高。这些不同的研究结果可能是因为低聚壳聚糖的来源、低聚糖脱乙酰度和还原端基修饰不同所致。另外,各处理所用混合糖中各组分的组成比例不同可能也是原因之一。

本研究结果表明,低聚壳聚糖作为一种外源激发子,可以显著诱导并增强毛白杨愈伤组织中的 PAL 及几丁质酶的活性。低聚壳聚糖处理后,几丁质酶反应迅速,2 h 后其活性即明显升高,6 h 时活性达到最大;PAL 活性变化的峰值出现相对较晚,低聚壳聚糖诱导 48 h 后其活性较对照变化最大;4 种激发子中,以质量浓度为 75 mg/L、平均聚合度为 10.02 的低聚壳聚糖的诱导效果最佳。由此可知,激发子 I,即平均聚合度越低的壳聚糖,对愈伤组织抗病相关酶活性的诱导作用越强,说明此低聚壳聚糖中含有较多的生物活性组分。

[参考文献]

- [1] 蒋挺大. 壳聚糖 [M]. 2 版. 北京:化学工业出版社,2006.
Jiang T D. Chitosan [M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2006. (in Chinese)
- [2] 孙 磊,陈国祥,程嘉翎,等. 低聚壳聚糖处理对低温胁迫下水稻幼苗类囊体膜特性的影响 [J]. 南京师范大学学报:自然科学版,2009,32(2):93-97.
Sun L, Chen G X, Cheng J L, et al. Effects of chitosan treatment on thylakoid membrane characters characteristics in rice seedling under low temperature [J]. Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition, 2009, 32(2): 93-97. (in Chinese)
- [3] Reddy M V B, Arul J, Angers P, et al. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality [J]. J Agr Food Chem, 1999, 47(3): 1208-1216.
- [4] 杨 峰,胡景江,李建龙,等. 干旱胁迫下壳聚糖对苹果幼苗抗旱性生理指标的影响 [J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2008,32(6):61-64.
Yang F, Hu J J, Li J L, et al. Effects of chitosan on some physiological indices of apple seedlings under drought stress [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2008, 32(6): 61-64. (in Chinese)
- [5] Daizo K, Tatauya H, Nobuyuki S. Induction patterns of chitinases in yam callus by inoculation with autoclaved *Fusarium oxysporum* ethylene and chitin and chitosan oligosaccharides [J]. Biotech Biochem, 1992, 56(2): 280-285.
- [6] Ben-Shalom N, Ardi R, Pinto R, et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan [J]. Crop Protection, 2003, 22: 285-290.
- [7] 赵小明,杜昱光,白雪芳. 氨基寡糖素诱导作物抗病毒辣病药效试验 [J]. 中国农学通报, 2004, 20(2): 195-197.
Zhao X M, Du Y G, Bai X F. Field experiments of oligochitosan controlling plant virus disease [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2004, 20(2): 245-247. (in Chinese)
- [8] 赵小明. 壳寡糖诱导植物抗病性及其诱抗机理的初步研究 [D]. 辽宁大连:中国科学院大连化学物理研究所, 2006.
Zhao X M. Preliminary study on the oligochitosan induced plant resistance and its mechanisms [D]. Dalian, Liaoning: Dalian Institute of Chemical Physics of Chinese Academy of Sciences, 2006. (in Chinese)
- [9] 宁 伟,刘志学,李 群,等. 壳寡糖诱导水稻过敏性细胞死亡及抗病性的提高 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 441-443.
Ning W, Liu Z X, Li Q, et al. Oligo saccharide oligo-glcNAc induces hypersensitive cell death and enhances disease resistance in rice [J]. Plant Physiology Communications, 2003, 39(5): 441-443. (in Chinese)
- [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.
Shang W J, Wu Y F, Zhao X M, et al. Induced resistance to TMV multiplication in tobacco with Chito-oligosaccharides [J]. Jour of Northwest Sci-Tech Univ of Agri And For: Nat Sci Ed, 2006, 34(5): 88-92. (in Chinese)
- [11] 李美芹. 壳聚糖抑制番茄叶霉病菌的活性与诱导抗性及其机理研究 [D]. 辽宁大连:中国海洋大学, 2007.
Li M Q. Study on antifungal activity, inducing resistance, and their mechanisms against *Fulvia fulva* (Cooke) [D]. Dalian, Liaoning: Ocean University of China, 2007. (in Chinese)
- [12] 李堆淑,胡景江. 低聚壳聚糖诱导大叶黄杨抗白粉病的组织病理学机制 [J]. 西北林学院学报, 2009, 24(5): 106-109.
Li D S, Hu J J. Histopathological mechanism of oligochitosan induced *Buxus megistophylla* resistance to *Powdery mildews* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(5):

- 106-109. (in Chinese)
- [13] 姜 桥,王金丽,荣瑞芬,等. 采前低聚壳聚糖处理对冬枣果实抗病性的诱导 [J]. 食品科技,2011,36(3):26-29.
Jiang Q, Wang J L, Rong R F, et al. Inducing of disease resistance of winter jujube by low molecular chitosan preharvest treatments [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(3): 26-29. (in Chinese)
- [14] 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.
Du Y G, Bai X F, Zhao X M, et al. The effect of oligochitosan on the activity of defensive enzyme and zymogram of isoenzyme in tobacco leaves [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2002, 18(2): 83-86. (in Chinese)
- [15] 张付云. 壳寡糖诱导烟草抗性相关基因的克隆和鉴定 [D]. 辽宁大连:中国科学院大连化学物理研究所,2007.
Zhang F Y. Cloning and characterization of resistance-related cDNA from tobacco induced by oligochitosan [D]. Dalian, Liaoning: Dalian Institute of Chemical Physics of Chinese Academy of Sciences, 2007. (in Chinese)
- [16] 赵小明,杜昱光. 寡糖激发子及其诱导植物抗病性机理研究进展 [J]. 中国农业科技导报,2006,8(6):26-32.
Zhao X M, Du Y G. Progress of research on oligosaccharide elicitors and mechanism of plant induced resistance by oligosaccharides [J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2006, 8(6): 26-32. (in Chinese)
- [17] 韩宝芹,位晓娟,房 子,等. 乙酰丙酮法测定甲壳胺寡糖数均分子量 [J]. 中国海洋药物杂志,2004,23(6):12-17.
Han B Q, Wei X J, Fang Z, et al. Determination of number average molecular mass of chitosan-oligosaccharide by acetylacetone method [J]. China J Mar Drugs, 2004, 23(6): 12-17. (in Chinese)
- [18] 胡景江,文建雷,景 耀,等. 杨树体内苯丙烷代谢与其对溃疡病抗性的关系 [J]. 植物病理学报,1992,22(2):185-188.
Hu J J, Wen J L, Jing Y, et al. The relation between metabolism of phenylalanine in poplar trees and resistance of poplar to poplar canker [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1992, 22(2): 185-188. (in Chinese)
- [19] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- Gao J F. Experiment guidance of phytophysiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006. (in Chinese)
- [20] Boller T, Gehri A, Mauch F, et al. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification properties, and possible function [J]. Plant, 1983, 157: 22-31.
- [21] 顾真荣,马承铸,韩长安. 产几丁质酶芽孢杆菌的筛选和酶活力测定 [J]. 上海农业学报,2001,17(3):92-96.
Gu Z R, Ma C Z, Han C A. Screening and identification of chitinase-producing *Bacillus* spp. and determination of their chitinase activity [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2001, 17(3): 92-96. (in Chinese)
- [22] 王关林,方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,2005.
Wang G L, Fang H J. Plant gene project [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2005. (in Chinese)
- [23] 欧阳光察,薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控 [J]. 植物生理学通讯,1988(3):9-16.
Ouyang G C, Xue Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant [J]. Plant Physiology Communications, 1988(3): 9-16. (in Chinese)
- [24] 宗兆锋,康振生. 植物病理学原理 [M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2010.
Zong Z F, Kang Z S. Principles of plant pathology [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2010. (in Chinese)
- [25] 张世明. 高等植物几丁酶研究进展 [J]. 植物生理学通讯,1989(1):8-13.
Zhang S M. Advance in the study on high plant chitinase [J]. Plant Physiology Communication, 1989(1): 8-13. (in Chinese)
- [26] Augur C, Yu I, SaKsi K. Further studies on the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-induced growth [J]. Plant Physiol, 1992, 99: 180-185.
- [27] Darvill A, Augur C, Bergmann C, et al. Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants [J]. Glycobiology, 1992, 2: 191-192.
- [28] Roby D, Gadelle A, Toppan A. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 143(3): 885.