

# 甲壳胺对作物几丁质酶诱导特性的研究

姜国良, 刘顺梅, 商慧敏, 刘云, 杨栋

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 以甲壳胺处理玉米、大豆的种子或植株, 植物体被诱导而产生几丁质酶。几丁质酶的活力随甲壳胺的浓度不同而变化, 在 100 ~ 400 mg/L 浓度范围内诱导效果比较理想。酶的活力也随时间延续呈现先升后降的变化趋势; 再次处理经过诱导的植株, 酶活力随处理次数增加而有增加的趋势, 且在植物体内存在时间也延长, 表明植物几丁质酶基因的表达具有记忆性。植物几丁质酶产生的部位与处理部位的距离有关, 越靠近处理部位, 酶活越高。

**关键词:** 甲壳胺; 作物; 几丁质酶; 诱导

中图分类号: Q539; Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)06-0001-04

甲壳胺(chitosan)又名壳聚糖、可溶性甲壳质, 化学名为(1,4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡聚糖, 是甲壳质(chitin)脱乙酰基的产物。由于其资源丰富、无毒、无污染等优点, 在农业、食品和医药卫生领域被广泛应用。甲壳胺已被用作植物生长调节剂、杀虫剂和抑菌剂<sup>[1-3]</sup>, 均显示出较好效果。

随着几丁质酶学研究的兴起和植物抗病性研究的进展, 人类认识到几丁质酶在植物体内的诱导与积累对于增强植物防卫能力有着重要作用<sup>[4]</sup>。几丁质酶是植物自身防御体系的组成部分, 含量极低, 现已在水稻、小麦等 70 多种植物中检测到几丁质酶活性<sup>[5]</sup>。多种生物因素和非生物因素均可诱导几丁质酶的产生<sup>[6]</sup>。因此, 开发可诱导植物体产生大量几丁质酶的一类无污染、具广谱抑菌能力的生防农药, 已成为当今植物抗病研究的热点。在诱导物选取及其定性定量研究中, 甲壳胺已被确认为较为理想的诱导物。

作者通过对经甲壳胺处理过的植物体内几丁质酶活力的测定, 阐明不同浓度甲壳胺溶液的诱导特点, 为甲壳胺在农业上的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 甲壳胺溶液

甲壳胺溶液由本实验室自制, 其浓度为 10% (10 g 甲壳胺溶于 100 mL 0.1% 的醋酸溶液中), 粘度为 20 cP·s。取上述 10% 的溶液用 0.1% 的醋酸溶液稀释成 6 个浓度: 0, 50, 100, 200, 400, 800 mg/L。

#### 1.1.2 0.5% 胶体几丁质的制备

称取 6 g 几丁质粉末 (Sigma 产品), 加入 180 mL 50% 的硫酸中, 搅拌至完全溶解, 倒入 1 000 mL 蒸馏水, 静置后倒去上层清液, 反复多次冲洗至 pH 中性, 离心后得乳状糊。取胶体几丁质 1 g 置于烧杯内, 烘干, 称重, 得其浓度约为 25%, 据此加蒸馏水配制成 0.5% 的胶体几丁质溶液。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 N-乙酰葡萄糖胺标准曲线绘制

以 N-乙酰葡萄糖胺的浓度为横坐标, 以  $A_{480}$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 标准曲线的回归方程为  $A_{480} = 17.037 \times (N - \text{acetylglucosamine})$ 。

### 1.2.2 植物幼苗的培养

将玉米和大豆种子放在直径为 15.5 cm 的培养皿中, 每种植物用 12 个培养皿, 各分为 6 组, 每组 2 个。种子覆以纱布, 加适量水, 在暗光下培养。当种子自身的营养消耗殆尽时, 将其移入土壤中。

### 1.2.3 几丁质酶的诱导

当植物种子涨软时, 将水倒掉, 换成 0, 50, 100, 200, 400, 800 mg/L 浓度的甲壳胺溶液处理种子 (每种

收稿日期: 2003-09-21, 修回日期: 2004-03-28

基金项目: 国家 863 计划项目 (819-07-10)

作者简介: 姜国良 (1964-), 男, 山东荣成人, 教授, 从事海洋生物材料研究, E-mail: gjliang@ouc.edu.cn



植物每个浓度处理 2 个培养皿)。用甲壳胺溶液处理 6~8 h 后,将处理液倒掉,再换成清水培养。每隔 24 h 取各培养皿中的种子(或幼苗)测其几丁质酶活,当各处理的酶活大都降为接近零时,照上述方法再用甲壳胺溶液处理一次,然后,每隔 24 h 取样测酶活。大豆种子用甲壳胺溶液处理 2 次,玉米种子共处理 3 次。

#### 1.2.4 酶的提取和测定

取处理过的幼苗整株 1 g,在 pH5.2 的醋酸缓冲液 5 mL 中研磨匀浆,于 12 000 r/min、0℃离心 20 min,取上清液测酶活。在 3 mL 0.5% 的胶体几丁质中加入 0.2 mL 酶上清液,后于 45℃水浴中反应 30 min,置沸水中 5 min 中止反应;将反应液在 4 000 r/min 离心 10 min,取上层清液按 3,5-二硝基水杨酸比色法测单糖含量<sup>[7]</sup>。每个处理浓度的酶活以

2 个培养皿的均值为结果,以每小时每克植物鲜重产生 1 μmol 乙酰葡萄糖胺的酶量为一个酶活单位。

#### 1.2.5 植物几丁质酶存在部位的研究

当玉米自身种子营养消耗殆尽时移入土壤,大约在三叶期,对长势良好的植株灌施甲壳胺溶液(50,100,200,400 mg/L 4 个浓度),24 h 和 48 h 后分别取根、茎、叶各 1 g,测定酶活力。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度甲壳胺溶液诱导几丁质酶的效果

#### 2.1.1 大豆

实验结果见表 1。

表 1 不同浓度甲壳胺溶液诱导大豆的几丁质酶活力[μmol/(g·h)]

Tab.1 The effect of different concentration chitosan induce the chitinase activity in soybean

处理时间(h)	甲壳胺浓度(mg/L)						
	0	50	100	200	400	800	
第 1 次	24	1.011 ± 0.32	1.124 ± 0.38	5.285 ± 0.69	5.397 ± 0.23	4.497 ± 0.59	6.971 ± 0.37
	48	1.462 ± 0.27	2.361 ± 0.30	2.811 ± 0.42	6.971 ± 0.41	7.646 ± 0.48	0
	72	3.711 ± 0.45	0	0	4.835 ± 0.38	0	0
第 2 次	24	0	0.562 ± 0.29	0	1.462 ± 0.49	2.923 ± 0.44	3.148 ± 0.42
	48	2.136 ± 0.51	4.835 ± 0.41	1.574 ± 0.33	0	0.562 ± 0.22	0
	72	12.593 ± 0.33	23.388 ± 0.47	27.436 ± 0.56	40.930 ± 0.72	18.215 ± 0.89	0

注:大豆质量为鲜质量。

#### 2.1.2 玉米

实验结果见表 2。

表 2 不同浓度甲壳胺溶液诱导玉米的几丁质酶活力[μmol/(g·h)]

Tab.2 The effect of different concentration chitosan induce the chitinase activity in corn

处理时间(h)	甲壳胺浓度(mg/L)						
	0	50	100	200	400	800	
第 1 次	24	1.462 ± 0.41	1.911 ± 0.42	2.100 ± 0.33	4.835 ± 0.49	1.799 ± 0.36	0
	48	0	0	0	0	0	0
第 2 次	24	0	3.935 ± 0.35	0	0	0	0
	48	0	8.546 ± 0.54	4.048 ± 0.29	5.397 ± 0.56	2.923 ± 0.44	17.766 ± 0.81
	72	1.349 ± 0.44	4.723 ± 0.71	9.445 ± 0.46	4.947 ± 0.39	5.397 ± 0.37	2.699 ± 0.52
	96	23.388 ± 0.97	20.914 ± 1.02	14.055 ± 0.46	10.897 ± 0.42	24.962 ± 0.91	45.877 ± 0.73
	120	0	0	1.349 ± 0.30	2.136 ± 0.48	0	0
第 3 次	24	5.622 ± 0.62	7.196 ± 0.81	3.598 ± 0.58	4.160 ± 0.37	2.586 ± 0.50	11.132 ± 0.89
	48	2.249 ± 0.37	9.445 ± 0.54	0.562 ± 0.71	4.273 ± 0.32	12.031 ± 0.62	6.072 ± 0.46
	72	31.709 ± 0.69	54.873 ± 0.99	38.793 ± 0.97	32.384 ± 1.09	54.873 ± 0.88	43.291 ± 0.78
	96	12.031 ± 0.88	15.292 ± 0.62	8.771 ± 1.00	17.316 ± 1.21	0.807 ± 0.31	11.582 ± 0.53
	120	3.148 ± 0.21	4.273 ± 0.27	0.112 ± 0.24	16.297 ± 0.57	5.172 ± 0.49	0
	168	10.457 ± 0.45	5.397 ± 0.34	4.160 ± 0.28	9.333 ± 0.62	8.995 ± 0.62	11.469 ± 0.64

注:玉米质量为鲜质量。

2.1.3 经多次诱导后玉米几丁质酶活力的变化趋势(以 200 mg/L 为例)

实验结果见图 1。

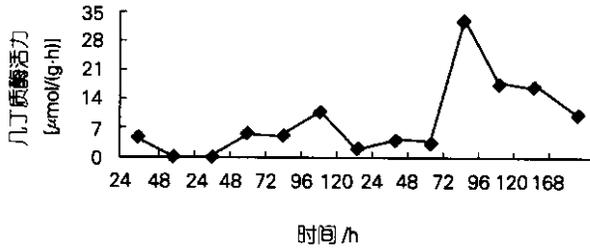


图 1 经多次 200 mg/L 甲壳胺溶液诱导后玉米几丁质酶活力的变化趋势

Fig. 1 The chitinase activity of corn after induced in 200 μg/mL chitosan for many times

2.2 几丁质酶产生部位的实验结果

实验结果见表 3。

表 3 24 h 诱导玉米幼苗不同部位几丁质酶活实验结果 [μmol/(g·h)]

Tab.3 The chitinase activity in different parts in corn

诱导部位	诱导时间(h)							
	24				48			
	甲壳胺浓度(mg/L)				甲壳胺浓度(mg/L)			
	50	100	200	400	50	100	200	400
根	0	3.284 ± 0.98	2.136 ± 0.47	0	0	3.172 ± 0.65	2.698 ± 0.73	3.947 ± 0.58
茎	0.112 ± 0.35	0.787 ± 0.42	0.675 ± 0.62	0	0	0	0	0
叶	0	0	0.224 ± 0.38	0	0	0	0	0

注:玉米幼苗质量为鲜质量

### 3 讨论

#### 3.1 不同浓度甲壳胺溶液诱导几丁质酶的效果

植物几丁质酶分布于茎、叶、种子及愈伤组织中,其相对分子质量为 25~40 ku<sup>[8,9]</sup>呈单体,具较高或者较低的等电点,最适作用 pH 值为 6,在 50 °C 以下保持稳定。其中 I 类几丁质酶为碱性,具体外活性,定位于液泡,其余为酸性,体外无活性,定位于细胞间隙<sup>[10]</sup>。防卫反应中几丁质酶与 β-1,3-葡聚糖酶的传导与定位研究表明,细胞间隙中几丁质酶为早期诱导反应的结果,能直接抑制侵入细胞间的真菌生长或间接释放真菌诱导因子而诱导几丁质酶活性的增加或宿主其它防卫反应的产生,而液泡中的几丁质酶的可能作用在于溶解细胞壁将液泡内物质释放于泡外<sup>[11]</sup>。

植物中几丁酶含量虽低,但在生命活动旺盛时期,如种子萌发时一直有着一定的本底合成量。由本实验结果可看出,随种子萌发的进行与幼苗的生长,几丁质酶活力有明显的增高趋势。

通过对以上两种植物诱导酶活力的测定,可确定甲壳胺的诱导浓度以 100~400 mg/L 为佳,尤其是 200 mg/L,因其诱导的酶活较高且酶在可检测范围内持续时间较长。

#### 3.2 植物几丁质酶基因表达的记忆性

尽管植物中无几丁质酶底物,酶活性也很低,但其遗传物质中却含无几丁质酶基因。植物几丁质酶基因的研究最早见于菜豆。本实验发现,经诱导产生的几丁质酶在植物体内经一定时间达到最大值,之后若不加以诱导则逐渐下降,直至可检测水平以下。在初次诱导后,植物体内几丁质酶活力低且持续时间短;二次诱导后酶活力与持续时间均明显提高,继续诱导

则效果更为明显。这表明植物体内几丁质酶基因的表达是有记忆性的,与动物体的多次免疫得到恒定高效抗体的效果相似。若能在合适的间隔时间不断加以处理,可得到较为恒定且持久的抗病效果。

### 3.3 几丁质酶在玉米植株中存在部位的研究

对经过诱导的玉米植株根、茎、叶内酶活力分别进行测定,发现几丁质酶主要存在于根中。究其原因可能是处理部位主要在根部的缘故。林晓蓉等<sup>[11]</sup>研究表明,寡聚糖在植物维管系统中具有可传导性,但有可能受到细胞壁上酶的作用而失活,因此诱导酶产生部位应当是与处理部位距离远近相关联。

参考文献:

[1] 李兆龙. 甲壳质和脱乙酰甲壳质在农业中的应用[J]. 今日科技, 1992(5): 6-7.  
 [2] Osuji G O, Cuero R G. Regulation of ammonium ion salvage and enhancement of the storage protein contents of corn, sweet potato, and yam tuber by N-(carboxymethyl) chitosan application[J]. *J Agruc Food Chem*, 1992, 4(2): 224-234  
 [3] 师素云, 薛启汉, 刘蔼民. 壳聚糖对玉米生长的调节

作用[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(2): 32-36.  
 [4] 崔萍, 蒋红蕾. 几丁质在植物抗病工程中的应用[J]. 山东轻工业大学学报, 2000, 14(3): 65-68.  
 [5] 高必达. 转几丁质酶基因防植物病害研究进展、问题与展望[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 32-35.  
 [6] Boller T, Vogell J P. Vacuolar localization of ethylene-induced chitinase in bean leaves[J]. *Plant Physiology*, 1984, 74: 442-444.  
 [7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994, 13-14.  
 [8] 曾艳, 赵南明, 刘进元. 几丁质酶与植物防卫反应[J]. 生物工程进展, 1997, 17(4): 31-34.  
 [9] 夏玉先, 裴炎, 李先碧, 等. 扁豆几丁质酶的特性与诱导[J]. 植物生理学报, 1996, 22(3): 272-276.  
 [10] 李继红, 邵寒霜, 郑学勤. 烟草 I 类几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程进展, 1998, 18(3): 309-313.  
 [11] 林晓蓉, 白雪芳, 杜昱光. 寡聚糖素诱导植物抗病性反应研究进展[J]. 生物工程进展, 1998, 18(5): 26-31.

## Induction character of chitosan on crops chitinase

JIANG Guo-liang, LIU Shun-mei, SHANG Hui-min, LIU Yun, YANG Dong  
 (College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received Sep., 21, 2003

Key words: chitosan; crops; chitinase; induction

**Abstract** Corn and soybean seeds and plants were processed with chitosan to induce chitinase production in the plants. Chitinase activity changed according to chitosan concentration with the optimum concentration at 100~400 g/L. Chitinase activity was also time an important determinant, after repeat processing chitinase activity and retention time both increased. Results show that plant chitinase gene expression has memory storage and was closely related to distance from the nearer to the site, the higher the level of activity.

(本文编辑: 张培新)