

## 寡糖诱导植物防卫反应研究进展\*

### STUDY PROCESS ON RESISTANCE REACTIONS OF OLIGOSACCHARIDES ELICITION IN PLANT

王松 姜国良 李立德 刘云

(青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

中图分类号 Q532+.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)03-0009-04

植物病害对农业生产有很大影响,当病害大规模爆发时将造成严重减产,因此多年来对植物病害,特别是由微生物(真菌、细菌、病毒等)病原引起的植物病害的研究一直深受中外学者重视。开发研制有效的防治病害的制剂是当前研究的重要内容。目前除了对传统的化学杀毒剂、杀菌剂(病毒A、菌克等)的研发以外,对于植物抗病诱导剂的研究受到越来越多的重视。通过对植物施加诱导剂在植物体诱发防卫反应,进而产生系统抗性使自身具备抗病能力。由于诱导剂不会对环境造成化学污染并能有效增加植物抗病性,因此被认为是新型生物农药。植物防卫反应是指植物抵抗病原侵染的一系列复杂的防御性生理反应,这些反应建立在一系列物质代谢基础之上,可以看作是一个病原-植物相互作用的过程。防卫反应不是单一的反应,而是通过复杂的级联反应完成。这些反应过程主要有:病原对宿主的攻击,防卫信号的识别与转导,植物-病原微生物表面的防御反应。在宿主植物受到病原攻击的早期发生多种变化,如细胞质的离子流动,蛋白质磷酸化与去磷酸化,生成活性氧等。随后在短时间内植物组织细胞中发生广谱的代谢修饰,这些代谢修饰主要包括:(a) 苯丙烷代谢途径和脂肪酸代谢途径,木质化反应,形成防止病原进一步侵染的物理屏障;(b) 产生特异性防御反应的化学信使物质如水杨酸,茉莉酮酸,乙烯等,诱导植物防卫基因的表达;(c) 具有抗微生物活性的化合物如植保素,病程相关蛋白(大多数病程相关蛋白是几丁质酶, $\beta$ -1,3葡聚糖酶),富含羟脯氨酸的糖蛋白(HPRGPs)等。植物防卫反应大多是由植物-病原细胞间相互识别启动,通过入侵的病原和宿主植物细胞壁产生的信号分子进行识别,这些信号分子被称为诱导子(elictor)。诱导子通过信号转导在植物体内诱导产生一系列防卫反

应。可作为诱导子的信号物质有很多,主要是植物和病原细胞壁降解产物如糖肽、糖蛋白、寡糖等。其中对寡糖诱导子的研究正逐渐成为热点。

#### 1 植物防卫反应中的寡糖诱导子

植物防卫反应中有相当数量的诱导子是寡糖。通常将聚合度在二至二十的单糖聚合物称为寡糖。这里所说的寡糖是寄主植物或入侵的病原体细胞壁降解产物,具有显著的诱导植物防卫反应的活性,也被称为寡糖素。来源于植物细胞壁的寡糖如寡半乳糖醛酸(果胶片段)、寡木质葡聚糖等称为内源诱导子;来源于病原细胞壁的为寡 $\beta$ -1,3-葡聚糖、寡几丁质等称为外源诱导子<sup>[1]</sup>。植物-病原相互作用的方式广泛存在于植物界,虽然水生藻类与陆生高等植物在进化过程中很早就发生分歧,但寡糖诱导子激发植物防卫反应的作用方式也普遍存在于海藻中。许多研究表明在褐藻与红藻中也存在诱导防卫反应的寡糖诱导子<sup>[2-4]</sup>,如褐藻中的寡褐藻胶,寡岩藻多糖,红藻中的寡琼脂糖等。

##### 1.1 陆生高等植物防卫反应中的寡糖诱导子

1976年Ayers发现从致病菌大雄疫病菌细胞壁降解产物获得的葡聚七糖可以诱导大豆产生植物抗毒素<sup>[5]</sup>,这是最早有关寡糖诱导子的报道。此后发现寡糖作为防卫反应的诱导子在高等植物中普遍存在。经研究发现植物和真菌的细胞壁是寡糖信号分子

第一作者:王松,出生于1975年,硕士研究生,从事农用海洋生物材料方向的研究。E-mail:wangsong75@163.com

收稿日期:2002-10-14;修回日期:2002-12-30

的源泉。防卫反应的寡糖信号都是植物或病原的细胞壁降解产物。

现在研究最多的寡糖诱导子是高等植物细胞壁果胶降解的寡聚体片段 ( $\alpha$ , -1, 4-D 半乳糖醛酸寡聚体)。果胶是高等植物细胞壁的主要成分,当真菌感染植物时可通过分泌半乳糖醛酸酶降解植物细胞壁产生寡果胶片段。Walker 等<sup>[6]</sup> 1982 年发现寡半乳糖醛酸可在大豆中诱导植保素累积。Mcneil 等<sup>[7]</sup> 1983 年发现寡半乳糖醛酸在高等植物中诱导产生植保素以抵抗真菌和细菌病原的入侵。寡半乳糖醛酸可在宿主植物中激发  $Ca^{2+}$  离子跨膜流动和氧化爆发反应 (oxidative burst) 的发生。氧化爆发是植物体内短时间内产生大量活性氧 (如  $H_2O_2$ ), 活性氧本身具有毒性, 可杀死入侵微生物病原, 同时可激活过氧化物酶活性, 而后者对木质化反应有直接影响<sup>[1]</sup>。有证据表明寡半乳糖醛酸可通过十八碳酸途径激活植物防卫反应基因表达<sup>[8]</sup>。通过一个中间结构亚麻酸的氢过氧化物累积茉莉酮酸, 而茉莉酮酸水平的增高可激活植物防卫基因转录活化<sup>[9]</sup>。寡半乳糖醛酸可诱导乙烯的合成, 乙烯在植物中作为中间信号可启动一系列防卫反应的发生。

几丁质是高等真菌细胞壁的主要成分, 它是由  $\beta$ -1, 4-N 乙酰基葡萄糖高分子聚合物构成。当病原真菌侵入植物体时, 宿主植物组织内的几丁质酶可将真菌细胞壁降解, 产生的几丁质寡聚体片段被宿主细胞识别, 进而诱导防卫反应的发生<sup>[10]</sup>。Walker 等研究发现寡几丁质在西红柿叶片中诱导豌豆素的产生。Barker 等<sup>[7, 9]</sup> 1989 年发现寡几丁质可在受损伤的小麦叶片中强烈诱导过氧化物酶 (POD) 和苯丙氨酸解氨酶 (PAL)。壳聚糖是几丁质部分脱乙酰基产物, 寡聚壳聚糖也是一种有效的诱导子。在溶液培养条件下壳聚糖可诱导黄瓜根、叶中几丁质酶和  $\beta$ -1, 3 葡聚糖酶活性提高, 在菜豆中也有类似反应。这两种酶以真菌细胞壁为作用底物, 可直接杀死入侵病原真菌。张燕等<sup>[10]</sup> 用质量分数为 0.5% ~ 3.0% 的寡壳聚糖对烟草种子进行浸种处理, 发现处理组的幼苗叶片 PAL 的活性明显高于对照组。PAL 是植保素、木质素等抗菌物质合成过程中的关键酶, POD 在木质素合成和酚类物质氧化过程中起重要作用。因此这些酶活性的提高与宿主植物繁育病原的能力密切相关。

木质葡聚糖是  $\beta$ -D 呋喃-葡萄糖残基通过  $\beta$ -1, 3-糖苷键结合成的高分子聚合物, 在高等植物中广泛存在, Ham 等<sup>[11]</sup> 1991 年发现当大豆受到病原攻击时  $\beta$ -1, 3 葡聚糖酶从细胞壁中释放具有诱导子活性的寡  $\beta$ -1, 3 葡聚糖片段诱导产生富含羟脯氨酸的糖蛋

白。其诱导活性与 Alberson 等发现的葡聚七糖相一致。可由此推测木质葡聚糖可能是作为  $\beta$ -葡萄糖诱导子的贮存库而存在。

## 1.2 海藻中的防卫反应信号

相比陆生高等植物, 海藻中的防卫反应寡糖诱导子研究的较晚, 但近来也已取得了很大的进展, 最先在大型海藻中发现的具有诱导子活性的寡糖是从红藻石花菜分离得到的寡琼脂糖<sup>[5]</sup>。Weinberger 等<sup>[12]</sup> 研究发现当石花菜中寡琼脂糖浓度增加几十微克就可显著启动氧化爆发反应的发生, 植物的呼吸作用在 3 min 内增加 6 倍, 在 15 min 内即可记录到  $H_2O_2$  释放。 $H_2O_2$  可直接杀死寄生绿藻。目前对褐藻寡糖诱导子研究较多, 褐藻胶由古洛糖醛酸和甘露糖醛酸聚合成, 是褐藻细胞壁中主要的结构多糖。Kipper<sup>[13]</sup> 等通过温和酸水解或褐藻酸裂解酶水解获得寡褐藻胶片段, 现在褐藻 (*Laminaria digitata*) 孢子体培养基中寡褐藻胶浓度在微克级升高时可诱导氧消耗的增加并相伴有  $H_2O_2$  释放, 以及明显的碘、钾离子的跨膜流动。进一步研究发理由  $\alpha$ -1, 4-L-古洛糖醛酸组成的寡聚体具有诱导子活性, 而寡聚甘露糖醛酸无诱导子活性<sup>[14]</sup>。岩藻多糖是存在于褐藻细胞间隙中的富含硫酸基的杂多糖, 经酶解获得的寡聚岩藻多糖可在褐藻中诱导与抗寄生绿藻防卫反应相关的特异性多肽合成。

## 1.3 海藻多糖寡聚体在陆生高等植物中诱导防卫反应

藻类与陆生高等植物在进化上很早就发生分歧, 但最近的研究表明海藻中的寡糖也可以在高等植物中诱导防卫反应。Klarzyaski 等<sup>[15]</sup> 发现经细菌酶解获得的寡褐藻胶可作为诱导子被高等植物识别从而诱导植物的防卫反应。Dascamps 等<sup>[16]</sup> 在烟草悬浮培养中加入 200  $\mu$ g / mL 岩藻寡糖, 在几分钟内诱导  $H_2O_2$  释放, 并在数小时内诱导病程相关蛋白的合成, 从红藻细胞中获得的角叉藻多糖硫酸酯可在悬钩子属的植物中诱导产生与防卫反应相关的酶及其它次级代谢产物。Olivier 等发现寡聚海带多糖可以在烟草悬浮培养细胞中诱导  $H_2O_2$  释放<sup>[16]</sup>, 并可激活脂氧化酶和苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的活性, 以及累积茉莉酮酸 (JA), 在大豆细胞中诱导植保素的累积。据推测这些海藻寡糖在结构上与陆生植物寡糖诱导子在结构上十分相似。

## 2 寡糖信号的特点

寡糖作为诱导子在高等植物中诱导防卫反应具有明显特征。(1) 聚合度: 寡半乳糖醛酸、寡几丁

质等寡糖的聚合度不同,作为诱导子的活力也就不同。寡半乳糖醛酸在西红柿中诱导乙烯合成时只有聚合度在4~6的片段最具活力<sup>[2]</sup>。在梨细胞悬浮培养中聚合度在6~12之间的半乳糖醛酸具有诱导活性;在很多高等植物整株实验时,聚合度在10~15之间诱导活性最高。寡聚几丁质在三聚体以上具有诱导活性。寡琼脂糖在诱导氧化爆发反应时,聚合度在6~12之间具有最高诱导活性<sup>[17]</sup>。寡褐藻胶在大豆中诱导PAL合成时的最小聚合度为5。植物防卫反应是一个高度有序的过程,寡糖的聚合度受到调控。已从大豆、苹果等的细胞膜中分离到聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(PGIPs)<sup>[18]</sup>,该蛋白可抑制聚半乳糖醛酸酶活性,防止果胶过度降解,使果胶寡聚体保持长期活性。与此相似葡聚糖降解可被真菌培养液中的蛋白所抑制,这些蛋白被称为葡聚糖酶抑制蛋白(GIPs)<sup>[5]</sup>。其作用是限制真菌和其它含葡聚糖的病原过度降解,增加植物防卫反应强度。(2)浓度:寡糖在很低浓度就可在植物中诱导显著的防卫反应发生。寡褐藻胶浓度在微克级升高时可在褐藻孢子体中诱导氧消耗的增加并伴有H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>释放。(3)结构:具有专一性结构是寡糖分子发挥诱导作用的关键<sup>[5]</sup>。以葡聚糖诱导植保素合成为例,葡聚糖必须是β-1,6糖苷键连接,并且有两个β-1,3糖苷键分支,如用外切β-1,3葡聚糖酶消化寡糖分子,或改变分支点的部位,则完全失去活性。作为诱导子的寡半乳糖醛酸其还原端必须具备完整的半缩醛基团。在褐藻胶降解获得的寡聚体片段中,寡聚古洛糖醛酸片段结构与寡半乳糖醛酸结构相似,具有诱导活性,而寡聚甘露糖醛酸无诱导子活性。

### 3 寡糖诱导子作用机理

植物的防卫反应是建立在植物与病原体相互识别相互作用基础之上的。寡糖诱导植物防卫反应涉及寡糖信号的识别、信号转导、防卫基因的活化等一系列反应。Mathien等<sup>[19]</sup>1991年从马铃薯细胞膜分离到专一结合寡半乳糖醛酸的蛋白——Romorin,证实植物细胞膜寡糖受体的存在。Yamada研究组<sup>[20]</sup>在研究真菌细胞壁几丁质片段多水稻培养细胞植保素的诱导作用时,发现水稻细胞微粒体组分中存在寡几丁质高度亲和性结合受体。PGIPs和GIPs也可能是寡糖受体的一部分。PGIPs有一段富含亮氨酸区域(LRR)可与寡半乳糖醛酸发生特异性结合。在寡糖诱导防卫反应过程中存在蛋白质磷酸化反应,Reymond等<sup>[21]</sup>用寡半乳糖醛酸处理欧芹叶片,发现有一部分细胞膜蛋白,

如pp34等发生磷酸化。Grab等1989年在大豆悬浮培养细胞中加入葡聚七糖诱导植保素合成时,细胞内有近35种蛋白质磷酸化。另外用寡糖诱导子处理后,大豆细胞、小麦、菜豆都有膜蛋白或细胞质蛋白磷酸化。这些蛋白质磷酸化可能与防卫反应中的某些酶活化,启动防卫基因转录有关。Merau发现用茉莉寡葡聚糖处理大豆细胞,发生细胞膜去极化引起H<sup>+</sup>离子外流和Ca<sup>2+</sup>离子流入,后来发现用寡半乳糖醛酸处理烟草细胞,用寡几丁质处理植物根部均可引起相同的反应<sup>[6]</sup>。Ca<sup>2+</sup>流入使细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度局部增高,从而增加膜β-1,3葡聚糖合成酶活性,促使胼胝质的快速合成,Ca<sup>2+</sup>还参与大豆、欧芹中植保素合成的信息转导,并与氧化爆发,活性氧生成有关。活性氧释放可能是植物中最早的防卫反应,它不仅可以直接杀死病原微生物,还可通过激活过氧化物酶加速木质化过程增强寄主防卫能力。用寡半乳糖醛酸,寡几丁质或寡褐藻胶处理大豆、烟草等的悬浮培养细胞可检测到显著的酮酸的累积<sup>[22]</sup>,而茉莉酮酸被认为在防卫反应中起关键的信号传递作用。当寡糖诱导子被寄主植物细胞识别后先从细胞膜释放出亚麻酸,亚麻酸经过氧化羟基亚麻酸中间体转化为茉莉酮酸。茉莉酮酸启动防卫基因转录,防卫基因的诱导表达最先是与植保素合成相关的酶,其后是水解酶和编码PR蛋白的基因表达,最后是HRPGP和质素合成有关的酶。

植物防卫反应是一个系统反应过程,寡糖诱导子在这一过程中起到关键的信号传递作用,目前还没有一个完整的反应模型,根据已有的结果可以总结这样的反应过程,寡糖诱导子被宿主植物识别后引起细胞膜蛋白磷酸化,细胞膜去极化,Ca<sup>2+</sup>流入细胞,诱发氧化爆发,随后过氧化物酶活性上升进一步引发木质素聚合以及促进HRPGP高级结构形成。另一方面,寡糖信号被寄主识别后诱导茉莉酮酸的累积,后者启动防卫反应基因转录活化,编码与植保素合成有关的酶和PR蛋白等。

### 4 寡糖诱导子的应用前景

对寡糖信号的研究在农业方面有广阔的应用前景。寡糖诱导子如果胶,β-1,3葡聚糖、几丁质、壳聚糖等的寡聚体在植物防卫反应中有多效性,在植物中可以有效地激活非特异性免疫,用1ng寡葡聚糖可在大豆细胞中诱导足够量的植保素积累<sup>[1]</sup>,即1g寡糖诱导子可使1000t植物组织产生足够量的植保素,由此可见寡糖是一种高效无毒的新型农药。几丁质不

仅存在与真菌细胞壁中,而且也是许多低等动物如:虾、蟹等的外壳中的重要成分,在自然界的有机物中仅次于纤维素,全世界每年仅水产加工后的几丁质废弃物就约为140多万吨,是十分丰富的生物农药资源。海藻中的褐藻胶、岩藻多糖、琼脂糖寡聚体可以在海藻中诱导防卫反应,可以抗诸如真菌、细菌、寄生绿藻等引起的藻类病害,对藻类水产养殖保护有重要意义。褐藻胶、岩藻多糖、琼脂多糖可以从海藻中提取,有丰富的天然资源,随着对海藻寡糖在多种陆生高等植物中诱导抗性的研究,可以开发新型的海藻寡糖农药。对于几丁质、壳聚糖、以及海藻多糖诱导子的研究与应用,将开拓广阔的海洋与农业相结合新领域。

#### 参考文献

- Frithjof CK, Bernard K. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol*, 2001, 125(5):278-291
- Campbell AD, Labavitch J M. Induction and regulation of ethylene biosynthesis by pectic oligomers in cultured pear cells. *Plant Physiol*, 1991, 97(1):699-705
- Aoyagi H, Yasuhira J, Tanaka H. Alginate promotes production of various enzymes by *Catharanthus roseus* cell. *Plant Cell Rep*, 1998, 17(5):243-247
- Sharrp JK, McNeil M, Albersheim P. The primary structure of one elicitor active and seven elicitor inactive hexa( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-D-glucitol isolated from the cell wall of *Phytophthora megasperma*. *J Biol Chem*, 1984, 259(7):11312-11320
- Albersheim P. Host pathogen interactions VII plant pathogens secrete proteins which inhibit enzymes of the host capable of attacking the pathogen. *Plant Physiol*, 1974, 53(5):684-687
- Descamps V, Klazinsky O, Barbeyton T. Fucodigosaccharides, enzyme pour leur preparation a partir de fucanes, bacterie productrice de l'enzyme et application des fucodigosaccharides a la protection des plantes. *Plant Physiol*, 1988, 88(4):316-326
- Nothnagel E A, McNeil M, Albersheim P, et al. Host pathogen interaction XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol*, 1983, 71:916-926
- Doeres SH, Syrovets T, Weiler E W, et al. Oligogalacturonides and chitosan activate genes through the octadecanoic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8):4095-4098
- Lapez-lane M, Van den Berg JDJ, Thomas Oates JE, et al. Structural identification of the lipooligosaccharide modulation signals of *Rhizobium loti*. *Mol microbial*, 1995, 15(7):527-538
- 张燕,方力,王宝.壳聚糖对烟草种子萌发及幼苗生理生化特性的影响. *吉林农业大学学报*, 1998, 20(3):28-30
- Ham K S, Kauffmann S, Albersheim P, et al. Host-pathogen interactions XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with  $\beta$ -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Mol Plant Microbe Interac*, 1991, 4:545-552
- Walker-Simmons M, Hadwiger LA, Ryan CA. Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antifungal proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 110(3):194-199
- Philippe Potin, Kamal Bouarab, Frithjof Kupper. Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Ecology and Microbiology*, 1999, 2:276-283
- 余叔文.植物生理与分子生物学.北京,农业科学出版社,1992.417-431
- Wit DE, Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci*, 1997, 2:452-458
- Olivier K, Bertrand P. Linear  $\beta$ -1,3-Glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol*, 2000, 124(9):1027-1038
- Foord SA, Atkins EDT. New X-ray diffraction results from agarose: extended single helix structures and implications for galactan mechanism. *Biopolymers*, 1989, 28(7):1345-1355
- Albersheim P, Anderson A J. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68(5):1815-1819
- Lafitte C, Barthe JP. Glycoprotein inhibitors of *Colletotrichum lindemuthianum* endopolygalacturonase in near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* resistant and susceptible to anthracnose. *Physiol Plant Pathol*, 1984, 25(9):39-53
- Reymond P, Grunberger S, Paul K, et al. Oligosaccharide defence signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(6):4145-4149
- Yonemoto Y, Tanaka H, Yamashita T, et al. Promotion of germination and shoot elongation of some plants by alginate oligomers prepared with bacterial alginate lyase. *J Ferment Bioceng*, 1993, 75(3):68-70
- Weinberger F, Friedlander M, Hoppe HG. Oligogalacturonates elicit a physiological response in *Gm. canina* (Rhodophyta). *Physiol Plant Pathol*, 1999, 25(11):59-63

(本文编辑:张培新)