

壳寡糖诱导和白粉菌侵染的辣椒叶片防御酶系活性研究

肖仲久^{1,2,3}, 蒋选利^{1,2}, 李小霞³, 张素勤¹

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 遵义师范学院 生物系, 贵州 遵义 563002)

摘要:以遵义朝天椒为供试材料, 用壳寡糖喷雾处理辣椒叶片后再接种辣椒白粉菌, 系统地研究了壳寡糖对辣椒防御酶活性变化的影响。结果表明: 壳寡糖喷雾处理辣椒后, 辣椒叶片中多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性较对照都有明显增加, 其中PPO和PAL峰值提前(处理后接种)。试验证明, 壳寡糖处理后, 随着酶活性增强, 辣椒的系统抗病性得到表达, 二者有一定的相关性。

关键词: 壳寡糖; 白粉菌; 辣椒; 防御酶

中图分类号: S 641.304⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)08-0016-04

壳寡糖又称寡聚氨基葡萄糖、甲壳低聚糖, 是由壳聚糖降解而成, 是2~10个氨基葡萄糖通过 β -1, 4糖苷键连接而成的低聚糖^[1]。对许多植物-病原物系统的研究表明, 植物对病原物侵入的生理生化反应是以酶的催化活动来实现的, 寄主防御酶可催化一些诱导型抗病物质的合成, 影响寄主的抗病反应^[2]。该课题组前期的研究已经证明, 以壳寡糖为激发子, 可启动辣椒的防卫反应, 抑制白粉菌的扩展^[3]。基于此, 试验以壳寡糖喷雾处理辣椒健康植株后再接种辣椒白粉病菌 *Leveillula taurica* (Lev.) Arn, 拟探讨壳寡糖诱导处理后辣椒叶组织防御酶活性变化及其与辣椒白粉病抗性诱导效果的关系, 为植物诱导抗性的应用和抗病机制研究提供更多理论依据, 促进诱导抗病性技术在实践中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料: 供试品种为贵州当地辣椒栽培种遵义朝天椒, 由贵州大学植物病理学教研室提供。将种子消毒后播种于80 cm×40 cm, 高约30 cm的育苗盆中, 待幼苗长至8~10片真叶时, 将植株移栽到直径约20 cm, 高约25 cm的瓷盆中, 每盆2~3株, 置于温室中培养。

病原菌: 供试病原菌辣椒白粉病菌 *Leveillula tauri-*

ca (Lev.) Arn 分生孢子采自贵州省贵阳市花溪区湖潮乡磊庄辣椒基地自然发病的植株, 在辣椒苗圃进行繁殖, 用时用毛笔将其刷下, 配置成孢子悬浮液(10^5 个/mL)。

供试药剂: 壳寡糖购自大连中科格莱克生物科技有限公司, 聚合度2~10。

1.2 方法

试验处理及采样方法: 辣椒成株期, 选用长势均一的健壮植株供试。用质量浓度50 μ g/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, 采用喷雾法接种孢子浓度为 10^5 个/mL的白粉菌。试验设处理(喷壳寡糖溶液后接种)、空白对照(喷清水不接种病菌)、接种对照(不喷药, 只喷清水和接种病菌)和喷药对照(只喷壳寡糖溶液不接种), 并对不需接种的对照进行隔离。各重复3次。接种后0.5、1、2、3、4、5、6、7 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, 叶片样品装入封口袋中, 做好标记, 放入-80℃冰箱中保存供试。

1.2.1 酶液的提取 多酚氧化酶(PPO)活性提取: 剪取辣椒叶片0.5 g, 加1 mL磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.0), 冰浴研磨, 10 000 g离心10 min, 上清液为PPO粗提液。过氧化物酶(POD)粗提液的提取: 剪取辣椒叶片0.5 g, 加入0.05 mol/L预冷的磷酸钠缓冲液(pH 7.8)5 mL, 冰浴研磨, 然后于10 000 rpm离心10 min, 上清液即为酶粗提液。苯丙氨酸解氨酶(PAL)粗提液的提取: 剪取辣椒叶片0.5 g, 加入3 M预冷的提取液(含5 mmol/L巯基乙醇和0.5% PVP的0.05 mol/L, pH 8.8的硼酸缓冲液), 冰浴研磨, 然后于10 000 rpm离心10 min, 上清液即为酶粗提液。 β -1, 3-葡聚糖酶粗提液的提取: 剪取辣椒叶片0.5 g, 加入0.05 mol/L预冷的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)5 mL, 冰浴研磨, 然后于10 000 rpm离心10 min, 上清液即为酶粗提液。

第一作者简介: 肖仲久(1980-), 男, 湖南武冈市人, 在读博士, 讲师, 现主要从事植物免疫学研究工作。E-mail: xzj198099@163.com。

通讯作者: 蒋选利(1960-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物免疫学研究工作。E-mail: 253946966@qq.com。

基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合J字[2009] 2104号); 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合J字(2006)2052号); 贵州大学人才科研基金资助项目。

收稿日期: 2009-03-25

1.2.2 酶活性的测定 参照其他植物酶活性的测定方法 几种酶活性均采用比色法测定^[4-7]。多酚氧化酶(PPO)活性的测定: 取 1.5 mL 0.2 mol/L 的邻苯二酚和 3 mL 的磷酸缓冲液, 加入 0.5 mL 酶液。对照管加入高温灭活的酶液。每处理重复 3 次, 30℃下反应 15 min, 用 0.1 mL 10% 的偏磷酸终止反应, 记录 398 nm 波长下的吸光值。酶活单位以 1 min 内引起 OD₃₉₈ 变化 0.01 的酶量为 1 个酶活性单位(U), 酶活大小以 U/g (FW) 表示。过氧化物酶(POD)活性测定: 取酶液 50 μL, 加入 2.95 mL 0.05 mol/L, pH 7.8 的磷酸钠缓冲液, 0.025 mol/L 愈创木酚 1 mL, 摇匀后, 30℃预热 3 min, 再加入 0.2 mol/L H₂O₂ 1 mL, 立即计时, 并测定 OD₄₇₀, 每 1 min 读数 1 次, 读 3 min 内的变化值, 以高温灭活的酶液做对照, 所加试剂和测定管相同。每处理重复 3 次, 酶活单位以 1 min 内引起 OD₄₇₀ 变化 0.01 的酶量为 1 个酶活性单位(U), 酶活大小以 U/g (FW) 表示。苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定: 向 3 mL 的反应介质(2 mL 的提取缓冲液和 1 mL 的 20 mmol/L L-苯丙氨酸)中, 加入 0.2 mL 的酶液, 对照加入 2.2 mL 的提取缓冲液和 1 mL 的 L-苯丙氨酸, 37℃反应 60 min, 加入 0.8 mL 的 40% 的三氯乙酸终止反应, 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清测定 290 nm 的光吸收。每处理重复 3 次。酶活单位以 OD₂₉₀ 变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U), 酶活大小以 U/g (FW) 表示。β-1, 3-葡聚糖酶活性测定: 向试管中加入 0.4 mL 的昆布多糖底物溶液(2.5 mg/ mL)和 0.1 mL 的酶液, 再加入 1 mL 醋酸钠缓冲液, 对照不加酶液, 多加 0.1 mL 缓冲液。37℃水浴中反应 30 min, 随后加入 2 mL DNS 溶液终止反应, 置于沸水浴中 5 min, 冷却。记录 540 nm 波长下的吸光值, 对照标准曲线求出样品液中的还原糖量。以 1 g 鲜组织 1 h 产生 1 μg 还原糖的酶量为 1 个酶活性单位(U)。

2 结果与分析

2.1 壳寡糖诱导辣椒抗白粉病性的表达

壳寡糖处理的辣椒植株在接种后 10 d 叶正面开始产生褪绿或淡黄色的小斑点, 对照接种的植株 8 d 就产生同样症状, 16 d 对照叶片背面密生肉眼可见的白色粉状孢子, 壳寡糖处理的植株 20 d 才出现。25 d 时待对照植株发病充分时统计病情指数, 壳寡糖处理的病情指数仅为 6.96, 对照达 32.38。

2.2 壳寡糖处理对多酚氧化酶(PPO)活性的影响

在整个取样时期, 壳寡糖喷雾处理后(除第 6 天), 未接种白粉菌的叶片多酚氧化酶(PPO)活性基本上都高于对照(CK 未接种)(图 1)。在处理 0.5 d, 酶活性就显著增加, 处理后 2 d 达到第 1 个高峰, 为对照的 137.02%; 壳寡糖喷雾处理后接种, 与对照(CK 接种)的酶活性变化趋势相似, 处理后 2 d 即出现第 1 个峰值, 为

对照的 137.02%。二者第 2 个峰值出现的时序有明显差异(壳寡糖处理后接种第 5 天出现酶活性出现第 2 个峰值, 为对照的 129.28%, 对照在第 6 天才出现第 2 个峰值), 壳寡糖喷雾处理后接种, 提前了酶活性的时序(比接种对照提前了 1 d)。可见, 壳寡糖喷雾处理可提高辣椒叶片中 PPO 的活性, 且壳寡糖喷雾处理对辣椒叶片中 PPO 活性的影响可能主要是提前了酶活性的时序。

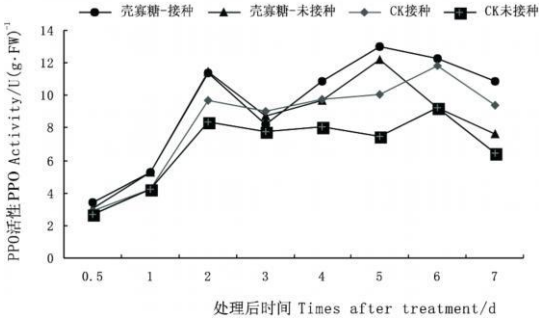


图 1 壳寡糖处理并接种后辣椒叶片 PPO 活性变化
Fig.1 Changes of PPO activity in pepper inoculated with *Leveillula taurica* (Lev.) Arn after oligochitosan pretreatment

2.3 壳寡糖处理对过氧化物酶(POD)活性的影响

由图 2 可以看出, 壳寡糖喷雾处理后, 未接种白粉菌的辣椒过氧化物酶(POD)活性与对照(CK 未接种)在测定时间内均呈现 2 个活性高峰, 但壳寡糖喷雾处理酶活性明显高于对照。在处理 2 d, 酶活性就达到第 1 个峰值, 为对照的 128.7%。2 d 后酶活性开始有所下降, 在处理 5 d 达到第 2 个峰值, 为对照的 141.51%; 壳寡糖喷雾处理后接种, 除第 3 天和第 6 天酶活性略低于对照(CK 接种)外, 其他取样时间的酶活性均高于对照。并于第 5 天达到酶活性最高峰值, 为对照的 120.48%。结果表明, 壳寡糖喷雾处理后辣椒叶片中过氧化物酶(POD)活性大幅度提高。

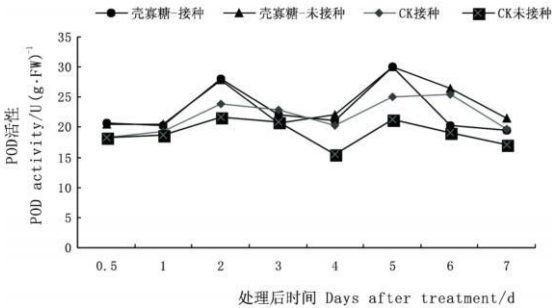


图 2 壳寡糖处理并接种后辣椒叶片 POD 活性变化
Fig.2 Changes of POD activity in pepper inoculated with *Leveillula taurica* (Lev.) Arn after oligochitosan pretreatment

2.4 壳寡糖处理对苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响

由图 3 可以看出, 在接种 1 d 内, 壳寡糖喷雾处理后

和各对照叶片中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性基本变化不大,在接种后第1天活性均有所降低,但壳寡糖喷雾处理后接种的降低幅度最小,然后酶活性逐渐上升。壳寡糖处理后未接种白粉菌的辣椒苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性明显高于对照(CK未接种),在处理3 d,酶活性就达到第1个峰值,为对照的221.43%,然后酶活性开始有所下降,在处理5 d达到第2个峰值,为对照的145.5%;壳寡糖喷雾处理后接种,除第4天酶活性略低于对照(CK接种)外,其他取样时间的酶活性均高于对照。酶活性出现2个高峰,但对照仅出现1个高峰,并提前了酶活性的时序(比接种对照提前了2 d)。并于第5天达到酶活性最高峰值,为对照的126.98%。以上结果表明,壳寡糖喷雾处理后7 d内提高了辣椒叶片中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性。

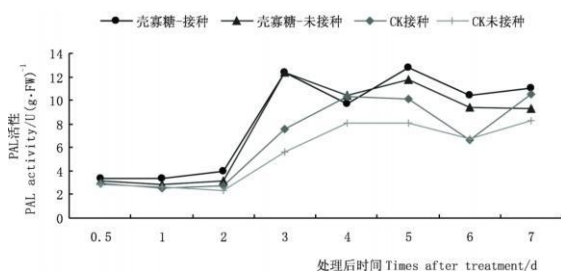


图3 壳寡糖处理并接种后辣椒叶片PAL活性变化

Fig.3 Changes of PAL activity in pepper inoculated with *Leveillula taurica* (Lev.) Arn after oligochitosan pretreatment

2.5 壳寡糖处理对 β -1,3-葡聚糖酶活性的影响

从图4可以看出,与其他酶活性相比,在整个取样期, β -1,3-葡聚糖酶活性变化幅度较小,峰值不是很明显。但还是可以看出,经壳寡糖处理后的辣椒植株 β -1,3-葡聚糖酶活性基本上都略高于未处理的辣椒植株。壳寡糖处理后的辣椒植株在第6天达到最高峰值(接种和未接种), β -1,3-葡聚糖酶活性分别为对照(CK未接种,CK接种)的113.97%和128.79%。试验结果显示,壳寡糖处理后辣椒 β -1,3-葡聚糖酶活性提高幅度较小。

3 结论与讨论

有关防御酶活性变化与其他植物病害的关系已有许多报道,不同学者在不同寄主-病原物互作系统中所得研究结果非正即反,不尽相同^[2]。以往的研究认为:PAL是诱导合成木质素最常见的酶,它不仅参与木质素的合成,而且与酚类代谢和植保素的合成都有密切关系;POD是木质素诱导合成的最常见的氧化-还原酶之一,在脱氢酶的参与下,可以催化许多重要酚类物质的氧化反应,参与木质素的聚合过程,是细胞内重要的活性氧清除剂,与植物抗病性有密切的关系;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。 β -1,3-葡聚糖酶是许多真菌细胞壁的主要组分之一,因此 β -1,3-葡聚糖酶在植物的抗病性方面可能具有重要作用。这些防御酶能否作为抗性指标用于检测生物农药的诱导抗病活性,不同的诱导剂和诱导植物上有不同的报导。因此,该研究在发现壳寡糖对辣椒白粉病有较高防效的基础上(另文发表),较系统地研究了几种防御酶的活性。

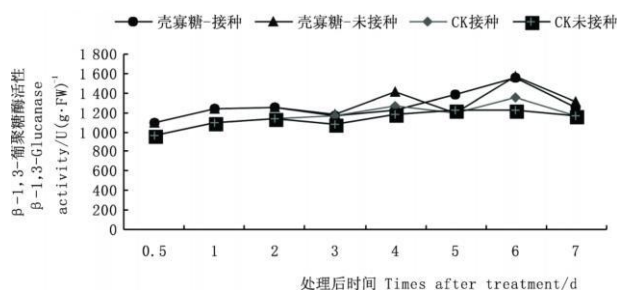


图4 壳寡糖处理并接种后辣椒叶片 β -1,3-葡聚糖酶活性变化

Fig.4 Changes of β -1,3-Glucanase activity in pepper inoculated with *Leveillula taurica* (Lev.) Arn after oligochitosan pretreatment

研究结果表明:与各对照相比,壳寡糖处理的辣椒叶片均可不同程度提高所测酶系的活性,尤其是PPO、POD、PAL活性提高显著。处理后,PPO、POD、PAL均有2个活性高峰,且酶活性变化及幅度均较对照明显。由此认为,这3种酶可以作为辣椒诱导抗病指标用于检测生物农药的生物活性。但经壳寡糖处理后 β -1,3-葡聚糖酶活性变化不是很显著,这与杜昱光等利用壳寡糖处理黄苗榆烟(*Nicotiana tabacum* cv.)再接种TMV的研究结果不同。可以表明壳寡糖诱导辣椒对白粉病的抗性,可能与植物体内活性氧代谢、木质素合成等有关。而 β -1,3-葡聚糖酶其活性变化不明显,似乎与壳寡糖诱导辣椒抗病机制无相关性或相关性不大。

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] 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谱的影响[J].中国生物防治,2002,18(2):82-86.
- [3] 肖仲久,李小霞,蒋选利.壳寡糖诱导辣椒白粉病初步研究[J].湖北农业科学,2009,48(3):617-619.
- [4] 于莉.黑斑毒素的提取及对向日葵超微结构和防御酶系的影响[D].沈阳:沈阳农业大学,1998:28-61.
- [5] 中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理学会编.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999.
- [6] 张宪政,陈凤玉,王荣富.植物生理学实验技术[M].沈阳:辽宁科技出版社,1994:17,99,144.
- [7] 陈鹏.小白对白粉病诱导抗性体系中蛋白质与积基因表达差异研究[D].西北农林科技大学博士论文,2004.

麻疯树水浸液对两种经济作物的化感作用研究

马 沅, 陈 放, 王胜华, 王升平

(教育部生物资源和生态环境重点实验室, 四川大学 生命科学院, 四川 成都 610064)

摘 要:以麻疯树种子的萌发率、胚根长度、根活力指数、叶绿素及光合作用作为测量指标, 以化感效应敏感指数 *RI* 为评价指标, 研究了麻疯树对 2 种经济作物烟草和玉米的化感作用。结果表明: 不同的麻疯树器官水浸液对烟草和玉米的抑制程度不同: 种子> 叶> 枝。烟草和玉米对低浓度麻疯树水浸液的反应不同: 烟草种子萌发与幼苗生长没有受到明显抑制, 而玉米种子萌发及幼苗生长则受到促进; 玉米地下部分对麻疯树化感物质较地上部分敏感, 烟草则无明显区别。麻疯树水浸液对玉米和烟草幼苗生长的抑制作用在生理上表现为: 抑制光合作用、减少气孔开放和胞间 CO₂ 浓度、降低根活力指数和叶绿素含量, 以及种子吸胀过程中的主动吸收, 增强呼吸作用。

关键词: 麻疯树; 玉米; 烟草; 化感作用; 水浸液; 根分泌液
中图分类号: S 565.9; S 572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)08—0019—05

如何缓解能源与环境压力, 是当今世界各国都面临的重要课题, 人们正在积极寻找与开发利用可再生的清洁能源以替换石油化石能源。麻疯树抗旱耐瘠、不与粮油作物争地, 是优质的生物柴油资源植物, 极具开发利

用价值^[1]。由于麻疯树含有一些毒性较强的物质, 如 Curcin 和二萜酯等, 它的自然分布常常是分散的^[4]。尽管如此, 许多国家与公司已开始大面积种植麻疯树, 印度于 2003 年启动了一项年产 1.3×10⁷ t 生物柴油的麻疯树种植计划^[2]。麻疯树在大面积种植初期即达到盛产期之前 5 年中常常与其它农作物进行间种。在印度, 麻疯树就与番茄、青红椒等一起种植^[3]。植物在自然条件下生存, 往往与其环境的其它生物建立相生相克的互作关系, 即所谓化感作用^[5]。由于化感作用在很大的程度上抑制其他作物的生长, 因此在自然和农业生态系统中受到日益广泛的关注^[6-8]。研究麻疯树对农作物生长发育的影响对于麻疯树套种时物种选择以及生产技术

第一作者简介: 马沅(1984-), 女, 硕士, 现从事植物化感研究。
E-mail: m314a@hotmail.com.
通讯作者: 陈放(1960-), 男, 博士, 教授, 现从事植物天然产物及生物技术研究工作。E-mail: chenfang@scu.edu.cn.
基金项目: 教育部重点基金资助项目(20060610015); 国际合作资助项目(2006DFB63400)。
收稿日期: 2009—03—20

Changes of Activities of Defensive Enzymes in Pepper Leaves Treated with Chito-Oligosaccharide and Inoculated with Powdery Mildew

XIAO Zhong-jiu^{1,2,3}, JIANG Xuan-li^{1,2}, LI Xiao-xia³, ZHANG Su-qin¹

(1. Agriculture College Guizhou University, Guiyang Guizhou 550025, China; 2. Guizhou University, Key Laboratory of Guizhou Mountainous Agricultural Pest, Guiyang Guizhou 550025, China; 3. Zunyi Normal College, Zunyi Guizhou 563002, China)

Abstract: The changes of activities of defensive enzymes were tested systematically in Zunyi *Capsicum annuum* treated with chito-oligosaccharides and inoculated with *Leveillula taurica* (Lev.) Arn in order to confirm the resistant mechanism of pepper to powdery mildew. The result showed that the activities of polyphenoloxidase (PPO), Peroxidase (POD) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) increased apparently compared with contrast plants, and the peaks of activities of PAL and PPO were earlier (inoculated after treated). So there was correlativity between the powdery mildew resistance expression and the increase of activities of defensive enzymes.

Key words: Chito-oligosaccharide; *Leveillula taurica* (Lev.) Arn; Resistance induced; Pepper; Defensive enzymes