

低聚糖激发子的制备及诱导杨树抗病性的研究

薛盼盼, 胡景江, 徐 擎

(西北农林科技大学 林学院 陕西 杨凌 712100)

摘 要:采用正交实验优选 H₂O₂ 氧化降解壳聚糖的最佳工艺条件,得到最佳降解方案:30% H₂O₂ 用量 10 mL,反应温度 60℃,反应时间 6 h,乙酸浓度 2%。在此基础上用壳聚糖及低聚糖溶液作为激发子诱导杨树抗病性,当低聚糖浓度为 10 mg/L 时,PAL、β-1,3-葡聚糖酶、几 质酶及木质素活性达到最高值分别为 对照的 3.41、3.89、3.12、2.56 倍。SOD、CAT 及 POD 活性分别为 对照的 4.01、2.59、2.65 倍。壳聚糖最佳诱导浓度为 20 mg/L,此时 PAL、β-1,3-葡聚糖酶、几 质酶及木质素酶活性分别为 对照的 3.15、3.85、3.02、2.56 倍。SOD、CAT 及 POD 活性分别为 对照的 3.81、2.43、2.59 倍。相同浓度的低聚糖与壳聚糖相比诱导效果更好。

关键词:壳聚糖降解; 正交实验; 低聚糖; 诱导抗病性

中图分类号: S 792.11 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2010)11—0031—06

壳聚糖作为一种高分子阳离子多聚物,具有无毒、易降解、生物亲和性好的优点,因而被广泛应用于医药、食品、化工等领域。近年来随着壳聚糖研究的广泛开展,大量研究表明壳聚糖能够有效诱导植物抗病性,但不同分子量的壳聚糖性质差异很大,因此该试验研究了壳聚糖的氧化降解,采用正交实验对影响壳聚糖降解的各因素条件进行筛选,利用最佳降解方案,得到优质的低聚糖。在此基础上该研究利用不同浓度的壳聚糖和低聚糖溶液作为激发子诱导杨树离体叶片,测定相关抗病性指标,为壳聚糖的进一步开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

毛白杨(*Populus tomentosa*): 采自西北农林科技大学北校区苗圃。壳聚糖: 国药包装,脱乙酰度为 90%。

1.2 试验方法

1.2.1 低聚糖激发子的制备 低聚糖激发子的制备按表 1、2 所示设计 L₉ (3⁴) 正交实验。取 20 g 壳聚糖分散于 400 mL 乙酸溶液中,均匀搅拌使壳聚糖全部溶解,加入一定体积的 30% H₂O₂,调节水浴锅温度,反应一定时间后,终止反应。反应结束后,用 10% NaOH 溶液调整至 pH 8~9,抽滤,滤液在 50℃减压浓缩,加入 3 倍体积

无水乙醇,静置过夜,抽滤后,真空干燥,制得不同分子量的水溶性壳聚糖^[1]。

表 1 H₂O₂ 法降解壳聚糖因素水平表

因素	水平		
	1	2	3
A: 30% H ₂ O ₂ 用量 A: The content of 30% H ₂ O ₂ /mL	8	10	12
B: 反应温度 B: The reaction temperature/℃	50	60	70
C: 反应时间 C: The reaction time/h	6	8	10
D: 乙酸浓度 D: The acetate concentration/%	1	2	3

表 2 四因素三水平正交实验设计

Table 2 The orthogonal test design of four factors and three levels				
编号 Number	A: 30% H ₂ O ₂ 用量 A: The content of 30% H ₂ O ₂ /mL	B: 反应温度 B: The reaction temperature/℃	C: 反应时间 C: The reaction time/h	D: 乙酸浓度 D: The acetate concentration/%
	H ₂ O ₂ /mL	/℃	time/h	/%
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁

1.2.2 壳聚糖脱乙酰度的测定 参照张胜义的方法^[2],具体方法: 取 25 mL 一定浓度的盐酸于 100 mL 烧杯中,插入甘汞—玻璃电极,在电磁搅拌下,用 0.1280 mol/L NaOH 标液滴定至 pH 为 3.00,记下消耗的 NaOH 体积 V₁,然后,称取 0.2 g 壳聚糖样品于 100 mL 烧杯中,加

第一作者简介: 薛盼盼(1985-),女,山西运城人,硕士,现主要从事森林病理学研究工作。E-mail: xuepanpan_1985@yahoo.com.cn。
通讯作者: 胡景江(1957-),男,陕西定边人,教授,现主要从事植物逆境生理学研究。E-mail: jingjianghu@yahoo.com.cn。
基金项目: 国家“十五”科技攻关资助项目(2001BA501A09)。
收稿日期: 2010—03—15

入 25.00 mL 盐酸, 搅拌, 待样品完全溶解, 用 NaOH 标准液滴定至 pH 为 3.00, 此时消耗的 NaOH 标准体积为 V_b 。另取一份样品, 置于烘箱中, 在 105℃ 干燥至恒重, 测出样品水分含量 W 。每个样品重复测定 3 次。脱乙酰度 (D.D.)% = $\{0.1280 \times (V_b0 - V_b) \times 0.016\} / \{G_x (100 - w) \times 0.0994\} \times 100\%$ 。其中: G_x —试样重量 (g), W —试样水分百分含量 (%), 0.016 与 1 mL 1 mol/L 盐酸相当的胺量 (g), 0.094 壳聚糖中理论胺基含量 (16/161)。

1.2.3 壳聚糖黏均分子量的测定 参照张峰等的方法^[3], 采用乌氏黏度计来测定黏度。取少量壳聚糖样品, 80℃ 真空干燥恒重后称取 0.05 g, 加入 0.2 mol/L CH_3COOH —0.1 mol/L CH_3COONa 缓冲溶液 50 mL, 搅拌使之完全溶解, 配成 0.1% 壳聚糖的乙酸缓冲溶液。在 25℃ 用乌氏黏度计测定分子量。黏度的计算采用一点法经验公式, 公式如下:^[1] $(\eta_p + 3 \ln \eta) / 4G$ $\eta_p = \eta - 1$ 。根据公式^[1] $\eta = K_m M_\eta^\alpha$ 来计算 M_η 。其中, $K_m = 1.81 \times 10^{-3}$, $\alpha = 0.93$ 。

1.3 植物诱导处理及抗病指标的测定

1.3.1 激发子的制备及诱导处理 将壳聚糖及降解得到最优的低聚壳聚糖分别配置成不同质量浓度的激发子, 壳聚糖的浓度梯度为 2、10、20、40、80 mg/L; 低聚糖的质量浓度为 1、5、10、20、40 mg/L。高压灭菌 (121℃, 20 min) 后备用。用不同浓度的激发子对杨树叶片进行喷施, 以无菌水为对照, 24 h 后取样, 测定相关指标。

1.3.2 苯丙氨酸解氨酶的测定 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的测定参照王敬文等的方法^[4]。取待测样品 1 g (鲜重), 经 -15℃ 冷冻固定后, 加 4 倍重量预冷的 0.2 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.8, 含 8 mmol 巯基乙醇) 在冰浴中研磨匀浆, 4℃ 下 10 000 r/min 离心 30 min, 上清液用于酶活性的检测。酶检测反应液组成: 硼酸缓冲液 (pH 8.8) 3 mL, L-苯丙氨酸 (80 mmol) 1 mL (对照管不加蒸馏水代之), 酶液 1 mL (根据酶活性适当稀释或增加体积)。摇匀后置 35℃ 恒温水浴保温 60 min, 加 0.2 mL 6 mol/L HCl 终止反应。若有沉淀需过滤或离心, 将对照管调零, 在 290 nm 处检测测定管反应液的吸光度 A_{290} 。以测定管反应液 1 h 时 A_{290} 增加 0.01 为一个酶活性单位 (U)。

1.3.3 几丁质酶活性的测定 参照 Boller 等的方法^[5], 取待测样品 1.0 g, 经 -15℃ 冷冻固定后, 加 2 mL 预冷的醋酸缓冲液 (pH 4.5) 研磨匀浆, 10 000 r/min 离心 15 min (4℃), 上清液即为酶粗提液。取 0.5 mL 酶液, 加 0.5 mL 胶状几丁质和 2.0 mL 醋酸缓冲液 (pH 4.5), 35℃ 反应 1 h, 每组 3 个重复, 对照用等体积缓冲液代替底物。反应结束后, 置于沸水浴中灭活 5 min, 然后以 3 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中的聚 N-乙酰葡萄糖胺的还原性残基。取 0.2 mL 反应上清液, 加 1.3 mL

H_2O 和 2.0 mL 铁氰化钾-碳酸钠试剂置于加塞试管中沸水浴中煮沸 15 min。冷却后以醋酸缓冲液为背景在 420 nm 测光吸收, 以对照 OD 值减去反应组 OD 值, 根据 NAG (N-乙酰氨基葡萄糖) 浓度—OD₄₂₀ 标准曲线, 得到对应产生还原残基的 NAG 的量, 以 1 g 产生 0.1 mg NAG 为一个酶活单位 (U)。

1.3.4 β -1, 3-葡聚糖酶活性测定 参照史益敏的方法^[6], 称取 0.5 g 植物材料剪碎后, 放入预冷的研钵中, 加入少许的石英砂, 加入 2.5 mL 0.05 mol/L 的醋酸钠缓冲液 (pH 5.0), 在冰浴中研磨成匀浆, 然后全部转移到离心管中, 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min, 所得上清液即为粗酶液, 置于冰箱中 -4℃ 保存, 用于酶活性测定。参照余永廷等的方法^[7], 在试管中加 300 μL 1 mg/mL 的昆布多糖溶液和 300 μL 酶液, 37℃ 水浴保温 30 min 后立即加入 1 mL DNS 溶液终止反应, 混匀, 置于沸水中显色 5 min, 流水冷却至室温, 于 540 nm 比色, 测定吸光度值 (A), 以沸水浴 10 min 失活的酶液为标准对照, 以吸光度差值 (样品液 A 值减去标准对照液 A 值) 对照葡萄糖标准曲线查出产生的葡萄糖量, 根据酶活力定义计算酶活力单位。一个酶活力单位 (U) 定义为, 37℃ 时 1 g 鲜组织每分钟催化昆布多糖产生 1 μg 葡萄糖的酶量。

1.3.5 木质素含量测定 参照波钦诺克的方法^[8], 取待测样 1.0 g, 用体积分数 1% 醋酸、丙酮等分离出水溶性和脂溶性化合物, 用 72% 硫酸水解除去纤维素和半纤维素, 用 0.085 mol/L 重铬酸钾—硫酸氧化水解样品中的木质素, 过量的重铬酸钾用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠标准液滴定 (KI 和淀粉为终点指示剂), 根据标准液的消耗量计算样品中木质素含量。

1.3.6 SOD 活性测定 参照高俊凤的方法^[9], 取 0.5 g 待测样品于预冷的研钵中, 加 2 mL 预冷的 50 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.8), 冰浴研磨后用缓冲液定容至 10 mL。取 5 mL 匀浆液于 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为酶粗提液。SOD 活性测定采用氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 光还原法^[9], 以抑制光氧化 50% NBT 的酶量为一个酶活单位 (U)。

1.3.7 CAT 活性测定 CAT 粗酶液的提取方法同 SOD, 采用紫外吸收法测定 CAT 的活性^[9]。取 10 mL 试管分别加入 pH 7.0 Tris-HCl 1.0 mL, 酶提取液 0.1 mL (对照管加灭活酶液), 蒸馏水 1.7 mL。加完后将所有试管放入 25℃ 水浴中预热 3 min, 逐管加入 0.2 mL 200 mmol/L H_2O_2 溶液, 每加 1 管立即在紫外分光光度计上测定 A_{240} (蒸馏水调零), 每隔 30 s 读数 1 次, 共测 3 min。以 1 min 内 A_{240} 降低 0.1 (3 支测定管的平均值) 为一个酶活性单位 (U)。

1.3.8 POD 活性测定 参照高俊凤的方法^[9], 粗酶液的提取方法同 SOD。取酶上清液 1~15 mL 具塞试管

中,加入 0.1% 愈创木酚 1 mL 摇匀后再加入蒸馏水 6.9 mL,摇匀。最后加入 0.18% 的 H₂O₂ 1 mL,立即计时,摇匀。25℃下准确反应 10 min,加入 5% 偏磷酸 0.2 mL 终止反应,以不加 H₂O₂ 空白管调零,在 470 nm 下比色。比色结果按回归方程计算,以每克鲜重材料反应生成 1 μg 产物为一个酶活单位(U)。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖降解正交实验分析

2.1.1 降解反应条件选择 H₂O₂ 用量的选择: H₂O₂ 用量是影响壳聚糖降解的主要因素。由单因素实验可知,在一定的温度和反应时间,不同的 H₂O₂ 与壳聚糖单元比的情况下,反应所得的壳聚糖的特性不同,随着 H₂O₂ 用量比的增加,降解壳聚糖的分子量逐渐降低,选择适当 H₂O₂ 的用量是控制降解得到特定分子量范围壳聚糖的关键。对于水溶性壳聚糖的制备, H₂O₂ 用量还直接影响反应后处理和产品色泽。当 H₂O₂ 与壳聚糖的单元比为 0.5 时,壳聚糖降解效率低,不能满足该研究的需求。因此选择的 H₂O₂ 用量为 8、10、12 mL。降解反应温度的选择:当反应温度低于 50℃时, H₂O₂ 氧化降解壳聚糖的反应非常缓慢,水溶性壳聚糖的产量非常低,大部分都属于水不溶性壳聚糖。因此该试验的反应温

度最低设置为 50℃,壳聚糖的降解速率与反应温度成正比,随着反应温度的升高,水溶性产物的速率大大增加,但是随着反应温度的升高,水溶性壳聚糖的颜色逐渐加深,当温度升至 80℃时,所得到的水溶性壳聚糖的颜色已经为棕黄色;色泽过深。所以在降解过程中,温度低,速度太慢;温度高,副反应增加。经过比较最终确定正交试验的温度为 50、60、70℃。降解反应时间的选择: H₂O₂ 氧化降解壳聚糖时,可与壳聚糖分子链中多个位点作用,降解反应刚开始时,壳聚糖分子量大,可结合的位点也就比较多,降解速度快,一定时间后,分子链大大缩短,降解速度减慢,加长反应时间也对分子量的减小起不到显著作用,在不影响壳聚糖降解效率的同时,选择正交试验的时间为 6、8、10 h。乙酸浓度选择:由单因素实验可知,乙酸浓度与降解液相对粘度基本呈正线性关系,当乙酸浓度增加时,壳聚糖分子上氨基可与 H⁺ 结合生成 R-NH⁺ 缺电子体系,而氧化降解反应多发生在氨基末结合 H⁺ 的糖单元的 1,4-糖苷键上,因此乙酸浓度增大反而会使降解受到阻碍;同时,如果乙酸浓度太小的话,壳聚糖则不易降解,同样也会影响降解效率。综合考虑选定的乙酸浓度为 1%、2%、3%。

表 3 四因素三水平正交实验结果

Table 3 The result of the orthogonal test of four factors and three levels

编号 Number	A: 30% H ₂ O ₂ 用量 A: The content of 30% H ₂ O ₂ /mL	B: 反应温度 B: The reaction temperature/℃	C: 反应时间/h C: The reaction time/h	D: 乙酸浓度 D: The acetate concentration/%	脱乙酰度 a Degree of deacetylation a/%	特性粘度 b Viscosity b/ mL·g ⁻¹	分子量(× 10 ⁴) Molecular weight(× 10 ⁴)	颜色 Color
1	8	50	6	1	72.68	20.01	2.23	浅
2	8	60	8	2	85.42	18.57	2.06	中
3	8	70	10	3	82.37	10.23	1.08	深
4	10	50	8	3	88.62	6.54	0.67	中
5	10	60	10	1	75.36	10.78	1.15	浅
6	10	70	6	2	83.15	15.39	1.68	深
7	12	50	10	2	79.28	12.07	1.29	深
8	12	60	6	3	88.34	16.73	1.84	浅
9	12	70	8	1	78.47	9.68	1.02	中
Ia	240.47	240.58	244.17	226.51				
IIa	247.13	249.12	252.51	247.85		Ta=I a+IIa+ IIIa= 733.69		
IIIa	246.09	243.99	237.01	259.33				
Ka	3	3	3	3				
I a/ Ka	80.16	80.19	81.39	75.50				
IIa/ Ka	82.38	83.04	84.17	82.62				
IIIa/ Ka	82.03	81.33	79.00	86.44				
Ra	2.22	2.85	5.17	10.94				
Ib	48.81	38.62	52.13	40.47				
IIb	32.71	46.08	34.79	46.03		Tb=I b+IIb+ IIIb= 120		
IIIb	38.48	35.3	33.08	33.5				
Kb	3	3	3	3				
IIb/ Kb	16.27	12.87	17.38	13.49				
IIIb/ Kb	10.90	15.36	11.60	15.34				
IIIb/ Kb	12.83	11.77	11.03	11.17				
Rb	5.37	3.59	6.35	4.18				

2.1.2 壳聚糖降解正交实验分析 按照表 3 所示设计的正交实验可见,Ia、IIa、IIIa 分别表示各因素在各水平下壳聚糖降解产物脱乙酰度值之和;Ia/ Ka、IIa/ Ka、IIIa/ Ka 分别表示各因素在各水平下壳聚糖降解产物的脱乙酰度的平均值。同理,Ib、IIb、IIIb 分别表示各因素在各水平下壳聚糖降解产物特性黏度值之和;Ib/ Kb、IIb/ Kb、IIIb/ Kb 分别表示各因素在各水平下壳聚糖降解产物的特性黏度的平均值。用同一因素各水平下平均值的极差 R 来反映各因素的水平变动对结果影响的大小。极差大就表示该因素的水平变动对试验结果影响大,反之则表示该因素的水平变动对结果影响小。通过分析极差数据 Ra 可知,各降解条件对脱乙酰度的影响大小差异显著,其主次顺序依次为:乙酸浓度> 反应时间> 反应温度> 30% H_2O_2 用量,因此反应中酸性介质中乙酸的用量对壳聚糖降解产物的脱乙酰度的影响颇为显著。分析极差数据 Rb 可知,降解各条件对降解产物特性黏度的影响的大小顺序为:反应时间> 30% H_2O_2 用量> 乙酸浓度> 反应温度,所以反应时间变化越大,产物的特性黏度变化也愈大。在降解实验中,希望所得到的壳聚糖降解产物前后的脱乙酰度变化幅度不大,降解产物的特性黏度越小越好,产物的颜色以浅色适宜,这样可以减少后续处理的时间。综合分析表 3 的数据,根据极差分析选取 $A_2B_2C_1D_2$ 工艺,这样可以得到优质的降解产物。 $A_2B_2C_1D_2$ 工艺具体为:30% H_2O_2 10 mL,反应温度 60℃,反应 6 h,乙酸浓度 2%。最后所得产物脱乙酰度为 87.69%,特性黏度为 6.28 mL/g,分子量为 0.64×10^4 。

2.2 低聚糖及壳聚糖诱导杨树抗病性的比较

2.2.1 激发子对 PAL 的诱导 由表 4 可看出,低聚糖激发子及壳聚糖激发子对 PAL 具有明显的诱导作用,经诱导处理后 PAL 活性明显高于对照。低聚糖诱导液浓度为 10 mg/L 时,PAL 活性达到最高值(535.73 U),为对照(157.18 U)的 3.41 倍 且随着浓度不断增大 PAL 活性不再发生明显变化,说明低聚糖的最佳诱导浓度为 10 mg/L。壳聚糖诱导液诱导的 PAL 活性最高值出现在 20 mg/L,此时 PAL 活性为(494.67 U),为对照(157.18 U)的 3.15 倍,随着壳聚糖诱导浓度的增加,PAL 活性反而略有降低,说明壳聚糖的最佳诱导浓度为 20 mg/L。总的来说,低聚糖 10 mg/L 的诱导效果比壳聚糖 20 mg/L 的诱导效果好,低聚糖是由壳聚糖降解出来的低分子量的多糖,因此更容易渗入植物组织内,诱导抗性反应,同样的浓度低聚糖的诱导效果比壳聚糖显著,但在实践中也可以通过增加壳聚糖的浓度来消减这种差别。

2.2.2 激发子对 β -1,3-葡聚糖酶的诱导 由表 5 可知,

经 2 种诱导液处理后酶活性变化明显,诱导效果显著。

表 4 PAL 酶活性测定结果

Table 4 The experiment result of PAL activity			
低聚糖诱导浓度 The inducement concentration of chitosan- oligosaccharides /mg · L ⁻¹	PAL 活性 PAL activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹	壳聚糖诱导浓度 The inducement concentration of chitosan /mg · L ⁻¹	PAL 活性 PAL activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹
0	157.18	0	157.18
1	279.44	2	231.54
5	371.63	10	323.35
10	535.73	20	494.67
20	534.67	40	485.70
40	530.14	80	478.67

低聚糖诱导液诱导下酶活性变化幅度明显,在 10 mg/L 的浓度下 β -1,3-葡聚糖酶活性达到最高值(42.44 U),为对照(10.90 U)的 3.89 倍,当浓度再增大时酶活性稍有降低,说明增加浓度并不能提高酶活性,低聚糖的最优诱导浓度为 10 mg/L。当壳聚糖诱导浓度为 20 mg/L 时, β -1,3-葡聚糖酶活性为(41.96 U),与对照相比诱导作用显著,为对照(10.90 U)的 3.85 倍,与壳聚糖最优诱导活性相比差之甚少。两者相同浓度时, β 1,3-葡聚糖酶活性差异显著,说明低聚糖能更好的诱导植物抗病性。

表 5 β 1,3-葡聚糖酶活性测定结果

Table 5 The experiment result of β 1,3-glucanase activity			
低聚糖诱导浓度 The inducement concentration of chitosan- oligosaccharides /mg · L ⁻¹	β 1,3-葡聚糖酶活性 β 1,3 glucanase activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹	壳聚糖诱导浓度 The inducement concentration of chitosan /mg · L ⁻¹	β 1,3-葡聚糖酶活性 β 1,3 glucanase activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹
0	10.90	0	10.90
1	12.87	2	12.97
5	17.51	10	19.33
10	42.44	20	41.96
20	41.98	40	41.55
40	39.36	80	39.12

2.2.3 激发子对木质素和几丁质酶活性的诱导 由表 6 可知,经过 2 种诱导液处理后木质素含量及几丁质酶活性都发生显著变化。低聚糖诱导后木质素含量最高为 44.80 mg/g,此时的诱导浓度为 10 mg/L,为对照(17.51 mg/g)的 2.56 倍。低聚糖诱导液浓度为 10 mg/L 时,几丁质酶活性(751.25 U)为对照(240.56 U)的 3.12 倍。当壳聚糖诱导浓度为 20 mg/L 时,木质素含量(44.76 mg/g)及几丁质酶活性(727.21 U)达到最高值,分别为对照的 2.56 倍和 3.02 倍。当诱导浓度再增大时,诱导效率也不再增加而保持趋于稳定。

表 6 木质素和几丁质酶活性测定结果

Table 6 The experiment result of lignin content and chitinase activity					
低聚糖诱导浓度 The inducement concentration of oligosaccharides/mg · L ⁻¹	木质素含量 Lignin content /mg · g ⁻¹	几丁质酶活性 Chitinase activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹	壳聚糖诱导浓度 The inducement concentration of chitosan/mg · L ⁻¹	木质素含量 Lignin content /mg · g ⁻¹	几丁质酶活性 Chitinase activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹
0	17. 51	240. 56	0	17. 51	240. 56
1	27. 55	393. 49	2	25. 72	342. 93
5	35. 22	546. 72	10	34. 30	512. 24
10	44. 80	751. 25	20	44. 76	727. 21
20	44. 33	749. 01	40	43. 99	623. 76
40	43. 99	742. 01	80	43. 77	614. 65

2. 2. 4 激发子对保护性酶活性的诱导 如表 7 所示, SOD、CAT 及 POD 经激发子诱导后活性均发生明显的变化, 抗病指标活性明显高于对照。低聚糖诱导液浓度为 10 mg/L 时诱导效率最大, SOD 活性(747. 85 U)、CAT 活性(112. 39 U)、POD 活性(821. 59 U)分别为对照(186. 72、43. 43、310. 19 U)的 4. 01、2. 59、2. 65 倍。壳聚糖诱导后 20 mg/L 的诱导作用最强, SOD 活性(712. 15 U)、CAT 活性(105. 60 U)、POD 活性(804. 52 U)分别为对照(186. 72、43. 43、310. 19 U)的 3. 81、2. 43、2. 59 倍。随着诱导液浓度增加酶活性不再持续增加, 保持稳定。

表 7 保护性酶活性测定结果

Table 7 The experiment result of protection enzyme							
低聚糖诱导浓度 The inducement concentration of oligosaccharides /mg · L ⁻¹	SOD 活性 SOD activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹	CAT 活性 CAT activity / U · g ⁻¹ FW · min ⁻¹	POD 活性 POD activity / μg · g ⁻¹ FW · min ⁻¹	壳聚糖诱导浓度 the inducement concentration of chitosan /mg · L ⁻¹	SOD 活性 SOD activity / U · g ⁻¹ FW · h ⁻¹	CAT 活性 CAT activity / U · g ⁻¹ FW · min ⁻¹	POD 活性 POD activity / μg · g ⁻¹ FW · min ⁻¹
0	186. 72	43. 43	310. 19	0	186. 72	43. 43	310. 19
1	354. 96	85. 42	524. 03	2	342. 50	82. 96	509. 39
5	509. 18	97. 32	698. 11	10	478. 28	97. 78	653. 03
10	747. 85	112. 39	821. 59	20	712. 15	105. 60	804. 52
20	744. 82	110. 29	820. 38	40	710. 33	103. 47	739. 40
40	743. 80	111. 54	818. 58	80	709. 52	79. 89	717. 54

3 结论与讨论

3. 1 壳聚糖降解试验

壳聚糖是自然界中储量丰富的天然高分子化合物, 因其良好的性质近年来受到广泛应用。壳聚糖的降解方法主要有酶降解法、化学降解法和物理降解法。对于壳聚糖的降解, 前人已做过大量研究, 罗平等^[10]利用 H₂O₂ 降解法得到了水溶性壳聚糖, 周孙英等^[11]采用纤维素酶降解壳聚糖表明纤维素酶能很好的降解壳聚糖。H₂O₂ 降解法是目前应用较多的一种降解方法。该试验采用正交降解法对影响降解的多个因素进行分析, 找寻最佳工艺条件。

壳聚糖降解受到反应温度、反应时间、乙酸浓度及 H₂O₂ 含量的影响。壳聚糖分子上的-NH₃⁺ 和醋酸根阴离子之间存在着一定的吸引力, 以盐键的形式存在。当温度较低时, 盐键不被破坏, 分子链不易断裂, 壳聚糖分子量变化不明显; 随着温度升高, 盐键逐渐被破坏, 壳聚糖分子量也随着发生大的变化。在反应初期壳聚糖降解速度较快, 壳聚糖的分子量变化较快, 随着时间的延长, 分子量变化逐渐变慢。这是因为壳聚糖在初始降解时, 分子链较长, 降解时分子链变短分子量减少, 已降解

的分子数占壳聚糖总分子数的比例增加, 因此随着时间延长, 壳聚糖的分子量变化不明显。壳聚糖分子链上的-NH₂ 能与 H⁺ 形成-NH₃⁺, 使得壳聚糖分子链伸展, 更易断裂。在一定范围内, 适当提高乙酸浓度, 有助于提高壳聚糖的降解速率。H₂O₂ 在降解反应体系中产生 ·OH 自由基, ·OH 自由基氧化能力极强, 对壳聚糖具有很强的氧化降解作用。但过量的 ·OH 自由基会导致未消耗的游离自由基积聚。所以选择适当的 H₂O₂ 用量是控制壳聚糖降解的关键。总的来说, 该试验采用的最终降解条件为: 反应温度 60 ℃, 反应时间 6 h, 乙酸浓度 2%, 30% H₂O₂ 用量 10 mL。

3. 2 激发子诱导抗病性反应

诱导抗病性是指利用生物的或者物理的、化学的因子处理植物, 改变植物对病害的反应, 产生局部的或系统的抗性。植物诱导抗病性的全过程是极其复杂的, 它是以激发子作为信号分子, 通过一系列信号传递, 开启抗病防卫相关基因, 表达抗病物质, 达到抗病的目的。

低聚糖及壳聚糖是一类具有调节植物生长发育、形态发生、果实成熟以及植物的抗逆性等多功能的生物活性分子。Chris 等^[12]研究表明用壳寡糖处理胡萝卜, 能

够诱导胡萝卜对核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)产生抗性,推迟发病时间。Albersheim (1984)发现^[13]低聚糖能诱导植保素的合成与积累,激活植物自我防卫系统。该试验采用壳聚糖和低分子量低聚糖作为激发子,通过诱导测定杨树叶片抗病指标,结果表明,两种激发子诱导作用显著,同浓度的低聚糖比壳聚糖的诱导效果优,壳聚糖可以通过增加浓度来增强诱导效果。低聚糖诱导的最佳浓度为 10 mg/L,壳聚糖的最佳诱导浓度为 20 mg/L,随着浓度增大诱导结果不再发生变化。

低聚糖及壳聚糖激发子诱导植物抗性的生化机制在于它能以信号分子的方式激活植物的一系列抗性反应中的一种或数种,如合成植保素、积累木质素、促进病程相关蛋白积累、合成与抗性有关的次生代谢酶如 PAL、几丁质酶、 β 1,3-葡聚糖酶等。这些抗性物质和酶有的能增强植物细胞壁的强度,有的能分解病菌细胞壁,有的对病菌有毒性,因而起到强化自身的保护结构以及杀灭或抑制病菌生长的作用。

低聚糖及壳聚糖对人体无危害,易分解,不污染环境,能作为激发子促进植物生长,其诱导抗病作用显著。另外低聚糖及壳聚糖来源广泛,经适当加工制成的生物肥料或药剂,具有使用量少、成本低、效果好等优点,在农林生产中具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 林强,马可立.纤维素酶—过氧化氢降解法制备低聚壳聚糖的研究[J].试验与技术,2003,27(6):7-10.

- [2] 张胜义.恒 pH 值法测定壳聚糖胺基含量[J].安徽大学学报,1992(1):84-86.
- [3] 张峰,殷佳敏,丁丽娟等.超声波辅助降解壳聚糖的研究[J].高分子材料科学与工程,2004(20):221-223.
- [4] 王敬文,薛应龙.植物苯丙氨酸解氨酶的研究II.苯丙氨酸解氨酶在抗马铃薯晚疫病中的作用[J].植物生理学报,1982,8(1):35-43.
- [5] Boller T, Gehri A, Maudt F, et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function [J]. Plant, 1983, 157: 22231.
- [6] 史益敏. β -1,3-葡聚糖酶的测定[C]//中国科学院上海植物生理研究所,现代植物生理学实验指南.北京:科学出版社,1999:128-129.
- [7] 余永廷,谢媛媛,黄丽丽,等.不同碳、氮源组合对小麦全蚀病菌产生胞外 β -1,3-葡聚糖酶的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(2):110-114.
- [8] OHHOKX H(波钦诺克).植物生物化学分析法[M].荆家海,丁钟嵘译.北京:科学技术出版社,1981:178-181.
- [9] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版西安公司,2000:192-199.
- [10] 罗平,何波兵,简显俊,等.水溶性低分子壳聚糖的制备[J].化学研究与应用,2000,12(6):666-669.
- [11] 周孙英,陈盛,余萍,等.纤维素酶降解壳聚糖的研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),2002,18(4):64-67.
- [12] Chris M, Cheah L H, Koolaal J P. Postharvest Biology and Technology [J], 2004, 33: 612-651.
- [13] Sharp J K, Menell M, Albersheim P. The primary structure of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa-(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* F. sp. *Glycinea* [J]. J. Biochem., 1984, 259: 11321-11326.

The Preparation of Chitosan-oligosaccharides Elicitors and the Study of Disease Resistance of Poplar Callus Induced by Chitosan-oligosaccharides Elicitors

XUE Pan-pan¹, HU Jing-jiang¹, XU Qing²

(College of Forestry Sciences Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: The peroxide degradation of chitosan conditions was optimized by orthogonal test design. The optimum peroxide degradation of chitosan conditions were: 30% H_2O_2 10 mL, temperature 60℃, time 6 h, acetate concentration 2%. The disease resistance of poplar callus induced by chitosan and chitosan-oligosaccharides elicitors was analyzed. When the chitosan-oligosaccharides concentration was 10 mg/L, PAL, β -1,3-glucanase, chitinase, lignin content, SOD, CAT and POD showed the highest activity which were 3.41, 3.89, 3.12, 2.56, 4.01, 2.59, 2.65 times as high as the each control enzyme activity. The optimum induced concentration of chitosan was 20 mg/L, under which the PAL, β -1,3-glucanase, chitinase, lignin content, SOD, CAT and POD activity were 3.15, 3.85, 3.02, 2.56, 3.81, 2.43, 2.59 times as high as the each control enzyme activity. The induction effect of chitosan-oligosaccharides was better than chitosan at the same concentration.

Key words: chitosan degradation; orthogonal test; chitosan-oligosaccharides; induced disease resistance