

溃疡病菌低聚糖激发子诱导杨树 细胞抗病机制的初步研究*

胡景江¹, 刘志龙², 文建雷¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 2 试验农场, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 以杨树愈伤组织为试验材料, 研究了杨树溃疡病菌细胞壁裂解物——低聚糖对杨树细胞有关抗病指标的诱导作用。结果表明, 该低聚糖具有明显的激发子活性, 能够诱导杨树细胞苯丙氨酸解氨酶(PAL)、几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶活性显著增高(分别为对照的2.80, 1.99, 2.84倍)和木质素、HRGP的积累(分别为对照的2.35, 2.61倍)。因此可以认为, 低聚糖激发子主要是通过快速启动和增强防卫基因表达的速度和强度, 使植物体内同抗病性有关的物质代谢增强, 导致抗病物质快速形成和积累, 从而诱导或增强了植物的抗病性。

[关键词] 杨树; 杨树溃疡病菌; 低聚糖激发子; 木质素; HRGP; PAL; 几丁质酶; β -1, 3-葡聚糖酶

[中图分类号] S718.43; S792.110.1

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2003)04-0145-04

低聚糖(oligosaccharide)一般是指含2~20个单糖的一系列小分子多糖。自从Albersheim等发现霉菌细胞壁组分 β -葡聚糖片段能激活植物细胞的抗病反应以来, 人们相继发现了其他一些植物、酵母、细菌细胞壁多糖的裂解物低聚糖有诱导植物细胞抗病的功能。具有激发子活性的低聚糖主要有低聚 β -葡聚糖、N-乙酰氨基葡萄糖、聚氨基葡萄糖、低聚半乳糖和木聚糖。其中前3种可由裂解真菌细胞壁的 β -葡聚糖和几丁质获得, 后两种可由裂解植物细胞壁的果胶质和纤维素获得。

利用“诱导抗性”或“交叉保护”的现象来防治植物病害已有较多报道^[1,2], 但大多局限于农作物, 涉及树木诱导抗病性以及诱导机制的研究则很少。本试验用溃疡病菌菌丝体细胞壁裂解物——低聚糖激发子处理杨树愈伤组织细胞, 初步研究了低聚糖诱导杨树细胞抗病性的生化机制。

1 材料与方法

1.1 杨树愈伤组织的培养

以毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)为供试植物材料, 取其2年生枝条韧皮部为外植体, 按胡景江等^[3]的方法培养愈伤组织。

1.2 溃疡病菌细胞壁裂解物的制备

从北京杨(*Populus pekinensis* Hsu)溃疡病斑上分离得到溃疡病菌(*Dothiorella gregaria* Sacc.), 按王

颖等^[4]的方法培养、制备干菌丝, 经加水研磨、高压(121℃, 0.1013 MPa, 30 min)裂解后取上清液即为含有低聚糖(低聚 β -葡聚糖和低聚N-乙酰氨基葡萄糖)的诱导液。诱导液的质量浓度以其中中性糖含量(用蒽酮法测定)表示。

1.3 愈伤组织的诱导处理

按王颖等^[4]的方法, 处理液质量浓度分别为0, 0.5, 5, 10, 50, 100 mg/L, 诱导后间隔一定时间取样, 测定抗病指标。

1.4 抗病指标的测定

1.4.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的提取与检测 参照王敬文等^[5]的方法, 取待测样品1.0 g, -15℃冷冻固定, 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)冰浴研磨匀浆, 4下10 000 r/min离心20 min, 上清液用于酶活性检测。检测反应液组成: 硼酸缓冲液3.0 mL + 80 mmol/L 苯丙氨酸1.0 mL + 酶液1.0 mL, 35℃反应60 min, 6 mol/L HCl终止酶活性, 紫外分光光度计测OD₂₉₀, 以每克鲜组织每分钟OD₂₉₀变化0.01为1个PAL(phenylalanine ammonia lyase)酶活性单位(u)。

1.4.2 木质素含量的测定 参照波钦诺克^[6]的方法, 取待测样1.0 g, 用体积分数10%醋酸、丙酮等分离出水溶性和脂溶性化合物, 用体积分数72%硫

* [收稿日期] 2002-09-12

[作者简介] 胡景江(1957-), 男, 陕西定边人, 教授, 主要从事植物生理学研究。

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 亚硫酸铁标准液滴定(邻菲罗啉为终点指示剂),根据标准液的消耗量计算样品中木质素含量。

1.4.3 几丁质酶的提取及检测 参照 Boller 等^[7]的方法,取待测样品 1.0 g,经-15℃冷冻固定后,加 2 倍重量预冷的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.4),冰浴研磨匀浆,4℃下 10 000 r/min 离心 15 min,上清液用于酶活性检测。0.5 mL 酶液与 0.5 mL 胶状几丁质(5 g/L)及 0.1 mL 缓冲液于 40℃水浴保温 1 h,冷却离心,取上清液 0.5 mL 加 0.8 mol/L 四硼酸钾 0.1 mL,沸水中准确加热 3 min,流水冷却后加对-二甲氨基苯甲醛(DMAB)试剂 3 mL,37℃保温 20 min,冷却后测 OD₅₈₅ 值,根据标准曲线计算反应液中 N-乙酰葡萄糖胺的含量。以每小时每克鲜样从胶状几丁质中释放 1 μg N-乙酰葡萄糖胺为一个酶活性单位(u)。

1.4.4 β-1,3-葡聚糖酶的提取与检测 待测样品 0.5 g,经-15℃冷冻固定后,加 2.5 mL 预冷的

0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 5.0),冰浴研磨匀浆,4℃下 1 500 r/min 离心 15 min,上清液 4℃下透析 10 h 后用于酶活性检测。以昆布多糖(Sigma 公司)为反应底物,按史益敏^[8]的方法测定 β-1,3-葡聚糖酶活性,以每分钟每克鲜样产生 1 μg N-还原糖为一个酶活性单位(u)。

1.4.5 富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)含量的测定 细胞壁的制备按李建华等^[9]所述的方法。细胞壁中 HRGP (Hydroxyproline-rich glycoprotein) 含量与羟脯氨酸(Hyp)含量成正相关^[10],因此本研究以 Hyp 含量代表 HRGP 的相对含量,Hyp 测定参照 Kivirikko^[11]的方法,取 20 mg 细胞壁样品测定 Hyp 含量来代表 HRGP 的相对含量(mg/g)。

2 结果与分析

2.1 诱导液质量浓度与诱导效率的关系

用不同质量浓度低聚糖诱导液处理杨树愈伤组织细胞 6 h(木质素和 HRGP 含量测定的样品处理时间为 60 h),测定有关抗病指标的变化,结果见表 1。

表 1 低聚糖诱导液质量浓度对有关抗病指标的影响

Table 1 Effect of elicitor concentration on resistant index

诱导液质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Elicitor concentration	抗性指标 Resistant index				
	PAL/u	木质素/(mg·g ⁻¹) Lignin	HRGP/ (mg·g ⁻¹)	几丁质酶/u Chitinase	β-1,3-葡聚糖酶/u β-1,3-gluconase
0.0	53.8	12.3	13.6	112	235
0.5	98.6	19.4	19.9	167	446
5.0	152.5	24.2	28.3	189	568
10	175.3	31.5	35.8	204	609
50	176.8	31.2	35.0	201	602
100	167.6	31.3	35.2	199	598

由表 1 可见,诱导液质量浓度对诱导效率有明显影响。经诱导处理后各抗病指标值均显著高于对照,诱导液质量浓度为 10 mg/L 时诱导效率达到最大,PAL、几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶活性及 HRGP 和木质素含量分别为对照的 3.25, 1.83, 2.59, 2.63 和 2.56 倍。当质量浓度再增大时,诱导效率不再增加。由此可见,诱导抗病性的强弱与诱导因子的强弱(或浓度)有关,在一定范围内诱导效应随诱导因子浓度的增加而加强,达到一定浓度后诱导效应不再增加而趋于稳定。

2.2 诱导处理后抗病指标的动态变化

2.2.1 PAL 活性的变化 用 10 mg/L 低聚糖诱导液处理杨树愈伤组织细胞,间隔 2 h 取样测定 PAL 活性,结果见表 2。由表 2 可见,诱导处理后 PAL 活性明显增高,10 h 达到峰值,为对照的 2.80 倍。

PAL 是植物体内苯丙烷代谢途径的关键酶,由该酶控制的苯丙烷代谢途径能合成多种酚类化合物,其中有許多是植保素类物质,具有强烈的抑制病原菌生长的活性。

2.2.2 几丁质酶活性的变化 诱导处理后间隔 2 h 取样测定几丁质酶活性,结果见表 2。由表 2 可见,经诱导处理后几丁质酶活性迅速增高,6 h 后达到峰值,为对照的 1.99 倍。许多植物病原真菌细胞壁的主要成分是几丁质,因此植物的几丁质酶有直接攻击病原菌的潜在能力。该酶能分解几丁质产生 N-乙酰葡萄糖胺或几丁寡糖,而这种含氮的低聚糖不仅能进一步诱导几丁质酶活性,而且具有调节植物细胞木质素代谢的功能。在许多植物中已观察到该酶被真菌及其细胞壁成分诱导积累,离体试验结果也表明该酶能抑制真菌孢子的萌发和菌丝体生

长^[12]。目前普遍认为,植物几丁质酶在抵御病原真菌侵染的保卫反应中起重要作用。

2.2.3 β 1,3-葡聚糖酶活性的变化 诱导处理后 β 1,3-葡聚糖酶活性的变化见表2。由表2可见, β 1,3-葡聚糖酶活性的动态变化与PAL和几丁质酶有相似的规律,处理后10h达到峰值,为对照的

2.84倍。 β 1,3-葡聚糖酶不仅能直接作用于病原菌的细胞壁,而且其分解细胞壁的产物(低聚糖)可作为激发子诱导其他抗病反应的酶系,如PAL,4-香豆酸-CoA 连结酶(4CL)等的积累,促进植保素、木质素等抗病物质的合成与积累,增强植物的抗病性。

表2 诱导处理后PAL,几丁质酶和 β 1,3-葡聚糖酶活性的动态变化

Table 2 Changes of the PAL, the chitinase, the β 1,3-glucanase activity with time

诱导时间/h Time	PAL		几丁质酶 Chitinase activity		β 1,3-葡聚糖酶 β 1,3-glucanase activity	
	处理 Treatment	对照 Control	处理 Treatment	对照 Control	处理 Treatment	对照 Control
0	53.3	53.3	104.2	104.2	204.2	204.2
2	66.4	52.3	154.6	111.5	257.6	210.5
4	89.7	55.6	186.7	107.7	326.4	204.7
6	112.4	54.8	216.3	108.9	436.8	208.2
8	143.5	56.9	200.1	112.4	510.1	210.4
10	167.6	59.7	199.3	109.6	594.8	209.2
12	156.2	60.6	189.4	108.8	583.2	212.5

2.2.4 HRGP含量的变化 低聚糖诱导液处理杨树愈伤组织细胞,间隔12h取样测定HRGP含量,结果见表3。

表3 诱导处理后HRGP和木质素含量的动态变化

Table 3 Change of the HRGP, Lignin content with time

诱导时间/h Time	mg/g			
	HRGP		木质素 Lignin	
	处理 Treatment	对照 Control	处理 Treatment	对照 Control
0	13.6	13.6	11.6	11.6
12	17.8	14.2	14.7	11.2
24	24.5	13.9	20.2	11.9
36	29.7	15.4	27.8	12.4
48	33.2	15.7	31.2	12.3
60	35.0	14.9	31.9	12.2
72	34.9	15.3	31.9	12.3

由表3可见,经诱导处理后HRGP含量稳步增高,60h时达35.0mg/g,为对照的2.35倍,此后其含量保持相对稳定状态。HRGP可作为凝聚素将病原菌固定在细胞壁上,阻止病原菌的入侵和扩散,同时也可作为木质素的沉积位点或结构屏障而在植物的抗病反应中起作用。

2.2.5 木质素含量的变化 诱导液处理杨树愈伤组织细胞时木质素含量的变化表现出与HRGP相似的规律(表3),60h时达31.9mg/g,为对照的2.61倍。细胞壁木质化能阻止病原真菌的入侵,阻断细胞内的水分和营养物质向病原菌供应,是重要的物理性抗菌物质。同时在木质素的合成过程中会产生多种具有抗菌作用的酚类物质。因此木质素的合成和在细胞上的沉积增强了细胞抗真菌侵染的能力。

3 讨论

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。植物的诱导抗病性的全过程是极其复杂的,不同类型激发子的诱导及其诱导机理还未研究清楚。从本研究结果来看,病原真菌细胞壁多糖裂解后产生的低聚糖具有明显的激发子活性,能够诱导杨树细胞的抗病反应。其诱导强度与激发子浓度有关,在一定范围内诱导强度随诱导因子浓度的增加而加强,达到一定浓度后诱导强度不再增加而趋于稳定。

溃疡病菌低聚糖激发子诱导杨树细胞抗病反应(机理)主要表现在以下3个方面:形成一种化学屏障,遏制病菌的浸染。这主要表现在经诱导后细胞内的苯丙烷代谢明显增强(PAL活性增高),由此导致植保素和酚类化合物在细胞内合成和积累,这些物质能够抑制病原真菌的生长或杀死病原真菌。

形成一种物理(结构)屏障,阻止病原真菌的入侵。诱导处理后木质素合成加速,HRGP积累,二者都能增强细胞壁的抗穿透能力,同时HRGP作为木质素沉积的位点或木质化的模板,因而与木质素一起构成了更为致密、不可穿透的结构屏障,阻止病原真菌的穿透入侵过程。一些水解病原菌细胞壁的酶,如几丁质酶和 β 1,3-葡聚糖酶活性显著增强。这类酶不仅能直接作用于病原菌的细胞壁,而且其分解细胞壁的产物(低聚糖)可作为激发子诱导其他抗病反应的酶系如PAL和4CL等的积累,促进植保素、

木质素等抗病物质的合成与积累,进一步增强植物的抗病性。

大量研究表明,植物的抗病性决定于体内抗病基因的存在和这些基因表达的速度、程度以及基因表达所产生的抗病物质的量。激发子能快速开启有关的抗病基因,增强这些基因表达的速度和强度,促进抗病物质的形成和积累,从而表现出抗病性。但有

关低聚糖激发子如何开启抗病基因还有待进一步研究。

本研究以杨树愈伤组织为试验材料,排除了生境中各种因素的干扰以及自然状态下树皮诱导处理的困难和树皮取样不均一等造成的误差,试验的重复性好,便于抗病机制的分子探讨。

[参考文献]

- [1] 李冠,薛应龙.哈密瓜抗疫霉病的诱导免疫研究[J].科学通报,1988,33(6):469-472.
- [2] Sequeira L. Mechanisms of induced resistance in plants[J]. Ann Rev Microbiol, 1983, 37: 51-79.
- [3] 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.
- [4] 王颖,胡景江,朱玮,等.杨树溃疡病寄生诱导抗病性的研究[J].西北林学院学报,1996,11(1):1-4.
- [5] 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.
- [6] J X 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.
- [7] 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.
- [8] 史益敏. β -1,3-葡聚糖酶活性的测定[A]. 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学指南[C]. 北京:科学出版社,1999.128-129.
- [9] 李建华,李雄彪.细胞壁的制备及其羟脯氨酸含量的测定[J].植物生理学通讯,1993,29(5):363-365.
- [10] Lamport D T A, Miller D H. Hydroxyproline arabinoside in the plant kingdom[J]. Plant Physiol, 1971, 48: 454-458.
- [11] Kivirikko K. I. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine[J]. Anal Biochem, 1976, 19: 249-253.
- [12] Boller T. Induction of hydrolase as a defense reaction against pathogens[A]. Key J I, Kosuge T. Cellular and Molecular Biology of Plant Stress[C]. New York: Alan R Liss, 1985. 247-262.

A preliminary study on the resistant mechanism of poplar cell induced by *D othiorella g regaria* cell wall oligo saccharide elicitor

HU Jing-jiang¹, LIU Zhi-long², WEN Jian-lei¹

(1 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2 Test Farm, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The inducing of *D othiorella g regaria* cell wall degradation product—oligo saccharides to the resistant index of poplar cell were studied with the poplar callus. The results showed that, the oligo saccharides have elicitor activity, and could induce the notable increase of PAL, chitinase, β -1,3-glucanase activity and accumulation of hydroxyproline-rich glucoprotein (HRGP) and lignin. It indicated that the oligo saccharides elicitor could start and speed up expression of the resistant gene. Accompanied with the fast expression of the gene, the resistant metabolism in the plant were increased, and the resistant products accumulated rapidly, the resistance of the poplar cell was increased.

Key words: poplar; *D othiorella g regaria*; oligo saccharides elicitor; Lignin; HRGP; PAL; chitinase; β -1,3-glucanase