

·专论与综述·

具有农业生物活性壳寡糖的研究进展

刘幸海, 李正名*, 王宝雷

(南开大学 元素有机化学研究所, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要:壳寡糖是一类由 N-乙酰氨基葡萄糖或氨基葡萄糖通过 β -(1, 4) 糖苷键连接起来的低聚合度水溶性的糖类, 在食品、医药、化妆品等方面具有广泛用途。主要评述了壳寡糖在植物生长调节(诱导抗性)、杀菌作用以及杀虫活性方面的应用, 表明壳寡糖是一种对环境友好的、良好的生物源农药。

关键词:壳寡糖; 诱导抗性; 杀菌活性; 杀虫活性

中图分类号: TQ 450.1

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006) 01-0001-07

Progress in Pesticidal Bioactivities for Chitosan Oligosaccharide

LIU Xing-hai, LI Zhengming*, WANG Bao-lei

(Institute of Element-organic Chemistry, State Key Laboratory of
Element-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Chitosan oligosaccharide polymerized by β -1, 4-linked N-acetyl-D-glucopyranose is water-soluble and is applied in food, pharmaceuticals and cosmetics nowadays. The developments of its pesticidal bioactivities such as plant growth regulation, fungicidal activity, pesticidal activity were presented. Chitosan oligosaccharide is an environmental friendly bio-pesticide.

Key words: chitosan oligosaccharide; induced resistance; fungicidal activity; pesticidal activity

甲壳素 (Chitin) 又名甲壳质或几丁质等, 广泛存在于低等动物, 特别是节肢动物, 如昆虫、甲壳动物等的外壳及低等植物、菌、藻类的细胞壁中, 是一种天然的生物高分子, 属线性多糖类, 是含氨基的均态多糖, 结构与纤维素极为相似。甲壳素是一种可再生的能源及工业原材料, 它在自然界的产量仅次于纤维素^[1]。壳聚糖是甲壳素脱 N-乙酰基的产物。由于甲壳素、壳聚糖不溶于水, 所以在开发应用上存在一定局限性, 而通过降解甲壳素或壳聚糖得到的壳寡糖 (其聚合度在 20 以

下)^[2], 不但水溶性好且易被吸收, 而且以其独特的各种功能性质, 在废水处理、食品工业、纺织、化工、日用化学品、农业、生物工程和医药等方面具有广泛的用途^[3~7], 如提高植物防御能力等, 是一类几丁质酶抑制剂^[8]。

海洋生物资源的研究利用是 21 世纪海洋资源开发的重点。壳寡糖是新一代海洋生物源农药, 具有无毒害、不污染环境、兼有药效和肥效双重生物调节功能的特点, 可诱导激活植物免疫系统, 提高植物抗病毒能力。

收稿日期: 2005-09-21; 修回日期: 2005-12-19.

作者简介: 刘幸海 (1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事新型生物活性物质的设计与合成研究; * 通讯作者: 李正名 (1931-), 男, 上海人, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 主要从事有机化学和农药化学的研究. 联系电话: 022-23503732; E-mail: nkzml@nk.sina.net

基金项目: 天津市科委重点基金资助项目 (033803411).

国内外曾有学者报道过壳寡糖的综述^[9~13],但大多是集中在其制备、修饰以及在医药、水处理等领域中的应用,至今尚未见有关壳寡糖在农业生物活性方面的综述。笔者综述了壳寡糖对植物的诱导抗性以及在杀菌、抑菌、提高杀虫活性等农业生理活性方面的研究进展。

1 植物生长调节活性(诱导抗性)

壳寡糖可作为植物生长调节剂,增强植物对病虫害的防御能力^[14,15]。其作为植物免疫激活因子的基础研究始于20世纪60年代。Ayers等^[16]于1976年发现细胞壁的寡糖碎片能诱导植物植保素(phytoalexin)合成。1985年Albersheim^[17]首次提出了寡糖素(oligosaccharins)这个新概念和新领域,并认为寡聚糖具有调控植物生长、发育、繁殖、防病和抗病等功能,能够刺激植物的免疫系统反应,每种活性寡聚糖可发出调节特定功能的信息,激活防御反应和调控植物生长,产生具有抗病害的活性物质,抑制病害的形成。

活性寡聚糖是一类具有一定结构和生物活性的聚合物,国际上研究较多的是植物及微生物细胞壁多糖降解的寡糖片断。越来越多的实验结果表明,植物细胞壁不仅能起到防御的结构屏障作用,而且当植物受到病菌感染时能产生积极的防御反应^[14]。这是因为,一方面植物细胞壁酶能水解病原菌细胞壁中的 α 肽葡聚糖、几丁质等,产生活性成分,诱导植物植保素等合成酶系基因的表达;另一方面,病菌入侵植物时,必须水解植物细胞壁的多糖,其降解产物也能诱导植保素的合成。因此,寡聚糖可有效地诱导植物产生防御反应,激活植物的系统性获得免疫反应。壳寡糖是以壳聚糖为原料,经酶法降解成的具有一定聚合度和一定结构的系列寡聚糖。壳寡糖的诱抗活性与壳寡糖的聚合度及脱乙酰度密切相关,低聚合度及高脱乙酰度的壳寡糖诱抗活性高^[18]。

1.1 对烟草的诱导抗性

烟草花叶病毒病(TMV)在生产上的危害很大,至今仍缺乏有效的治疗药剂。目前,选择合适的诱抗剂不失为一种有效的防治方法,其广阔的应用前景已引起人们的高度重视。

郭红莲等^[19]以壳寡糖诱导烟草枯斑三生叶(Nicotiana tabacum var. samsun NN)寄主后,调查了其病斑的抑制率,同时研究了壳寡糖单独处

理和以病毒粒子侵染诱导的病程相关蛋白的差异。结果表明,壳寡糖处理对TMV侵染有保护作用,施用后7d,以浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 和75 $\mu\text{g/mL}$ 时其对枯斑的抑制效果为好。通过体外测试发现,壳寡糖对TMV粒子有钝化作用。单独施用壳寡糖可以诱导烟草产生6条耐碱性的PR蛋白,其中1条区别于TMV侵染诱导的PR。与此同时,杜昱光等^[20]研究了壳寡糖对烟草防御酶活性及同工酶谱的影响。以黄苗榆烟草为试材,摩擦接种法接种烟草花叶病毒,比色法测定了几种防御酶活性,研究壳寡糖对烟草烟草花叶病毒这一互作系统激发产生的一系列抗病生理生化反应的可能性。初步试验结果表明:壳寡糖处理可导致烟草叶片过氧化物酶(PO)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和 β -1,3葡聚糖酶活性有不同程度的提高。由PO同工酶谱分析得知,喷药后接种病毒处理者可看到7条酶带且谱带色浓,酶活性强。由此初步认为壳寡糖诱导的抗病毒机制与提高PO活性及其增多同工酶谱的酶带有关;分析得知,SOD、CAT和PPO3种酶似乎与壳寡糖诱导的抗病毒机制相关不大或无相关性;单因素的喷药和接毒多可导致几种防御酶活性的提高,尤其是PAL和 β -1,3葡聚糖酶活性提高明显,但喷药后接毒者酶活变化及升高幅度似乎与两单因素的加权效应无关。由此可见,壳寡糖对烟草的多种酶具有良好的活性,可以利用其诱导抗病机制实现对烟草病毒病的控制,减少经济损失。

1.2 对水稻的诱导抗性

稻瘟病和纹枯病是水稻的重要病害,在世界范围内每年造成上亿千克产量损失,高发病时甚至可以造成减产50%^[21,22]。Obara等^[23]用固相微萃取技术和GC-MS法分析不同诱导剂释放的挥发物作为诱导剂处理稻瘟病菌Pyricularia oryzae,将病菌嫁接到水稻叶片上(含有壳寡糖),用比较GC的保留时间和质谱的方法可确定不同的诱导剂挥发物。不同的诱导剂产生的挥发物在定性和定量上有一些差别。结果发现单萜和倍半萜烯为稻瘟病的诱导挥发物。Inui等^[24]将一系列浓度的壳寡糖放到水稻培养液中,也发现其能够诱导苯丙氨酸解氨酶(PAL)。最近日本科学家发现,在悬浮培养的水稻细胞内,壳寡糖诱导的亲和蛋白能够使植物进行抗毒素的生物合成,他们已经就这一成果申请了专利^[25]。

胡健等^[26]以还原糖平均相对分子质量为 500、1 000、1 500、2 000、3 000 的壳寡糖作为诱导剂,分别针对对水稻纹枯病具不同抗性的柠檬香草、特青以及七苗香等水稻品种苗期及抽穗期进行了几丁质酶诱导试验。结果表明:相对分子质量不同的壳寡糖对供试水稻品种叶片几丁质酶的诱导作用不同,相对分子质量为 1 500 的壳寡糖诱导效果最佳,而相对分子质量为 500 的壳寡糖诱导效果最差。比较苗期及抽穗期的诱导速度,苗期快于抽穗期。不同水稻品种对纹枯病的抗性不同,其几丁质酶的诱导能力也不同,无论是苗期还是抽穗期,抗病能力强的水稻品种,几丁质酶的诱导水平也高。

宁伟等^[27]用 5 种不同浓度的壳寡糖处理三叶期感病水稻植株 H7S, 24 h 后,以锥虫蓝 (Trypan blue) 染色,观察壳寡糖诱导水稻叶片细胞死亡产生情况并拍照记录。对 30 株水稻幼苗发病情况的统计结果显示,经 5 $\mu\text{g/mL}$ 壳寡糖处理的水稻植株抗稻瘟病能力明显增强,病斑级数为 2~3 级,植株抗病级数为 1~2 级;而未经壳寡糖处理的植株极大部分病斑为感病病斑,发病级数在 4~5 级。5 $\mu\text{g/mL}$ 壳寡糖处理的防病效果达 50% 以上。总之,壳寡糖诱导后接种稻瘟病菌的植株抗性明显增强,病斑级别下降,侵染速度减慢,抗病性的增强源于壳寡糖诱导的 HR 类细胞死亡。

我国水稻种植面积大,用药量也大。20 世纪 70 年代中旬上海农药研究所发现并创制的井冈霉素对水稻纹枯病防效良好,但其成本较高;而壳寡糖主要来源于海洋生物的外壳,由降解途径得到,成本较低,研究表明它也是一种潜在的良好生物源农药。

1.3 对胡萝卜的诱导抗性

Chris 等^[28]利用链霉菌 N-174 壳聚糖酶制备了平均聚合度为 7 的 (质量浓度为 0.2%) 的壳寡糖,并用其处理收获后的胡萝卜,针对其核盘霉菌,测量了它的抑制系数。发现核盘霉菌在马铃薯琼脂上呈放射状生长,这使得胡萝卜在放置 3 d 以上时就开始腐烂。但当在零度或使用壳寡糖处理后,就能够诱导胡萝卜对核盘霉菌产生抗体。

1.4 对番茄的诱导抗性

Noah 等^[29]研究了 5% 或 30% 乙酰化程度的几丁质、壳寡糖和壳聚糖对番茄 *Lycopersicon esculentum* 叶片中水解酶的诱导情况。喷洒几丁质和壳聚糖 7 d 后,在番茄叶片中检测到了壳聚糖

酶、几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶的离子键和水溶性的变化;虽然壳寡糖是一个很好的抗病诱导剂,但它不能诱导番茄叶中的上述 3 种酶;壳聚糖高聚物和低聚物能够使这 3 种酶的离子键增加,但水溶性却难以改变。他们还发现乙酰化程度低的壳寡糖没有诱导作用,而 95% 乙酰化的壳寡糖是一个有效的抗病诱导剂。此外,壳聚糖高聚物具有诱导性,而其低聚物不具诱导性,这主要是由于其相对分子质量在起作用。

何培青等^[30]研究了 0.3% 壳寡糖诱导番茄叶片 120 h 后,其挥发性物质对番茄枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 孢子萌发和菌丝生长的影响,采用气相色谱-质谱联用技术,检测诱导后番茄叶中挥发性物质及植保素日齐素和量的变化。结果表明,经壳寡糖诱导后,番茄叶中挥发性物质对病菌的抑制率较对照组高。番茄叶中挥发性抗真菌物质的总含量为对照组的 1.49 倍;氧合脂类、萜类及芳香类化合物的含量分别提高了 61%、10% 和 69%,其中 (E)-2-乙烯醛的含量增加了 64%,水杨酸甲酯的含量增加了 38%。壳寡糖不能诱导番茄植保素日齐素的合成。

1.5 对棉花的诱导抗性

郭红莲等^[31]研究发现,壳寡糖可以诱导棉花细胞活性氧代谢发生改变。他们以不同浓度壳寡糖为激发子,均可诱导棉花悬浮细胞的活性氧迸发,其峰值出现时间都在 20~30 min 左右;此外,壳寡糖还可以诱导棉花细胞中活性氧清除酶系活性的变化, SOD 和 CAT 活性变化的最大值在处理 60~90 min 左右。浓度不同的壳寡糖在诱导趋势变化上却相似。他们^[32]以壳寡糖诱导处理细胞,加入终浓度分别为 0.05 mmol/L 的 LaCl_3 和三氟乙酸 (TFA),处理过程中细胞保持在悬浮状态。研究表明,壳寡糖可诱导棉花细胞苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性增加,钙信使系统参与壳寡糖对棉花细胞的诱抗作用。除钙信使系统外,壳寡糖的诱抗作用可能还存在其他的信息传递途径。

1.6 对小麦的诱导抗性

近年来,由于小麦品种、栽培制度、肥水条件的改变,小麦病害逐渐加重,已成为影响小麦高产、稳产的重大障碍。日本京都大学 Ishihara A tsushi^[33]用壳寡糖测试燕麦时,发现其能够诱导燕麦 HTT 酶的活性,从而诱导其产生抗病能力。刘晓等^[34]用壳寡糖和脱氧雪腐镰刀菌烯醇

(DON) 以不同方式处理小麦 *Triticum aestivum* L. 种子,测定其从 G1期启动进入 S期和 G2-M 期的胚细胞百分率和小麦黄化苗的生长。结果表明,壳寡糖可促进小麦种子胚细胞周期启动并促进小麦根数目增加,说明壳寡糖对小麦种子的胚细胞分裂有促进作用。壳寡糖预处理小麦种子可解除 DON 对小麦黄化苗生长及胚细胞启动的抑制作用,表明寡聚糖可提高植物对病原菌毒素的抗耐性,这可能是寡聚糖诱导植物提高抗病性的重要机制之一。

Takezawa^[35] 用小麦培养的细胞来研究 Ca^{2+} 的传递作用和诱导细胞对真菌病原体的抵抗作用。以 *typhula ishikariensis* 衍生的物质来诱导用小麦培养的细胞,结果显示, *ccd-1* 基因密码是一个 14 kDa 的 Ca^{2+} 蛋白质复合物,它具有一个偏酸性的两性分子特征。壳寡糖诱导显示了它能够转换 Ca^{2+} 信号,这能使植物启动自己的防御体系,免受真菌的入侵。

1.7 对草莓的诱导抗性

郭红莲等^[36] 以草莓悬浮培养的细胞为对象,研究了壳寡糖处理对活性氧代谢的效应。结果表明,壳寡糖可诱导草莓悬浮培养细胞的活性氧迸发,其峰值出现于 20~30 min,同时也可诱导活性氧清除酶活性上升, SOD 和 CAT 活性的最大值出现在处理后 60~90 min。此外,他们还研究了壳寡糖与草莓的结合过程^[37]。

1.8 对油菜的诱导抗性

陆引罡等^[38] 以壳聚糖酶降解壳聚糖而得的壳寡糖为基本成分,配以化肥、微量元素及防腐剂等成分,混合调制成较稳定的胶体溶液后拌种,发现其对油菜种子发芽和出苗均无显著影响,但可促进油菜生长,提高壮苗率,增加产量,增产幅度在 4.3%~9.7%,其增产以增加每角果粒数为主。壳寡糖拌种可明显抑制油菜菌核病的发生,对 3 个油菜品种的防治率分别为 34.19%~44.10%。室内测定结果发现,用较高浓度的壳寡糖 (0.5~0.75 mg/mL) 拌种,其对油菜菌核病菌菌丝生长有抑制作用,表明壳寡糖对油菜菌核病菌有诱导抗性。

由此可见,壳寡糖是植物识别病原真菌入侵的非特异性信号,对许多植物显示出强烈的免疫诱导活性,可以激发植物的基因表达,产生抗病的

甲壳素酶、壳聚糖酶、植保素和免疫蛋白,这些物质能抑制和杀灭病菌生长,达到抗病的目的。此外,壳寡糖还有一些其他的生物学活性,如对植物细胞的生长具有很好的活化作用,能参与调节植物生长发育状态,促进植物开花、结果,促进植物对营养物质的吸收和利用,从而提高农作物的产量和质量。

2 杀菌活性 (抗菌、抑菌)

壳寡糖具有广谱抑菌活性并对人畜无毒^[39,40],开发壳寡糖生物源农药是减少化学农药施用量的有效途径。郑连英等^[41] 研究推测壳寡糖通过渗透进入病原菌细胞体内,吸附其体内带有阴离子的细胞质,并产生絮凝作用,扰乱细胞正常的生理活动,最终杀灭病菌。施用壳聚糖可直接抑制病菌生长或诱导植物的抗病反应,提高植物的抗病性。经实验室生物活性测定和田间药效试验证明,壳寡糖对番茄早疫病、黄瓜白粉病、棉花黄萎病、大豆病毒病、辣椒病毒病、木瓜病毒病等均有很好的防效。

早在 1989 年就有学者^[42] 研究出了壳寡糖对植物病原体的抑菌作用,结果表明壳寡糖对 *Fusarium oxysporum*、*Phomopsis fukushi* 和 *Alternaria alternata* 等植物病原体的抑制作用比壳聚糖要强。

最近日本有学者^[43] 研究了一种安全、无污染的、能够促进植物生长和对植物病原体产生拮抗作用的壳寡糖复合物 (壳聚糖 壳寡糖 它们的盐 =1:1:50,质量比)。研究人员在 800 g 糊精和 100 g 壳寡糖的混合物中加入一些无机盐,螯合后喷施于黄瓜叶面上,可使黄瓜叶面上的霉菌消失,同时对蚜虫也有抑制作用。

我国一些学者也对壳寡糖的抗菌功效进行了研究^[44~48],发现壳寡糖对常见植物病原菌具有良好的抑菌活性 (表 1),且随着浓度提高抑菌作用增强。同时研究也揭示了壳寡糖的聚合度 (DD) 或平均相对分子质量都与壳寡糖的抑菌性能有关,随着聚合度的增加或分子质量的降低,其抑菌作用增强。

3 提高杀虫活性和趋避活性

目前常规使用的杀虫剂剂型及施药方法难以使农药充分接触到靶标昆虫,更多的是残留在环

Table1 Plants inhibit different pathogen after chitosan oligosaccharide-treatment

Plant植物	Pathogen病原菌
Cucumber黄瓜	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> 枯萎病
	<i>Cladosporium cucumerinum</i> Ell et Arthur 黑星病
	<i>Botrytis cinerea</i> Pers 灰霉病
	<i>Colletotrichum orbiculare</i> 炭疽病
	<i>Sphaerotheca pannosa</i> 白粉病
Asparagus芦笋	<i>Phomopsis asparagi</i> Sacc 茎枯病
Pear梨	<i>Alternaria kikuchiana</i> Tanaka 黑斑病
	<i>Venturia nashicola</i> 黑星病
Rice水稻	<i>Thanatephorus cucumeris</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> 纹枯病
	<i>Pyricularia oryzae</i> Cav. 稻瘟病
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> 白叶枯病
Cotton棉花	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> Sydner et Hausen 枯萎病
	<i>Vercillium dahliae</i> Kleb. 黄萎病
	<i>Rhizoctonia solani</i> K. 立枯病
	<i>Macrophoma phaseolina</i> 炭疽病
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> 角斑病
Apple苹果	<i>Botryosphaeria berengeriana</i> f. sp. <i>piricola</i> (Nose) Koganezawa et Sakuma 轮纹病
Rape油菜	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 菌核病
Pepper辣椒	<i>Phytophthora capsici</i> Len. 疫病
Wheat小麦	<i>Gibberella zeae</i> 赤霉病
Tomato番茄	<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary 晚疫病
	<i>Botrytis cinerea</i> Pers 灰霉病
Potato马铃薯	<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>sepedonicum</i> 环腐病
Orange柑橘	<i>Penicillium italicum</i> Wehmer 青霉病

境中,造成浪费,且污染环境,给人类健康造成危害。大量的文献资料^[49~53]指出,农药到达作用靶标前的损失量可达 60%~90%,实际上真正能够到达靶标机体上的药物有效成分仅是施药总量的 0.1%。所以如何提高杀虫剂的缓释性能就成为了亟需解决的问题。

任清明^[54]对壳聚糖提高杀虫剂和趋避剂的使用效果进行了研究。结果表明:(1)壳聚糖可使高效氯氰菊酯杀虫持效时间延长至少 1 个月,说明其对高效氯氰菊酯有明显的缓释和控释功能。

(2)壳聚糖能延长避蚊胺的作用时间长达 4 h,说明其对避蚊胺有明显的缓释和控释功能。(3)可直接利用壳聚糖复配高效氯氰菊酯和避蚊胺,制成缓释剂型。但是有关杀虫、趋避作用的最长时间及其对杀虫剂和趋避剂的缓释作用程度还需进一步研究。

韩国有学者^[55]发现,将相对分子质量为 140~100 000 的壳聚糖溶解,制备得到质量分数为 10%的壳聚糖溶液,然后与壳寡糖、藻酸盐等混合,再加入一些稳定剂得到的混合物具有杀虫活性。

张必等^[45]将壳聚糖及壳低聚糖用于室内杀虫实验。结果表明,壳聚糖对鳞翅目和同翅目害虫均具有一定的杀虫活性,在相同浓度下,对小菜蛾的杀虫活性高于对棉铃虫,对不同蚜虫的杀虫活性一般在 60%~80%之间,最高可达 99%。

壳聚糖对害虫的杀虫活性虽然不如化学农药,不宜直接作为常规杀虫剂使用,但从农药与环境相容性上考虑,壳聚糖可以部分代替杀虫剂或作为杀虫剂的增效物质使用。

4 总结和展望

综上所述,壳寡糖是一种良好的生物源农药,它能够诱导植物产生抗病性,具备一定的杀菌效果,并能够提高其他一些杀虫剂的杀虫效果。我国一些科研院所在壳寡糖应用于农作物的病虫害防治等方面也取得了一些研究成果,如中国科学院大连化学物理研究所承担的“863”计划课题“海洋寡糖抗植物病毒生物新农药的研制”。他们利用海洋动物多糖为原料,应用现代分子生物学、生

物化工及分析化学新方法,在筛选不同来源的降解酶、确定酶解工艺条件以及研究海洋寡糖抗病毒机理的基础上,研制出的壳寡糖生物源农药对蕃茄和烟草病毒病的平均防治效果为 64.1%,取得了防治蕃茄、烟草病毒病的农业部农药登记证书。因此,有必要对壳寡糖进行更广泛深入的研究,使这一宝贵的天然资源得到更好的开发和利用。

参考文献:

- [1] Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday G W. Chitin in Nature and Technology[M]. New York: Plenum Press, 1986. 354.
- [2] ZHENG Jun-xian (郑菊仙). Functional Oligosaccharides (功能性低聚糖) [M]. Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2004.
- [3] Roberts G A F. Chitin Chemistry [M]. London: Macmillan Press, 1992. 72.
- [4] Goosen M F A. Applications of Chitin and Chitosan [M]. Lancaster, PA: Technomic Publishing, 1997. 7.
- [5] Muzzarelli R A A, Peter M G. Chitin Handbook [M]. Grottammare: Atec Edizioni, 1997. 193.
- [6] Picart Catherine, Schneider Aurore, Etienne Olivier, et al. Controlled degradability of polysaccharide multilayer films in vitro and in vivo[J]. Advanced Functional Materials, 2005, 15 (11): 1771-1780.
- [7] Kuroiwa Takashi, Ichikawa Sosaku, Sato Seigo, et al. Physiological activities and efficient production processes of chitosan oligosaccharides[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2005, 52 (7): 285-296.
- [8] Park You-Me, Chang Hye-Lan, Huh Tae-Lin, et al. Molecular cloning of chitosanase gene and quantitative production of chitosan oligomer[J]. Korean J Microbio and Biotech, 2004, 32 (1): 16-21.
- [9] Sakai Kazuo, Yaizu Suisan, Kogaku Kogyo K K. Development of chitin-chitosan oligosaccharides [J]. New Food Industry, 1989, 31 (6): 17-25.
- [10] Mita M, Sugima M, Miyamoto T. Synthesis and function of chitin-chitosan saccharose[J]. Kobunshi Kako, 1992, 41 (3): 137-142.
- [11] Matahira Yoshiharu. Production and utilization of chitosan-oligosaccharides[J]. Food Style, 1997, 1 (7): 53-57.
- [12] HU Zhipeng (胡志鹏). 壳寡糖的研究进展 [J]. Chin J Biochem Pharmac (中国生化药物杂志), 2003, 24 (4): 210-212.
- [13] ZHU Guo-fang (竺国芳), ZHAO Lu-hang (赵鲁杭). 几丁寡糖和壳寡糖的研究进展 [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2000, 73 (1): 43-46.
- [14] Roby D, Gadelle A, Toppan A. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 143 (3): 885.
- [15] Usov A I. Oligosaccharins—a new class of signaling molecules in plants [J]. Uspekhi Khimii, 1993, 62 (11): 1119-1144.
- [16] Ayers A R, Ebel J, Fineli F, et al. Host-pathogen interactions XI. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var *Soiae* [J]. Plant Physiol, 1976, 57: 751.
- [17] Albersheim P, Valent B S. Host pathogen interactions in plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics [J]. J Cell Biol, 1978, 78: 627-643.
- [18] LI Shu-guang (李曙光), BAI Xue-fang (白雪芳), DU Yu-guang (杜昱光), et al. 壳寡糖的分离分析及其诱抗活性研究 [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2002, 90 (6): 1-3.
- [19] GUO Hong-lian (郭红莲), LI Dan (李丹), BAI Xue-fang (白雪芳), et al. 壳寡糖对烟草 TMV 病毒的诱导抗性研究 [J]. Chin Tobacco Sci (中国烟草科学), 2002, 23 (4): 1-3.
- [20] DU Yu-guang (杜昱光), BAI Xue-fang (白雪芳), ZHAO Xiaoming (赵小明), et al. 壳寡糖对烟草防御酶活性及同工酶酶谱的影响 [J]. Chin J Bio Control (中国生物防治), 2002, 18 (2): 83-86.
- [21] Jia Y, Singh P, Wang Z, et al. Development of molecular strategies to control rice blast and sheath blight diseases [J]. SAAS Bulletin Biochemistry and Biotechnology, 2004, 17: 20-34.
- [22] Yamaguchi T, Shibuya N. Oligosaccharides which induce defense reactions in plants [J]. Baioisaiensu to Indasutori, 1999, 57 (9): 607-610.
- [23] Obara N, Hasegawa M. Induced volatiles in elicitor-treated and rice blast fungus-inoculated rice leaves [J]. Biosci Biotech and Biochem, 2002, 66 (12): 2549-2559.
- [24] Inui H, Yamaguchi Y, Hirano S. Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminaroligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture [J]. Biosci, Biotech and Biochem, 1997, 61 (6): 975-978.
- [25] Kaku H, Shibuya N, Minami E. High-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor from rice and use in controlling disease resistance [P]. WO 2005085444, 2005-09-15.
- [26] HU Jian (胡健), CHEN Yun (陈云), CHEN Zong-xiang (陈宗祥). 壳寡糖对水稻纹枯病不同抗性品种几丁质酶诱导的研究 [J]. Jiangsu Agric Res (江苏农业研究), 2000, 21 (4): 37-40.
- [27] NING Wei (宁伟), LIU Zhi-xue (刘志学), LI Qun (李群), et al. 壳寡糖诱导水稻过敏性细胞死亡及抗病性的提高 [J]. Plant Physiology Communications (植物生理学通讯), 2003, 39 (5): 441-443.
- [28] Chris M, Cheah L H, Koolaard J P. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan [J]. Postharvest Biology and Technology,

- 2004, 33: 61-65.
- [29] Noah B S, Natalya K, Riki P. Differences in the elicitation of soluble and ionic bound enzymes in tomato leaves using chitin derivatives[J]. Israel J Plant Sci, 2002, 50(4): 259-263.
- [30] HE Pei-qing(何培青), JIANG Wan-feng(蒋万枫), ZHANG Jin-can(张金灿), et al. 壳寡糖对番茄叶挥发性抗真菌物质及植保素日齐素的诱导效应[J]. Periodical of Ocean University China(中国海洋大学学报), 2004, 34(6): 1008-1012.
- [31] GUO Hong-lian(郭红莲), DU Yu-guang(杜昱光), BAI Xue-fang(白雪芳), et al. 壳寡糖对棉花悬浮培养细胞活性氧的作用[J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物), 2003, 1: 11-13.
- [32] GUO Hong-lian(郭红莲), BAI Xue-fang(白雪芳), DU Yu-guang(杜昱光), et al. 氯化镧和三氟乙酸对壳寡糖诱导棉花细胞抗性的影响[J]. Acta Argonomica Sinica(作物学报), 2004, 30(2): 186-188.
- [33] Ishihara A, Miyagawa H, Matsukawa T. Induction of hydroxy anthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-N-acetylchitooligosaccharides in oats[J]. Phytochemistry, 1998, 47(6): 969-974.
- [34] LIU Xiao(刘晓), DU Yu-guang(杜昱光), BAI Xue-fang(白雪芳). 壳寡糖诱导小麦种胚细胞抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抑制的效应[J]. Acta Botanica Sinica(植物学报), 2001, 43(4): 370-374.
- [35] Takezawa D. A rapid induction by elicitors of the mRNA encoding CCD-1, a 14 kDa Ca^{2+} binding protein in wheat cultured cells[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42: 807-817.
- [36] GUO Hong-lian(郭红莲), BAI Xue-fang(白雪芳), LI Shu-guang(李曙光), et al. 壳寡糖诱导草莓细胞活性氧代谢的变化[J]. Acta Horticulturae Sinica(园艺学报), 2003, 30(5): 577-579.
- [37] ZHAO Xiao-ming(赵小明), YU Wei-ting(于炜婷), BAI Xue-fang(白雪芳). 壳寡糖与草莓细胞结合过程的研究[J]. Acta Horticulturae Sinica(园艺学报), 2005, 32(1): 20-24.
- [38] LU Yin-gang(陆引罡), QIAN Xiao-gang(钱晓刚), PENG Yi(彭义), et al. 壳寡糖油菜种衣剂剂型应用效果研究[J]. Seed(种子), 2003, (4): 38-40.
- [39] Kim S K, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 62(4): 357-368.
- [40] Someya Hideo, Sato Noriaki. Marine animal-derived mineral compositions for improvement of biological balance and treatment of various diseases[P]. Jpn Kokai Tokkyo Koho, JP 2004175680, 2004-06-24.
- [41] ZHENG Lian-ying(郑连英), ZHU Jiang-feng(朱江峰), SUN Kun-shan(孙昆山). 壳聚糖的抑菌性能研究[J]. Material Science and Technology(材料科学与工艺), 2000, 18(2): 22-24.
- [42] Hirano S, Nagao N. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogen[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(11): 3065-3066.
- [43] Yoshiharu M, Mitsuki K. Chitosan and chitin oligosaccharides as synergistic plant growth stimulators and protectants[P]. JP 09143013, 1995-11-20.
- [44] ZHANG Min(张泌), QI Shu-hua(齐淑华), TAN Tian-wei(谭天伟), et al. 壳低聚糖聚合度分析及室内抑菌活性研究[J]. Plant Protection(植物保护), 2003, 29(3): 28-31.
- [45] ZHANG Min(张泌), TAN Tian-wei(谭天伟), YUAN Hui-zhu(袁会珠). 壳聚糖杀虫与壳低聚糖抑菌活性研究[J]. J Beijing Univ Chem Tech(北京化工大学学报), 2003, 30(4): 13-16.
- [46] HU Jiang(胡健), JIANG Yong-ming(姜涌明), YIN Shi-xue(殷士学). 壳寡糖抑制植物病原菌生长的研究[J]. J Yangzhou Univ(Nat Sci)[扬州大学学报(自然科学版)], 2000, 3(2): 42-44.
- [47] Wei X K, Lei C L. Studies on the antimicrobial activity of chitooligosaccharides from housefly Larvae, Musca domestica vicina Macquart (Diptera: Muscidae)[J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(3): 299-304.
- [48] LIU Bi-yuan(刘碧源), GAO Shi-ying(高仕瑛), LI Bang-liang(李邦良), et al. 壳寡糖抗菌活性的实验研究[J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2003, 24(2): 73-75.
- [49] Metcalf R L. Changing role of insecticides in crop protection[J]. Annual Review of Entomology, 1980, 25: 219-256.
- [50] FU Ze-tian(傅泽田), QI Li-jun(祁力钧). 国内外农药使用现状及解决农药超量使用问题的途径[J]. Transactions Chin Society Agric Engin(农业工程学报), 1998, 14(2): 7-12.
- [51] ZHANG Zhao-xian(张朝贤), HU Xiang-en(胡祥恩), QIAN Yi-xin(钱益新). 国外除草剂应用趋势及我国杂草科学研究现状和发展方向[J]. Acta Phytophylacica Sinica(植物保护学报), 1997, 24(3): 278-283.
- [52] YUAN Hui-zhu(袁会珠), QI Shu-hua(齐淑华), YANG Dai-bin(杨代斌). 农药使用技术发展趋势[J]. China Plant Protection(植保技术与推广), 2001, 21(2): 37-38.
- [53] JIN Xin-yi(金心怡). 从提高施药技术谈解决农药超量使用问题的途径[J]. Tea in Fujian(福建茶叶), 2000, (1): 13-15.
- [54] REN Qing-ming(任清明). Study on Increased Effect of Pesticides and Replent Confected by Chitosan(应用壳聚糖提高杀虫剂和驱避剂效果的试验研究)[D]. Xi'an(西安): The Fourth Military Medical University(第四军医大学), 2001.
- [55] Yun K S. Method for producing biological insecticide using chitosan-alginate and Ficus carica extract[P]. KR 2002014190, 2002-02-25.

(Ed. JIN S H)