

朱刘影,张健,刘倩倩,等.核黄素和脱乙酰几丁质对甘薯几丁质酶的诱导作用[J].江苏农业科学,2014,42(8):106-108.

# 核黄素和脱乙酰几丁质对甘薯几丁质酶的诱导作用

朱刘影<sup>1</sup>,张健<sup>1</sup>,刘倩倩<sup>1</sup>,徐悦<sup>1</sup>,马媛媛<sup>1</sup>,谢逸萍<sup>2</sup>,刘美艳<sup>1</sup>

(1.江苏师范大学整合植物生物学研究所/江苏师范大学生命科学学院,江苏徐州 221116;

2.中国农业科学院甘薯研究所,江苏徐州 221121)

**摘要:**利用甘薯黑斑病菌的孢子悬液诱导甘薯块根几丁质酶活性。结果表明,黑斑病浸染使甘薯块根几丁质酶活性上升,抗病品种南京-92块根内几丁质酶活性比感病品种烟台-252提高速度快、活性高、保持时间长,有利于抵抗病原菌的侵害。体外抑菌试验显示几丁质酶液对甘薯黑斑病菌具有较强的抑制作用。核黄素和脱乙酰几丁质处理均能诱导甘薯块根几丁质酶活性提高。

**关键词:**甘薯;黑斑病;几丁质酶;核黄素;脱乙酰几丁质

**中图分类号:** S435.313<sup>+</sup>.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0106-03

甘薯(*Ipomoea batatas*)是仅次于水稻、小麦和玉米的重要粮食作物,甘薯叶被世界卫生组织确定为最佳蔬菜<sup>[1]</sup>。甘薯产乙醇能效高、无污染,是生物能源的理想材料之一。甘薯黑斑病(*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted)是危害甘薯的主要病害,在甘薯的种植和储藏过程中均有发生<sup>[2]</sup>。目前对于甘

薯抗黑斑病的研究多集中在筛选抗病品种和杂交育种方面<sup>[3]</sup>,对于甘薯抗黑斑病机制方面的报道很少<sup>[4-5]</sup>,研究也不深入。植物病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PRs)是植物体内被病原菌等刺激物刺激产生的一类蛋白质,正常情况下含量并不高,一旦被诱导,含量迅速增加,从而提高植物对病虫害等逆境的防御能力<sup>[6]</sup>。植物几丁质酶被认为是一类与植物抗病有着密切关系的病程相关蛋白。它参与了植物体内防御机制<sup>[7-8]</sup>,在外界刺激物的刺激下可使植物体内本身含量较少的酶迅速积累。诱导物分为两大类,一类为生物性的刺激物,包括细菌、真菌、病毒类或者真菌细胞壁降解物<sup>[9-10]</sup>,另一类为非生物性的刺激物,包括机械损伤、虫伤、脱乙酰几丁质、乙烯、水杨酸、紫外光、重金属盐等。通过诱导物来诱导甘薯几丁质酶含量上升和活性提高的研究未见报道。本试验研究了核黄素和脱乙酰几丁质对甘薯块根几丁质酶诱导作用,旨在为生产上防治甘薯黑斑病提供理论依据。

收稿日期:2013-11-12

基金项目:国家甘薯产业技术体系建设专项(编号:CARS-11-B-09-A);江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(编号:12ssjcxzdy11);转基因生物新品种重大专项,转基因生物分子特征识别技术(编号:2011ZX08012-002);江苏高校优势学科建设工程资助项目;江苏省徐州市科技计划(编号:XF13C056)。

作者简介:朱刘影(1992—),女,江苏连云港人,本科生,生物科学专业。E-mail:zly19921110@163.com。

通信作者:刘美艳,副教授,从事生物化学与分子生物学的研究。E-mail:liumeiyan@jsnu.edu.cn。

平均达1 690.27 kg/hm<sup>2</sup>,比半量普通复混肥增产6.34%。包膜复混肥在油菜生长前期没有普通复混肥效果好,直到油菜生长后期,才表现出较好效果,促进油菜生物量以相对较高的速度继续积累,为油菜籽粒结实保证植株更加活跃的状态。

## 参考文献:

- [1]汪丰云,王晓峰,杨林霞,等.化学家与化学肥料的发展[J].化学教育,2011,32(9):94-96.
- [2]宁清同,王丽香.我国农业化肥污染防治制度初探[J].行政与法,2012(11):74-79.
- [3]朱利平,卫树银,任冬生,等.包膜肥料的研究进展[J].河北农业科学,2008,12(6):40-42,53.
- [4]肖强,张夫道,王玉军,等.纳米材料胶结包膜型缓/控释肥料对作物产量和品质的影响[J].植物营养与肥料学报,2008,14(5):951-955.
- [5]卫丽,马超,黄晓书,等.控释肥对夏玉米碳、氮代谢的影响[J].植物营养与肥料学报,2010,16(3):773-776.
- [6]韩宝文,贾良良,刘小玲,等.河北省冬小麦主产区控释尿素应用效果研究[J].河北农业科学,2010,14(9):56-57,79.
- [7]王艳华,董元杰,邱现奎,等.控释肥对坡耕地花生生理特性、产

量及品质的影响[J].作物学报,2010,36(11):1974-1980.

- [8]汪浩.菜需肥特性及施肥技术[J].现代农业科技,2009(23):83,86.
- [9]Landels S P. US markets for controlled-release fertilizers: present size and value, projected demand, trends, and opportunities for new CRF products[C]//Scheib R M. Controlled release fertilizer workshop. New York:Marcei Dekker Pubi,1991.
- [10]杨同文,尹飞,杨志丹,等.包膜肥料研究现状与进展[J].河南农业大学学报,2003,37(2):141-144.
- [11]Vyas B N, Mistry K B. Hydrolysis of prilled urea, sulphur coated urea and urea super granules in anoxic solution sol and inceptisol[J]. Indian Journal of Agricultural Science,1985,55(1):35-40.
- [12]许秀成,李萍,王好斌.裹型缓释/控制释放肥料专题报告[J].磷肥与复肥,2000,15(3):1-6.
- [13]崔文慧,王干,韩守良,等.不同缓释肥施用比例对油菜生长及土壤养分的影响[J].河南农业科学,2013,42(3):59-62.
- [14]刘代平,宋海星,刘强,等.油菜根系形态和生理特性与其氮效率的关系[J].土壤,2008,40(5):765-769.
- [15]邹菁.色环保型缓释/控释肥料的研究现状及展望[J].武汉化工学院学报,2003,25(1):13-17.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试甘薯品种为南京 - 92 (高抗黑斑病) 和烟台 - 252 (高感黑斑病), 甘薯黑斑病菌原物, 均由中国农科院甘薯研究中心提供。

### 1.2 方法

1.2.1 黑斑病菌孢子悬液的制备 黑斑病菌孢子悬液的制备按照王景崇等的方法<sup>[4]</sup>进行。

1.2.2 薯块接种 选取两个品种正常无病斑的薯块, 用自来水冲洗干净, 再放入 0.1% 的次氯酸钠溶液中, 表面消毒 10 min, 用蒸馏水冲洗 3 次。将块根切成约 1.0 cm 厚的圆片, 将 0.1 mL 黑斑病菌内分生孢子悬液涂在块根圆片的表面, 放置于 28 °C 恒温箱中培养, 以蒸馏水涂抹块根圆片的作为对照组。

1.2.3 几丁质酶的提取和活性测定 分别取两个品种染菌后的甘薯块根各 0.5 g, 加 4 mL 0.02 mol/L 乙酸 - 乙酸钠缓冲液 (pH 5.5), 冰浴研磨, 定容至 5 mL, 4 °C 8 000 r/min, 离心 15 min, 上清液为待测酶液。几丁质酶活力测定参照 Boller 等方法<sup>[11]</sup>进行。酶活定义: 以每小时分解胶体几丁质产生 1  $\mu\text{mol}$  *N* - 乙酰氨基葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位 (U/mL)。

1.2.4 甘薯几丁质酶体外抑菌试验 采用琼脂扩散法来检测甘薯几丁质酶体外抑菌的效果<sup>[12]</sup>。PDA 培养基冷却后, 用灭菌后直径 7 mm 的打孔器在平板上均匀打出 6 个孔洞。用无菌牙签挑出琼脂柱。在每个孔中加入少量未凝固的 PDA 封住孔底部, 约 2 mm 厚度。然后将 20  $\mu\text{L}$  无菌酶液以及稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的酶液分别加入孔中, 最后用新的灭菌后的打孔器在活化好的待试菌种培养基上打一个菌饼, 将其倒贴于加过菌液的培养基正中央, 28 °C 培养箱中倒置培养 4 d。通过比较病斑大小来判定几丁质酶的抑菌效果。检测对象为甘薯黑斑病菌、小麦赤霉病菌、水稻纹枯病菌。

1.2.5 核黄素和脱乙酰几丁质处理 脱乙酰几丁质原液的

制备按王荣娟<sup>[13]</sup>的方法进行。

将 3 mL 核黄素 (1 mmol/L) 和脱乙酰几丁质 (1 mg/mL) 均匀涂抹在薯块的表面, 然后将薯块放入培养皿中,  $30 \pm 1$  °C 暗箱中保温。试验各处理均设 3 次重复。数据采用 SPSS Statistics 软件进行统计分析。 $P < 0.05$  (用 \* 表示) 为显著性差异,  $P < 0.01$  (用 \*\* 表示) 为极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑斑病侵染对不同抗性甘薯块根几丁质酶活性的影响

黑斑病对 2 种不同抗性甘薯块根内几丁质酶活性的影响见图 1。从图 1 可以看出, 未接种黑斑病菌时, 南京 - 92 和烟台 - 252 块根中几丁质酶活性差异不显著。接菌后 2 个品种几丁质酶活性上升, 于接菌后 6 d 达到最大值, 而高抗品种南京 - 92 块根几丁质酶活性增加速度高于高感品种烟台 - 252。差异分析表明, 染菌 4 d 和 8 d 时南京 - 92 块根几丁质酶活性显著高于烟台 - 252, 2 d 和 6 d 时两甘薯品种几丁质酶活性差异极显著。

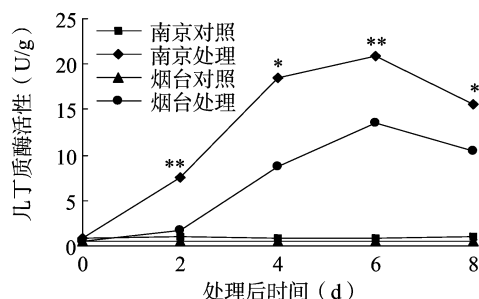


图1 黑斑病侵染对甘薯几丁质酶活性的影响

### 2.2 甘薯几丁质酶对 3 种真菌的抑制作用

检测了甘薯几丁质酶对甘薯黑斑病菌、小麦赤霉病菌和水稻纹枯病菌的抑制作用 (图 2)。通过比较抑菌圈的大小可以看出: 甘薯几丁质酶液 (100) 和稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的酶液对甘薯黑斑病菌 (图 2 - A) 有较明显的抑制作用, 对小麦赤霉病菌 (图 2 - B) 和水稻纹枯病菌 (图 2 - C) 的抑制作用较小。

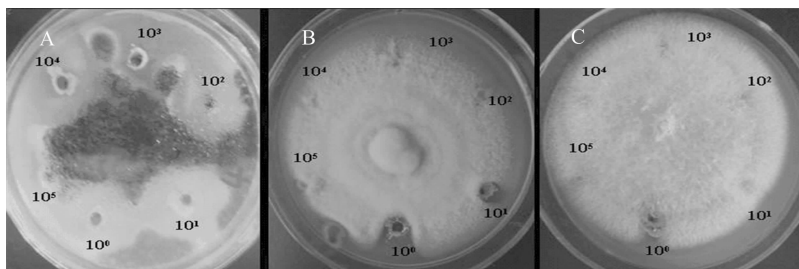


图2 甘薯几丁质酶对 3 种真菌的抑制作用

### 2.3 核黄素对不同抗性甘薯几丁质酶活性的影响

经核黄素处理后, 2 种不同抗性甘薯块中几丁质酶活性均呈现升高的趋势 (图 3)。高抗品种南京 - 92 几丁质酶活性的上升幅度比高感品种烟台 - 252 大, 且在整个处理期间南京 - 92 几丁质酶活性高于烟台 - 252。处理 4 d 和 6 d 时, 南京 - 92 几丁质酶活性是烟台 - 252 的 213.9% 和 175%。显著性分析表明, 处理 2 d 和 8 d 时 2 个甘薯品种几丁质酶活

性差异显著; 处理 4 d 和 6 d 时 2 个甘薯品种几丁质酶活性差异极显著。

### 2.4 脱乙酰几丁质对不同抗性甘薯几丁质酶活性的影响

脱乙酰几丁质能提高甘薯几丁质酶的活性 (图 4)。比较 2 个抗性不同甘薯品种几丁质酶活性的变化可以看出, 南京 - 92 几丁质酶活性的上升速度快且活性高于高感品种烟台 - 252。处理 4 d 和 6 d 时, 南京 - 92 几丁质酶活性是烟

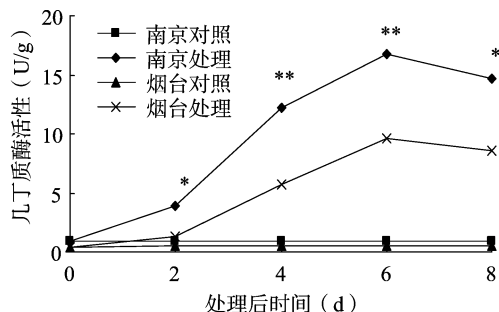


图3 核黄素对不同抗性甘薯几丁质酶活性的影响

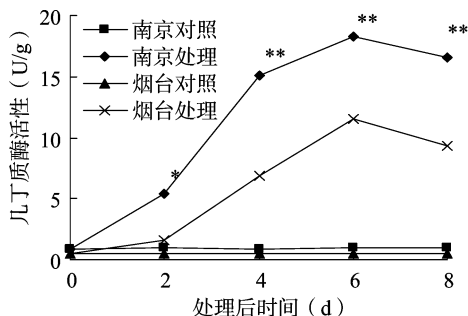


图4 脱乙酰几丁质对不同抗性甘薯几丁质酶活性的影响

台-252的221.9%和158.9%。显著性分析表明,处理2 d时2个甘薯品种几丁质酶活性差异显著;处理4 d、6 d和8 d时2个甘薯品种几丁质酶活性差异极显著。

### 3 讨论

几丁质是真菌细胞壁的主要成分,几丁质酶的底物为几丁质,因此植物几丁质酶能够直接降解真菌细胞壁,抑制真菌孢子萌发和菌丝生长,从而达到抑制真菌病害的作用<sup>[14]</sup>。本试验结果验证了甘薯几丁质酶是一种诱导酶<sup>[15-16]</sup>。未感染黑斑病时,高抗和高感薯块内几丁质酶活性都很低,并且差异不显著;受黑斑病菌感染后,两个品种薯块能够迅速积累几丁质酶来水解黑斑病菌的细胞壁,抑制菌丝的生长,高抗品种甘薯块内的几丁质酶比高感品种积累的量多,几丁质酶活性在处理2 d和6 d时达到极显著差异,说明几丁质酶对于甘薯抵抗黑斑病的侵染具有重要作用。抑菌试验进一步证明了甘薯几丁质酶对甘薯黑斑病有较强的抑制作用。

几丁质酶是重要的病程相关蛋白,能够分解 $\beta$ -1,4键形成的线性几丁质,几丁质酶活性能够在抗性诱导过程中显著增强<sup>[17]</sup>。研究表明,核黄素作为非专化激发子可以诱导植物产生系统获得抗病性<sup>[18]</sup>。脱乙酰几丁质主要存在于海洋生物、昆虫的甲壳中,研究表明,脱乙酰几丁质能诱导植物提高抗病性<sup>[13,19]</sup>。本研究结果表明,核黄素和脱乙酰几丁质处理能提高甘薯块根几丁质酶活性,高抗品种酶活性高于高感品种,几丁质酶活性的上升有助于提高甘薯对黑斑病的抵抗能力。这与以玉米、番茄、苹果为试验材料的结果一致<sup>[20-21]</sup>。本研究结果为生产上防治甘薯黑斑病提供了一种可行的方法。

### 参考文献:

- [1] 蔡自建, 阚建全, 陈宗道. 甘薯营养研究进展[J]. 四川食品与发酵, 2003, 39(3): 48-51.
- [2] 谢一芝, 邱瑞镰, 戴起伟, 等. 甘薯抗黑斑病育种研究进展[J]. 国外农学: 杂粮作物, 1997(2): 22-24.
- [3] 赵冬兰, 张允刚, 唐军, 等. 抗甘薯黑斑病优异种质资源的筛选与评价[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(1): 80-83.
- [4] 王景景, 刘美艳, 谢逸萍, 等. 黑斑病对甘薯叶酚类物质含量、PPO及PAL活性的影响[J]. 广西植物, 2012, 32(3): 406-409.
- [5] 刘美艳, 孙厚俊, 王景景, 等. 甘薯块根抗黑斑病酚类物质代谢研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(24): 226-230.
- [6] 彭霞薇, 赵哀梅, 白志辉, 等. 果胶酶激发子对黄瓜叶片病程相关蛋白及细胞壁物质的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 325-328.
- [7] 邱永祥, 柯玉琴, 代红军, 等. 甘薯抗蔓割病的酚类物质代谢的研究[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(5): 167-170.
- [8] 庄炳昌, 王玉民. 抗性不同大豆品种感染灰斑病后若干生化变化[J]. 作物学报, 1993, 19(6): 567-569.
- [9] 于汉寿, 张益民, 陈永萱, 等. 油菜几丁质酶的纯化及其在抗菌核病中的作用[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(3): 41-44.
- [10] 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳. 豇豆几丁质酶的诱导与纯化[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 351-355.
- [11] Boller T, Gehria A, Mauch F, et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function[J]. Planta, 1983, 157: 22-31.
- [12] 杨建, 林丽飞, 陈绍兴, 等. 大黄藤内生放线菌分离及抗菌活性初步研究[J]. 红河学院学报, 2010, 8(2): 49-53.
- [13] 王荣娟, 姚允聪, 戚亚平, 等. 苹果脱乙酰几丁质发酵液诱导苹果叶片对斑点落叶病的早期抗性反应[J]. 生态学报, 2012, 32(7): 2239-2247.
- [14] 马汇泉, 甄惠丽, 孙伟萍. 几丁质酶及其在抗植物真菌病害中的作用[J]. 微生物学通报, 2004, 24(3): 50-53.
- [15] 汪少芸, 李邦德, 吴金鸿, 等. 绿豆几丁质酶的纯化与酶学性质分析[J]. 福州大学学报, 2004, 32(6): 769-772.
- [16] 黄璟, 校现周. 乙烯利和乙烯刺激对橡胶树胶乳中几丁质酶活性和胶乳产量的影响[J]. 热带作物学报, 2003, 24(4): 1-5.
- [17] Zhu Y J, Qiu X H, Moore P H, et al. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2003, 63: 237-248.
- [18] Zhang S J, Yang X, Sun M W, et al. Riboflavin-induced priming for pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2009, 51: 167-174.
- [19] Hu X Y, Fang J Y, Ca W M. Oxidative burst and saponin synthesized in ginseng cells induced by deacetylation of chitin were mediated by Mitogenactivated protein kinase[J]. Science in China, 2004, 34(1): 31-40.
- [20] 易承波, 叶华智. 外源化学物质对玉米抗弯孢菌叶斑病的诱导作用[J]. 植物保护, 2005, 31(5): 31-35.
- [21] 黑银秀, 朱为民, 郭世荣, 等. 核黄素和接种番茄黄化曲叶病毒对番茄几丁质酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(4): 135-139.