

21科41种(变种)植物叶片几丁质酶系的研究*

陈崇顺 徐凤彩 李明启

(华南农业大学农业生物系, 广州 510642)

摘要 对广州地区常见的21科41种(变种)植物叶片几丁质酶系研究的结果表明, 所有受试植物都具有几丁质酶活性。几丁质酶不仅存在于被子植物的双子叶植物和单子叶植物中, 而且也存在于裸子植物及蕨类植物中。几丁质酶活性及比活性均较高的有蕹菜、葱、蕨类植物、蒜、茄科植物、玉米、菜豆、番木瓜等。植物一般都具有两种几丁质酶: 外切酶和内切酶。几丁质外切酶活性及比活性均较高的有蕨类植物、葱、茄科植物等。几丁质内切酶活性及比活性均较高的有蕹菜、裸子植物等。不同植物几丁质外切酶与内切酶的比例相差较大。有些植物的几丁质酶系以外切酶为主, 如茄科植物、大部分豆科植物、番木瓜等; 有些植物以内切酶为主, 如裸子植物、伞形科植物、蕹菜等; 有些植物的外切酶与内切酶含量相差不大。

关键词 植物; 叶片; 几丁质酶系

Studies on the chitinase system in leaves from 41 plant species (var.) related to 21 families
Chen Chong-Shun, Xu Feng-Cai and Li Ming-Qi (Department of Agricultural Biology, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642), *J. Plant Resour. & Environ.* 1993, 2(4): 28~33

This paper presented studies on the chitinase system in leaves from 41 plant species (var.) related to 21 families. The results obtained indicated that all the plants examined possessed chitinase activity. Chitinase was present not only in angiosperms (dicotyledons and monocotyledons), but also in gymnosperms and ferns. A higher chitinase activity with a higher chitinase specific activity was found in *Ipomoea aquatica*, *Allium fistulosum*, the ferns, *Allium sativum*, the plants of Solanaceae, *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Carica papaya*, etc. Both kinds of chitinases; exochitinase and endochitinase were detected in the same plant. A higher exochitinase activity with a higher exochitinase specific activity was found in the ferns, *Allium fistulosum*, the plants of Solanaceae, etc.; and a higher endochitinase activity with a higher endochitinase specific activity was found in *Ipomoea aquatica*, the gymnosperms, etc. Plants differed greatly from one to another in the ratio between exochitinase activity and endochitinase activity, some plants showed a much higher activity of endochitinase than that of exochitinase; and some plants, an activity of exochitinase similar to that of endochitinase.

Key words plant; leaves; chitinase system

收稿日期 1993-06-21

* 本研究为国家博士后科学基金资助科研项目的一部分。

裸子植物及野生植物部分经华南农业大学植物教研室吴万春教授鉴定。

几丁质酶(EC 3. 2. 1. 14)是一种分解聚 N-乙酰氨基葡萄糖分子的糖苷酶。根据酶反应初级产物的类型,几丁质酶系可分为外切酶和内切酶。外切酶的作用产物仅是 N-乙酰氨基葡萄糖,而内切酶则产生几丁质寡糖^[1]。与微生物的几丁质酶相比,对植物几丁质酶的研究较迟较少,且多集中于少数几个科的几个种,如:豆科的菜豆、豌豆,茄科的烟草、番茄,葫芦科的黄瓜,禾本科的小麦等^[1,4]。我们以广州地区常见的21科41种(变种)植物(分属蕨类植物门,裸子植物门及被子植物门)为试材,比较系统地研究了这些植物叶片的几丁质酶系,为对植物几丁质酶进行更深入的研究奠定基础。

材料与方 法

1. 材料

(1) 受试的41种(变种)植物如下:

- | | |
|--|---|
| Lygodiaceae 海金沙科 | <i>Apium graveolens</i> L. 旱芹 |
| <i>Lycopodium japonicum</i> (Thunb.) Sw. 海金沙 | Convolvulaceae 旋花科 |
| Pteridaceae 凤尾蕨科 | <i>Ipomoea aquatica</i> Forsk. 蕹菜 |
| <i>Pteris multifida</i> Poir. 井栏边草 | Solanaceae 茄科 |
| <i>Pteris semipinnata</i> L. 半边旗 | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 番茄 |
| Araucariaceae 南洋杉科 | <i>Lycium chinense</i> Mill. 枸杞 |
| <i>Araucaria cunninghamia</i> Sweet 南洋杉 | <i>Capsicum frutescens</i> L. 辣椒 |
| Pinaceae 松科 | <i>Nicotiana tabacum</i> L. 烟草 |
| <i>Pinus massoniana</i> Lamb. 马尾松 | Plantaginaceae 车前科 |
| Moraceae 桑科 | <i>Plantago asiatica</i> L. 车前 |
| <i>Broussonetia papyrifera</i> (L.) Vent. 构树 | Cucurbitaceae 葫芦科 |
| Chenopodiaceae 藜科 | <i>Cucumis sativus</i> L. 黄瓜 |
| <i>Spinacia oleracea</i> L. 菠菜 | Compositae 菊科 |
| <i>Beta vulgaris</i> L. 甜菜 | <i>Adenostemma lavenia</i> (L.) Kuntze. 下田菊 |
| Amaranthaceae 苋科 | <i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronq. 小白酒草 |
| <i>Amaranthus tricolor</i> L. 苋 | <i>Lactuca sativa</i> L. 莴苣 |
| Cruciferae 十字花科 | <i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i> L. 皱叶莴苣 |
| <i>Brassica chinensis</i> L. 青菜 | <i>Ixeris denticulata</i> (Houtt.) Stebb. 苦苣菜 |
| <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L. 卷心菜 | <i>Wedelia prostrata</i> (Hook. et Arn.) Hemsl. 卤地菊 |
| Leguminosae 豆科 | Gramineae 禾本科 |
| <i>Glycine max</i> (L.) Merr. 大豆 | <i>Oryza sativa</i> L. 稻 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. 菜豆 | <i>Setaria palmifolia</i> (Willd.) Stapf. 棕叶狗尾草 |
| <i>Vigna cylindrica</i> (L.) Skeels 眉豆 | <i>Zea mays</i> L. 玉米 |
| <i>Vicia faba</i> L. 蚕豆 | Araceae 天南星科 |
| <i>Pisum sativum</i> L. 豌豆 | <i>Alocasia macrorrhiza</i> (L.) Schoot 海芋 |
| Oxalidaceae 酢浆草科 | Commelinaceae 鸭跖草科 |
| <i>Oxalis corymbosa</i> DC. 铜锤草 | <i>Zebrina pendula</i> Schnizl. 吊竹梅 |
| Caricaceae 番木瓜科 | Liliaceae 百合科 |
| <i>Carica papaya</i> L. 番木瓜 | <i>Allium fistulosum</i> L. 葱 |
| Umbelliferae 伞形科 | <i>Allium sativum</i> L. 蒜 |
| <i>Coriandrum sativum</i> L. 芫荽 | <i>Allium tuberosum</i> Rottl. ex Spreng. 韭 |

甜菜、卷心菜、大豆、眉豆、蚕豆、豌豆、番木瓜、烟草源于栽培网室；菠菜、苋、青菜、芫荽、旱芹、蕹菜、番茄、枸杞、辣椒、茼蒿、皱叶茼蒿、苦苣菜、葱、蒜、韭购于蔬菜市场；其余植物采于华南农业大学校园本部及园艺系蔬菜圃。

(2) 源于蟹壳的几丁质由中国科学院广州化学研究所提供。蜗牛酶为北京百泰生化技术公司制品。其他化学试剂为分析纯或生化试剂。

2. 方法

(1) 胶状几丁质的制备，按 Berger 和 Reynolds 的方法^[37]。

(2) 粗酶液的制备：选取生长正常、具有代表性的成熟叶片，洗净，晾干，称取10 g，剪碎，置研钵内，加入15 ml的0.1 mol/L柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)，研磨，用单层尼龙布过滤，将滤液离心10 min(7000 r/min，室温)，收集上清液，即得粗酶液。

(3) 几丁质酶活性的测定，参照 Boller 等^[5,7]的方法。

1) 几丁质酶总活性的测定：取400 μ l的胶状几丁质(10 mg/ml)加1400 μ l(10 mmol/L)磷酸钠缓冲液(pH 6.4)，混匀，再加200 μ l粗酶液，混匀，置37 $^{\circ}$ C恒温水浴保温2 h。随后，置100 $^{\circ}$ C恒温水浴煮沸3 min，离心10 min(2400 r/min，室温)。取上清液400 μ l，加20 μ l(1 mol/L)磷酸钠缓冲液(pH 7.1)和80 μ l的1%(w/v)蜗牛酶，将此反应液置37 $^{\circ}$ C恒温水浴保温30 min，以水解几丁质寡糖。最后，按照 Reissig *et al.* 的比色法^[9]，测定所有 N-乙酰氨基葡萄糖。以在上述条件下，每增加0.010个光密度值的酶量为1个酶活力单位(U)。

2) 几丁质外切酶活性的测定：与上述几丁质酶总活性的测定方法基本相同，只是加入的蜗牛酶已经灭活处理。

3) 几丁质内切酶活性的确定：几丁质酶总活性与相应的外切酶活性之差。

(4) 蛋白质含量的测定，按 Bradford 法^[6]。

结果与讨论

广州地区常见的41种(变种)植物叶片中的几丁质酶总活性、几丁质外切酶和几丁质内切酶活性及蛋白质含量测定结果见表1。它们的几丁质酶总比活性，几丁质外切酶比活性，几丁质内切酶比活性，及它们分别占几丁质酶总比活性的百分数见表2。

1. 几丁质酶在蕨类植物、裸子植物及被子植物中的分布

由表1可知，所有受试的21科41种(变种)植物的叶片都具有几丁质酶的活性。Powning 和 Irzykiewicz^[8]报告，小麦、菜豆、胡萝卜、豌豆、洋葱、巴旦杏、茼蒿等11科13种植物的种子均具有几丁质酶的活性。Boller *et al.* ^[5]于1983年报告，菜豆、豌豆、大豆、番茄、向日葵、黄瓜、棉花、玉米、小麦的叶片也都具有几丁质酶的活性。我们测得的结果表明，几丁质酶不仅存在于被子植物的双子叶植物和单子叶植物中，而且也存在于裸子植物及蕨类植物中。由此可以想见，几丁质酶在高等植物中是广泛存在的。根据我们的研究，几丁质酶活性及比活性皆较高的有蕹菜、葱、蕨类植物、蒜、茄科植物、玉米、菜豆、番木瓜等。

2. 21科41种(变种)植物叶片的几丁质酶系的外切酶与内切酶活性比较

几丁质酶广泛存在于高等植物中。不过，在高等植物中，至今尚未发现它的底物——几丁质的存在，而几丁质是某些真菌细胞壁的组成成分。因此，人们推测，几丁质酶在植物抵抗

表1 不同种(变种)植物叶片中的(总)几丁质酶、几丁质外切酶及内切酶的活性
 Tab 1 Total chitinase, exochitinase and endochitinase activities in leaves of various plant species (var.)

种(变种) Species(var.)		几丁质酶活性 Chitinase activity($\mu\text{g}/200\text{ ml}$)		蛋白质含量 Protein ($\mu\text{g}/200\text{ ml}$)	
		总活性 Total	外切酶 Exochitinase		内切酶 Endochitinase
海金沙	<i>Lygodium japonicum</i>	881.25	538.75	342.50	128.96
井栏边草	<i>Pteris multifida</i>	1427.50	1113.75	313.75	179.84
半边旗	<i>P. semipinnata</i>	353.75	230.00	133.75	89.60
南洋杉	<i>Arucaria cunninghamia</i>	140.00	8.75	131.25	50.88
马尾松	<i>Pinus massoniana</i>	162.50	1.25	161.25	12.80
构树	<i>Broussonetia papyrifera</i>	507.50	380.00	127.50	214.40
菠菜	<i>Spinacia oleracea</i>	570.00	468.75	101.25	228.80
甜菜	<i>Beta vulgaris</i>	221.25	91.25	130.00	241.26
苋	<i>Amaranthus tricolor</i>	322.50	126.25	196.25	195.87
青菜	<i>Brassica chinensis</i>	253.75	118.75	135.00	118.45
卷心菜	<i>B. oleracea var. capitata</i>	183.75	36.25	147.50	151.46
大豆	<i>Glycine max</i>	336.25	280.00	56.25	218.24
菜豆	<i>Phaseolus vulgaris</i>	625.00	541.25	83.75	184.96
眉豆	<i>Vigna cyathodica</i>	158.75	32.50	126.25	146.12
蚕豆	<i>Vicia faba</i>	325.00	295.00	30.00	258.24
豌豆	<i>Pisum sativum</i>	353.75	272.50	81.25	179.20
铜锤草	<i>Oxalis corymbosa</i>	240.00	63.75	176.25	75.00
番木瓜	<i>Carica papaya</i>	811.25	720.00	91.25	251.84
芫荽	<i>Coriandrum sativum</i>	193.75	16.25	177.50	73.06
旱芹	<i>Apium graveolens</i>	152.50	26.25	126.25	71.84
蕹菜	<i>Ipomoea aquatica</i>	326.25	32.50	293.75	18.69
番茄	<i>Lycopersicon esculentum</i>	596.25	550.00	46.25	158.01
枸杞	<i>Lycium chinense</i>	616.25	470.00	146.25	171.12
辣椒	<i>Capiscum frutescens</i>	761.25	667.50	93.75	276.70
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i>	435.00	328.75	106.25	108.50
车前	<i>Plantago asiatica</i>	218.75	101.25	117.50	45.63
黄瓜	<i>Cucumis sativus</i>	222.50	167.50	55.00	375.36
下田菊	<i>Adenostemma lavenia</i>	142.50	52.50	90.00	234.95
小白酒草	<i>Coryza canadensis</i>	98.75	27.50	71.25	82.52
茼蒿	<i>Lactuca sativa</i>	177.50	70.00	107.50	41.50
皱叶茼蒿	<i>L. sativa var. crispata</i>	157.50	51.25	106.25	34.47
苦苣菜	<i>Izerris denticulata</i>	168.75	42.50	126.25	64.32
岗地菊	<i>Wedelia prostrata</i>	176.25	107.50	68.75	109.71
稻	<i>Oryza sativa</i>	995.00	812.50	182.50	581.12
棕叶狗尾草	<i>Setaria patrifolia</i>	268.75	161.25	107.50	150.49
玉米	<i>Zea mays</i>	1002.50	780.00	222.50	265.60
海芋	<i>Alocasia macrorrhiza</i>	258.75	123.75	135.00	218.24
吊竹梅	<i>Zebrina pendula</i>	155.00	57.50	97.50	44.90
葱	<i>Allium fistulosum</i>	481.25	300.00	181.25	57.77
蒜	<i>A. sativum</i>	380.00	191.25	188.75	83.01
韭	<i>A. tuberosum</i>	192.50	130.00	62.50	66.75

表2 不同种(变种)植物叶片中的(总)几丁质酶、几丁质外切酶及内切酶的比活性

Tab 2 Total chitinase, exochitinase and endochitinase specific activities in leaves of various plant species (var.)

种(变种) Species (var.)	几丁质酶比活性 Chitinase specific activity (U/mg protein)		
	总比活性 Total	外切酶 Exochitinase	内切酶 Endochitinase
海金沙 <i>Lygodium japonicum</i>	6833.5	4177.7(61.1)*	2655.8(38.9)
并栏边草 <i>Pteris multifida</i>	7937.6	6193.0(78.0)	1744.6(22.0)
半边旗 <i>P. semipinnata</i>	4059.7	2567.0(63.2)	1492.7(36.8)
南洋杉 <i>Araucaria cunninghamia</i>	2751.6	172.0(6.3)	2579.6(93.7)
马尾松 <i>Pinus massoniana</i>	12695.3	97.7(0.8)	12597.6(99.2)
构树 <i>Broussonetia papyrifera</i>	2367.1	1772.4(74.9)	594.7(25.1)
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	2491.3	2048.7(82.2)	442.6(17.8)
甜菜 <i>Beta vulgaris</i>	917.1	378.2(41.2)	538.9(58.8)
苋 <i>Amaranthus tricolor</i>	1646.5	644.6(39.1)	1001.9(60.9)
青菜 <i>Brassica chinensis</i>	2142.3	1002.5(46.8)	1139.8(53.2)
卷心菜 <i>B. oleracea var. capitata</i>	1213.2	239.3(19.7)	973.9(80.3)
大豆 <i>Glycine max</i>	1540.7	1283.0(83.3)	257.7(16.7)
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	3379.1	2926.3(86.6)	452.8(13.4)
眉豆 <i>Vigna cylindrica</i>	1086.4	222.4(20.5)	864.0(79.5)
蚕豆 <i>Vicia faba</i>	1258.5	1142.3(90.8)	116.2(9.2)
豌豆 <i>Pisum sativum</i>	1974.1	1520.6(77.0)	453.5(23.0)
铜锤草 <i>Oxalis corniculata</i>	3200.0	850.0(26.6)	2350.0(73.4)
番木瓜 <i>Carica papaya</i>	3221.3	2859.0(88.8)	362.3(11.2)
芫荽 <i>Coriandrum sativum</i>	2651.9	222.4(8.4)	2429.5(91.6)
旱芹 <i>Apium graveolens</i>	2122.8	365.4(17.2)	1757.4(82.8)
蕹菜 <i>Ipomoea aquatica</i>	17455.9	1738.9(10.0)	15717.0(90.0)
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	3773.5	3480.8(92.2)	292.7(7.8)
枸杞 <i>Lycium chinense</i>	3601.3	2746.6(76.3)	854.7(23.7)
辣椒 <i>Capsicum frutescens</i>	2751.2	2412.4(87.7)	338.8(12.3)
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	4009.2	3030.0(75.6)	979.2(24.4)
车前 <i>Plantago asiatica</i>	4794.0	2218.9(46.3)	2575.1(53.7)
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	592.8	446.2(75.3)	146.6(24.7)
下田菊 <i>Adenostemma lavenia</i>	606.5	223.5(36.9)	383.0(63.1)
小白酒草 <i>Conyza canadensis</i>	1196.7	333.3(27.9)	863.4(72.1)
茼蒿 <i>Lactuca sutra</i>	4277.1	1686.7(39.4)	2590.4(60.6)
皱叶茼蒿 <i>L. sativa var. crispa</i>	4569.2	1486.6(32.5)	3082.4(67.5)
苦苣菜 <i>Iteiris denticulata</i>	2623.6	660.8(25.2)	1962.8(74.8)
鹧地菊 <i>Wedelia prostrata</i>	1606.5	979.9(61.0)	626.6(39.0)
稻 <i>Oryza sativa</i>	1712.2	1398.2(81.7)	314.0(18.3)
棕叶狗尾草 <i>Setaria palmifolia</i>	1785.8	1071.5(60.0)	714.3(40.0)
玉米 <i>Zea mays</i>	3774.5	2936.7(77.8)	837.8(22.2)
海芋 <i>Alocasia macrorrhiza</i>	1185.6	567.0(47.8)	618.6(52.2)
吊竹梅 <i>Zebrina pendula</i>	3452.1	1280.6(37.1)	2171.5(62.9)
葱 <i>Allium fistulosum</i>	8330.4	5193.0(62.3)	3137.4(37.7)
蒜 <i>A. sativum</i>	4577.8	2303.9(50.3)	2273.9(49.7)
韭 <i>A. tuberosum</i>	2883.9	1947.6(67.5)	936.3(32.5)

* 括号内的数字表示几丁质外切酶或内切酶活性的百分数(几丁质外切酶或内切酶的比活性/(总)几丁质酶比活性)。

The figures in parentheses indicated the percentages of exochitinase or endochitinase activity (exochitinase or endochitinase specific activity / total chitinase specific activity).

含几丁质病原物侵染的机制中起作用^[2,4]。现已有研究证实这一假说^[6,10]。另一方面,几丁质酶系的外切酶与内切酶的作用并不完全相同。在植物保卫反应中,几丁质内切酶的作用可能更大^[1,4,5,10]。

由我们对41种(变种)植物叶片的几丁质酶系的外切酶与内切酶活性的比较系统的研究(表1和表2)可知,一般地说,植物都具有两种几丁质酶:外切酶和内切酶。有些植物未见报告有几丁质内切酶的活性,或者所报告的几丁质酶的活性与其他的报道相差较大^[2,5],这可能与测定方法以及植物生长条件等因素有关。根据我们的研究,几丁质外切酶活性及比活性均较高的有蕨类植物、葱、茄科植物、玉米、菜豆、番木瓜等。几丁质内切酶活性及比活性均较高的有蕨菜、裸子植物、葱、海金沙、芫荽、铜锤草等。不同植物几丁质外切酶与内切酶的比例相差较大。有些植物的几丁质酶系以外切酶为主,如茄科植物、大部分豆科植物、番木瓜等;有些植物以内切酶为主,如裸子植物、伞形科植物、蕹菜等;有些植物的外切酶与内切酶含量相差不大。迄今为止,我们尚未见到系统研究植物几丁质酶系(外切酶和内切酶)的报告。本研究结果可为不同的研究目的选取合适试材,对植物几丁质酶进行更深入的研究奠定基础。

参 考 文 献

- 1 张世明, 1989; 植物生理学通讯 (1): 8~13.
- 2 Abclis F B, R P Bosshart, L E Forrence *et al.* 1971; *Plant Physiol.* 47: 129~134.
- 3 Berger L R, D M Reynolds. 1958; *Biochem. Biophys. Acta* 29: 522~534.
- 4 Boller T. 1985; In: Key J L, T Kesuge (eds). *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, Alan R. Liss, Inc, New York. 247.
- 5 Boller T, A Gehri, F Mauch *et al.* 1983; *Planta* 157: 22~31.
- 6 Bradford M M. 1976; *Anal. Biochem.* 72: 248~254.
- 7 Mauch F, L A Hadwiger, T Boller. 1984; *Plant Physiol.* 76: 607~611.
- 8 Powning R F, H Irzykiewicz. 1965; *Comp. Biochem. Physiol.* 14(1): 127~133.
- 9 Reissig J L, J L Strominger, L E Leloir. 1955; *J. Biol. Chem.* 217: 959~966.
- 10 Roberts W K, C P Selitrennikoff. 1988; *J. General Microbiol.* 134: 169~176.

(责任编辑:盛国英)

书 讯

《禾本科叶表皮微形态图谱》

陈守良、金岳杏、吴竹君著,江苏科学技术出版社1993年11月出版,精装,200页。本书是作者1979~1991年对禾本科叶表皮微形态的研究成果,包括6亚科114属、285种、15变种的叶片表皮微形态显微照片。全书分概论与各论两部分。对构成叶片表皮微形态的细胞作了文字与图片的说明。并分别阐述各种叶片表皮微形态的特微,每种附有显微照片。书内共有

显微照片300余张,排成图版106幅;是研究禾本科植物分类系统的重要依据,可根据破碎的禾本科叶片鉴别植物种类;本书可供农、林、牧业以及公安与美术工作者参考。全书图版均注有英文,便于国际交流。每册定价人民币44元。欲购者,请与南京中山门外,邮编210014,江苏省植物研究所金岳杏联系。