

壳寡糖诱导草莓细胞活性氧代谢的变化

郭红莲 白雪芳 李曙光 杜昱光

(中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

摘要: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 活性的最大值在处理后的 60~90 min。

关键词:壳寡糖; 草莓; 活性氧; 抗氧化酶类

中图分类号: S 668.4 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2003) 05-0577-03

1 目的、材料与方法

近年研究证实, 活性氧迸发存在于植物与微生物相互作用产生的防御反应过程中, 是植物对病原菌应答的最早期反应之一, 同时也是引起植物早期抗病反应的重要因子^[1,2]。以动、植物为原料经化学或生物降解产生的寡聚糖也可诱导烟草、棉花、大豆等对病毒和真菌的抗性^[3,4]。以海洋中的虾、蟹、贝类等外壳为主要来源经降解而成的壳寡糖(脱乙酰几丁寡糖)具有多种生物功能, 但目前对壳寡糖诱导抗性的机理尚不清楚。作者以壳寡糖为材料, 以草莓悬浮培养的细胞为对象, 研究壳寡糖处理草莓细胞后活性氧的产生及活性氧清除酶——过氧化氢酶(CAT)及超氧化物歧化酶(SOD)的变化, 进而探讨壳寡糖对草莓细胞产生诱导抗性的可能机制, 为其作为生防药剂的应用提供理论依据。

草莓悬浮培养细胞在 MS 液体培养基中摇床培养, 转速为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 每 20 d 继代培养 1 次, 培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光照强度 1500 lx 。鲁米诺(luminol, $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$, 分子量 177.17)为 Nerck 公司产品, 壳寡糖经酶降解法获得, 过膜, 聚合度为 $4 \sim 11$ ^[4], NBT 购自华美生物试剂公司。

壳寡糖诱导处理: 以 5000 g 离心收集培养细胞, 然后以 B_5 培养液洗 1 次, 按 $1 \mu\text{g}$ 细胞(DM)每 mL 的浓度重新悬浮在相同的细胞培养液中, 在相同的培养条件下维持 2 h 后, 按 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度加入壳寡糖作激发子, 诱导过程中细胞保持在悬浮状态。

取培养细胞 10 mL , 加入 3 mL 的发光试剂(鲁米诺为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液配制, $\text{pH} 10.2$), 以 Beckman 公司的 LS5801 液闪仪测定反应系统内最大发光强度, 用相对光单位(relative light unit, RLU)表示活性氧水平, 重复 3 次, 取平均值。CAT 活性的测定参照张宪政等方法^[5]。SOD 活性测定用 NBT 光还原抑制法^[6]。

2 结果分析与讨论

2.1 壳寡糖对草莓细胞活性氧水平的影响

图 1 显示, 两种浓度壳寡糖处理均引起草莓悬浮细胞活性氧代谢的变化。对照细胞的活性氧代谢是一个动态的平衡过程, 而壳寡糖处理后, 活性氧水平都先迅速增加, 并在 20~30 min 时达到最高值, 然后以不同速度缓慢下降。其中, $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 壳寡糖处理的活性氧比对照约高出 1 倍。

2.2 CAT 活性变化

加入 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 壳寡糖后, 草莓悬浮细胞 CAT 活性逐渐上升, 70 min 时达到最大值。 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

收稿日期: 2002-11-11; 修回日期: 2003-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39980012); 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-SW-301-03)

壳寡糖处理后, CAT 活性从 20 min 后开始上升, 60 min 时达到最大值, 以后逐渐下降 (图 2)。

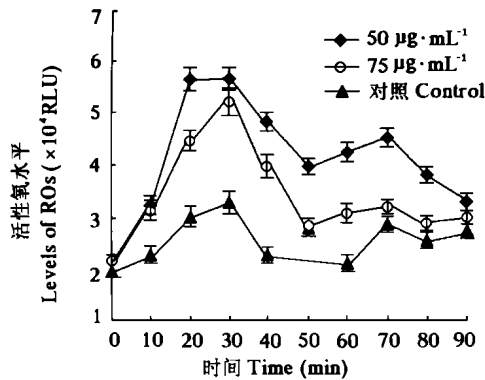


图 1 不同浓度壳寡糖处理时活性氧的变化

Fig. 1 The changes of active oxidant treated with different contents of oligochitosan

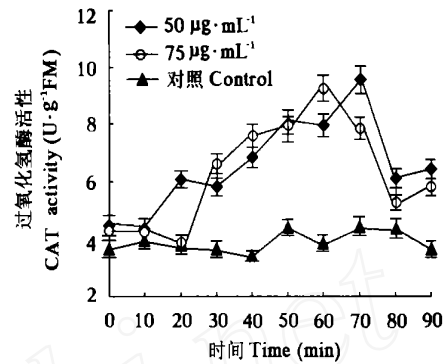


图 2 不同浓度壳寡糖处理时 CAT 酶活性的变化

Fig. 2 The changes of CAT activities with different contents of oligochitosan

2.3 SOD 活性的变化

图 3 表明壳寡糖处理能诱导细胞 SOD 活性上升, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 壳寡糖处理细胞在 70 min 时达到峰值, 而 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的壳寡糖处理细胞在 90 min 时酶活性最大, 两者酶活性峰值相近。

已有研究表明, 在病原菌与植物的非亲和性互作诱导中, 局部和系统抗性可能与活性氧有因果关系^[7]。植物对病原物侵染的早期抗性反应之一是产生活性氧的迸发, 也有人认为, 活性氧可能作为抗性信号参与植物防卫反应的发生^[8]。本试验中壳寡糖处理草莓细胞, 在 20~30 min 时活性氧即达到峰值 (图 1)。由于活性氧的增加既可来自于 O_2^- 产生速率的直接增加, 也可来自因清除系统受抑而引起的 O_2^- 被动积累, 但通过对清除酶活性的测定 (图 2, 图 3), 可以认为壳寡糖处理能直接诱导活性氧产生速率的早期直接增加。这

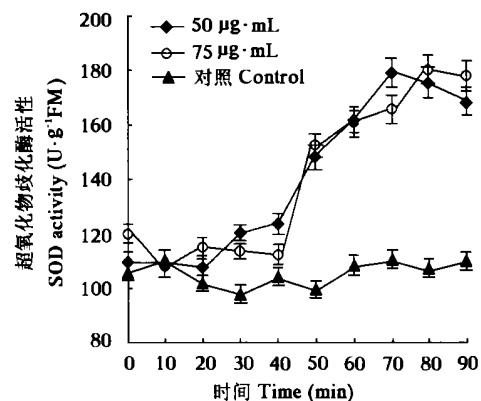


图 3 不同浓度壳寡糖处理的 SOD 酶活性的变化

Fig. 3 The changes of SOD activities treated with different contents of oligochitosan

这可能有利于启动活性氧信号系统, 并引起抗性信号的转导^[2]。而在处理后期活性氧清除酶——CAT 和 SOD 活性显著增加, 可以清除过多活性氧, 避免活性氧积累对细胞的伤害作用。因而壳寡糖处理草莓细胞可以诱导发生与植物抗病反应类似的活性氧变化, 活性氧释放先期增加, 后期活性氧清除酶活性增加, 以防止过多的活性氧的伤害作用。

参考文献:

- 1 刘曼西, Kolattukudy P E. *Ventricillium alboratum* 激发子诱导的番茄组织培养细胞反应性氧迸发. 植物生理学报, 1996, 22 (2): 137~140
- 2 葛秀春, 宋凤鸣, 郑 重. 稻瘟菌侵染后水稻幼苗活性氧的诱导与抗病性的关系. 植物生理学报, 2000, 26 (3): 227~230
- 3 赵小明, 杜昱光, 白雪芳, 等. 中科 3 号防治棉花黄萎病田间药效试验. 中国棉花, 2001, 28 (12): 15~17
- 4 白雪芳, 杜昱光, 刘 晓, 等. 真菌寡糖激发子对植物抗病相关酶活性的影响. 中国生物防治, 2002, 18: 81~83
- 5 张宪政, 陈凤玉, 王荣富. 植物生理学实验技术. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994. 17~21
- 6 陈 捷, 蔺瑞明, 高增贵, 等. 弯孢菌毒素对玉米叶斑病防御酶系及诱抗作用的研究. 植物病理学报, 2002, 32 (1): 43~48
- 7 李红玉, 何晨阳, 王金生. 活性氧对植物防卫信号传导的作用探讨. 农业生物技术学报, 1996, 4 (2): 190~196
- 8 Keppler L D, Baker C J O. 2-initiated lipid peroxidation in a bacterium-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspension. Phytopath, 1989, 79 (5): 555~561

The Effect of Oligochitosan on Active Oxygen Metabolism of Suspension Strawberry Cells

Guo Honglian, Bai Xuefang, Li Shuguang, and Du Yuguang

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract : To study the mechanism of inducing resistance on plant cells, the suspension strawberry cells were treated with different concentrations of oligochitosan. The results showed that oligochitosan could induce the changes of active oxygen metabolism in strawberry cells and the oxidative burst appeared in 20 ~ 30 minutes; while the activities of the eliminated enzymes such as CAT and SOD increased gradually, the maximum changes of SOD and CAT activities happened in 60 ~ 90 minutes.

Key words : Oligochitosan; Strawberry; Active oxygen; Antioxidative enzymes

千屈菜对富营养化水体中磷的去除作用

柳 骅 夏宜平 邓云兰 (浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029)

Removal Effect of Purple Loosestrife (Lythrum salicaria L.) to P in Eutrophic Water

Liu Hua, Xia Yiping, and Deng Yunlan (College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

关键词：千屈菜；富营养化水体；P去除率

中图分类号：S 682.31 **文献标识码：**A **文章编号：**0513-353X (2003) 05-0597-01

试验于 2001 年 8 月 11 日 ~ 9 月 10 日进行。千屈菜选用整齐健壮的 6 月份扦插苗 (株高约 20 cm)，用清水洗净后置于总 P 浓度不同的营养液中 (以 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 配制)。选用能净化富营养化水体的凤眼莲为对照植物，置于总 P 浓度为 0.05 和 0.4 mg L^{-1} 的水体中。植株用打孔的泡沫板固定在培养箱中，每框用水均为 10 L，定期以蒸馏水补足蒸发失去的水分。3 次重复，完全随机排列。塑料温室内空气流通，光照为自然散射光。试验共 30 d，每 5 d 采集水样 1 次，用钼酸铵分光光度法测定总 P 浓度。

从试验结果 (表 1) 可以看出，在总 P 0 ~ 0.4 mg L^{-1} 的浓度范围内千屈菜都具有较强的适应性。总 P 浓度与根系鲜样质量、植株鲜样质量、植株总干样质量之间均呈显著正相关。

千屈菜和凤眼莲水体中总 P 浓度的下降均十分明显。生长 30 d 后，千屈菜对水体中总 P 的去除率达到 98.35%，去除效果与对照凤眼莲近似，说明千屈菜在降低富营养化水体中总 P 浓度的整体效应方面与凤眼莲没有明显的差异。

从表 1 中看出，在最初 10 d，千屈菜具有“快速”吸收 P 的净化特性，水体中总 P 浓度呈直线下降，此后速度逐渐减慢。但总 P 浓度为 0 的水体中总 P 含量呈先上升后下降的变化趋势，这是否由于植株体内的 P 释放到水体中并达到某种平衡所致尚需进一步探讨。

表 1 总 P 浓度不同的水体中千屈菜生长量和对水中总 P 的去除作用

Table 1 Comparison of plant growth and total phosphorous removal at different concentrations of total phosphorous in purple loosestrife

材料 Materials	总 P 浓度 Concentrations of total phosphorous (mg L^{-1})						根系鲜样质量 Root fresh mass (g)	植株鲜样质量 Plant fresh mass (g)	总干样质量 Total dry mass (g)
	0	5 d	10 d	15 d	20 d	30 d			
千屈菜 Purple loosestrife	0	0.057	0.039	0.014	0.011	0.007	3.93 \pm 0.60	18.27 \pm 3.49	2.15 \pm 0.07
	0.05	0.032	0.028	0.015	0.013	0.009	4.79 \pm 0.74	20.92 \pm 4.48	2.37 \pm 0.16
	0.10	0.045	0.036	0.012	0.007	0.003	4.24 \pm 0.19	19.51 \pm 1.62	2.50 \pm 0.11
	0.20	0.065	0.016	0.012	0.011	0.004	5.22 \pm 1.05	19.77 \pm 3.99	2.61 \pm 0.50
	0.30	0.031	0.017	0.014	0.012	0.009	6.59 \pm 0.41	22.00 \pm 1.69	2.74 \pm 0.03
	0.40	0.189	0.027	0.017	0.011	0.007	6.64 \pm 0.81	23.28 \pm 1.60	2.60 \pm 0.19
凤眼莲 Water hyacinth	0.05	0.031	0.013	0.013	0.009	0.004			
	0.40	0.061	0.025	0.014	0.011	0.002			

收稿日期：2003 - 01 - 20；修回日期：2003 - 05 - 23