

壳聚糖处理对马铃薯块茎组织活性氧代谢的影响

李永才¹, 孙小娟^{1,2}, 毕阳^{1,*}

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

2. 天祝藏族自治县农技中心, 甘肃天祝 733200)

摘要:以大西洋马铃薯(cv. Atlantic)块茎为试材,研究了壳聚糖处理及干腐病菌 *Fusarium sulphureum* 挑战接种对马铃薯块茎组织活性氧(ROS)代谢的影响,结果表明:壳聚糖处理能显著提高马铃薯切片过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子(O₂⁻)和抗坏血酸(AsA)含量及过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性,而降低超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性, *F. sulphureum* 挑战接种可进一步提高壳聚糖处理及对照马铃薯切片的 H₂O₂ 和 O₂⁻ 的含量及 CAT、APX 和 GR 的活性。可见壳聚糖和病原物可通过诱导氧迸发而启动马铃薯组织的抗病反应。

关键词:壳聚糖,活性氧代谢,马铃薯块茎,硫色镰刀菌,干腐病

Effect of chitosan treatment on reactive oxygen species metabolism in potato tuber slices

LI Yong-cai¹, SUN Xiao-juan^{1,2}, BI Yang^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Agricultural Technology Centre of Tibetan Autonomous County of Tianzhu, Tianzhu 733200, China)

Abstract: Effect of chitosan treatment and *Fusarium sulphureum* challenge inoculation on reactive oxygen species metabolism in potato tuber slices was studied. The results showed that chitosan significantly increased the contents of hydrogen peroxide (H₂O₂), super oxide radical (O₂⁻) and ascorbic acid (AsA) and activities of catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), however activities of superoxide dismutase (SOD) and ascorbic peroxidase (APX) were decreased. The activities of CAT, APX and GR and the production of H₂O₂ and O₂⁻ were enhanced furthermore by inoculated with *F. sulphureum* in the treated tissue and the control. It was proposed that chitosan as a chemical activator could induce oxidative burst and then initiate disease defence response of potato tuber tissue.

Key words: chitosan; reactive oxygen species metabolism; potato tuber; *Fusarium sulphureum*; dry rot

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)08-0313-04

马铃薯块茎干腐病是马铃薯贮藏期间的主要病害,早期估计其造成的损失每年平均达6%~10%,有时甚至高达60%^[1]。近年来对甘肃省马铃薯主产区马铃薯贮藏期病害调查发现平均病薯率为27.59%,其中88.5%为硫色镰刀菌(*Fusarium sulphureum*)引起的黑色干腐型病薯,给马铃薯的鲜食和加工带来很大的经济损失^[2]。但目前主要是通过采后使用

苯咪唑等化学合成杀菌剂进行控制,然而由于病原物对噻苯咪唑抗药性、农药残留和环境污染问题受到普遍关注,因此寻求一种替代方法来控制该病已势在必行。壳聚糖作为一种天然的防腐保鲜剂,本实验室近期研究表明,壳聚糖不但能有效地抑制马铃薯干腐病菌的生长、孢子萌发,改变菌丝的形态及超微结构^[3],而且还能诱导马铃薯组织产生抗病性^[4]。活性氧(reactive oxidative species, ROS)因在植物防御中具有关键作用而成为目前的研究热点,主要表现在 ROS 不但具有直接的抗微生物功能^[5],而且参与细胞壁木质化及富含羟脯酸的糖蛋白的交联而抵御病原菌侵袭^[6]。此外,ROS 还作为第二信使调控抗病相关基因的表达,并引起过激性细胞死

收稿日期: 2009-09-29 * 通讯联系人

作者简介: 李永才(1973-),男,副教授,博士,研究方向:果蔬采后贮藏保鲜与病害控制。

基金项目:农业部农业公益性行业科研专项经费项目(NYHYZX 07-6);甘肃省农业生物技术项目(GNSW-2005-08)。

[4] 周金玲. HACCP 在鸡精调味料生产中的应用[J]. 食品科学, 2005(8): 567-569.

[5] 赵文红, 曾晓房, 白卫东, 等. 腐竹生产的 HACCP 管理及

质量控制[J]. 中国调味品, 2008(4): 88-89.

[6] 赵箭, 龚海岩, 等. 中华人民共和国国家标准 GB/T22656-2008[S].

亡,启动植物抗病防御反应^[7]。本实验以大西洋马铃薯(cv. Atlantic)块茎为试材,研究了壳聚糖处理及干腐病菌 *Fusarium sulphureum* 挑战接种对马铃薯块茎组织活性氧代谢的影响,以期代替化学合成药物控制马铃薯块茎干腐病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

马铃薯块茎 品种为大西洋,块茎于2008年9月份采自甘肃省农牧厅秦王川高新技术园区,网袋包装后运抵实验室冷库低温($16 \pm 2^\circ\text{C}$)贮藏待用;马铃薯干腐病病原物硫色镰刀菌(*Fusarium sulphureum* Schlechlendahl) 由甘肃省农业科学院植物保护所提供;壳聚糖 济南海得贝海洋生物工程有限公司(食品级,脱乙酰度为90.2%,粒度80目)。

1.2 实验方法

1.2.1 材料处理方法 参照 Sun 等^[4]及 Ray 和 Hammerschmidt 方法^[8]。用灭菌的接种环将 $200\mu\text{L}$ 0.25%的壳聚糖溶液均匀涂布于事先切好并活化的马铃薯切片(厚10mm,直径20mm)上,以无菌水处理为对照。挑战接种是将在 PDA 上培养7d的 *F.sulphureum* 配制成 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液,并在处理后1d涂布于壳聚糖处理和对照的马铃薯切片,处理和接种后的切片均置于 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 的暗箱中。

1.2.2 测定方法 分别于0.25%壳聚糖处理和挑战接种后1、2、3、4、5d用不锈钢刀切取马铃薯处理面下3~4mm处组织3g,用锡箔纸包好,液氮冷冻,在 -80°C 超低温冰箱中保存待测。

O_2^- 产生速率测定:参照王爱国和罗广华方法^[9], $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{FW}$; H_2O_2 含量的测定:参照 Patterson 的方法^[10], $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{FW}$; SOD 活性:参照 Prochazkova 等方法^[11],以每毫克蛋白抑制 NBT 光化还原的50%为一个酶活性单位(U)表示, $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{protein}$; CAT: 参照 Clairbone 等方法^[12], $\text{mmol} \text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot \text{min}^{-1}$; APX 的活性测定:参照 Nakano 等方法^[13],以每分钟每毫克蛋白氧化的 AsA 微摩尔数表示, $\mu\text{mol AsA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$; GR 的活性测定:参照 Halliwell 和 Foyer 法^[14],以每分钟每毫克蛋白氧化的 NADPH 钠摩尔数表示, $\text{nmol NADPH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$; AsA 含量的测定:参照 Tanaka 等的方法^[15],以每克鲜重所含的 AsA 微克数表示, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

各项指标重复3次。酶活性测定采用 UV-2550 分光光度计,数据统计分析采用 Excel 和 DPS 数据处理系统。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率的影响

壳聚糖处理可明显提高马铃薯切片 H_2O_2 的含量和 O_2^- 的产生速率(图1)。对于 H_2O_2 处理者第2d就已高于对照,第3d和第4d显著提高,分别高出同期对照的18.4%和20.7%,第5d与对照基本相等(图1A)。而处理后第2d的 O_2^- 的产生速率略低于对照,从第3d

开始持续增高,第4d和第5d分别高出对照的46%和60%(图1B)。*F.sulphureum* 挑战接种可显著提高处理者和对照的 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率。

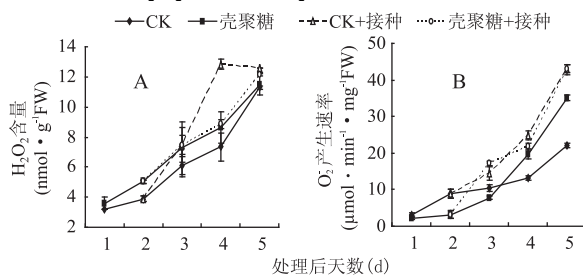


图1 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片

H_2O_2 (A)含量和 O_2^- (B)产生速率的影响

2.2 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片 SOD 和 CAT 活性的影响

壳聚糖处理可显著降低马铃薯切片的 SOD 活性(图2A)。处理者第2d的 SOD 活性就开始明显下降,第3d到第5d下降速度最快,其下降速度高于对照。*F.sulphureum* 挑战接种显著加速了处理者和对照 SOD 活性的下降,挑战接种后处理者的 SOD 活性显著低于挑战接种后的对照,第5d的活性低于同期对照20%。

图2B表明,马铃薯切片的 CAT 活性可被壳聚糖处理诱导。处理后第1d处理者的 CAT 活性就已高于对照44.6%,以后随着时间延长, CAT 活性逐渐增加,第4d达到峰值,高于同期对照10.75%。*F.sulphureum* 挑战接种可显著提高处理者和对照的 CAT 活性,与挑战接种后的对照相比,挑战接种后处理者的 CAT 活性高于同期对照的20.9%。

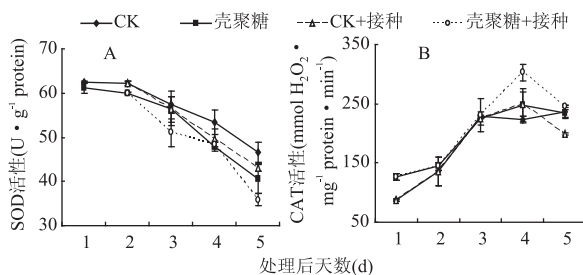


图2 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片

SOD(A)和 CAT(B)活性的影响

2.3 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片 APX 和 GR 活性的影响

从图3可见,壳聚糖处理对马铃薯切片 APX 和 GR 的活性具有一定影响。APX 活性受到抑制,处理者第1d的 APX 活性就已低于对照63.8%,与对照相比,壳聚糖处理在5d范围内均可抑制 APX 活性的提高。*F.sulphureum* 挑战接种可提高处理者和对照的 APX 活性,但差异不显著(图3A)。而对于 GR 处理后第2d活性就已高出对照55.4%,第4d达到最大,随后其活性显著下降。*F.sulphureum* 挑战接种降低了处理者和对照的 GR 活性,但壳聚糖处理者延缓了 GR 活性的降低(图3B)。

2.4 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片 ASA 含量的影响

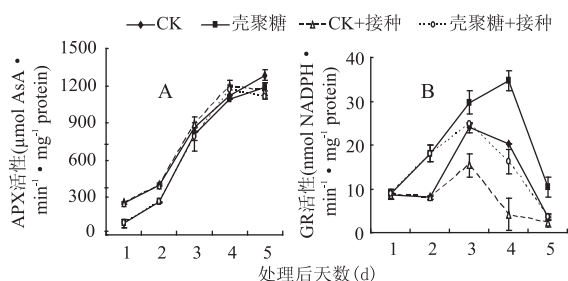


图3 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片 APX(A)和GR(B)活性的影响

壳聚糖处理明显提高了马铃薯切片 AsA 含量 (图4)。随着时间的延长对照和处理者的 AsA 含量均呈现先升高后降低趋势,第4d的 AsA 含量均达到最大,且处理者 AsA 含量高出对照 39.9%。*F.sulphureum*挑战接种加速了处理者和对照 AsA 含量的降低速率,但处理者 AsA 含量的降低速率低于对照,两者之间无显著性差异。

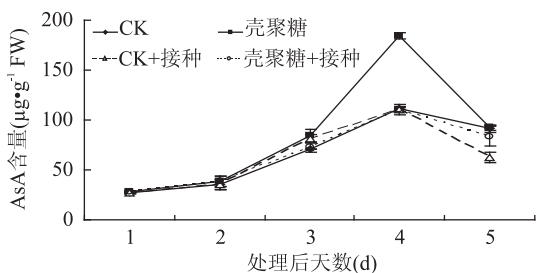


图4 壳聚糖处理及挑战接种对马铃薯切片 AsA 含量的影响

3 讨论

正常生理条件下,植物体内会产生 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 等 ROS,ROS 又不断被消除,使植物体内 ROS 产生和清除处于动态平衡。这种平衡由植物体抗氧化酶系统(SOD、CAT、POD、APX 和 GR 等)和抗氧化物质(AsA、GSH 和 VE 等)调控。本研究结果显示,壳聚糖处理及 *F.sulphureum* 挑战接种可明显促进马铃薯切片 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率的提高,由此表明, H_2O_2 和 O_2^- 在参与马铃薯块茎诱导抗病性方面具有重要作用。该结果与壳聚糖处理提高了小麦幼苗 H_2O_2 含量的结果相似^[16]。王益光等^[17]研究表明 0.5% 壳聚糖涂膜处理杨梅果实后 O_2^- 产生速率提高,与本实验结果相似。氧突发(oxidative burst)被认为是诱发植物 HR 反应的重要因素,也是植物对病原菌应答的早期特征性反应之一^[18]。已有研究表明,活性氧(ROS, reactive oxygen species)除与植物的 HR 反应关系密切外,其水平高低还与植物的抗病强弱直接相关。ROS 可直接作为信号传递过程中的中间体,在转录水平上激活和调控植物体内病程相关蛋白基因表达及植保素的合成等防御相关基因的表达^[19]。Torres 等^[20]研究表明 H_2O_2 含量的升高与苹果果实的抗 *P.expansum* 能力呈直接正相关。

植物体内 ROS 代谢中,SOD、POD 和 CAT 是清除 ROS 过程中最重要的抗氧化酶,SOD 清除 O_2^- 转化为 H_2O_2 和 O_2 ,CAT 和 POD 清除 H_2O_2 使之转化为 H_2O ^[21-22]。本研究中壳聚糖处理及 *F.sulphureum* 挑战

接种可明显降低马铃薯切片 SOD 活性,这可能与壳聚糖处理诱导 O_2^- 产生速率增高有关。这与诱抗剂在其它寄主上研究有一定的差异。一般由亲和性相互作用引起感病反应中 SOD 活性升高。如在受锈菌侵染的菜豆叶片, TMV 侵染的烟草叶片,线虫侵染的番茄和豌豆根部组织中,SOD 的活性明显增加,而且与症状的表现有关。但在非亲和性反应中,SOD 活性无多大变化,甚至下降。如挑战接种 TMV 或根结线虫的番茄抗病品种的叶片或根部中,SOD 活性明显下降;而受稻瘟菌非亲和小种侵染的水稻叶片中,SOD 活性无显著变化^[23]。壳聚糖处理提高了马铃薯切片 CAT 活性,该结果与舒英杰等^[24]发现壳聚糖处理黄瓜种子,提高了幼苗 CAT 活性的结论相一致。宋世清等^[25]研究发现,NaCl 胁迫下壳聚糖处理可以提高黄瓜幼苗 CAT 活性,李红斌等^[26]发现,喷施壳聚糖的黄瓜幼苗在热胁迫下 8h 内体内活性氧清除主要酶类 SOD、CAT 明显提高。

AsA-GSH 循环是一个重要的清除 H_2O_2 的系统,APX 和 GR 是抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环的关键酶。其中 APX 是关键酶,APX 是利用 AsA 为电子供体的 H_2O_2 的清除,GR 利用 NADPH 作为辅助因子而将 GSSG 还原成 GSH,AsA 和 GSH 是 AsA-GSH 循环中的两种重要抗氧化成分^[27-28]。本实验中壳聚糖处理及 *F.sulphureum* 挑战接种明显促进了马铃薯切片 GR 活性,而抑制了 APX 活性,该结果与王益光等^[17]用 1% 壳聚糖涂膜处理在杨梅果实研究结论相一致。马铃薯切片 AsA 含量被壳聚糖处理诱导,同时挑战接种有效抑制了处理者 AsA 含量的降低速率,提高了它的抗氧化水平,这可能是因为病原菌的侵染会引起植物体内 GSH 和 AsA 等抗氧化物质含量的增加^[29]。

综上所述,壳聚糖处理能明显促进马铃薯切片 H_2O_2 和 AsA 的积累,提高 O_2^- 产生速率,增加 CAT 和 GR 活性,降低 SOD 和 APX 活性,*F.sulphureum* 挑战接种可进一步提高处理者及对照 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率,CAT、APX 和 GR 活性,但降低了 SOD 活性以及 AsA 含量。可见壳聚糖和病原物可通过诱导氧迸发(oxidative burst)而启动马铃薯组织的抗病反应。至于壳聚糖对抗氧化酶的作用机理,还有待进一步研究。

参考文献

[1] Theron D J. Prediction of potato dry rot on the presence of Fusarium in soil adhering to tubers at harvest[J]. Plant Disease, 1991, 75: 126-129.
 [2] 何苏琴,金秀琳,魏周全,等. 甘肃省定西地区马铃薯块茎干腐病原真菌的分离鉴定[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19: 550-552.
 [3] Li Y C, Sun X J, Bi Y, et al. Antifungal activity of chitosan on *Fusarium sulphureum* in relation to dry rot of potato tuber[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(5): 597-604.
 [4] Sun X J, Bi Y, Li Y C, et al. Postharvest chitosan treatment

(下转第 328 页)

Journal of Biological Chemistry, 1957, 226(1):497-509.

- [4] 邓泽元, 范亚苇. 不同饲养类型鸡蛋中脂类的含量测定[J]. 食品科学, 2004, 25(9):140-143.
- [5] Christie W. Lipid analysis— isolation, separation, identification and structural analysis of lipids [M]. The Oily Press, 2003: 205-300.
- [6] 李荷芳. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1):34-40.
- [7] 蒋霞敏, 郑亦周. 14种微藻总脂含量和脂肪酸组成研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27:243-247.
- [8] 梁萌青, 王家林, 常青. 海水养殖和低盐养殖凡纳滨对虾脂肪酸分析比较[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1):88-91.
- [9] 范亚苇, 邓泽元, 李琼. 鄱阳湖野生鱼类脂肪酸含量的比较研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12):597-600.
- [10] 谢钦铭, 李长春, 彭赐莲. 鄱阳湖浮游藻类群落生态的初步研究[J]. 江西科学, 2000, 18(3):162-166.

(上接第315页)

- induces resistance in potato against *Fusarium sulphureum* [J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(5):615-621.
- [5] Pang M, Kun J. Peroxidase generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks [J]. Phytopathology, 1992, 82:696-699.
- [6] Bradley D J, Kjellom P, Lamb C J. Elicitor induced and wound induced oxidative cross-linking of a proline rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response [J]. Cell, 1992, 70(1):21-30.
- [7] Foyer C H, Lopez-Delgado H, Dat J F, et al. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100:241-254.
- [8] Ray H, Hammerschmidt R. Responses of potato tuber to infection by *Fusarium Sambucinum* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1998, 5(3):81-92.
- [9] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(6):55-57.
- [10] Patterson B D, Mackae E A, Ferguson IB. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium [J]. Annual Review of Biochemistry, 1984, 13(9):487-492.
- [11] Prochazkova D, Sairam R K, Srivastava GC, et al. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves [J]. Plant Science, 2001, 16(1):765-771.
- [12] Clairbone A. Catalase activity. In: Greenwald W.A. (ed.) Handbook of methods of oxygen radical research. CRC press, Boca Raton, 1985, 2:83-84.
- [13] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiology, 1981, 22:867-880.
- [14] Halliwell B, Foyer C H. Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography [J]. Planta, 1978, 139:9-17.
- [15] Tanaka K, Suda Y, Kanda N, et al. O₃ tolerance and ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts [J]. Plant and Cell Physiology, 1985, 25:25-31.
- [16] 王云, 蔡汉, 陆任云, 等. 壳聚糖对胁迫条件下小麦生

- [11] Ishida-Okawara A, Tsuchiya T, Nunoi H, et al. Modulation of degranulation and superoxide generation in human neutrophils by unsaturated fatty acids of odd carbon numbers [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1996, 1314:239-246.
- [12] 祖丽亚, 罗俊雄, 樊铁. 海水鱼与淡水鱼脂肪中 EPA、DHA 含量的比较 [J]. 中国油脂, 2003, 28(11):48-50.
- [13] 姚婷. 海水鱼与淡水鱼 omega-3 多不饱和脂肪酸含量的比较研究 [J]. 现代食品科技, 2005, 21:3-5.
- [14] Food and Agriculture Organisation the United Nations and World Health Organization (1994). Fats and oils in human nutrition. Report of a Joint Expert Consultation. Rome.
- [15] Simonetti M S, Blasi F, Bosi A, et al. Stereospecific analysis of triacylglycerol and phospholipid fractions of four freshwater fish species: *Salmo trutta*, *Ictalurus punctatus*, *Ictalurus melas* and *Micropterus salmoides* [J]. Food Chemistry, 2008, 110:199-206.

长及生理的影响 [J]. 生态学杂志, 2007, 26:1671-1673.

- [17] 王益光, 罗自生, 席岫芳, 等. 壳聚糖涂膜处理对杨梅活性氧代谢的影响 [J]. 果树学报, 2001, 18(6):349-351.
- [18] Baker C J, O'neil N I L, Keppler L D, et al. Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco suspensions [J]. Phytopathology, 1991, 15:4-7.
- [19] Inze D, Montagu M V. Oxidative stress in plants [J]. Current Opinion Biotechnology, 1995, 6:153-158.
- [20] Torres R, Valentines M C, Usall J, et al. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in "Golden Delicious" apple fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 27:235-242.
- [21] Demming A B. Photoprotection and other responses of plants to high light stress [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 435:619-626.
- [22] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(2):121-125.
- [23] 葛秀春, 宋凤鸣, 郑重. 稻瘟菌侵染后水稻幼苗活性氧的产生与抗病性的关系 [J]. 植物生理学报, 2000, 6(3):227-231.
- [24] 舒英杰, 时侠清, 张子学, 等. 壳聚糖对黄瓜种子萌发及幼苗抗冷性的效应 [J]. 种子, 2007, 26(1):22-25.
- [25] 宋士清, 刘微, 郭世荣, 等. 化学诱抗剂诱导黄瓜抗盐性及其机理 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(10):71-76.
- [26] 李红斌, 苗立祥, 寿森炎. 壳聚糖对黄瓜幼苗抗热性的影响 [J]. 北方园艺, 2007(8):7-9.
- [27] 孙卫红, 王伟青, 孟庆伟. 植物抗坏血酸过氧化物酶的作用机制、酶学及分子特性 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2):143-147.
- [28] Noctor G, Foyer C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 49:269-279.
- [29] Liu H X, Jang W B, Bi Y, et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35:263-269.