

海带对褐藻酸降解菌的抗性 与其抗氧化能力的相关性分析

唐学玺, 王艳玲, 李肖然, 杨 震

(1. 青岛海洋大学 生命学院, 山东 青岛 266003)

摘 要: 采用生物化学的方法测试2个品系的海带(*Laminaria japonica*)对褐藻酸降解菌抗性的差异性, 并对其抗氧化能力进行研究, 旨在为海带烂病的防治提供生物学基础依据。结果表明, 1) 海带荣城1号对褐藻酸降解菌的抗性远高于海带901; 2) 海带荣城1号细胞内2种抗氧化酶—超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性明显高于海带901; 而另一种抗氧化酶—过氧化氢酶(CAT)的活性与海带901相比没有明显的差别; 3) 海带荣城1号的脂溶性抗氧化能力同样明显高于海带901。说明海带的抗氧化能力与其对褐藻酸降解菌的抗性有一定的相关性。

关键词: 褐藻酸降解菌; 海带; 抗氧化能力; 抗性

中图分类号: S949.288.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)01-0014-04

McCord 和 Fridovich^[1]提出的生物自由基伤害学说已广泛应用于需氧生物细胞伤害机理的研究。其研究表明, 自由基往往参加逆境胁迫(盐害、病害、低温和污染等)对植物体的伤害。植物体在逆境胁迫下通常产生大量的自由基并在植物细胞内过量积累而破坏细胞的大分子物质, 如蛋白质、核酸、脂类和糖类等, 最终导致整个植物体的伤害。在长期的生物进化过程中, 植物体内形成了一套完善的抗氧化机制以清除过量的自由基, 维持体内自由基产生与清除的平衡, 从而减轻植物体的伤害作用。因此, 植物体对逆境的耐受力与其抗氧化能力的大小密切相关。到目前为止, 在高等植物中有关植物体的抗氧化能力与其抗病和抗感染的相关性研究已有报道^[2,3], 而对低等植物, 如大型海藻, 该方面的研究仍属空白。海带是我国开展大型经济海藻养殖的主要对象, 养殖历史长, 海带人工育苗是我国海带养殖事业发展的一个重要环节^[4]。海带病烂, 尤其在苗期, 会造成很大的经济损失。研究指出, 海带的病烂

与褐藻酸降解菌的大量繁殖有关^[5-8]。褐藻酸降解菌是海带藻体上主要附生细菌, 正常情况下并不引起病烂, 但若养殖环境恶化, 如过于密植、损伤、温度过高, 使海带的抵抗力下降, 细菌易于侵入并大量繁殖, 从而导致病害。本文以褐藻酸降解菌为病原细菌, 研究海带感染过程中4种抗氧化酶活性的变化, 以期对海带病烂的生物学基础研究和海带病烂的防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 海带品种的选择

选择海带(*Laminaria japonica*)的2个品系, 即海带荣城1号和海带901, 分别取自荣城育苗厂和烟台育苗厂, 藻体长度为1.2~1.5 m。

1.2 菌株的选择

选用本实验室分离的具有高褐藻酸酶活性的菌株, 为革兰氏阴性, 杆状, 细胞体积为(0.6~0.7 μm) $\times$ (1.5~2.4 μm)。按伯杰氏手册将其定为埃氏交替单胞菌(*A. espejiana*)。

1.3 感染处理

1.3.1 方法1 用灭过菌的棉球沾取无菌海水擦洗海带中部小块(2.0 cm $\times$ 2.0 cm)后, 置于灭菌培

收稿日期: 2001-04-17.

基金项目: 国家重点基础研究专项经费资助项目(1999012004).

作者简介: 唐学玺(1965-), 男, 教授, 主要从事生态毒理学研究。
Tel: 0532-2032952.

养皿中待用。取灭过菌的刀片在海带块上划约 2 mm 刀口,然后取褐藻酸降解菌接种到海带刀口处,加入适量无菌海水,并置于无光线直射处静置培养。

1.3.2 方法 2 用无菌海水配制 10^6 /ml 的菌悬液,分别取 150 ml 装入 250 ml 的无菌培养瓶中,然后放入划上刀口的海带小块,置于无光线直射处培养,每天摇匀 3 次。

1.4 抗性分析

海带对褐藻酸降解菌的抗性按下式计算:

抗性大小 = (一段时间内未感染的块数/放入的总块数) $\times 100\%$ 。

1.5 抗氧化酶活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定按照 Bewley 等^[9]改进的氮蓝四唑光化学还原反应法,1 个活力单位定义为能引起反应初速度(指不加酶时)半抑制时的酶用量。过氧化物酶(POD)活性的测定参照 Srivastava 和 Huystee^[10]改进的愈创木酚法进行。过氧化氢酶(CAT)活性的测定采用 Droillard^[11]的方法进行。

1.6 脂溶性抗氧化能力的测定

按 Mckersie 等^[12]方法测亚油酸过氧化物共轭双烯在 232 nm 的光吸收,光吸收对时间的斜率为 S ,则脂溶性抗氧化能力 $A_{OA} = (S_{\text{对照}} - S_{\text{样品}})/S_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

1.7 蛋白质含量的测定

按 Bradford^[13]方法,以牛血清白蛋白作标准曲线。

2 结果

2.1 褐藻酸降解菌感染对海带超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

在褐藻酸降解菌感染过程中,海带 901 和海带荣成 1 号细胞内 SOD 活性表现出一致的变化规律,即在感染的初期(前 3 d),海带细胞内 SOD 的活性急剧上升。3 d 后,随着感染时间的延长,SOD 活性又呈现出逐渐下降的趋势。至 12 天时,SOD 活性降低到最低点,随后没有明显的升降变化(图 1)。 t 检验表明,在感染的 3~6 d,海带荣成 1 号和海带 901 的 SOD 活性差异显著($P < 0.05$)。说明海带荣成 1 号的 SOD 活性明显高于海带 901。

2.2 褐藻酸降解菌感染对海带过氧化氢酶(CAT)活性的影响

褐藻酸降解菌感染过程中,海带细胞内 CAT 活性的变化规律类似于 SOD 活性的变化。在感染的前 3 d,CAT 活性急剧上升,3 d 后,随着感染时间的延长,CAT 活性逐渐下降(图 2)。但是,就海带 2 个品系间 CAT 活性水平来说,它们在褐藻酸降解菌感染的整个过程中差异都不显著($P > 0.05$)。

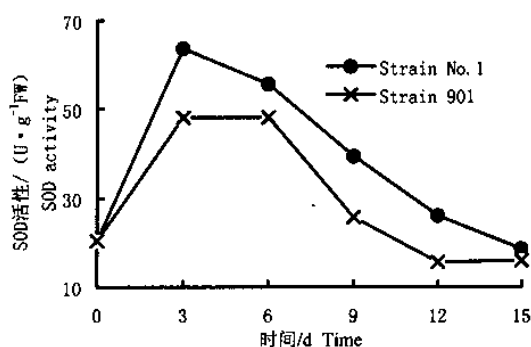


图 1 褐藻酸降解菌感染对海带 SOD 活性的影响

Fig. 1 Effects of infection on SOD activity in *Laminaria japonica*

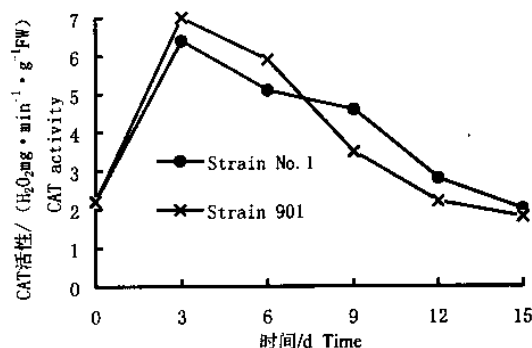


图 2 褐藻酸降解菌感染对海带 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of infection on CAT activity in *Laminaria japonica*

2.3 褐藻酸降解菌感染对海带过氧化物酶(POD)活性的影响

褐藻酸降解菌感染过程中,海带细胞内 POD 活性的变化不同于 SOD 和 CAT 活性的变化规律。在褐藻酸降解菌感染的整个过程中,海带 2 个品系的 POD 活性的变化均不明显,表现出对褐藻酸降解菌感染较高的稳定性。但是 2 个品系间的差异极显著($P < 0.01$),海带荣成 1 号细胞内的 POD 活性远远

高于海带 901(图 3)。

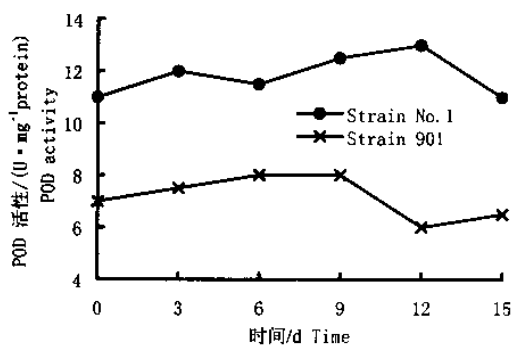


图 3 褐藻酸降解菌感染对海带 POD 活性的影响

Fig.3 Effects of infection on POD activity in *Laminaria japonica*

2.4 褐藻酸降解菌感染对海带脂溶性抗氧化能力的影响

褐藻酸降解菌感染过程中, 海带 2 个品系的脂溶性抗氧化能力的变化规律如图 4 所示, 随着感染时间的延长, 海带荣成 1 号先升后降, 而海带 901 在感染的早期阶段变化不明显, 后期阶段出现下降趋势。在整个感染过程中, 2 者的差异显著 ($P < 0.05$), 海带荣成 1 号的脂溶性抗氧化能力高于海带 901。

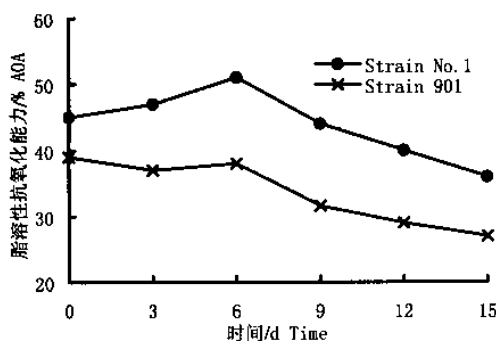


图 4 褐藻酸降解菌感染对海带脂溶性抗氧化能力的影响

Fig.4 Effects of infection on lipid-soluble antioxidative activity in *Laminaria japonica*

2.5 海带 2 个品系对褐藻酸降解菌感染抗性的差异性分析

结果(图 5)显示, 海带荣成 1 号比海带 901 表

现出较高的对褐藻酸降解菌感染的抗性, t 检验表明, 2 者差异显著 ($P < 0.05$)。

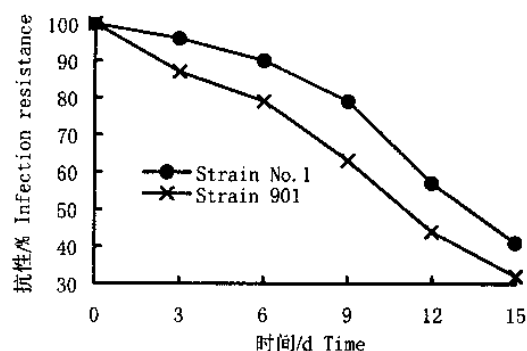


图 5 海带对褐藻酸降解菌感染的抗性差异分析

Fig.5 Difference of infection-resistance against alginic acid decomposing bacteria in *Laminaria japonica*

3 讨论

植物体的抗氧化能力可分为水溶性抗氧化能力和脂溶性抗氧化能力。水溶性抗氧化能力的大小主要取决于几种关键性的抗氧化酶, 如 SOD、POD 和 CAT 等; 而脂溶性抗氧化能力主要取决于细胞的一些脂溶性抗氧化物质, 如胡萝卜素、维生素 E 等。2 种类型的抗氧化系统相互联合、相互补充共同完成生物体抵抗不良环境胁迫的作用。目前发现酶促系统在生物尤其在植物的抗病和抗感染过程中起着重要的作用^[2,3]。Dhindsa 和 Mutowe^[14]认为植物体抗氧化能力的强弱, 尤其 SOD 活性的高低是抗旱性的重要指标。武宝轩等^[15]和 Kalir^[16]的工作也证明植物的抗盐和抗旱力与抗氧化酶(SOD)的活性密切相关, 但 Price 等^[17]却在 10 种植物中发现 8 种在干旱胁迫下其 SOD 和 CAT 活性没有变化, POD 活性有变化但无规律性。本文对海带的研究表明, 褐藻酸降解菌感染下海带荣成 1 号的 SOD 和 POD 活性明显高于海带 901。说明 2 种抗氧化酶-SOD 和 POD 活性的高低与海带对褐藻酸降解菌的抗性密切相关, 且 SOD、POD 在海带抵抗褐藻酸降解菌感染的过程中所起的作用要远远大于 CAT。

脂溶性抗氧化剂在植物的抗逆生理中往往起重要作用。Price 等^[17]报道, 非酶性的抗氧化剂在植物抵御干旱时所起的作用要超过抗氧化酶类。本实验证实, 海带对褐藻酸降解菌的抗性既与抗氧化酶类有关, 又与脂溶性抗氧化能力的强弱密切相关。

总之,无论是酶性和非酶性的,还是水溶性和脂溶性的,其抗氧化能力与植物抗逆性的关系具有植物种类的差异性。综合实验结果认为,海带对褐藻酸降解菌的抗性与细胞总抗氧化能力(水溶性和脂溶性)的强弱有一定的相关性。至于海带细胞的抗氧化系统在抗褐藻酸降解菌感染中的作用过程和作用机制有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemoglobin) [J]. J Bio Chem, 1969, 224: 6 049 - 6 055.
- [2] Elstner E F, Kramer R. Role of the superoxide free radical ion in photosynthetic ascorbate oxidation and ascorbate-mediated photophosphorylation [J]. Biochem Biophys Acta, 1973, 314: 340 - 353.
- [3] 王雅平,刘伊强,施磊,等.小麦对赤霉病抗性不同品种的 SOD 活性[J]. 植物生理学报, 1993, 19(4): 353 - 358.
- [4] 曾呈奎,吴超远. 海带养殖学[M]. 北京: 科学出版社, 1962. 1 - 229.
- [5] Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganism newly isolated from decaying Laminaria [J]. Jap Scient Fish, 1961, 27(4): 339 - 341.
- [6] 陈 笃,林光恒,沈世泽. 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用[J]. 海洋与湖泊, 1979, 10(4): 329 - 332.
- [7] 陈 笃,林光恒,沈世泽. 海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系[J]. 海洋与湖泊, 1981, 12(2): 133 - 137.
- [8] 丁美丽. 环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响的研究[J]. 海洋学报, 1990, 12(2): 224 - 229.
- [9] Bewley J D. Physiological aspects of desiccation tolerance [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1979, 30: 195 - 238.
- [10] Srivastava O P, Huystee P B. Evidence for close association of POD polyphenol oxidase and IAA oxidase isozyme of peanut suspension culture medium [J]. Can J Bot, 1973, 51: 2 207 - 2 215.
- [11] Droillard M J, Paulin A, Massot J C. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petal of cut carnations [J]. Physiologia Plantarum, 1987, 71: 197 - 202.
- [12] McKersie B D, Beversdorf W D, Hunel P. The relationship between ozone insensitivity and lipid-soluble antioxidants [J]. Can J Bot, 1982, 60: 2 682 - 2 691.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Ann Biochem, 1976, 72: 248 - 254.
- [14] Dhindsa R S, Mutowe W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation [J]. J Expt Botany, 1981, 32: 79 - 91.
- [15] 武宝轩, 格林·托德. 小麦幼苗中超氧化物歧化酶活性与幼苗脱水忍耐力相关性的研究[J]. 植物学报, 1985, 27(2): 152 - 160.
- [16] Kalir A, Poliakoff-Mayber A. Changes in activity of malate of *Halimione portulacoides* (L.) aellen exposed to high sodium chloride concentrations [J]. Ann Bot, 1981, 47: 75 - 85.
- [17] Price A H, Hendry G A. Stress and the role of active oxygen scavengers and production enzymes in plants subjected to drought [J]. Biochem Soc Trans, 1992, 17: 493 - 498.

Relationship between resistance against alginic-acid-decomposing bacteria and antioxidative activity in *Laminaria japonica*

TANG Xue-xi, WANG Yan-ling, LI Kui-ran, YANG Zhen

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: Using biochemistry methods, two strains of seaweed *Laminaria japonica* were analyzed. The strains named *L. japonica* No. 1 and *L. japonica* 901 (briefly No. 1 and No. 901), respectively, with body length 1.2-1.5 m. The results show that the resistance against alginic-acid-decomposing bacteria in No. 1 is much higher than that in No. 901, and the activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in No. 1 is significantly higher than that in No. 901, while the activity catalase (CAT) does not show any obvious difference between No. 1 and No. 901. Meanwhile, the lipid-soluble antioxidative activity in No. 1 is also higher than that in No. 901. All the results imply that there exists a close relationship between infection-resistance and antioxidative activity in *L. japonica*. The purpose of this study is to research the biological basis for control of seaweed rot diseases.

Key words: alginic-acid-decomposing bacteria; *Laminaria japonica*; antioxidative activity; resistance