

文章编号:1000-582X(2002)04-0079-05

声波刺激对猕猴桃愈伤组织的生理效应

阳小成,王伯初,段传人,戴传云,贾毅,王秀娟

(重庆大学生物工程学院教育部生物力学与组织工程重点实验室,重庆 400044)

摘要:用强声波处理中华猕猴桃(*Actinidia chinensis planch*)茎段的愈伤组织,研究模拟声场的力学刺激对木本植物愈伤组织生长分化的生理生化效应,并就声波对植物发生作用的可能机理进行了探讨。结果表明,猕猴桃对强声波刺激的应激效应与本实验室此前对草本植物非洲雏菊(*Gerbera Jamesonii acrocarpus*)的研究有相似的结果。即适度频率和强度的声波刺激(1 000 Hz、100 dB)可促进猕猴桃愈伤组织的生长,使胞内可溶性蛋白质含量升高,SOD活性升高,而IAA氧化酶活性降低;但当声波刺激超过一定范围后,愈伤组织的生长受到明显的抑制,可溶性蛋白质含量下降,SOD活性降低而IAA氧化酶活性升高。研究结果显示:植物对外界强声波刺激的应激效应是很明显的。

关键词:声波刺激;中华猕猴桃;愈伤组织;应激效应

中图分类号:Q947

文献标识码:A

生物力学的创始人冯元桢院士说:“应力-生长关系的研究是生物力学活的灵魂”。但以前它的研究对象主要集中在有关动物和人体的医学问题上,对于植物学上的相关问题则重视不够。在生物力学的新兴分支——植物力学(Plant Mechanics)中,我们也借用了应力这一来源于物理学的概念,但对其内涵进行了推广和拓宽,于是就提出了环境应力和植物应激的概念^[1]。

环境应力是指一切自然的或人为施加于植物体的应力,它包括自然和人为两大应力源^[1,2]。植物的生活习性决定了它们大多无法避开环境或人为施加的对其有影响的作用力。国内外许多科学家在研究声波对植物的生长影响时发现:一定强度的音乐刺激能明显地促进植物的生长;Cosgrove(1992)研究了植物细胞生长与应力刺激之间的关系^[3];Lynch和Lintithac(1995)在植物发育过程中对单个细胞进行应力加载实验,并对细胞内应力信号的转导进行了初步探索^[4];Lichterthaler总结了消除应力源的植物再生状况,提出“积极应力”和“消极应力”的概念^[5]。而“应激是植物在各种应力作用于植物体后的一种逐渐适应的生理状态,当应力在阈值范围内时,可以刺激植物的同化作用和植物的生长,当超过一定阈值时,将导致植物的早衰甚至死亡”^[2,6]。可见,应力对植物的作用有正负两方面

的影响,如果我们控制外界应力对植物的作用持续时间和强度,那么对植物的生长发育可能产生有利的效应。

目前关于植物对环境应力刺激效应的研究虽然取得了不少成果,但总的说来仍处于起步阶段,尚有很大的发展空间。此外,从已发表的相关研究的文献来看,植物应激效应的研究主要局限在草本植物上,如烟草、胡萝卜、菊花、苜蓿等^[7-12]。但应用价值更大、研究难度相对也较大的木本植物则少有涉及,因此决定以木本植物猕猴桃为研究对象,就环境应力的一种主要形式——声波对愈伤组织的作用规律和引起其生长的机理作初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 猕猴桃愈伤组织的培养

中华猕猴桃(*Actinidia chinensis planch*)是一种经济价值较高的木质藤本植物,其果实肉厚汁多,酸甜适度,被誉为水果“维C之王”。植物的愈伤组织是一种尚未分化的组织,是植物组织培养过程中的一个重要阶段,愈伤组织细胞处在不断分生状态,容易受培养条件和外加刺激的影响,并将其所受刺激直接通过分化形式的差异表现出来,易于跟踪研究。因此我们选用中华猕猴桃茎段的愈伤组织作为实验材料。

• 收稿日期:2001-12-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770206)

作者简介:阳小成(1965-),男,重庆人,重庆大学博士研究生。主要从事植物组织工程研究。

对于猕猴桃组织培养的培养基,经过对比实验最终选用了经实践检验公认效果最佳的培养基配方(MS培养基附加3%蔗糖、0.75%琼脂、1 mg/l ZT)^[13]。将灭菌后的猕猴桃茎段作为外植体插入此培养基中,并置于温度为25℃,光照时间为12 h·d⁻¹,光照强度为2500 Lux的培养箱中进行培养。约10 d左右产生黄绿色致密的愈伤组织。随后可对其进行继代培养(培养基配方不变),以扩大实验材料的数量。

1.2 研究方法

交变力作用场的研究中采用的装置为本实验室自制的声波发生装置(见图1),采用正弦波的作用方式,在不同频率和不同强度的条件下对猕猴桃茎尖愈伤组织进行刺激,研究声波的有关生物学效应。

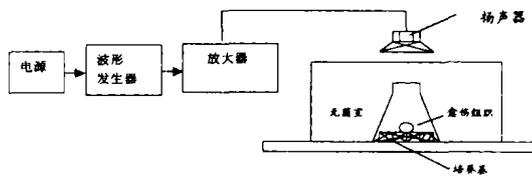


图1 声波发生装置示意图

这一声波加载装置主要是由电源、放大器、波形发生器和扬声器组成。我们可以通过放大器来调节声波的强度,通过波形发生器来调节声波的频率,这样就可控制声波的强度和频率,进而调节交变应力作用的大小,扬声器与愈伤组织块的距离约为20 cm。

将培养于三角瓶中的猕猴桃愈伤组织置于无菌小箱中进行加载处理。由于声波的物理参数是由频率和强度2个指标共同决定的。因此,我们采用单因子实验设计,实验分为2大组。首先固定声波在某一频率(1000 Hz),选取声波的强度分别为90 dB,95 dB,100 dB,105 dB和110 dB共5组进行加载处理,另加1个不做任何处理的对照组(CK)供对比;对另一大组,我们则先固定声波在某一强度(100 dB),再选取声波频率分别为100 Hz,500 Hz,1000 Hz,2000 Hz和5000 Hz共5组进行加载处理,并同样附加一个对照组(CK)。我们

对这2个实验组每次在声场中均刺激60 min,每天作用1次,连续作用20 d,然后在无刺激作用下于恒温光照培养箱中培养10 d,再将这些愈伤组织块用于后面的各项生理指标的测定。

经综合分析,我们在实验前后分别选取测定:愈伤组织的生长率、可溶性蛋白质的含量、SOD活性和IAA氧化酶活性的变化等4个意义较大、可较全面客观反映植物生长发育状况的生理生化指标,来研究考察强声波刺激对猕猴桃愈伤组织生长发育的影响(即植物的应激效应),并尝试探讨其影响植物生长的内在机制。

1.2.1 愈伤组织生长的测定

愈伤组织鲜重的变化是反映细胞增殖状况的一个最直接的指标,因而也是考察植物组织生长发育状况的直观、有效的依据。我们在进行声波刺激前,每组样品(即CK和5组刺激组)均用电子天秤称量愈伤组织块的鲜重,声波刺激培养20 d后,再称量愈伤组织块的鲜重,由此可得到各组鲜重的增加率。

1.2.2 可溶性蛋白质含量的测定

对可溶性蛋白质含量的测定按Bradford的方法(即考马斯亮蓝G-250测定法)详见参考文献[14]。

1.2.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

SOD活性的测定采用Giannoplitis和Ries的方法,以抑制光化还原NBT(氯化硝基四氮唑蓝)50%为一个酶活性单位。详见参考文献[15]

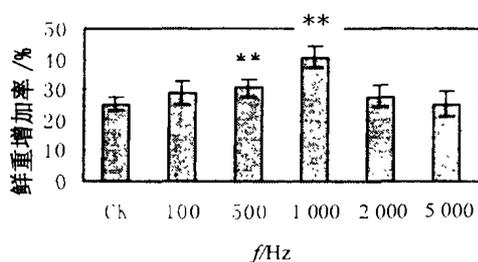
1.2.4 IAA氧化酶活性的测定

IAA氧化酶活性的测定参照蔡武城等人的方法。其原理是根据吲哚乙酸(IAA)在无机酸存在的条件下与FeCl₃作用生成红色螯合物,可用比色法进行测定。详见参考文献[16]

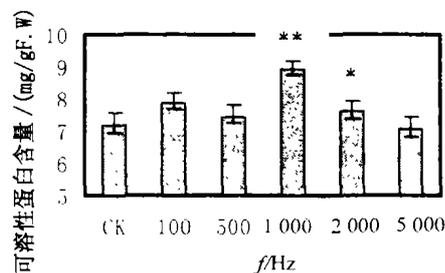
2 结果与分析

2.1 强度固定(100 dB)而频率不同的声波刺激对愈伤组织的生理效应

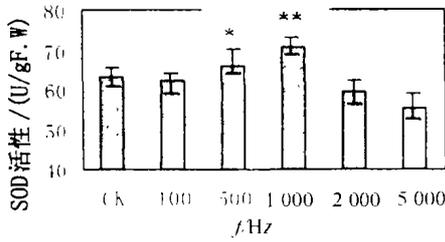
实验结果见图2。



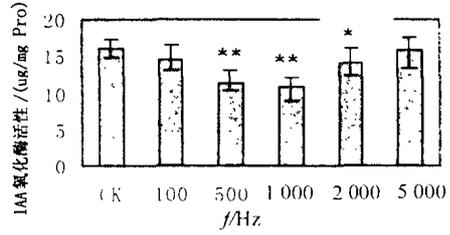
a. 对愈伤组织生长的影响



b. 对可溶性蛋白质含量的影响



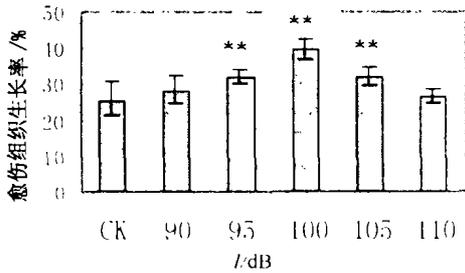
c. 对 SOD 活性的影响



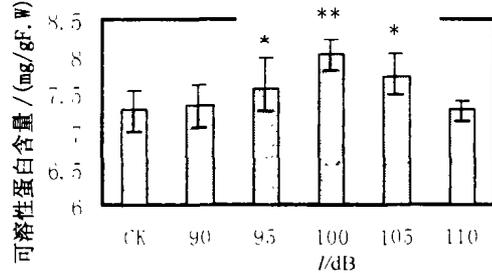
d. 对 IAA 氧化酶活性的影响

图 2 强度一定(100 dB)而频率不同的声波刺激对猕猴桃愈伤组织部分生理指标的影响

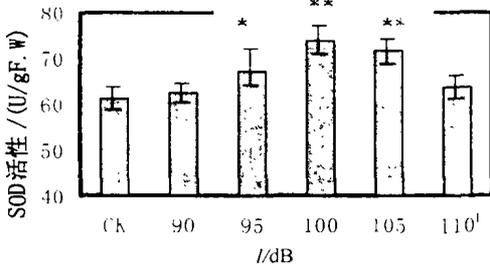
2.2 频率固定(1 000 Hz)而强度不同的声波刺激对愈伤组织的生理效应



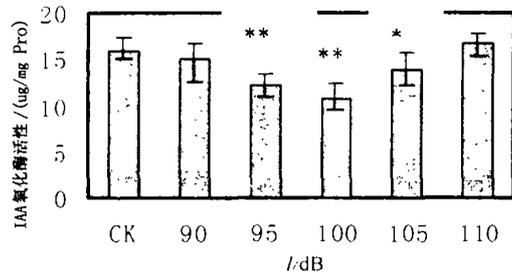
a. 对愈伤组织生长的影响



b. 对可溶性蛋白质含量的影响



c. 对 SOD 活性的影响



d. 对 IAA 氧化酶活性的影响

图 3 频率一定(1 000 Hz)而强度不同的声波刺激对猕猴桃愈伤组织部分生理指标的影响

从图表中提供的各个实验结果可以看到:无论声波的强度和频率如何组合,声波刺激组的这几个生理指标的测定值几乎都优于相应对照组(CK)的值,但是其各自的促进作用与声波的强度和频率有着密切的相关性。其中以 1 000 Hz 组和 100 dB 组的促进效果最明显。研究表明,声波刺激对猕猴桃愈伤组织的生长发育有着增强和抑制的双重作用,这种调节作用与声波的频率和强度有关。总体而言,当声波强度定在 100 dB 时,若频率低于 1 000 Hz,产生促进愈伤组织的效果;当声波频率高于 1 000 Hz 时,则开始抑制生长,且抑制作用随着声波频率的增加而增加;反过来,当声波频率定在 1 000 Hz 时,若声波强度低于 100 dB 时,均产生促进愈伤组织生长的效果;当声波强度大于 100 dB 时,则抑制生长,且抑制作用随着声波频率的增加而增

加。我们重复 3 次实验,所得结果几乎完全一致。有关实验结果见图 3。可见其与前者有着相似的研究结果。

加。我们重复 3 次实验,所得结果几乎完全一致。

实验结果表明,声波刺激对猕猴桃愈伤组织的生长发育起着增强或抑制的双重作用。这种调节作用与刺激的频率和强度有关:当声波频率低于 1 000 Hz 或强度低于 100 dB 时,几乎均产生促进愈伤组织生长发育的效果;当频率和强度大于上述范围时,则开始抑制生长,且抑制作用随着声场的频率和强度的增加而增加。

3 讨 论

通过上面对猕猴桃愈伤组织生长密切相关的几个生理生化指标的测定,我们可以发现:强声波刺激对猕猴桃愈伤组织生长、发育和细胞分裂有着很重要的影响。从实验结果来看,愈伤组织的鲜重、SOD 活性、可溶性蛋白质的含量等 3 个指标随着声波刺激程度的增

加,从总体趋势来看有所增加,能促进植物健壮生长,并且均在频率为 1 000 Hz 或声强为 100 dB 时作用效果最明显;此后若声波刺激再增加,上述生理生化指标又有较显著的降低,表明过高频率和强度的声波刺激抑制植物体的生长发育。IAA 氧化酶活性的变化则刚好与前面几个指标相反,但具有同等的生理意义。这一研究表明了声波刺激对猕猴桃愈伤组织的生长具有明显的双向效应。可以认为,适度的声波刺激有利于植物细胞生理活性的提高,而过高强度的应力刺激对细胞来说已不是一种常规意义上信号刺激,而是一种机械性的损伤。

这一结果与本实验室此前对草本植物非洲雏菊 (*Gerbera Jamesonii acrocarpous*) 机械振荡的应激效应的研究结果有较大的相似性^[8],说明外界环境的应力刺激对植物生长的促进作用是有一定普遍意义的,相关研究证明:环境因子对植物的生长发育、繁殖、衰老等生理过程有着深刻的影响。轻微的环境变化可以促进细胞的同化作用,改善植物的生理活性,有利于植物生长。但应力所引起的生物学效应及其作用机理的研究是一个相当复杂的问题,虽然现在关于应力信号转导的研究较多,但要得到满意的解释却很难。我们尝试从微观的细胞和分子生物学角度探讨应力对植物的作用机理。

声波刺激可以不同程度的促进可溶性蛋白质含量的增加,对于较低频率的声波刺激使可溶性蛋白质的含量上升,这可能是在轻微的声场作用下,细胞中形成了有利于基因表达的环境,从而使某些基因表达的频率增强和细胞内蛋白质合成酶的活性升高,为细胞分裂做充分的准备,并提供了很好的物质基础,从而促进植物生长;当声波刺激超出一定范围后,可溶性蛋白含量呈明显的下降趋势,这可能是由于细胞内微环境的平衡被破坏,细胞要调整微环境的平衡需要消耗大量的能量,尤其是 DNA 受到损伤,这样使其合成受阻,分解加强,从而导致了蛋白质含量的下降。

SOD(即超氧化物歧化酶)是造成植物多种伤害的活性氧的一种有效清除剂,其活性的大小与植物抗病、抗逆境胁迫、抗衰老等有关,同时也与细胞分裂和分化有一定的关系,很多实验也证明了 SOD 活性与愈伤组织的生长呈正相关^[11,12]。植物的光合、呼吸和某些酶促反应具有产生活性氧的能力,而这些活性氧在体内的积累会导致细胞内核酸分子的断裂、多糖的解聚、不饱和脂肪酸的过氧化作用、蛋白质的交联和聚合等,从而导致细胞膜结构的破坏和细胞的损伤,甚至死亡。研究证明:活性氧伤害植物的机理之一在于它能够启

动膜脂过氧化或膜脂脱酯作用,从而破坏膜的结构。与植物活性氧产生的多条途径相对应,植物在长期进化中形成极为复杂的内源保护系统,而 SOD 处于抵御活性氧的“第一道防线”,当有适当强度的声波刺激时,SOD 活性上升,以清除声波刺激产生的自由基,使细胞内保持一个稳定的有利于生长的环境;当声波刺激强度超一定阈值后,则其活性下降,氧自由基又积累起来伤害植物体。这说明 SOD 对声波刺激产生破坏的调控保护作用是有一定限度的。

生长素(IAA)是细胞分裂生长所必需的微量物质,IAA 含量的高低与愈伤组织形成的快慢有关。植物体内 IAA 分解主要是由 IAA 氧化酶和过氧化物酶(POD)调节,IAA 氧化酶的活性越高,则体内 IAA 含量越少,生长受抑制的程度就越大;反之,则促进愈伤组织生长。在声波的刺激下,猕猴桃愈伤组织内 IAA 氧化酶活性的变化趋势与另几个生理指标的变化刚好相反,说明适当频率和强度的声波刺激降低了 IAA 氧化酶的活力,从而有利于 IAA 的生成,促进植物的生长。至于声波究竟是如何影响 IAA 氧化酶活性大小的,尚待更深入研究。

总之,物理刺激(包括机械振荡、静电磁场和强声波处理等)对农作物和其他经济植物生长发育的促进作用已为国内外科学家的研究所证实。实际上,大量不同的应力源通过不同方式产生的作用都导致一些相似的植物生理反应^[8,11,12]。但这些研究许多至今仍停留在实验研究的阶段,有待在今后的生产实践中对这些研究成果加以进一步的应用推广,而且对其详细作用机理的探索也有待进一步加强。

参考文献:

- [1] 王伯初,段传人,龙雪峰,等. 植物应激效应的研究[J]. 中国学术期刊文摘,1999,5(7):924-925.
- [2] ALSCHER R G, CUMMING. Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation as mechanism[M]. New York: Wiley-Liss, 1990.
- [3] DANIEL J, COSGROVE. Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth[J]. New Phytol, 1993, 124: 1-23.
- [4] TIMOTHY M. LYNCH, PHILIP M. LINTILHAC. Mechanical signals in plant development: A new method for single cell studies[J]. Developmental Biology, 1997, 181: 246-256.
- [5] LIGHTENTHALER H K. Plant stress detection by reflectance and fluorescence[M]. Ann. N. Y. Acad. Sci, 1998.
- [6] NUCCITELLI R, Erickson C A[J]. Exp cell. Res, 1983, 147: 195-201.
- [7] WANG B C, WANG H C, ZHAO Y Y, LIU. The effects of alternative stress on the cell membrane deformability of

- Chrysanthemum cells [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001, 20: 321 - 325.
- [8] WANG B C, LONG X F, DUAN C R, et al. Response of *Gerbera Jamesonii* Acrocarpous Callus Stimulated By Mechanical Vibration[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerface, 2001, 21: 253 - 257.
- [9] WANG B C, AKIO YOSHIKOSHI, AKIO SAKANISHI. Carrot Cell Growth Response in A Stimulated Ultrasonic Environment [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1998, 12: 89 - 95.
- [10] LIU Y Y, WANG B C, ZHAO H C. Alternative Stress Effects on the Ca^{2+} Distribution In the Chrysanthemum Callus Cells [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001, 22: 245 - 249.
- [11] 孙克利, 席保树, 蔡国友, 等. 交变应力作用下烟草细胞热力学相行为的研究[J]. 生物物理学报, 1999, 15(3): 579 - 582.
- [12] 赵剑, 杨文杰, 马福荣, 等. 高压静电场(HVEF)对苜蓿叶片愈伤组织增殖的影响[J]. 生物物理学报, 1997, 13(2): 255 - 256.
- [13] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996.

Brief Study on Physiological Effects of Sound Field on *Actinidia Chinensis* Callus

YANG Xiao - cheng, WANG Bo - chu, DUAN Chuan - ren,
DAI Chuan - yun, JIA Yi, WANG Xiu - juan

(Bioengineering college of Chongqing University, Key Lab for Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

Abstract: Insight into the relationship between plant cell (tissue) and physical stimulation is a focus of biomechanics. In this study, several important plant physiological indexes of *Actinidia chinensis* callus in sound field including the content of soluble proteins, the activity of SOD, the activity of IAA oxidase and the penetrability of cell membrane, were measured. Some information is got about stress effect through the study and try to explore its mechanism. From the result of experiment, we found that there were a great similarity of stress effect on sound field between *Actinidia chinensis* and *Gerbera Jamesonii acrocarpous*, a kind of herbage plant, which had been studied in our lab before. That is to say, the sound field also has dual effect on woody plant. It can enhance or inhibit the growth and development of *Actinidia chinensis* callus along with the sound field frequency, and the moderate frequency of sound field acting on the callus could promote callus growth. A conclusion is drawn that the optimal stimulation of sound field are 100 dB and 1 000 Hz. Under the conditions, the sound field can distinctly enhance the growth of *Actinidia chinensis* callus. Whereas, it is not very easy to explore the detail mechanism of environmental stress effects on plant. This paper discussed the mechanism of sound field stress on plant from the level of cell and molecule.

Key words: actinidia chinensis; sound field; callus; stress effect

(责任编辑 陈移峰)