

脱毒骏枣幼树叶片活性氧代谢的研究

刘 和 郭 艳* 宋金龙

(山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801)

摘 要: 大田自然生长条件下脱毒骏枣幼树叶片的超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 生成速率、过氧化氢 (H_2O_2)、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、抗坏血酸 (AsA) 含量以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性的变化规律与对照未脱毒骏枣幼树叶片相应各指标的变化规律基本一致。生长前期脱毒骏枣幼树叶片的 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率、 H_2O_2 、MDA 含量以及 SOD、POD、CAT、GR、APX 活性都低于对照, 并且随着树体的不断生长, 差异越来越明显。后期除 $O_2^{\cdot-}$ 生成速率、 H_2O_2 、MDA 含量仍显著低于对照外, 其它各指标均显著高于对照。脱毒幼树叶片的 AsA 含量在整个生长期都高于对照, 前期差异不显著, 中后期差异显著。试验结果表明, 脱毒骏枣与未脱毒骏枣相比具有较低的活性氧水平和较强的活性氧清除能力, 在生长后期表现出较强的抗性。

关键词: 枣; 脱毒; 活性氧代谢; 保护酶

中图分类号: S 665.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 05-0969-05

Studies on Metabolism of Active Oxygen Species in the Leaves of Young Virus-free Trees of *Ziziphus jujuba* 'Junzao'

Liu He, Guo Yan*, and Song Jinlong

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: The dynamics of the generation rate of $O_2^{\cdot-}$, the contents of H_2O_2 , MDA, GSH, AsA and the activities of SOD, POD, CAT, GR, APX in the leaves of virus-free *Ziziphus jujuba* Mill 'Junzao' trees were similar with those in leaves of common 'Junzao' trees. The generation rate of $O_2^{\cdot-}$, the contents of H_2O_2 , MDA, GSH, AsA and activities of SOD, POD, CAT, GR, APX in the leaves of virus-free 'Junzao' trees were lower than those of common 'Junzao' trees in the early period of growth. The differences became significant with the growth of trees. In the later period of growth, most indexes in the leaves of virus-free 'Junzao' trees were higher than those of common 'Junzao' trees except the generation rate of $O_2^{\cdot-}$, the contents of H_2O_2 and MDA. However, the content of AsA in the leaves of virus-free 'Junzao' trees was higher than that of common 'Junzao' trees throughout the growth period, and the difference was significant only in later period of growth. The results showed that there were lower reactive oxygen species (ROS) content and stronger ability to clean out the ROS in virus-free 'Junzao' trees than those in common 'Junzao' trees.

Key words: *Ziziphus jujuba*; Virus-free; ROS metabolism; Protective enzyme

植物体内活性氧具有广泛的生理生化效应, 对生命有双重作用, 与植物的抗逆性密切相关^[1~3]。目前对脱毒果树的研究多集中在脱毒方法、树体的生长结果习性和光合特性以及叶片内含物的变化等方面^[4~6], 而对活性氧代谢方面的研究较少, 在脱毒枣树上未见报道。作者以山西著名枣品种 '骏枣' 为试材, 进行了脱毒与未脱毒幼树在大田自然生长条件下叶片内活性氧代谢规律的研究, 旨在探索脱毒骏枣幼树树体内活性氧代谢特点, 为枣树的无毒化栽培提供理论依据。

收稿日期: 2006-02-28; 修回日期: 2006-07-06

* 现工作单位为山西林业职业技术学院园艺系, 邮编 030009。

1 材料与方法

试验于 2004 年 5 ~ 12 月在山西农业大学园艺站和生命科学学院中心实验室进行。试材骏枣 (*Ziziphus jujuba* Mill 'Junzao') 来自山西农业大学农学院生物技术系, 为大田 3 年生脱毒 (采用茎尖脱毒方法脱除枣疯病病毒) 自根幼树、脱毒嫁接幼树 (砧木为酸枣 *Ziziphus spinosa* Hu)、未脱毒自根幼树和未脱毒嫁接幼树。试验田地平整, 土质为壤土, 肥力一般。骏枣为南北行栽植, 株行距为 2 m × 4 m。

4 株为一小区, 3 次重复, 每个处理 12 株, 顺序排列。在试验期间苗木自然生长, 不浇水、不施肥、不打药, 只定期除草。于 5 月 16 日、6 月 16 日、7 月 16 日、8 月 5 日、8 月 25 日和 9 月 21 日 (均为晴天) 的上午 9 时, 分别采取各处理植株上正南方 2 年生健壮永久性二次枝第 3 ~ 4 节枣股抽生枣吊的第 3 ~ 5 片叶, 每株取 20 片, 混合在一起, 用液氮速冻, 保存在 - 75 的超低温冰箱中用于测定 O_2^- 生成速率^[7], H_2O_2 含量^[8], MDA 含量^[9], SOD、POD、CAT 活性^[10], APX 活性^[11], GR 活性^[12], GSH 含量^[13], A SA 含量^[14] 和蛋白质含量^[15]。每个指标每次测定 3 次, 取平均值。试验结果进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 脱毒骏枣幼树叶片 O_2^- 生成速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的变化

在整个生长季节, 脱毒骏枣幼树叶片的 O_2^- 生成速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的变化趋势与对照未脱毒树基本相同。

H_2O_2 和 MDA 含量的变化更趋一致, 但二者与 O_2^- 生成速率的变化在生长前期略有不同。如图 1 所示, 5 月 16 日 ~ 7 月 16 日脱毒骏枣与对照的 H_2O_2 含量和 MDA 含量先升高后降低, 而 O_2^- 的生成速率此期却持续下降, 于 7 月 16 日降到最低。7 月 16 日之后, O_2^- 生成速率、 H_2O_2 含量与 MDA 含量均逐渐回升。

方差分析表明, 脱毒幼树 O_2^- 生成速率、 H_2O_2 含量和 MDA 含量均显著 ($P < 0.05$, 下同) 低于未脱毒幼树 (MDA 含量在 8 月 5 日所测结果除外)。

2.2 脱毒骏枣幼树叶片 SOD、POD、CAT 和 APX 活性的变化

脱毒幼树的 SOD 活性变化趋势与对照基本一致, 总体呈先升高后降低的动态变化 (图 2)。方差分析表明, 6 月 16 日、7 月 16 日和 8 月 5 日脱毒幼树的 SOD 活性都显著低于未脱毒幼树, 而到 8 月 25 日和 9 月 21 日又显著高于未脱毒幼树。

生长期脱毒幼树 POD、CAT 和 APX 活性变化趋势与未脱毒幼树一致, 且三者均表现出先降低后回升又降低的动态变化 (图 2)。

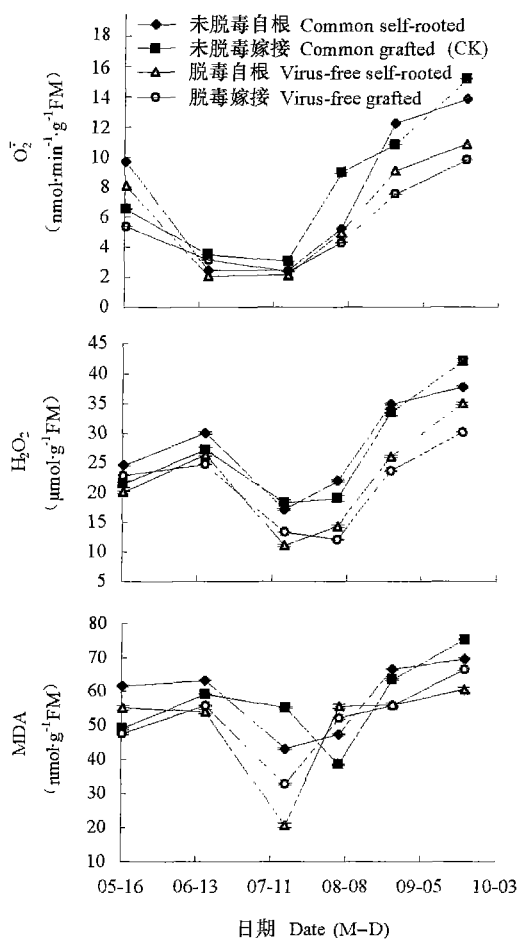


图 1 生长期骏枣叶片的 O_2^- 生成速率、 H_2O_2 含量和 MDA 含量
Fig. 1 The generation rate of O_2^- , contents of H_2O_2 and MDA in *Z. jujuba* 'Junzao' leaves during the period of growth

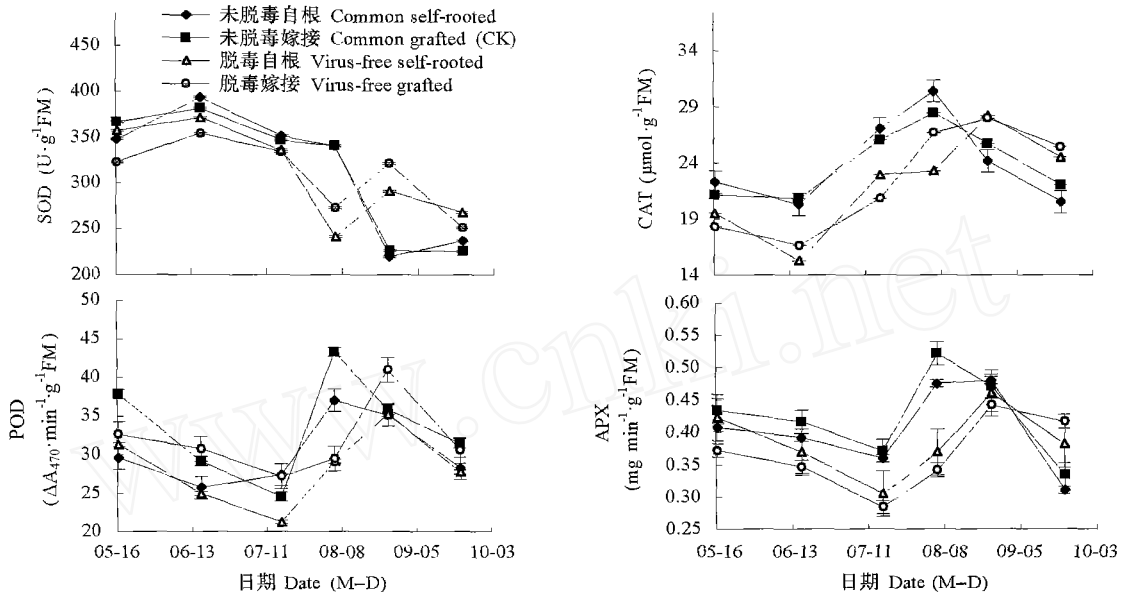


图 2 生长期骏枣叶片的 SOD、POD、CAT 和 APX 活性

Fig. 2 The activities of SOD, POD, CAT and APX in *Z. jujuba* 'Junzao' leaves during the period of growth

APX 活性变化规律与 POD 更为相似，均在 7 月 16 日降到生长前期的最低值，CAT 的变化规律与二者略有不同，在 6 月 16 日就降到了最低值。与对照相比，脱毒幼树的 POD、CAT 和 APX 活性在 6 月 16 日、7 月 16 日（POD 除外）和 8 月 5 日均显著低于对照，在 9 月 21 日显著高于对照（POD 除外）。

2.3 脱毒骏枣幼树叶片 AsA、GSH 含量和 GR 活性的变化

脱毒骏枣叶片的 AsA 含量在生长期呈现先升后降又升，8 月 5 日达到峰值后持续下降的变化；而对照逐渐升高，6 月 16 日即达到峰值，而后一直降低（图 3）。脱毒骏枣的 AsA 含量整个生长期都高于对照，在生长后期的 8 月 5 日、8 月 25 日和 9 月 21 日差异显著。

脱毒幼树与未脱毒幼树 GSH 含量的变化相同，前期逐渐升高，到 7 月 16 日达到峰值，之后持续降低（图 3）。整个生长时期脱毒幼树 GSH 含量都低于对照，7 月 16 日和 9 月 21 日差异显著。脱毒幼树 GR 活性的变化趋势与对照相同，均呈先升高后降低的变化（图 3）。脱毒幼树与未脱毒骏枣相比 GR 活性的变化幅度较小，并且在生长后期（9 月 21 日测的结果）显著高于对照，其它时期均低于对照，其中 6 月 16 日、7 月 16 日和 8 月 5 日差异显著。

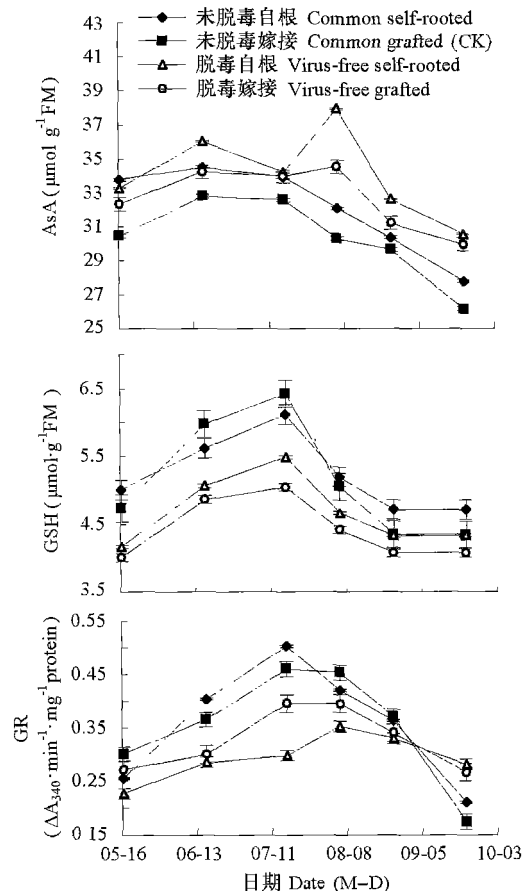


图 3 生长期骏枣叶片的 AsA 和 GSH 含量及 GR 活性

Fig. 3 The content of AsA and GSH, and the activity of GR in *Z. jujuba* 'Junzao' leaves during the period of growth

3 讨论

3.1 脱毒骏枣幼树叶片活性氧及膜脂过氧化

试验结果显示,在生长期的绝大部分时间(6月16日~9月21日)骏枣叶片MDA含量的变化趋势与 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量的变化一致,只在幼叶期(5月16日~6月16日) O_2^- 生成速率相反,其原因可能是 O_2^- 被SOD歧化后生成了 H_2O_2 ^[16]。相比之下,MDA含量与 H_2O_2 含量的变化相关性更密切,这说明 H_2O_2 对细胞膜的损伤比 O_2^- 更强。因为枣叶片中富含 Fe^{2+} ,它很容易与 H_2O_2 发生Fenton反应后生成 $\cdot\text{OH}$ ^[17], $\cdot\text{OH}$ 是极强的氧化剂,一旦产生,它就会立刻氧化临近的任何分子,而且 H_2O_2 以分子状态可以扩散到很远的距离,作用时间更长,对细胞膜的伤害更大^[18]。

在生长期脱毒幼树叶片的 O_2^- 生成速率、 H_2O_2 含量及MDA含量比未脱毒幼树低的试验结果说明,在相同的生长条件下未脱毒苗叶片受到活性氧伤害的程度较脱毒苗大,膜脂过氧化程度高。这可能与病毒侵染树体后在树体活细胞内繁殖消耗,及其代谢产物的毒害作用影响树体正常生理代谢,促进树体活细胞衰老和死亡有关^[19]。

3.2 脱毒骏枣幼树叶片活性氧与酶促保护

试验结果表明,脱毒与未脱毒骏枣叶片SOD和 O_2^- 之间,POD、CAT、APX与 H_2O_2 之间在生长期呈此消彼长的动态变化。5月16日~6月16日, O_2^- 生成速率持续下降而SOD活性持续上升;6月16日~7月16日 O_2^- 生成速率变化不大,7月16日以后持续上升,而6月16日~9月21日SOD水平总体呈下降趋势,二者变化是相反的。POD、CAT和APX活性变化规律相同,都经历了先降低后升高而后再降低的动态变化,与 H_2O_2 含量的变化正好相反。

脱毒幼树叶片SOD、POD、CAT和APX活性在生长前期低于未脱毒幼树,在后期却显著高于未脱毒幼树。如此变化的原因以及这4种酶活性是否直接受 O_2^- 和 H_2O_2 的诱导,还需要进一步研究。Zheng等^[20]研究了黄瓜幼苗从长出第3片幼叶起直到该叶充分展开为止这个时间段中SOD和GP以及脂溶性抗氧化剂的变化,发现叶片幼龄期防御活性氧的能力很强,由活性氧引发的脂类过氧化相应较弱,而叶片衰老时防御活性氧的能力下降,活性氧引发的脂类过氧化就增强。据本试验结果结合前人的研究可以认为,脱毒幼树与对照相比,在生长后期叶片SOD、POD、CAT和APX活性较高,说明后期脱毒幼树叶片抗衰老能力较强。

3.3 脱毒骏枣幼树叶片活性氧与AsA、GSH

AsA、GSH在清除活性氧的过程中起着重要作用^[21,22]。试验结果显示,骏枣幼树叶片AsA、GSH含量在生长前期逐渐上升, O_2^- 生成速率及 H_2O_2 含量呈现下降趋势;生长后期AsA、GSH含量不断下降,清除活性氧能力减弱,而 O_2^- 生成速率及 H_2O_2 含量持续上升。GSH是GR催化反应的产物^[23],因而脱毒与未脱毒骏枣叶片内的GSH含量和GR活性的变化均保持一致。

脱毒骏枣幼树叶片GR与SOD、POD、CAT及APX的变化相似,在生长前期低于未脱毒幼树,在生长后期显著高于未脱毒苗。而AsA含量在整个生长期内一直高于对照,GSH却一直低于对照,这与抗氧化酶的变化特点不同,其原因尚不明确。

总之,与未脱毒骏枣相比,脱毒骏枣幼树叶片活性氧物质 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量较低;在生长后期SOD、POD、CAT、GR和APX 5种保护酶的活性以及活性氧清除剂AsA的含量较高,其清除活性氧的能力较强,说明脱毒可延缓因活性氧引起的叶片的衰老。

参考文献:

- 1 Burdon R H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18 (4): 775~794
- 2 Wolin M S, Mohazzab H K M. Mediation of signal transduction by oxidants. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant de-*

- fenses New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 21~48
- 3 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学通讯, 1991, 27 (2): 84~90
Chen S Y. Injury of membrane peroxidation on plant cell Plant Physiology Communications, 1991, 27 (2): 84~90 (in Chinese)
- 4 廖明安, 冷怀琼. 苹果无病毒与带病毒幼树某些内含物及生育的差别. 中国果树, 1993 (2): 6~8
Liao M A, Leng H Q. The difference of some substance and development in between virus-free and virus-infected apple trees China Fruits, 1993 (2): 6~8 (in Chinese)
- 5 李焕秀, 廖明安. 苹果无病毒和带病毒品种生理生化特性的研究初报. 四川农业大学学报, 1993 (2): 277~281
Li H X, Liao M A. Studies of physiological, growing and fruiting properties of virus-free and virus-infected apple trees J. Sichuan Agric Univ, 1993 (2): 277~281 (in Chinese)
- 6 项殿芳, 宋金耀, 刘永军, 章德明, 陈霜莹. 脱毒对苹果苗木和砧木的过氧化物酶、硝酸还原酶及蛋白质、氨基酸含量的影响. 华北农学报, 1995 (2): 82~86
Xiang D F, Song J Y, Liu Y J, Zhang D M, Chen S Y. Effects of virus-free treatment on the activities of peroxidase and nitrate reductase and nitrogen metabolism in apple trees Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1995 (2): 82~86 (in Chinese)
- 7 王爱国, 罗广华, 邵从本. 植物的氧化代谢和活性氧对细胞的伤害. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1989, 5: 11~23
Wang A G, Luo G H, Shao C B. Oxygen metabolism and the injury of reactive oxygen species on cell in plant The Journals of Institute of Botany in South China, Chinese Academy of Sciences, 1989, 5: 11~23 (in Chinese)
- 8 林植芳, 林桂珠, 李双顺, 赵成学. 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 累积与膜脂过氧化的关系. 植物生理学报, 1988, 14: 16~22
Lin Z F, Lin G Z, Li S S, Zhao C X. Relation between the accumulation of H_2O_2 and the cell membrane peroxidation in aging leaf and chloroplast Journal of Plant Physiology, 1988, 14: 16~22 (in Chinese)
- 9 汤章诚. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 305
Tang Z C. Experimental guide of modern plant physiology. Beijing: Science Press, 1999. 305 (in Chinese)
- 10 朱广廉, 钟梅文, 张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 1990. 37~40
Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. Experiments of plant physiology. Beijing: Beijing University Press, 1999. 37~40 (in Chinese)
- 11 Gossett D R. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton Crop Science, 1994, 34: 706
- 12 Knorzer O C, Dumer J, Boger P. Alteration in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (Glycine max) induced by oxidative stress Physiol Plantarum, 1996, 97: 388~396
- 13 王娟, 李德全. 水分胁迫对玉米根系 AsA-GSH 循环及 H_2O_2 含量的影响. 中国生态农业学报, 2002, 10 (2): 95~96
Wang J, Li D Q. Effects of water stress on AsA-GSH cycle and H_2O_2 content in maize root Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2002, 10 (2): 95~96 (in Chinese)
- 14 Cakmak, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves Plant Physiol, 1992, 98: 1222~1227
- 15 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding Anal Biochem, 1976, 44: 276~287
- 16 方允中, 郑荣梁, 沈文梅. 自由基生命科学进展 (第1集). 北京: 原子能出版社, 1993. 70~75
Fang Y Z, Zheng R L, Shen W M. Advances in free radical life sciences (vol 1). Beijing: Atomic Energy Press, 1993. 70~75 (in Chinese)
- 17 Nonhebel D C, Walton J C. Free radical chemistry, structure and mechanism. Cambridge: University Press, 1974. 1~28
- 18 Simic M G, Bergtold D S, Karam L R. Generation of oxygen radicals in biosystems Mutation Res, 1989, 214: 3~12
- 19 王际轩. 苹果的无病毒栽培与发展前景. 北方果树, 1995 (3): 3~5
Wang J X. Cultivating and improvement of virus-free apple trees Northern Fruits, 1995 (3): 3~5 (in Chinese)
- 20 Zheng R L, Yang Z T. Lipid peroxidation and oxidative defence systems in early leaf growth Plant Grow. Reg, 1991, 10 (1): 187~189
- 21 Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 249~279
- 22 Bors W, Saran M. Radical scavenging favonoid antioxidants Free Radic. Res. Comms, 1987, 2 (4-6): 289~294
- 23 Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of seglutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress Free Radica Biol Med, 1994, 17 (3): 235~248