

甲基紫精滴注法快速衡量香蕉抗氧化能力的初步试验

柯德森 徐志防 孙谷畴

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘 要: 滴注在香蕉 (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) 叶片表面上的甲基紫精 (Methyl Viologen, $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 液滴, 经过 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照 10 h, 可在滴注位点周围形成明显的褐色损伤斑点。通过测定香蕉叶片主要抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性, 发现褐斑直径与 SOD 和 CAT 活性呈明显的负相关, 说明甲基紫精褐斑直径与香蕉抗氧化能力之间具有密切的关系。外源活性氧处理引起的叶片膜脂过氧化损伤与甲基紫精褐斑直径呈正相关, 表明利用甲基紫精滴注法快速衡量香蕉抗氧化能力的可行性。

关键词: 香蕉; 甲基紫精; 抗氧化能力; 活性氧

中图分类号: S 662. 9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0319-03

1 目的、材料与方法

决定某种植物是否适合在特定的胁迫环境下生长的时候, 其抗氧化能力是必须考虑的重要因素。衡量植物的抗氧化能力必须综合考虑各种因素和指标, 是一个非常繁琐的过程, 而且测定过程必须匀浆组织, 也可能使测出的结果偏离完整组织中的实际情况。因此, 建立一套无须破坏组织完整性的快速简便的衡量方法就显得很重要。甲基紫精又名百草枯 (Paraquat), 是一种常用的活性氧自由基源^[1]。滴注在植物叶片上的甲基紫精液滴渗入到叶表皮细胞中, 当叶绿体发生光合电子传递的时候将一个电子传递给甲基紫精使其产生超氧阴离子自由基 (O_2^-)^[2], 生成的 O_2^- 造成了液滴周围细胞的损伤而形成褐色的斑点。我们在利用甲基紫精处理香蕉叶片的试验中发现, 滴注在香蕉叶片表面上的甲基紫精液滴所形成的褐色斑点的大小, 与香蕉本身的抗氧化能力可能具有某种相关关系, 对此我们进行了探讨。

材料为盆栽 (玻璃温室, 温度 30°C 左右, 每天自然光照 9 h) 25 d 的两个香蕉 (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) 品种 (威廉斯、巴西) 幼苗, 苗高约 60 cm。选长势基本一致的 20 株幼苗分别于 6、10、15、18 和 25°C 培养 18 h, 再回到 30°C 适应 5 h, 目的是人为造成株间抗氧化能力及其他生理生化性质的差异。取顶端第 2 片叶子 (叶长约 15 cm, 共 20 片) 为材料。将一滤纸圆片用蒸馏水均匀润湿, 置于一干净培养皿内, 叶片用蒸馏水洗干净, 充分展平于滤纸上。用微量注射器取 $5 \mu\text{L}$ 甲基紫精滴注于叶片正面使成一均匀液滴, 每一叶片滴注 10 点。将培养皿置于光照培养箱中, 25°C 下 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照 10 h, 测量每个液滴形成的褐斑的直径, 取 10 个褐斑直径的平均值。测定叶片 SOD、CAT 活性及丙二醛含量^[3~5]。

2 结果与分析

2.1 甲基紫精最适浓度的确定

分别取正常生长和经过 6°C 低温处理 18 h 的香蕉幼苗叶片用甲基紫精滴注, 从图 1 可见, 无论对

收稿日期: 2002-06-25; 修回日期: 2002-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39670070); 广东省自然科学基金项目 (000990)

威廉斯或巴西品种, 甲基紫精液滴褐斑直径都随着浓度的升高而增大。当浓度大于 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时褐斑直径不再随浓度而增大, 可见该浓度是该条件下活性氧产生的饱和浓度, 能最大限度反映不同植株间的差异, 因而以下试验均采用这个浓度。另外, 正常生长的香蕉叶片甲基紫精褐斑的直径明显小于经过冷胁迫的香蕉叶片, 说明甲基紫精褐斑直径的不同反映了不同生长环境造成的香蕉植株间的差异 (可能也包括抗氧化能力的差异)。

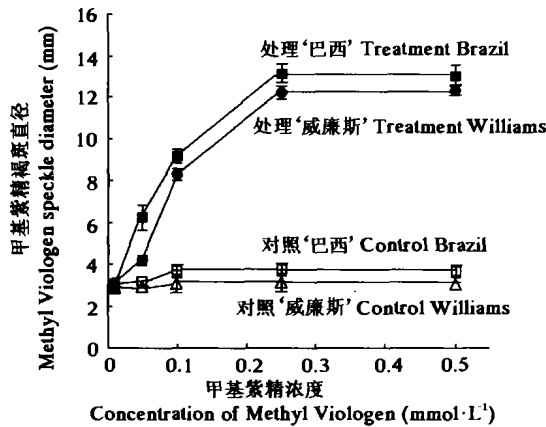


图1 甲基紫精浓度与叶片上形成的褐斑直径的关系

Fig. 1 The relationship between Methyl Viologen concentration and the damage speckles diameter formed on the surface of leaves

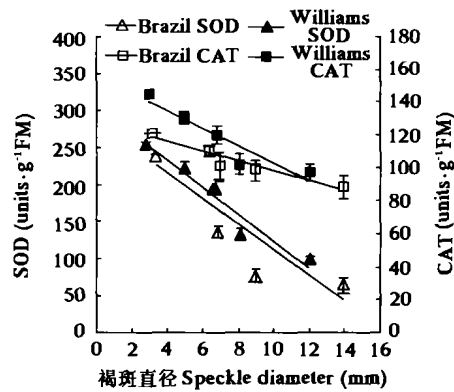


图2 甲基紫精褐斑直径与 SOD 和 CAT 活性的关系

Fig. 2 The relationship between the speckle diameter of Methyl Viologen and the activity of SOD and CAT

2.2 甲基紫精褐斑直径与 SOD 和 CAT 活性的关系

取不同温度处理的香蕉幼苗叶片, 沿着主脉将叶子剪成两半。其中一半用于测量 SOD 和 CAT 活性; 另一半进行甲基紫精滴注, 每半片叶子上滴注 5 个液滴。以甲基紫精褐斑直径为横坐标, SOD 和 CAT 的活性为纵坐标作图 (图 2), 可以看出, SOD 和 CAT 的活性均随着甲基紫精褐斑直径的增大而明显下降, 计算相关系数, 结果是威廉斯香蕉为 -0.95 和 -0.93 , 巴西香蕉为 -0.88 和 -0.95 , 表明 SOD 活性及 CAT 活性与甲基紫精液滴损伤褐斑直径呈明显的负相关性。由于 SOD 和 CAT 是植物体内最重要的活性氧清除酶, 它们的活性之和在很大程度上反映了植物抗氧化能力的高低, 所以甲基紫精液滴在叶片上形成的褐斑直径可能反映了植物抗氧化能力的趋向。

2.3 用外源活性氧直接验证香蕉的抗氧化能力

取不同温度处理的幼苗叶片, 沿着主脉剪成两半。一半用于甲基紫精滴注, 另一半直接浸泡于外源活性氧系统中。 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 碱性溶液为外源超氧阴离子自由基产生系统, 外源 H_2O_2 的浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。25℃ 培养 12 h 后测定丙二醛的含量。从图 3 可以看到, 随着甲基紫精在叶片上形成的褐斑直径的增大, 叶片经外源活性氧处理后的丙二醛积累增多。计算褐斑直径

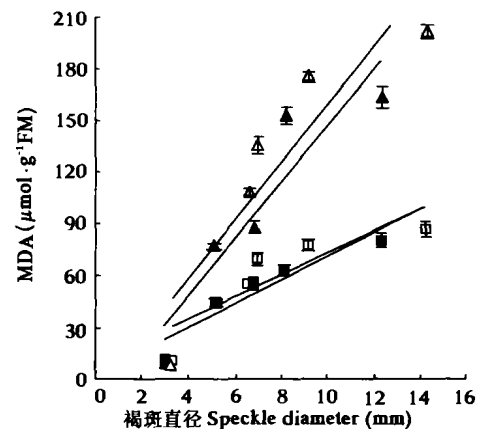


图3 外源活性氧处理后香蕉叶片丙二醛含量与甲基紫精褐斑直径的关系

■巴西 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理; □巴西 H_2O_2 处理的;
▲威廉斯 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理; △威廉斯 H_2O_2 处理。

Fig. 3 Relationship between the content of MDA and the speckle diameter of Methyl Viologen after treated by exogenous active oxygen in banana leaves

■Brazil treated with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; □Brazil treated with H_2O_2 ;
▲Williams treated with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; △Williams treated with H_2O_2 .

与丙二醛含量之间的相关系数, 可得 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理的巴西和威廉斯香蕉分别为 0.94 和 0.92, H_2O_2 处理的巴西和威廉斯香蕉分别为 0.86 和 0.91。由于丙二醛的含量直接反映了植物的抗氧化能力, 因此可以说甲基紫精褐斑直径与香蕉抗氧化能力之间具有明显的负相关性, 初步证明了利用甲基紫精滴注法直接衡量香蕉抗氧化能力的可行性。

滴注在植物叶片上的甲基紫精液滴吸收叶绿体光合电子传递过程的一个电子而产生超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)^[2], $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可以被转化成其他形式的活性氧 (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ 等), 从而造成更广泛的伤害, 因此甲基紫精在叶片上形成的褐斑直径就不仅仅涉及 SOD 的活性, 而且也涉及了 CAT 及其他酶促或非酶促的活性氧清除物质, 是植物活性氧清除能力的综合体现。当植物抗氧化能力较强时候, 甲基紫精产生的各种活性氧被及时清除, 对周围细胞的伤害较小, 形成的褐斑直径也较小, 反之形成的斑点直径则较大, 这可能就是甲基紫精滴注法可以用于快速衡量植物抗氧化能力的原理。这里我们通过初步试验提出甲基紫精滴注法, 目的是希望从一个新的角度探索可以用于直接衡量和定量表示香蕉的抗氧化能力的方法, 为最终应用于生产实践提供初步的依据。

参考文献:

- 1 Hasson H M. Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *E. Scherichia Coli*. *J. Biol. Chem.*, 1978, 253: 8143 ~ 8148
- 2 Doulis A G, Donahue J L, Alscher R G. Differential responses to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system. *Physiol. Plant*, 1998, 102: 461 ~ 471
- 3 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 1983, 9 (1): 77 ~ 84
- 4 Patterson B D, Mackac E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal. Biochem.*, 1984, 139: 487 ~ 492
- 5 王爱国, 邵从本, 罗广华, 等. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. *植物生理学通讯*, 1986, (2): 55 ~ 57

A Preliminary Study to Evaluate the Antioxidative Capacity of Banana by Comparing the Diameter of Methyl Viologen Speckles

Ke Desen, Xu Zhifang, and Sun Guchou

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: After 10 h illumination under the light of $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, obvious speckles could be formed in the place where the Methyl Viologen was dripped as little blobs on the surface of banana leaves. By determining the activity of two chief antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), a significant reverse linear relationship was found between the diameter of Methyl Viologen speckle and the two enzymes activities, showing the close relationship between the speckle diameter and the antioxidative capacity in bananas. Exogenous active oxygen species could induce the damage such as peroxidation of membrane lipid in banana leaves, the damaging degree is closely related with the diameter of Methyl Viologen speckles, this result indicated that the rapid method to evaluate antioxidation capacity in bananas was feasible.

Key words: Banana; Methyl Viologen; Antioxidative capacity; Reactive oxygen species

《英汉生物化学及分子生物学词典》

本词典收集生物化学、分子生物学及与其相关的细胞生物学、免疫学、遗传学、微生物学及医药学等方面词条约 21 000 条, 大部分词条附有简明释义。书中还收录一些缩写词和同义词, 供读者查阅文献、翻译文章使用。定价: 88 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。