

刺梨果实和叶片发育过程中抗坏血酸和抗氧化酶的协同变化

安华明^{1*}, 樊卫国¹, 刘庆林², 陈力耕³

(¹ 贵州大学喀斯特山地果树资源研究所, 贵阳 550025; ² 凯里学院生物科学技术系, 贵州凯里 556000; ³ 浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘要: 以‘贵农5号’刺梨为材料, 研究了果实和叶片发育过程中主要保护酶和抗坏血酸 (AsA) 的变化。结果表明, 刺梨果实和叶片内都具有较高的 SOD 活性, 并在发育过程中呈基本相似的变化模式; 总体上看, 刺梨叶片中具有较高的 POD 和 CAT 等抗氧化酶活性, 并呈‘初期升高后期降低’的变化趋势, 但 AsA 含量及其氧化还原态 (AsA 与 AsA 库的比值) 较低。在果实中, SOD 活性和 AsA 含量高, 而 POD 活性很低, 并且在果实发育中、后期降至检测不到的水平, 整个生育期都未能检测到 CAT 活性。这表明刺梨果实和叶片中存在着不同的自由基清除协作机制。

关键词: 刺梨; 抗坏血酸; 抗氧化系统; 协同变化

中图分类号: S 661 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 05-1293-04

Co-changes of Antioxidant Enzymes and Ascorbic Acids During the Fruit and Leaf Development of *Rosa roxburghii*

AN Hua-ming^{1*}, FAN Wei-guo¹, LIU Qing-lin², and CHEN Li-geng³

(¹ Research Institute for Fruit Resources of Karst Mountain Region, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ² Department of Biotechnology, Kaili University, Kaili, Guizhou 556000, China; ³ Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *Rosa roxburghii* Tratt ‘Guinong 5’ was used to investigate the co-changes of antioxidant enzymes activity and ascorbic acid contents in fruits and leaves during the development. The results showed that the high activity of SOD presented in both fruits and leaves, and basically with a parallel pattern during the development. The high activities of POD and CAT and low ascorbate content, which increased at the early developmental stage but decreased later in leaves. By comparison, the fruit had a remarkable characteristics of extreme richness of both SOD and ascorbic acid although transitory and weak POD and no CAT activity was detected during the fruit development. These data revealed that different ROS-scavenging mechanisms co-operating in the fruits and leaves of this plant.

Key words: *Rosa roxburghii* Tratt; Ascorbic acid; Antioxidant system; Co-change

植物在发育过程中由于氧化代谢或逆境胁迫而产生的活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 可通过抗氧化系统清除。包括保护酶系统如过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 等和非保护酶系统如维生素 C (抗坏血酸, AsA)、谷胱甘肽、维生素 E 等, 共同作用使植物细胞维持着氧化—还原的动态平衡 (Mittler, 2002)。以往相关研究多集中在保护酶系统, 而

收稿日期: 2007-01-29; 修回日期: 2007-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30660114); 贵州省自然科学基金项目 (20062038); 贵州省教育厅自然科学基金项目; 贵州大学人才基金项目

* E-mail: anhuaming888@yahoo.com.cn

对非保护酶系统以及非保护酶系统与保护酶系统间的协同保护的具体过程和机制报道较少。本试验中以高含 AsA 的刺梨为材料,通过测定和分析其整个生育期内果实和叶片中抗氧化系统各主要组分的变化,探讨它们的协作分工和可能的氧化保护作用机理。

1 材料与方法

供试材料为3年生优良无性系刺梨‘贵农5号’(*Rosa roxburghii* Tratt ‘Guinong 5’),种植于贵州大学刺梨种质资源圃。于5月10日~8月28日,每10 d取样1次,果样和叶样(各约100 g)分别随机取自树势基本一致的植株树冠外围中上部和结果枝中上部,取样时间为上午10时。用于取样的刺梨植株为60株。所取样品用液氮处理后保存于-70℃待用。

取2 g果肉或1 g叶片置于预冷的研钵中,加5 mL的 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的偏磷酸研磨成匀浆。将匀浆全部转入离心管中,于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min后,取上清液用于测定AsA和DHA含量。以上操作均在4℃下进行。

AsA含量用高效液相色谱法(HPLC)测定,以峰面积外标法计算其含量。AsA标样购于Sigma公司。参考安华明等(2005b)提供的方法测定DHA含量。总AsA或AsA库 = AsA + DHA; AsA库氧化还原态(%) = $\text{AsA} / (\text{AsA} + \text{DHA}) \times 100$ (Turcsányi et al., 2000)。

根据陈建勋和王晓峰(2002)提供的方法测定POD、CAT和SOD的活性:取1 g果肉或0.5 g叶片于预冷的研钵中,加入10 mL的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液(pH 7.8)研磨成匀浆并全部转入离心管中,于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,上清液即为酶液。以上操作都在4℃下进行。其中POD和CAT活性以每分钟OD值增加和减少0.01为1个活力单位($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$),SOD活性以抑制氮蓝四唑光化还原的50%为1个酶活性单位($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)。

2 结果与分析

2.1 刺梨果实和叶片发育过程中SOD活性的变化

图1显示,刺梨果实中SOD活性从幼果形成到7月中旬略有增加,并在7月中旬升至整个生育期的最高水平;7月中旬以后,随着果实的发育成熟缓慢而下降,但直到果实成熟可食时仍维持在相当高的水平。这一水平相当于猕猴桃、无花果、山楂、黑莓等SOD含量的10倍以上,是苹果、柑橘、梨、葡萄的20~50倍(史肖白等,1998)。

SOD是植物细胞内活性氧清除反应过程中第一个发挥作用的重要保护酶,它与 O_2^- 反应形成 H_2O_2 和氧分子,并与抗氧化系统的其它组分一起在防止细胞氧化伤害和保护细胞结构和功能等方面发挥着重要作用(马旭俊和朱大海,2003)。刺梨果实在整个发育过程中保持较高SOD活性的特点,表明SOD是刺梨果实保护酶系统中起主导作用的关键组分,这对于有效清除细胞内ROS和减缓衰老具有重要意义;同时,鉴于SOD在人体中的重要保健作用,这一特点也为刺梨果实具有较高营养保健功能提供了有力佐证。

刺梨叶片从发育初期到7月初,SOD活性变化趋势与果实相似,较为平缓;之后,随着叶片的逐渐成熟和衰老,SOD活性急剧下降至发育初期的约1/2水平(图1)。

2.2 刺梨果实和叶片发育过程中POD和CAT活性的变化

图2表明,在整个发育过程中,果实内POD活性变化很大:发育初期约一月内POD活性逐渐升高,6月初达到最高水平,之后下降,7月初直至成熟检测不到其活性。这说明POD可能只对清除刺梨幼果期产生的 H_2O_2 起一定作用。在刺梨果实整个发育过程中始终未能检测到CAT的活性,那么果实在7月以后继续发育和逐渐成熟过程中产生的 H_2O_2 等应该主要由其它抗氧化物质来清除。

叶片中POD和CAT的表现与果实中截然不同(图2),在整个发育过程中,POD均保持一定活

性,并在发育中期(5月底至6月底)维持在较高水平,之后下降;而CAT则在幼叶时期就迅速升高到较高水平,并在6月初之后随着叶片的发育和衰老迅速降低。这表明,在刺梨叶内,两种抗氧化酶在清除氧自由基和氧化保护方面共同发挥了作用。

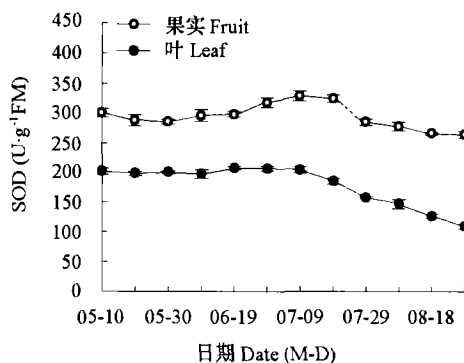


图1 刺梨果、叶发育过程中SOD活性的变化

Fig. 1 Changes of SOD activity in *R. roxburghii* fruits and leaves during the development

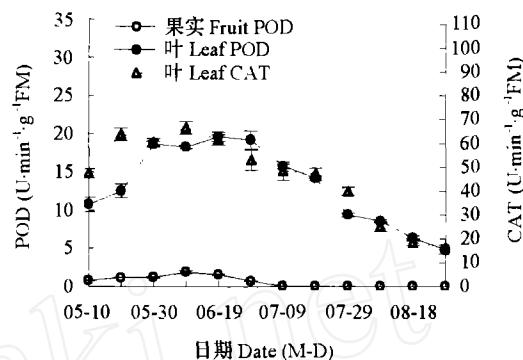


图2 刺梨果、叶发育过程中POD, CAT活性的变化

Fig. 2 Changes of POD and CAT activities in *R. roxburghii* fruits and leaves during the development

植物体内, SOD与 O_2^- 反应形成的 H_2O_2 可在POD和/或CAT的作用下转变成 H_2O 从而消除 H_2O_2 对细胞的氧化损伤(Mittler, 2002; 马旭俊和朱大海, 2003)。因此这3种酶的协同作用可有效阻止 O_2^- 、 H_2O_2 等的过量产生对细胞所造成的氧化伤害。

刺梨果实和叶片中POD和CAT活性不同的变化模式,意味着这两种酶在刺梨不同组织细胞和不同发育时期起着大小不同的作用,果实和叶片存在着不同的清除自由基的机制。

2.3 刺梨果实、叶发育过程中AsA含量及其氧化还原态的变化

AsA可以直接清除植物体内的ROS,从而对细胞起保护作用(Liebler et al., 1986; Padh, 1990; Asada, 1992)。AsA参与氧化还原反应后的氧化产物为DHA, DHA又可通过脱氢抗坏血酸还原酶的作用还原为AsA,因此通常将两者统称为AsA库。AsA与AsA库的比值称为AsA库的氧化还原态。AsA(还原型)含量和AsA库氧化还原态反映了维生素C在植物细胞内能够发挥氧化保护能力的大小。

图3显示,在刺梨果实发育初期的约一个月内,AsA的含量很低,但AsA库的氧化还原态却在不断升高。之后,随着AsA的不断积累,AsA库的氧化还原态也不断增加(其中在6月初略有下降,具体原因尚不清楚),至7月初已达到约99%,并直至果实成熟。这表明在刺梨果实的整个发育过程中,AsA清除氧自由基和抗氧化能力总体上不断增强,即使是在发育后期和果实成熟过程中也未有降低的趋势。结合AsA在清除氧自由基方面的重要作用,这一突出特点对于避免在果实发育后期因POD和CAT活性的缺乏而导致的 H_2O_2 等过度积累无疑具有重要意义。

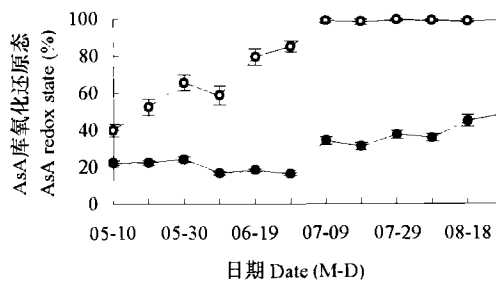
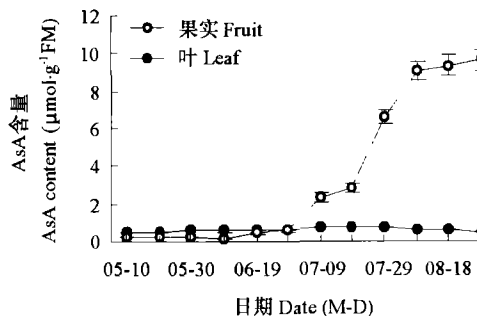


图3 刺梨果、叶发育过程中AsA含量及其氧化还原态的变化

Fig. 3 Changes of AsA content and it's redox state in *R. roxburghii* fruits and leaves during the development

与果实不同,在刺梨叶片发育过程中,AsA 含量变化平缓,含量很低,不足成熟果实的 1/10。叶片中 AsA 库的氧化还原态的变化较果实稍显缓和,总体上看呈上升趋势。至发育末期,由于叶内各抗氧化组分(包括 POD、CAT 和 AsA 等)的急剧降低最终导致其内部氧化—抗氧化平衡的打破和叶片的衰老加速,这与作者之前的研究(安华明等,2005a)一致。

本试验结果表明,刺梨果实和叶片内存在着不同的抗氧化系统协作机制。在叶片不断发育和成熟过程中,SOD、POD、CAT 活性或 AsA 含量都呈下降的趋势,但直至成熟仍然保持一定的水平,说明它们共同参与了自由基清除和氧化保护的动态过程。而在果实发育过程中,随着 AsA 的不断积累和 AsA 氧化还原态的不断提高,POD 活性却逐渐降低直至检测不到,而 CAT 活性则在整个生育期都检测不到。

此外,我们过去的研究(安华明等,2005b)也发现,在发育后期的果实中,APX 活性也极其微弱,甚至检测不到。这表明,在刺梨果实中,特别是在果实发育后期,与 SOD 协同作用的抗氧化成分并非 POD 或 CAT 等抗氧化酶类,发挥主要作用的可能是 AsA 等一些非酶组分。

References

- An Hua-ming, Chen Li-geng, Fan Wei-guo, Liu Qing-lin. 2005a. Ascorbate contents and activities of some antioxidant enzymes during senescence of *Rosa roxburghii* leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (6): 994–997. (in Chinese)
- 安华明,陈力耕,樊卫国,刘庆林. 2005a. 刺梨叶衰老过程中维生素 C 含量和部分抗氧化酶活性的变化. *园艺学报*, 32 (6): 994–997.
- An Hua-ming, Chen Li-geng, Fan Wei-guo, Liu Qing-lin. 2005b. Relationship between ascorbic acid accumulation and related enzyme activities in fruit of *Rosa roxburghii* TrOatt. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 31 (4): 431–436. (in Chinese)
- 安华明,陈力耕,樊卫国,刘庆林. 2005b. 刺梨果实中维生素 C 积累与相关酶活性的关系. *植物生理与分子生物学学报*, 31 (4): 431–436.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 235–241.
- Chen Jian-xun, Wang Xiao-feng. 2002. Plant physiological experiment technology. Guangzhou: South China University of Technology Press: 119–124. (in Chinese)
- 陈建勋,王晓峰. 2002. 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社: 119–124.
- Liebler D C, Kling D S, Reed D J. 1986. Antioxidant protection of phospholipid bilayers by a-tocopherol. Control of a tocopherol status by ascorbic acid and glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 12114–12119.
- Ma Xu-jun, Zhu Da-hai. 2003. Functional roles of the plant superoxide dismutase. *Hereditas*, 25 (2): 225–231. (in Chinese)
- 马旭俊,朱大海. 2003. 植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展. *遗传*, 25 (2): 225–231.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9): 405–410.
- Padh H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology*, 68: 1166–1173.
- Shi Xiao-bai, Gu Yin, Zhuang Yi-yi. 1998. Studies on contents of SOD in *Rosa roxburghii*. *Chinese Wild Plant Resources*, 17 (4): 49–52. (in Chinese)
- 史肖白,顾 姻,庄一义. 1998. 刺梨超氧化物歧化酶含量分析. *中国野生植物资源*, 17 (4): 49–52.
- Turcsányi E, Lyons T, Plochl M, Barnes J. 2000. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Experimental Botany*, 51 (346): 901–910.