

不同叶龄苹果叶片抗坏血酸含量与其代谢相关酶活性的比较

马春花¹, 马锋旺^{1,2*}, 李明军¹, 韩明玉¹, 束怀瑞^{1,2}

(¹西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; ²山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018)

摘要:以‘嘎拉’苹果 (*Malus domestica* Borkh ‘Gala’) 叶片为试材, 研究了幼叶、展开叶、成熟叶、衰老叶 4 个不同时期叶片的抗坏血酸 (AsA) 含量、合成和代谢相关酶活性及其相互之间的关系。结果表明, 不同叶龄苹果叶片总抗坏血酸和 AsA 含量的变化趋势一致, 均在成熟期最高, 衰老期开始下降, AsA 关键合成酶 GaLDH 活性表现出相应的变化。同时, 有助于 AsA 再生的脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性均在叶片衰老期最低, 并伴有抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性的下降和 H₂O₂ 的大量积累, 使抗坏血酸氧化程度在衰老期也达到最大。

关键词: 苹果; 叶片; 叶龄; 抗坏血酸

中图分类号: S 661.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 04-0995-04

Comparisons of Ascorbic Acid Contents and Activities of Metabolism Relative Enzymes in Apple Leaves of Various Ages

MA Chun-hua¹, MA Feng-wang^{1,2*}, LIMing-jun¹, HAN Ming-yu¹, and SHU Huai-rui^{1,2}

(¹College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Ascorbic acid (AsA) metabolism, including AsA content, metabolism relative enzymes activities and relationships among them, was investigated in leaves of apple (*Malus domestica* Borkh ‘Gala’) of various ages, i. e. young leaves, expanding leaves, mature leaves, aged leaves. The results showed that total AsA content and AsA content changed accordingly, reaching maximum in mature leaves and minimum in aged leaves, and changes of GaLDH activity were accordant with AsA content. With the decline of APX activities and accumulation of H₂O₂, the activities of MDHAR, DHAR and GR which conduce to regeneration of AsA were lowest at aged leaves, so as to the extent of AsA oxidation reached maximum in aged leaves.

Key words: Apple; Leaf; Leaf age; Ascorbic acid

抗坏血酸 (AsA) 是大多生物体内重要的抗氧化剂和许多酶的辅因子, 在生长发育中起着重要作用 (Noctor & Foyer, 1998)。由于 AsA 在植物体不同发育时期或不同器官中作用不同, 植物体内可通过自身的合成与周转来调控 AsA 的水平 (Ishikawa et al, 2006)。研究植物自身 AsA 代谢规律, 寻找植物不同器官或不同发育时期 AsA 代谢特点, 对进一步研究 AsA 在植物体内的功能及其水平调控可能具有重要的意义。

作者以苹果品种嘎拉的叶片为材料, 研究不同叶龄叶片 AsA 含量与代谢相关酶的变化, 以期为依据 AsA 水平研究调控及延缓叶片衰老进程提供理论基础。

收稿日期: 2006 - 11 - 09; 修回日期: 2007 - 05 - 25

基金项目: 农业部 ‘948’ 项目 (2006-G28); 西北农林科技大学 “拔尖人才支持计划” 项目 (2005-2)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fwm65@sina.com)

1 材料与方法

试材为西北农林科技大学园艺场长势一致的 5 年生 ‘嘎拉’ 苹果 (*Malus domestica* Borkh ‘Gala’) 叶片。果树株距 2 m, 行距 4 m, 在整个生长期所有田间管理与当地果园一致。于 2005 年 4 月 15 号挂牌标记植株上生长一致的阳面外围春梢顶端新生叶片并计时。于 8 月取标记枝条上叶龄约 5 ~ 10 d (幼叶)、20 ~ 25 d (展开叶)、40 ~ 45 d (成熟叶) 和 100 ~ 120 d (衰老叶) 的叶片。采后立即投入液氮带回实验室, 放入 - 70 °C 冰箱, 用于各项指标测定。各项指标重复测定 6 次。

H₂O₂ 含量测定参考林植芳等 (1988) 的方法。AsA、脱氢抗坏血酸 (DHA)、谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量和抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、脱氢抗坏血酸还原酶 (DAHR)、单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 及谷胱甘肽还原酶 (GR) 酶活性测定参考 Ma 和 Cheng (2003) 的方法。L - 半乳糖酸 - 内酯脱氢酶 (GaLDH) 酶活性测定参考 Ôba 等 (1995) 的方法。酶活性测定采用 UV-2500 分光光度计。

数据统计分析采用 DPS 数据处理系统。

2 结果分析与讨论

2.1 不同叶龄苹果叶片 AsA、DHA 和总抗坏血酸含量的差异

图 1 表明, 在幼叶、展开叶、成熟叶和衰老叶中总抗坏血酸、AsA 和 DHA 含量差异很大。总抗坏血酸和 AsA 含量均是在成熟叶中最高, 在衰老叶中下降。

反映抗坏血酸氧化还原状态的 AsA/DHA 比值在展开叶期达到最高, 衰老叶中下降 (图 3), 说明抗坏血酸氧化还原状态与叶片的衰老密切相关。

安华明等 (2005a) 也曾报道刺梨叶片衰老过程中总抗坏血酸、AsA 和 DHA 含量逐渐下降, AsA 的氧化程度增大。

2.2 不同叶龄苹果叶片 GSH、GSSG 及总谷胱甘肽含量的差异

GSH 是植物体内另一个重要的抗氧化剂和氧化还原势的调节剂, 作为 DHA 的电子供体, 其氧化还原态是通过 Asada 循环来与 AsA 联系的 (Noctor & Foyer, 1998)。

从幼叶到成熟叶, 总谷胱甘肽含量变化幅度不明显, 但衰老叶中显著下降, 同时 GSH 含量在衰老叶最低; 而 GSSG 在展开叶和成熟叶中含量较低, 衰老叶中升高 (图 2)。从而, 反映谷胱甘肽氧化还原状态的 GSH/GSSG 比值在展开叶最大, 衰老叶中降低 (图 3)。

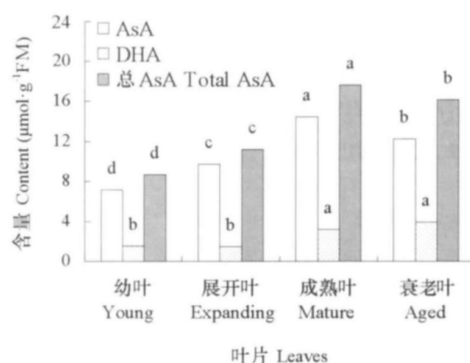


图 1 不同叶龄苹果叶片 AsA、DHA 及总抗坏血酸含量

Fig. 1 AsA, DHA and total AsA contents in apple leaves at various ages

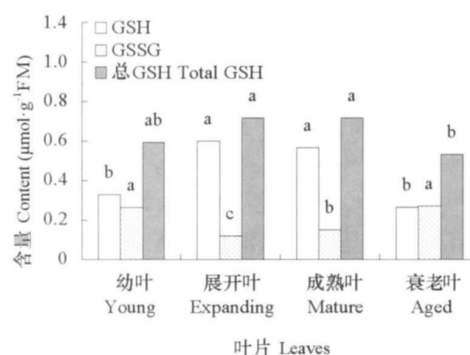


图 2 不同叶龄苹果叶片 GSH、GSSG 及总谷胱甘肽含量

Fig. 2 GSH, GSSG and total GSH contents in apple leaves at various ages

2.3 不同叶龄苹果叶片 GaLDH活性的差异

最近证实植物体内 AsA 的主要合成途径是 L - 半乳糖途径, GaLDH 是本途径中催化 AsA 生物合成的最后一个关键酶, 在一定程度上调控着 AsA 的生物合成 (Ishikawa et al, 2006)。GaLDH 活性从幼叶到成熟叶不断上升, 在衰老叶有所下降, 与总抗坏血酸含量的变化趋势基本一致 (图 4)。AsA 合成能力是决定 AsA 水平的主要因素之一, 可通过过量表达 GaLDH 来提高植物体内 AsA 水平, 目前已有这方面的相关报道 (安华明 等, 2005b)。

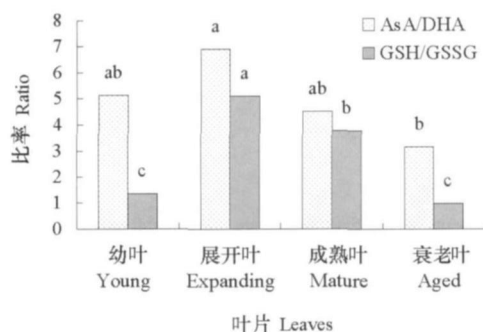


图 3 不同叶龄苹果叶片 AsA/DHA 及 GSH/GSSG

Fig 3 AsA/DHA and GSH/GSSG in apple leaves at various ages

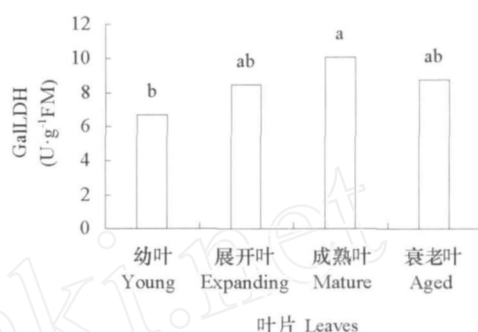


图 4 不同叶龄苹果叶片 GaLDH 活性

Fig 4 GaLDH activities in apple leaves at various ages

2.4 不同叶龄苹果叶片 H₂O₂含量及 APX活性的差异

如图 5 所示, 幼叶的 H₂O₂ 含量最低, 随着叶龄增加, H₂O₂ 含量显著增加, 在衰老叶达到最大。以 AsA 为电子供体来清除 H₂O₂ 的 APX 活性在幼叶和展开叶差异不大, 在衰老叶中, 相对于 H₂O₂ 含量的明显上升, APX 活性降低幅度较大 (图 6)。这说明苹果叶片的衰老与 APX 活性下降, H₂O₂ 大量积累有关。

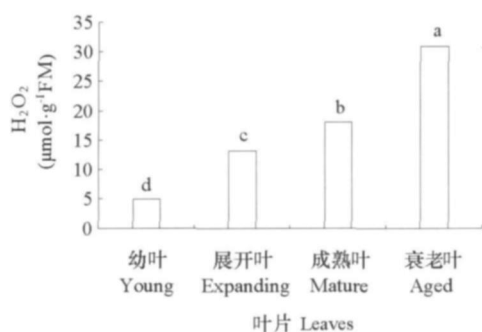


图 5 不同叶龄苹果叶片 H₂O₂ 含量

Fig 5 H₂O₂ contents in apple leaves at various ages

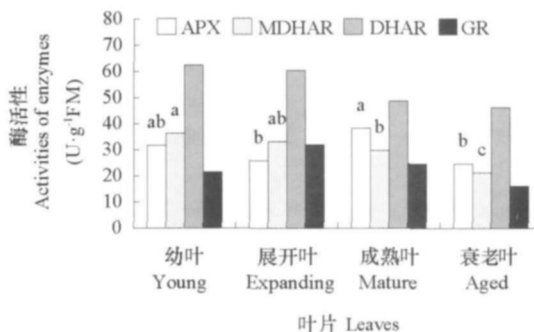


图 6 不同叶龄苹果叶片 APX、MDHAR、DHAR 和 GR 活性

Fig 6 APX, MDHAR, DHAR and GR activities in apple leaves at various ages

2.5 不同叶龄苹果叶片 MDHAR、DHAR 和 GR 活性的差异

AsA 水平除了受合成影响外, 还受再生影响。在 AsA 循环中, AsA 作为 APX 电子供体清除 H₂O₂ 同时, 自身被氧化生成 MDHA (Noctor & Foyer, 1998)。MDHA 一部分可经非酶歧化生成 AsA 和 DHA, 另一部分可被 MDHAR 还原为 AsA。DHA 若不能及时被 DHAR 还原为 AsA, 可进一步降解为草酸和/或酒石酸 (Green & Fry, 2005)。因而, DHAR 对于维持 AsA 水平及氧化还原状态极为重要。

本试验中, 伴随叶片的老化, APX 活性的下降及 H₂O₂ 的积累, MDHAR 和 DHAR 活性下降, 尤

其在衰老叶活性最低 (图 6)。在幼叶和展开叶, 合成酶 GaLDH 活性相对较低, 但高的 MDHAR 和 DHAR 活性维持了 DHA 低水平和 A_{sA} 高水平。在衰老叶 DHAR 和 MADHAR 的明显下降与 DHA 的积累和 A_{sA} 含量下降相关。

我们在研究苹果离体叶片衰老过程时也发现二者的活性明显下降 (马春花 等, 2006), 这说明二者活性水平与衰老进程相关。近来 Barth 等 (2004) 对 A_{sA} 缺乏拟南芥突变体的研究发现, A_{sA} 水平与衰老进程有关。

A_{sA} 再生能力伴随生长发育而下降, 尤其在衰老期, DHAR、MADHAR 和 GR 活性的明显下降与 DHA 的积累和 A_{sA} 含量的下降相关, 这说明通过增加再生酶的活性能提高植物 A_{sA} 积累 (Chen et al, 2003), 进而对延缓衰老, 增加抗逆性可能有重要作用。

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. 2005b Cloning of cDNA fragment of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase and its expression in different organs of *Rosa roxburghii* Tratt. *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (3): 571 - 575. (in Chinese)
- 安华明, 陈力耕, 樊卫国. 2005b 刺梨果实半乳糖内酯脱氢酶基因 cDNA 片段的克隆及在不同器官的表达. *中国农业科学*, 38 (3): 571 - 575.
- Barth C, Moeder W, Klessig D F, Conklin P L. 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin C-1. *Plant Physiology*, 134 (4): 1784 - 1792.
- Chen Z, Young T E, Ling J, Chang S C, Gallie D R. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (6): 3525 - 3530.
- Green M A, Fry S C. 2005. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, 433: 83 - 87.
- Ishikawa T, Dowdle J, Smimoff N. 2006. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126 (3): 343 - 355.
- Lin Zhi-fang, Li Shuang-shun, Lin Gui-zhu, Guo Jun-yan. 1988. The accumulation of hydrogen peroxide in senescing leaves and chloroplasts in relation to lipid peroxidation. *Acta Phytophysiol Sinica*, 14 (1): 16 - 22. (in Chinese)
- 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 郭俊彦. 1988. 衰老叶片和叶绿体中 H₂O₂ 累积与膜脂过氧化的关系. *植物生理学报*, 14 (1): 16 - 22.
- Ma Chun-hua, Ma Feng-wang, Li Ming-jun, Han Ming-yu, Shu Huai-rui. 2006. Effects of exogenous ascorbic acid on senescence of detached apple leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (6): 1179 - 1184. (in Chinese)
- 马春花, 马锋旺, 李明军, 韩明玉, 束怀瑞. 2006. 外源抗坏血酸对离体苹果叶片衰老过程的影响. *园艺学报*, 33 (6): 1179 - 1184.
- Ma F W, Cheng L L. 2003. The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shade peel. *Plant Science*, 165: 819 - 827.
- Noctor G, Foyer C H. 1998. Ascorbate and glutathione: keep active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249 - 279.
- Ôba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T. 1995. Purification and properties of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *Journal of Biochemistry*, 117: 120 - 124.