猕猴桃离体生根期间抗氧化系统的变化*

王顺才[1,2], 马锋旺[2], 梁 东[2], 徐凌飞[2], 耶兴元[2]
(1 天水师范学院 生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741001;
2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以美味猕猴桃品种海沃德组培苗为试材, 研究了生根过程中抗氧化系统的变化规律及其相互关系。结果表明, 在美味猕猴桃海沃德组培苗生根过程中, 超氧化物歧化酶(SOD)活性和抗坏血酸(ASA)含量先增加后下降; 过氧化物酶(POD)活性先降低后升高; 过氧化氢酶(CAT)活性和谷胱甘肽(GSH)含量先下降后升高, 接着又降低。与对照相比, NAA 不同程度地提高了抗氧化酶活性和抗氧化剂含量, 说明猕猴桃体内较高水平的抗氧化能力对生根具有促进作用。

[关键词] 猕猴桃; 离体生根; 抗氧化系统
[中图分类号] S663.401 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)01-0083-04

不定根发生是一个复杂的分化现象。据报道[1], 许多重要的植物生理生化过程是在活性氧参与下完成的, 活性氧的产生对植物细胞既有消极伤害的一面, 也有积极有益的一面。植物体内具有完善的抗氧化防御系统, 由抗氧化酶和抗氧化剂组成。在正常生理条件下, 植物细胞的抗氧化系统以酶促与非酶促途径维持体内活性氧代谢系统的动态平衡, 保证植物生命活动的正常进行[2]。研究表明, 不定根发生与过氧化物酶(POD)活性变化有密切的关系[3~5], 但关于抗氧化系统在猕猴桃组培苗不定根形成过程中的作用, 还未见报道。本试验研究了NAA 诱导猕猴桃组培苗生根期间超氧化物歧化酶(SOD)、POD、过氧化氢酶(CAT)活性和抗坏血酸(ASA)、谷胱甘肽(GSH)含量的变化, 以探讨植物体内抗氧化系统对不定根发生的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

选用继代培养3~4周、生长健壮的美味猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)海沃德(Hayward)组培苗, 切取长度约1.5 cm 的带芽茎段进行离体培养。预备生根试验证明, NAA 在0.8 mg/L 时, 对根的诱导效果最好, 且生根时间短, 根长势好。试验共设2组: 一组为对照, 以MS 为培养基(无植物生长调节剂); 另一组为处理, 以附加0.8 mg/L NAA 的MS 为培养基。MS 培养基含蔗糖30 g/L, 琼脂6 g/L, pH 为5.8。接种后的材料置于人工智能光照培养箱中培养, 温度为(24±2) ℃, 每天光照14 h, 光照强度为3 000 lx。转接后每隔2 d 取样1 次, 用嫩茎叶进行各项指标的测定, 每项测定重复3 次。

1.2 测定方法

1.2.1 SOD, POD 和CAT 活性测定 参照高俊凤[6]的方法。

1.2.2 ASA 含量测定 用钼蓝比色法[6]测定ASA 含量。取嫩茎叶1~2 g, 加入草酸-EDTA 溶液(称取6.30 g 草酸和0.75 g EDTA-Na_2 溶于蒸馏水并定容至1 000 mL) 10 mL, 研磨成匀浆, 于4 ℃, 3 000 r/min 离心10 min 后, 取上清液用于ASA 含量测定。

取1 mL 上清液转入25 mL 容量瓶中, 依次加入草酸-EDTA 溶液4 mL, 偏磷酸-乙酸(取3 g 偏磷酸加体积分数20% 冰醋酸48 mL, 溶解后加蒸馏水稀释至100 mL) 0.5 mL, 体积分数5% 硫酸1 mL, 50 g/L 钼酸铵2 mL, 用蒸馏水定容至25 mL。混匀后, 置于30 ℃水浴中保温15 min, 用蒸馏水调零, 测定760 nm 波长下的光吸收值。根据ASA 标准溶液绘制标准曲线, 计算样品中的ASA 含量。

1.2.3 还原型GSH 含量测定 参照Elman[7]的方法测定GSH 含量。取嫩茎叶1 g, 剪碎后加入体积分数5% 三氯乙酸5 mL, 冰浴研磨呈匀浆后, 于4 ℃、

* [收稿日期] 2003-12-10
[作者简介] 王顺才(1976-), 男, 甘肃陇西人, 硕士, 主要从事果树生理与生物技术研究。
[通讯作者] 马锋旺(1964-), 男, 山东汶上人, 教授, 博士生导师, 主要从事果树抗性生理与生物技术改良研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4 000 r/min离心10 min,取上清液定容至5 mL,用于测定GSH 含量。

取样品上清液0.5 mL,加入150 mmol/L NaH_2PO_4(pH 7.7) 2.6 mL,摇匀后加入0.18 mL二巯基双硝基苯甲酸(DTNB)试剂(称75.3 mg DTNB 溶于30 mL 100 mmol/L 磷酸缓冲液,pH 6.8),以磷酸缓冲液(pH 6.8)代替DTNB 试剂作空白。摇匀,于30 ℃水浴中保温反应5 min,测定412 nm 波长下的光吸收值。根据GSH 标准溶液绘制标准曲线,计算样品中的GSH 含量。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃生根期间SOD 活性变化

图1表明,处理SOD 活性先升高,随后下降并逐渐低于对照,于第4天达最高峰,比对照提前2 d,两者的峰值差异不明显。对照SOD 活性前2 d急剧下降,以后逐渐升高,第6天达最高峰,6 d后下降且高于处理。第2天和第4天时,处理SOD 活性比对照分别高17.0%和7.62%,说明NAA 在生根前期提高了SOD 活性,并使之维持在较高水平上。

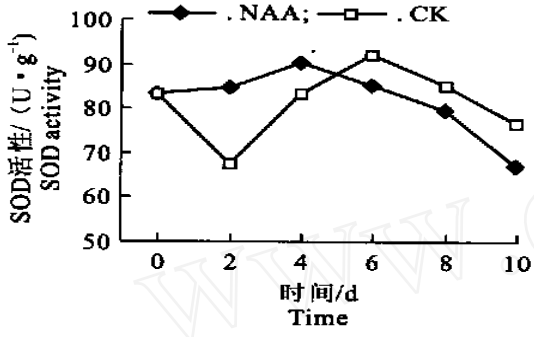

图1 猕猴桃离体生根期间SOD 活性变化

Fig. 1 Changes of SOD activity in kiwifruit during rooting *in vitro*

2.2 猕猴桃生根期间POD 活性变化

图2表明,处理和对照的POD 活性变化曲线基本一致,均表现为先下降后升高的趋势。第4天时,处理POD 活性最低,与对照最低值(第2天)差异不明显;第10天处理POD 活性达到最高峰,比对照高31.08%,差异显著($P < 0.05$)。对照POD 活性在前2天下降,以后逐渐升高到原来水平。由此可见,POD 活性在不定根发生后期逐渐升高。

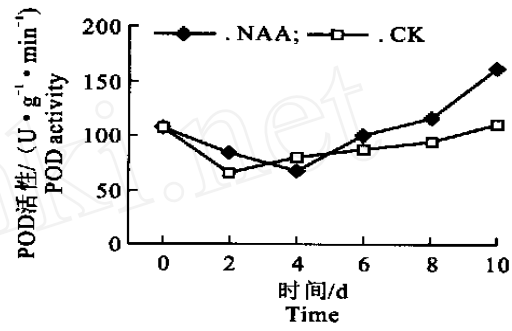

图2 猕猴桃离体生根期间POD 活性变化

Fig. 2 Changes of POD activity in kiwifruit during rooting *in vitro*

2.3 猕猴桃生根期间CAT 活性变化

由图3可知,处理和对照CAT 活性变化趋势十分相似。前2天,处理和对照CAT 活性迅速下降,处理略低于对照;第2~4天,处理和对照的CAT 活性均急剧升高;第6天处理的CAT 活性达到最高峰,对照却一直下降并低于原来水平。第4,6,8天,处理CAT 活性比对照分别高17.40%,34.71%和32.53%。第6天处理的CAT 活性最高,比对照峰值(第4天)高20.44%,且差异显著($P < 0.05$)。这表明猕猴桃离体生根期间,处理的CAT 活性明显增加,提高了植株的抗氧化能力。

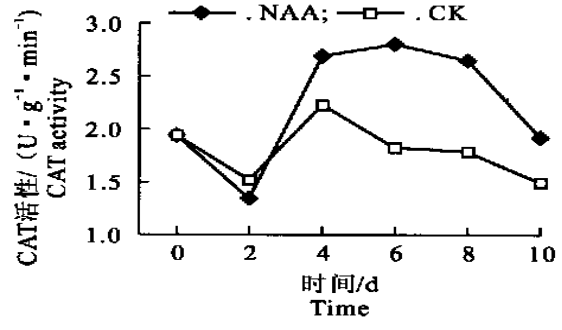

图3 猕猴桃离体生根期间CAT 活性变化

Fig. 3 Changes of CAT activity in kiwifruit during rooting *in vitro*

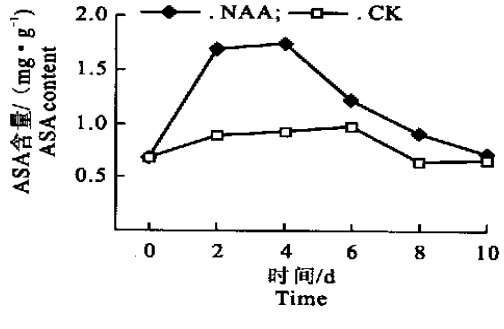

图4 猕猴桃离体生根期间ASA 含量变化

Fig. 4 Changes of ASA content in kiwifruit during rooting *in vitro*

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　猕猴桃体内ASA 含量变化

在猕猴桃离体生根过程中, 处理ASA 含量于第 2 天急剧增加, 第 4 天时达到最大值, 以后持续下降到原来的水平, 并明显高于对照。对照ASA 含量在前6 天略有增加, 以后呈下降趋势(图4)。第2 天和第 4 天时, 处理和对照的ASA 含量差异极显著($P < 0.01$); 第6, 8, 10 天时, 二者差异不显著。

2.5　猕猴桃生根期间GSH 含量变化

如图5 所示, 处理与对照的GSH 含量变化趋势十分相似。离体培养前4 天, 处理和对照的GSH 含量均下降, 处理比对照略低, 两者最低值差异不显著; 4 d 后, 处理与对照的GSH 含量均迅速增加, 第 6 和8 天时变化平缓, 处理比对照分别高 23.79% 和 24.71%; 第10 天时, 处理的GSH 含量下降, 与对照相差不大。

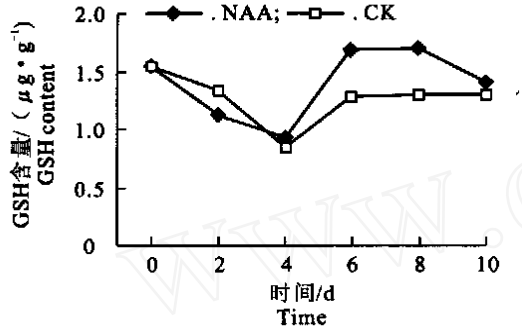

图5　猕猴桃离体生根期间GSH 含量变化

Fig. 5　Changes of GSH content in kiwifruit during rooting *in vitro*

3　讨　论

形态学观察统计结果表明, 在生根培养基上培养 5 天后, 猕猴桃组培苗茎段基部形成一个像"帽"的结构, 10 d 后生根率达 93.8%, 此时对照生根率仅 6.5%。

试验研究表明, 猕猴桃组培苗经NAA 处理后, 抗氧化酶活性均有不同程度地提高, SOD 和CAT 活性升高较早, POD 活性升高较迟。SOD 是氧自由基代谢的第一酶类, 催化$O_2^{\cdot-}$ 转化为H_2O_2, H_2O_2 必须再经CAT 和POD 等协同作用清除掉, 才能使植物生理代谢正常进行。SOD 是典型的诱导酶, 活性氧含量上升时诱导SOD 活性升高[2]。本试验发现, 生根前4 天, 处理SOD 活性维持在较高水平, 可能与生理代谢旺盛, 产生大量活性氧有关; 4 d 后处理SOD 活性下降, 比对照低, 可能是由于处理CAT 和POD 活性增加, 使植物具有了较强的自由基清除能力。这与Camp[8]的研究结论一致。

POD 是普遍存在于植物体内的含铁卟啉辅基的酶, 在细胞分化中有重要作用。本试验发现, 10 d 内处理POD 活性变化趋势与对照十分相似, 第10 天处理POD 比对照高31.08%。Gasper 等[9]研究发现, POD 同工酶具有调节植物内源激素IAA 合成的功能, 控制着植物细胞的生长发育。生根前期POD 活性降低, IAA 含量增加, 有利于诱导不定根发生; 生根后期POD 活性缓慢升高, 可能与H_2O_2 参与细胞壁形成、木质素单体的聚合[1]以及根原基的形成[10]有关。

内源生长素可触发根尖细胞周期蛋白基因 *cyc1At* 表达, 进而促进细胞分裂和根的生长[11]。猕猴桃组培苗经NAA 诱导后, 生根 4 d 起处理POD、CAT 活性均比对照高, 但 10 d 内处理的CAT 和POD 活性变化趋势与对照一致。这说明POD 和CAT 在不定根形成过程中起调节作用。与处理不同的是, 对照SOD 活性在前 2 天显著降低。SOD 活性下降造成$O_2^{\cdot-}$ 积累, 这使$O_2^{\cdot-}$ 与过量的H_2O_2 反应产生损伤力更大的羟自由基(·OH)和单线态氧($^1O_2$), 因而很易引发细胞膜氧化性的破坏作用[1]。由此推测, 对照生根率低下的生理原因可能与植物体内较低水平的抗氧化能力有关。

ASA 和GSH 是2 种主要的抗氧化剂, 对清除活性氧有重要的作用。ASA 和GSH 可被$O_2^{\cdot-}$ 直接氧化, 但叶绿体中的$O_2^{\cdot-}$ 主要由SOD 歧化为H_2O_2 和O_2[12]。由于叶绿体内缺少CAT, 叶绿体内的H_2O_2 主要通过ASA-GSH 循环系统被清除[13]。本试验发现, 10 d 内处理的ASA 和GSH 含量变化趋势与对照基本一致, 且明显高于对照。在处理组中, 4 天前ASA 含量急剧增加, GSH 含量降低; 4 天后ASA 含量逐渐下降, GSH 含量开始增加。有研究[1]指出, 在正常条件下, ASA 含量丰富时, 可使Fe^{3+} 循环还原为Fe^{2+} 状态, 有利于植物体内Fenton 反应和ASA 的再生。由于只有还原型抗坏血酸(ASA)才具有生理功能, 在维持高含量ASA 时GSH 被消耗[14]。Aono 等[15]研究发现, 叶绿体体内GSH 含量增加, 能促进ASA-GSH 循环, 使抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)的活性相应增加, 这些酶协调作用可清除体内活性氧, 维持叶绿体体内较低的膜脂过氧化水平。这说明抗氧化剂在不定根形成过程中具有重要作用。

本试验研究了处理和对照在离体生根期间抗氧化系统的动态变化, 说明较高水平的抗氧化能力与

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

猕猴桃不定根发生有密切关系,同时也证明NAA促进了这些物质的代谢过程,促进了猕猴桃组培苗生根。

由于试验材料有限,只测定了刚刚开始生根的时期,后期工作有待进一步完善。关于离体生根条件下植物体内抗氧化系统的促进机理,有待进一步试验研究。

[参考文献]

[1] 余叔文,汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1998. 721-758.

[2] 宋纯鹏. 植物衰老生物学[M]. 北京:北京大学出版社,1998. 30-57.

[3] 马锋旺,李嘉瑞. 苹果新梢离体不定根形成期间某些生理变化的研究[J]. 西北农业学报,1995,4(1):80-83.

[4] Istvan Kiraly, Ildiko Balla, Julia Jakab, et al. Responses of the photosynthetic system and peroxidase activity to the rooting conditions of oak micropropagation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 66: 155-158.

[5] Hausman O B, Potter J R. Rooting of apple, Rhodoendron, and mountain lauerel cutting from stockplants etiolated under two temperatures[J]. Hortscience, 1997, 32(2): 304-306.

[6] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000.

[7] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Arch Biochem Biophys, 1959, 82: 70-77.

[8] Camp W V. Enhencement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants Overproducing Fe-Superoxide dismutase in chloroplasts[J]. Plant Physiol, 1996, 112: 701-712.

[9] Gasper T, Penel C, Castillo F J. A two step control of basic acidic peroxidases and its significance for growth and development[J]. Plant Physiol, 1985, 64: 418-424.

[10] 刘玉艳,于凤鸣,于 娟. IBA对含笑扦插生根影响初探[J]. 河北农业大学学报,2003,26(2):25-29.

[11] 孙海国,张福锁. 缺磷胁迫对小麦根细胞周期蛋白基因*cyc1At*表达的影响[J]. 植物生理学学报,2000,26(5):441-445.

[12] RAO M V. Influence of salilylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress and H_2O_2-metabalizingo enzymes[J]. Plant Physiol, 1997, 113: 137-149.

[13] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of acticity oxygens and of excess photons[J]. Annual Review Plant Physiol and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 601-639.

[14] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control[J]. Annual Review Plant Physiol and Plant Molecular Biology, 1998, 49: 249-279.

[15] Aono M, Saji H, Fujiyama. Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Physiol, 1995, 107: 645-648.

Changes of the antioxidation system in kiwifruit during rooting culture *in vitro*

WANG Shun-cai[1,2], MA Feng-wang[2], LIANG Dong[2], XU Ling-fei[2], YE Xing-yuan[2]

(1 *School of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu* 741001, *China*;
2 *College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: The changes of antioxidation system and their relations in kiwifruit during rooting culture *in vitro* were studied with the tissue cultured "Hayward" shoots. The results showed that the SOD activity, the ASA content first increased and then declined constantly. The activity of POD declinied during the first 4 days, and then increased in the following days. Both GSH content and CAT activity increased after an obvious decline, and finally declined. Compared with the control, activity and content of the antioxidation system were obviously raised by NAA, indicating that the higher activity of antioxidation system had an important promoting effect on rooting culture *in vitro* in kiwifruit.

Key words: Kiwifruit; root culture *in vitro*; antioxidation system

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net