

⑨

# 葡萄脯氨酸累积变异系CAT 和SOD活性研究

陈耀锋<sup>1</sup> 贺普超<sup>2</sup> 廖祥如<sup>3</sup> 席美丽<sup>4</sup>

(1 西北农业大学农学系, 2 园艺系, 3 基础科学系, 4 食品系, 陕西杨凌 712100)

**摘要** 研究了无胁迫和NaCl胁迫条件下,同基因型二倍体葡萄4个脯氨酸累积变异系和对照系愈伤组织的过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果表明,在无胁迫条件下,葡萄脯氨酸累积变异系的CAT和SOD活性显著高于对照系,4个变异系的CAT活性分别是对照的2.41、2.39、2.29和2.13倍,SOD活性分别是对照的4.51、3.69、3.84和3.72倍。在一定浓度NaCl胁迫下,对照系和变异系的CAT和SOD活性都有一定的增加,变异系的CAT和SOD活性仍高于对照系。脯氨酸累积变异系CAT和SOD活性高是其对NaCl胁迫具有较强抗性的可能原因之一。

**关键词** 葡萄,愈伤组织,脯氨酸累积变异系,过氧化氢酶,超氧化物歧化酶

**中图分类号** S663.101

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是植物细胞中重要的两种保护酶。在通常情况下,SOD能催化需氧生物在还原 $O_2$ 和 $H_2O$ 的过程中产生的有害氧自由基( $O_2^-$ )的歧化反应产生 $H_2O_2$ ,而过氧化氢酶和过氧化物酶又能将 $H_2O_2$ 转化为无害的分子氧和水<sup>[1,2]</sup>。研究证实,植物在各种逆境条件下,细胞内自由基产生和消除的平衡会遭到破坏而有利于产生的方面<sup>[3]</sup>,具有一定抗性的生物材料在逆境下存在着较高的保护酶活性<sup>[4,5]</sup>。在利用羟脯氨酸(HYP)胁迫筛选高等植物脯氨酸酶累积变异的研究中,从细胞和个体水平上都证明了由HYP胁迫筛选而获得的稳定的脯氨酸累积变异系具有一定的抗逆性<sup>[6~10]</sup>。但未见有关抗性机理的研究。本研究通过对具有一定耐盐性的葡萄同基因型4个脯氨酸累积变异系的SOD和CAT活性分析,初步探讨了高等植物脯氨酸累积变异系的抗逆机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试材料为通过HYP胁迫筛选获得的二倍体葡萄愈伤组织4个稳定的脯氨酸累积变异系<sup>[1]</sup>。研究证明,4个变异细胞无性系具有较强的耐盐性<sup>[12]</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 过氧化氢酶活性 取在继代培养基上生长20 d的愈伤组织500 mg,加2 mL pH 8.0的磷酸缓冲液研磨,匀浆倒入离心管中,用1 mL pH 8.0的磷酸缓冲液洗涤研钵一

收稿日期 1997-08-19

作者简介 陈耀锋,男,1956年生,副教授,博士

并转入离心管中,于 $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 $10\text{ min}$ ,收集上清液即为提取酶液。过氧化氢酶活性分析参照 Jablonski 和 Anderson<sup>[13]</sup>的方法并加以改良,3 mL 反应液中含有 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0), $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $0.2\text{ mL}$ 提取酶液,于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,752 紫外分光光度计上测定 $240\text{ nm}$ 波长吸收减少值( $E_{240}=39.4\text{ mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),计算CAT活性。重复测定3次。

1.2.2 超氧化物歧化酶活性 取继代培养 $20\text{ d}$ 的愈伤组织 $500\text{ mg}$ 左右,用 $5\text{ mL}$  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 8.0)研磨提取,取研磨液预冷几分钟后倒入离心管中于 $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 $10\text{ min}$ ,取上清液即为提取酶液。SOD活性测定采用Bewley<sup>[14]</sup>等改进的光化学测定法,总体积为 $3\text{ mL}$ 反应混合体系中含有 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}$ -磷酸缓冲液(pH 7.8), $1.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋氨酸, $75\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NBT}$ (硝基四唑蓝), $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{EDTA}$ , $2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素和 $0.2\text{ mL}$ 酶制备液。于 $10\,000\text{ lx}$ 光照, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 $30\text{ min}$ , $560\text{ nm}$ 测定,计算SOD酶活性。重复测定3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄愈伤组织CAT最适反应的pH值

分别在pH 6.24,6.47,6.69,7.17,7.38,7.73,8.04,8.34和9.18磷酸缓冲系统中测定了葡萄胚性愈伤组织无性系(W)的CAT活性。结果表明(图1),在不同pH缓冲系统中,CAT的活性差异很大,反应体系中pH值过高或过低都不利于CAT活性的表达,葡萄胚性愈伤组织CAT酶活性的适宜pH值为6.69~7.38,最适pH为7.17。

### 2.2 葡萄脯氨酸累积变异系的CAT活性变化

在pH 7.0的反应体系中,测定了4个脯氨酸累积变异系(HR<sub>5</sub>、HR<sub>1</sub>、HR<sub>2</sub>和HR<sub>6</sub>)和对照系(W)愈伤组织的CAT活性(附表)。结果表明,同基因型葡萄脯氨酸累积变异系的CAT活性均显著的高于对照系,4个变异系的CAT活性分别是对照系的2.41、2.30、2.29和2.13倍。

附表 变异系和对照系愈伤组织的CAT和SOD活性

材 料	CAT 活性		SOD 活性	
	( $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	变异系/对照系	( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	变异系/对照系
W	$0.1713\pm 0.0015$	—	$0.4367\pm 0.0387$	—
HR <sub>5</sub>	$0.4134\pm 0.0081$	2.41	$1.9715\pm 0.0789$	4.51
HR <sub>1</sub>	$0.3934\pm 0.0072$	2.30	$1.6100\pm 0.1523$	3.69
HR <sub>2</sub>	$0.3921\pm 0.0020$	2.29	$1.6765\pm 0.0983$	3.84
HR <sub>6</sub>	$0.3675\pm 0.0091$	2.13	$1.6250\pm 0.1130$	3.72

### 2.3 NaCl胁迫下变异系的CAT活性变化

葡萄脯氨酸累积变异系和对照系在 $40, 80, 120$ 和 $160\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 胁迫 $14\text{ d}$ 后,CAT活性随NaCl浓度的升高而增加。对照系的增加速度大于4个变异系,当NaCl浓度达到 $120\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,CAT活性又迅速下降,说明高浓度的NaCl对对照系细胞有一定的伤害(图2)。脯氨酸累积变异系在供试的NaCl胁迫浓度范围内,随NaCl浓度的提高,CAT活性虽有一定波动,但总趋势是稳步上升,其CAT活性均高于同一处理下的对照系。

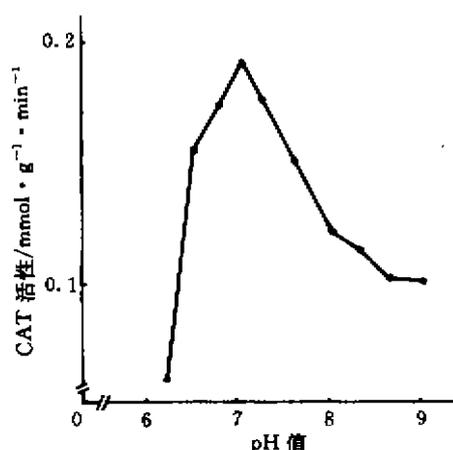


图 1 不同 pH 条件下葡萄无性系(W)的 CAT 活性

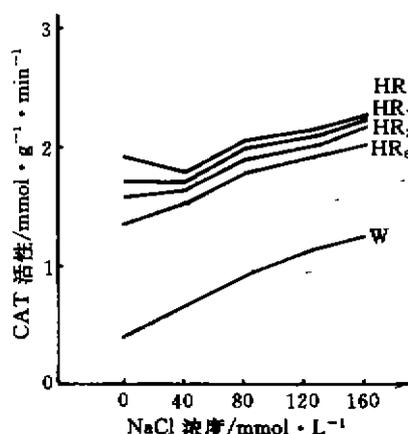


图 2 NaCl 胁迫下变异系和对照系的 CAT 活性

#### 2.4 葡萄脯氨酸累积变异系的 SOD 活性变化

表 1 结果表明,变异系愈伤组织的 SOD 活性都显著的高于对照系,4 个脯氨酸累积变异系愈伤组织的 SOD 活性比对照系分别高 4.51、3.69、3.84 和 3.27 倍。

#### 2.5 NaCl 胁迫对葡萄脯氨酸累积变异系

##### SOD 活性的影响

抗性变异系 HR<sub>5</sub>、HR<sub>1</sub>、HR<sub>2</sub>、HR<sub>3</sub> 和对照系在 NaCl 浓度为 0、40、80、120 和 160 mmol · L<sup>-1</sup> 培养基中,经继代培养 2 周后的愈伤组织 SOD 活性测定结果(图 3)表明,随着培养基中 NaCl 浓度的增加,对照系 SOD 活性迅速提高,NaCl 浓度从 0 提高到 120 mmol · L<sup>-1</sup>,SOD 活性由 0.4367 nmol · mg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup> 提高到 1.258 nmol · mg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>,增加了 2.88 倍。变异系 SOD 活性在无盐胁迫时就较高,盐胁迫下 SOD 活性逐步增加,但增加幅度较缓。在每个 NaCl 胁迫处理中,

变异系 SOD 的酶活性远高于对照系。

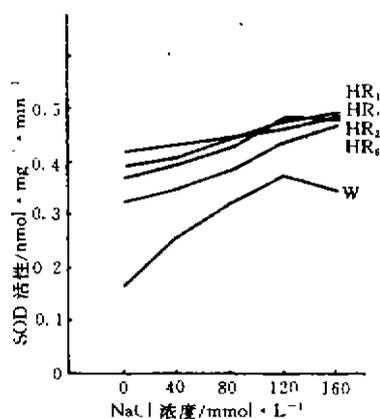


图 3 NaCl 胁迫下变异系和对照系 SOD 活性变化

### 3 讨论

SOD 和 CAT 是植物细胞中两个重要的保护酶类。本研究通过同基因型葡萄脯氨酸累积变异系和对照系愈伤组织 SOD、CAT 活性分析,证明变异系 SOD 和 CAT 活性远高于其对照系。4 个变异系的 CAT 活性分别是对照系的 2.41、2.30、2.29 和 2.13 倍,SOD 活性分别是对照系的 4.51、3.69、3.84 和 3.72 倍。表明葡萄脯氨酸累积变异系在脯氨酸累

积的同时保护酶活性也更高。而这种特性使变异系比对照系更能适应于逆境胁迫。

植物体内保护酶活性的提高有利于植物抗逆特性的形成,这已有许多报道。强烈的阳光使番茄出现伤斑,与细胞中  $O_2^-$  的过量产生有关,推测 SOD 可能在这种伤害中起保护作用<sup>[15]</sup>。菜豆嫩叶的 SOD 活性较老叶高,其抗  $O_3$  的能力也大<sup>[4]</sup>。地衣在遭受干旱时 SOD 具有保护作用<sup>[5]</sup>。小麦幼苗中 SOD 活性与脱水忍耐能力之间存在着显著正相关。用联吡啶季胺盐(Paraquat)处理凤眼莲叶片,使其 SOD 活性增强,则能减轻低温引起的伤害<sup>[16]</sup>。用茉莉酸甲脂处理花生幼苗,在水分胁迫条件下,体内 SOD 和 CAT 酶活性下降程度比未经处理的轻,SOD 同工酶带数比对照多,比对照抗旱性强<sup>[17]</sup>。这些研究表明,植物体内保护酶活性高,能增强植物对逆境胁迫的抗性。本研究中 4 个脯氨酸累积变异系在无助胁迫条件下的 CAT、SOD 活性比对照系高,在不同盐浓度条件下 4 个变异系的 CAT、SOD 酶活性变化较对照系小,这种趋势和它们所表现出的抗盐性是一致的<sup>[17]</sup>。说明葡萄脯氨酸累积变异系所表现出的抗盐性可能与变异系中高的保护酶活性有关,而这种高的保护酶活性在清除逆境胁迫下变异系细胞中产生过量的氧自由基、平衡细胞代谢方面起重要作用。

#### 参 考 文 献

- 1 Fridovich L. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; Superoxide dismutase provide an important defence. *Science*, 1978, 201: 875~880
- 2 Fridovich L. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: Prece W A ed, *Free Radical in Biology*. New York, Academic press, 1976
- 3 武宝玟, 格林·托德. 小麦幼苗中过氧化物歧化酶活性与幼苗脱水忍耐力相关性的研究. *植物学报*, 1985, 27(2): 152~160
- 4 Lee T C, Wicks T. Superoxide dismutase. *Plant Physiol*, 1982, 69: 1444~1449
- 5 Dhindsa R S, Matowe W. Drought tolerance in two mosses, Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J Exp Bot*, 1980, 32: 79~91
- 6 Kueh J S H, Bright S W J. Proline accumulation in a barley mutant resistant to trans-4-hydroxy-l-proline. *Planta*, 1982, 153: 166~172
- 7 Widholm J M. Selection and characteristion of cultured carrot and tobacco cells resistant to lysine methinine and proline analogs. *Can J Bot*, 1975, 54: 1523~1533
- 8 Tantan H, Dorffling K. In vitro selection of hydroxyproline-resistant cell lines of wheat (*Triticum aestivum*): accumulation of proline, decrease in osmotic potential, and increase in frost tolerance. *Physiol plant*, 1991, 82(2): 243~248
- 9 陈 晖, 匡柏健, 王敬驹. 羊草抗羟脯氨酸细胞变异系的筛选及其特性分析. *植物学报*, 1995, 37(2): 102~108
- 10 贺道耀, 余叔文. 水稻高脯氨酸愈伤组织变异体的选择及其耐盐性. *植物生理学报*, 1995, 21(1): 65~72
- 11 陈耀锋, 贺普超, 廖祥如. 葡萄脯氨酸累积变异系的分离研究. *西北农业大学学报*, 1997, 25(2): 14~19
- 12 陈耀锋, 贺普超, 廖祥如等. 同基因型葡萄愈伤组织脯氨酸累积变异系的抗盐性研究. *农业生物技术学报*, 1997, 5(1): 58~63
- 13 Jablonskip P, Auderson J W. Light dependent reduction of dehydro a s corbate by ruptured pea chloroplasts. *Plant physiol*, 1981, 67: 1239~1224
- 14 Bewey L O. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Ann Rev Plant Physiol*, 1979, 30: 195~238
- 15 Rabinowitch H D, Sklan D, Budowski P. Photo-Oxidative damage in the ripening tomato fruit; protective role of

superoxide dismutase. *Physiol Plant*, 1982, 54: 369~374

16 季成, 王崇效, 余叔文. 凤眼莲超氧化物歧化酶活性与抗寒性的关系. *植物生理学报*, 1989, 15(2): 133~137

17 潘瑞炽, 豆志杰, 叶庆生. 茉莉酸甲酯对水分胁迫下花生幼苗 SOD 活性和脂膜过氧化作用的影响. *植物生理学报*, 1995, 21(3): 221~228

## CAT and SOD Activities of Grape Proline Accumulation Variant Lines

Chen Yaofeng<sup>1</sup> He Puchao<sup>2</sup> Liao Xiangru<sup>3</sup> Xi Meili<sup>4</sup>

(1 Department of Agronomy, 2 Department of Horticulture, 3 Department of Basic Science,

4 Department of Food Science, Northwest Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract** Activities of Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) of four proline accumulation variant lines from homogeneous diploid grape somitic callus under NaCl-free and NaCl-stress were studied. The result showed that CAT and SOD activities of grape proline accumulation variant lines under NaCl-free condition were significantly higher than those of the control line. CAT activities of four variant lines HR<sub>5</sub>, HR<sub>1</sub>, HR<sub>2</sub> and HR<sub>6</sub> were 2.41, 2.30, 2.29 and 2.32 times and SOD activities were 4.51, 3.69, 3.84 and 3.73 times as those of control line respectively. Under NaCl-stress conditions, CAT and SOD activities of four variant lines and control line were all increased, but variant lines still showed higher level of activities than their control line. It is suggested that high activities of CAT and SOD in the proline accumulation variant lines play an important role in variant lines more resistant to NaCl-stress than the control line.

**Key words** Grapes, Callus, Proline accumulation variant, Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD)