

苹果叶片离体衰老过程中抗坏血酸代谢的变化^{*}

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

(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 271000)

[摘 要] 以苹果(*Malus domestica* Borkh) 品种嘎拉(Gala)秋梢成熟叶片为试材, 在水培养条件下, 研究了离体苹果叶片衰老过程(0, 6, 12, 18, 30, 48 和 72 h) 中抗坏血酸-谷胱甘肽(A SA -GSH) 循环及A SA 合成关键酶L-半乳糖- γ -内酯脱氢酶(GaLDH) 的变化。结果表明, 在整个衰老过程中, 伴随H₂O₂ 含量、质膜相对透性和MDA 含量升高, 离体苹果叶片中单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR) 活性下降, 抗坏血酸过氧化物酶(APX) 和脱氢抗坏血酸还原酶(DAHR) 活性分别在18 和30 h 达到最高值, 而后开始下降。GaLDH 对苹果叶片离体衰老反应迅速, 在6 h 活性达到最高, 而后开始迅速下降。A SA /DHA, 总A SA 和总GSH 含量随离体培养时间的延续均先上升而后下降, 而GSH/GSSG 比值在叶片离体衰老过程中一直下降。说明在苹果叶片离体衰老过程中, 抗氧化剂A SA 代谢主要是通过提高DHAR 活性来维持其高水平, 抵制衰老。

[关键词] 苹果; 离体叶片; 抗坏血酸-谷胱甘肽循环; L-半乳糖- γ -内酯脱氢酶

[中图分类号] S311

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006) 12-0065-04

植物在衰老过程中伴随着生物氧自由基大量积累^[1]。抗坏血酸(A SA) 是植物体内重要的抗氧化剂, 可通过一系列氧化还原反应来直接清除过氧化氢(H₂O₂)^[2]。A SA 清除H₂O₂ 的过程是在H₂O₂ 被抗坏血酸过氧化物酶(APX) 还原时, 作为电子供体的A SA 被氧化成单脱氢抗坏血酸(MDHA), 然后MDHA 再被单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR) 还原成A SA, MDHA 也可通过非酶歧化反应生成脱氢抗坏血酸(DHA), DHA 在脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR) 和谷胱甘肽(GSH) 参与下可进一步还原为A SA, 使H₂O₂ 最终被清除^[3]。在高等植物中, A SA 除了通过抗坏血酸-谷胱甘肽(A SA -GSH) 循环系统再生外, 还可以自身合成。近年来, A SA 的生物合成途径已逐渐被了解, Wheeler 等^[4]和 Gatzek 等^[5]提出并证实的L-半乳糖途径, 被公认是高等植物合成A SA 的主要途径。虽然A SA 生物合成不同步骤的亚细胞定位有待进一步阐明, 但催化A SA 生物合成最后一步的L-半乳糖- γ -内酯脱氢酶(GaLDH) 已被证明存在于线粒体内膜中^[6]。关于植物衰老过程中A SA 通过A SA -GSH 循环再生及合成的研究, 国内

外尚无系统报道。本文以嘎拉苹果秋梢成熟叶片为试材, 研究了苹果叶片离体衰老过程中A SA -GSH 循环及A SA 合成酶GaLDH 活性的变化, 以探讨植物衰老对抗坏血酸代谢的影响, 为延缓植物衰老提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用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 cv. Gala) 树, 采取树体外围秋梢上成熟叶片为材料。

A SA, GSH, DHA, L-半乳糖- γ -内酯(L-GL), 细胞色素c(L ytc), 抗坏血酸氧化酶(AO) 及GR 均购自Sigma 公司。UV-1700 可见紫外分光光度计。

1.2 样品处理

通过叶柄施加水分, 在HPG-280HX 植物气候箱(光照7 500 lx, 温度22 °C, 相对湿度70%) 中培养, 分别在0, 6, 12, 18, 30, 48 和72 h 取样, 投入液氮速冻, -70 °C 保存, 用于各项指标的测定。每个指标重复3 次以上。

^{*} [收稿日期] 2005-12-08

[基金项目] 西北农林科技大学“拔尖人才支持计划”农业部948 项目(2006-G28)

[作者简介] 李明军(1981-), 男, 甘肃泾川人, 在读博士, 主要从事果树生理生态研究。

[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。E-mail: fwm64@sina.com

1.3 测定指标及方法

1.3.1 质膜相对透性、丙二醛(MDA)含量和 H_2O_2 含量的测定 质膜相对透性和MDA含量测定参考李合生等^[7]的方法, H_2O_2 含量测定参考林植芳等^[8]的方法。

1.3.2 APX,MDHAR和DHAR活性测定 参考Ma等^[9]的方法。

1.3.3 GaLDH活性测定 GaLDH活性测定参考O'ba等^[10]的方法。称取1.0 g苹果叶片,在含0.4 mmol/L蔗糖,体积分数10%甘油,30 mmol/L巯基乙醇和10 g/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的PBS(0.1 mol/L,pH 7.4)中研磨成匀浆,500×g,2℃离心15 min,收集上清液。上清液于22 000×g,2℃离心20 min,弃上清,沉淀用含体积分数10%甘油和5 mmol/L GSH的Tris-HCl(50 mmol/L,pH 8.5)悬浮液悬浮,即为酶液。3 mL反应体系含50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),0.1% Triton X-100,0.1 mmol/L NaN₃,0.02 mmol/L细胞色素c(Cytc),4.5 mmol/L L-半乳糖-γ内酯(L-GL)及0.2 mL酶液。25℃下测定525 nm处还原态Cytc的生成量。酶活力单位定义为:1 min内氧化1 μmol L-GL(或生成2 μmol还原态Cytc)为1个酶活力单位(U)。

1.3.4 ASA、DHA、GSH和GSSG含量的测定 参考Ma等^[9]的方法。

1.4 数据统计与分析

试验数据采用DPS数据处理系统。

2 结果与分析

2.1 苹果叶片离体衰老过程中质膜相对透性及MDA和 H_2O_2 含量的变化

由图1可以看出,在苹果叶片离体衰老过程中,相对电导率和MDA含量均显著上升,且在72 h时较对照分别增加了79.30%和69.41%。与此同时,苹果叶片代谢产生的对自身有毒害作用的活性氧之一 H_2O_2 含量也显著上升,且在72 h时较对照增加了66.43%。

2.2 苹果叶片离体衰老过程中ASA-GSH循环系统相关酶活性的变化

由图2可以看出,在苹果叶片离体衰老过程中,APX活性在18 h时较对照上升了49.24%,而后开始下降。还原DHA的DHAR活性的变化趋势和APX基本一致,先上升后下降,在30 h时达到最高,

较对照上升了36.21%,而后开始下降。而还原MDHA的MDHAR活性一直下降,在72 h时较对照下降了10.25%。

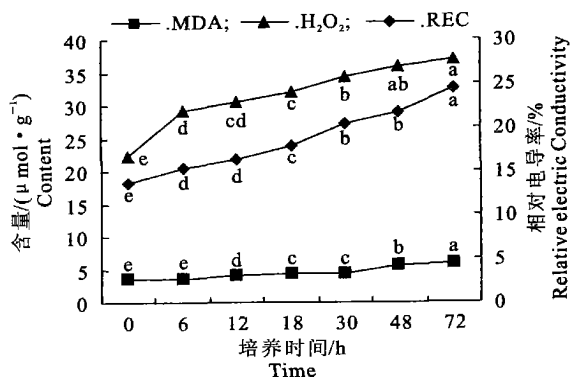


图1 苹果叶片离体衰老过程中相对电导率、MDA和 H_2O_2 含量的变化

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Fig 1 Changes on REC and concentration of MDA and H_2O_2 during senescence of detached apple leaves. Data with the different letters indicate the difference is significant ($P < 0.05$). The same as below.

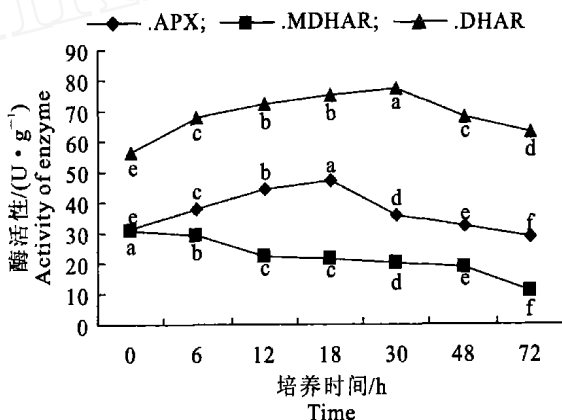


图2 苹果叶片离体衰老过程中APX, DHAR和MDHAR活性的变化

Fig 2 Changes on activities of APX, DHAR, MDHAR during senescence of detached apple leaves

2.3 苹果叶片离体衰老过程中GaLDH酶活性的变化

GaLDH作为ASA合成过程中最后一个关键酶,在苹果叶片离体衰老过程中,其活性在6 h时上升了67.71%,而后开始明显下降(图3)。说明在离体衰老条件下,苹果叶片中ASA的合成能力初期增加,之后随衰老的加剧而明显下降;且苹果叶片GaLDH活性对衰老的反应相当迅速。

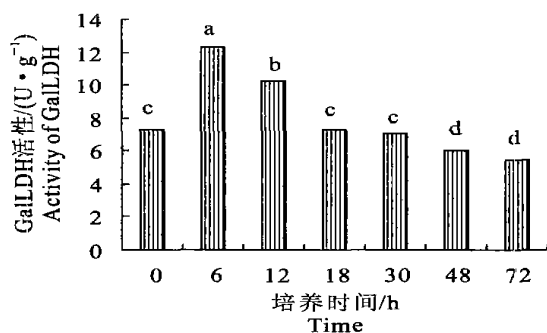


图3 苹果叶片离体衰老过程中GalLDH活性的变化

Fig 3 Changes on activity of GalLDH during senescence of detached apple leaves

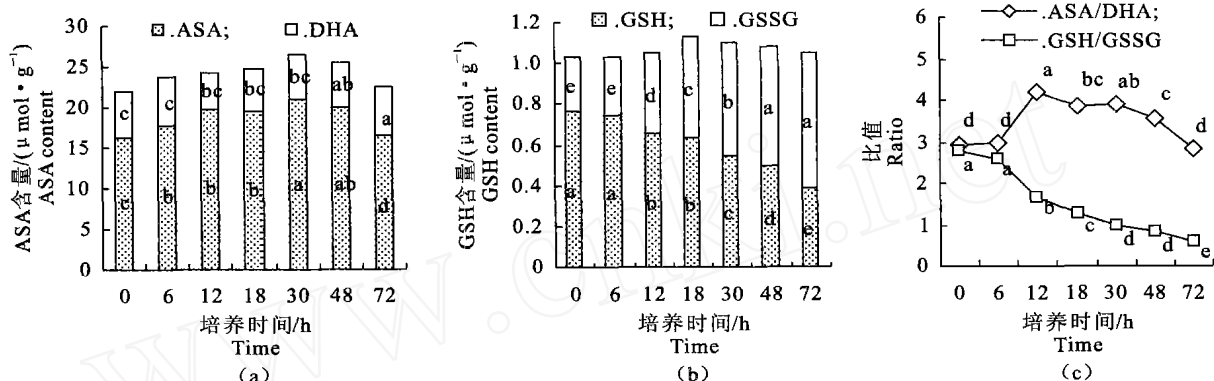


图4 苹果叶片离体衰老过程中ASA (a)、GSH (b)含量及ASA/DHA、GSH/GSSG比值(c)的变化

Fig 4 Changes on content of ASA (a) and GSH (b) and ratio (c) of ASA/DHA and GSH/GSSG during senescence of detached apple leaves

2.5 苹果叶片离体衰老过程中GSH和GSSG含量的变化

由图4(b)可以看出,在离体衰老过程中,苹果叶片总谷胱甘肽含量(GSH + GSSG)先上升,而后下降,但变化幅度不大;GSH含量在叶片衰老过程中逐渐下降,在72 h时较对照(0 h)下降了49.67%;GSSG含量在叶片衰老过程中逐渐增加,且在72 h时较对照增加了2倍多;表示谷胱甘肽氧化还原势的GSH/GSSG比值在叶片离体衰老过程中明显下降(图4(c))。

3 讨论

本研究结果表明,在苹果叶片离体衰老过程中, H_2O_2 含量、质膜相对透性和MDA含量升高,表明膜质过氧化物的发生使膜系统的结构和功能受到损伤,并随衰老进程而加剧。ASA-GSH循环作为植物体内主要抗氧化系统,可以抑制活性氧的产生,在植物衰老过程中起着重要作用^[11]。以ASA为电子供体

2.4 苹果叶片离体衰老过程中ASA和DHA含量的变化

由图4(a)可以看出,在30 h时苹果叶片中表示抗坏血酸库大小的总抗坏血酸含量(ASA + DHA)较对照增长幅度最大,达20.43%,而后下降。在此过程中,还原态ASA含量变化趋势与总ASA变化趋势基本一致,同样在30 h增长幅度最大,达28.30%,而后开始下降。DHA含量先下降后上升,由此引起反映抗坏血酸氧化还原状态的ASA/DHA比值随培养时间的延长先上升而后下降(图4(c)),这说明抗坏血酸氧化还原状态与叶片离体衰老密切相关。

的APX可以直接清除 H_2O_2 ,MDHAR、DHAR和GSH有助于ASA的再生,避免对植物生长起负面作用的DHA的积累^[12]。本研究中,在苹果叶片离体衰老过程中,APX和DAHR活性均先上升后下降,说明在苹果叶片离体衰老过程中,活性氧(AOS)含量升高,激发苹果叶片中抗坏血酸防御系统^[13],从而使清除 H_2O_2 的APX和加快ASA循环再生的DHAR酶活性上升,分别在18和30 h时达到最高。但随衰老时间的延续,对植物有毒害作用的AOS大量积累,降低了相关酶的活性,使清除 H_2O_2 的能力大幅度下降。MDHA是APX催化产生的自由基中间体,可以自发歧化反应生成ASA和DHA,也可通过MDHAR还原为ASA(以NADPH或NADH作为还原剂)。在整个衰老过程中,苹果离体叶片MDHAR活性下降,表明其活性在衰老过程中受到了抑制。

GSH作为DHA的电子供体,其氧化还原态是通过ASA-GSH循环与ASA发生联系。GSH不仅在

加快ASA 再生上有重要作用,而且本身也是生物体内重要的抗氧化剂之一^[14]。在苹果叶片离体衰老过程中,总ASA 和总GSH 含量均先上升后下降。说明衰老开始时,叶片通过总ASA 和总GSH 含量的上升来增加抵御能力,但随着衰老加剧,超过其再生能力时,总ASA 和总GSH 含量下降,同时GSH/GSSG 也明显下降,这与Smirnoff 等^[15]和Jimenez 等^[11]的报道一致。ASA 作为APX 清除H₂O₂ 的电子供体,其含量和氧化还原状态的变化直接反映了植物衰老的程度。在苹果叶片离体衰老过程中,ASA 先上升而后下降,氧化态的DHA 含量却先下降后上升,由此引起的反映抗坏血酸氧化还原状态的ASA/DHA 比值随时间的延续先上升而后下降。

作为合成ASA 的L-半乳糖途径,GaLDH 是催

化ASA 生物合成的最后一个关键酶^[4]。在本试验中,6 h 时GaLDH 活性达最高,之后随着衰老时间的延续,GaLDH 活性开始下降。说明在离体衰老过程中,苹果叶片中ASA 的合成能力初期增加,而后随衰老的加剧而明显下降;而且苹果叶片GaLDH 对衰老的反应相当迅速。Davey 等^[16]认为,当植物处于特殊生理状态(如衰老、果实成熟或软化等)时,糖醛酸途径可能是ASA 合成的一种交替途径,但要清楚地阐明糖醛酸转变途径的过程、生理作用以及与L-半乳糖途径之间的关系,还需进一步研究。Chen 等^[17]研究认为,ASA 与植物对环境改变或防御过程相关的信号转导有关,但在逆境下,植物是否是通过改变ASA 的合成能力来改变ASA 氧化还原状态,从而参与逆境信号的转导,还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Dhindsa R S, Dhindsa P P, Thorpe T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. J Exp Bot, 1981, 32: 93-101.
- [2] Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants[J]. Ann Bot, 1996, 78: 661-669.
- [3] Smirnoff N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection[J]. Phil Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci, 2000, 355: 1455-1464.
- [4] Wheeler G L, Jones M A, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants[J]. Nature, 1998, 393: 365-369.
- [5] Gatzek S, Wheeler G L, Smirnoff N. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis[J]. Plant J, 2002, 30: 541-553.
- [6] Siendones E, Gonzalez-Reyes J A, Santos-Ocana C, et al. Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono-g-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane[J]. Plant Physiol, 1999, 120: 907-912.
- [7] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-194.
- [8] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 衰老叶片和叶绿体中H₂O₂ 的积累与膜脂过氧化物的关系[J]. 植物生理学, 1988, 14(1): 16-22.
- [9] Ma F W, Cheng L L. 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[J]. Plant Sci, 2003, 165: 819-827.
- [10] Oba K, Ishikawa S, Nishikawa M, et al. Purification and properties of L-galactono-γ-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots[J]. J Biochem, 1995, 117: 120-124.
- [11] Jimenez A, Hernandez J A, Pastori G, et al. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves[J]. Plant Physiol, 1998, 118: 1327-1335.
- [12] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 249-279.
- [13] James R M, Hanan, Don F W, Anjura. Seasonal patterns of glutathione and ascorbate metabolism in field grown cotton under water stress[J]. Crop Sci, 2005, 45: 193-201.
- [14] Ball L, Accotto G P, Bechtold U, et al. Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2004, 16: 2448-2462.
- [15] Smirnoff N, Pallanca E. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress[J]. Biochem Soc Trans, 1996, 24: 472-478.
- [16] Davey M W, van Montagu M, Inzé D, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing[J]. J Sci Food Agric, 2000, 80: 825-860.
- [17] Chen Z, Gallie D R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement[J]. Plant Cell, 2004, 16: 1143-1162.

(下转第73页)

- [9] Branas J. Relations entre la vigne et le système climat-sol[C]//Symposium International Sur L'écologie De La Vigne, 1978: 39-47.
- [10] Huglin P. Nouveau mode d'évaluation des possibilités héliothermiques d'un milieu viticole[A]//Symposium international sur L'écologie De La Vigne, 1978: 89-97.
- [11] Huglin P. Biologie et écologie de la vigne[M]. Paris: Payot L ausanne, 1986: 297-304.
- [12] Jackson D. I Prediction of a district's grape-ripening capacity using latitude-temperature index (LTI) [J]. Am J Enol vatic, 1988, 39(1): 19-28.
- [13] 中国科学院《中国自然地理》编辑委员会 中国自然地理(气候) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [14] 盛承禹 中国气候总论[M]. 北京: 科学出版社, 1986: 375-389.
- [15] 李华, 火兴三, 房玉林 我国酿酒葡萄区划指标的研究[J/OL]. [2005-09-27][2005-12-10]. 中国科技论文在线 <http://www.paper.edu.cn>.
- [16] Tony K Wolf, John D Boyer Vineyard site selection[J/OL]. Virginia Tech. [2003-12][2005-12-10]. <http://www.ext.vt.edu/pubs/viticulture/463-020/463-020.html>.
- [17] 罗国光, 吴晓云, 冷平 华北酿酒葡萄气候区划指标的筛选与气候分区[J]. 园艺学报, 2001, 28(6): 487-796.

Study of the zoning thermal indexes of the grapevine

L I Hua, HUO Xing-san

(College of Enology, Northw est A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The zoning thermal index of grapevine at present was summarized and analyzed. Through comparison between several kinds of thermal indexes and analysis of China's climate characteristics, frost-free period is considered to be a proper thermal index of climatic zoning for grapevine in China. Frost-free period, 160 days or more, (30 annual mean values, and the occurrence of frost-free period < 150 days did not surpass 3 times in 30 years) is the lower thermal limit, which is suitable for the growth of grapevine in China.

Key words: grapevine; zoning index; thermal index; frost-free period

(上接第68页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)12-0065-EA

Changes on ascorbate metabolism during senescence of detached apple leaves

L I Ming-jun¹, MA Feng-wang^{1,2}, MA Chun-hua¹, ZHANG Lin-sen¹, HAN Ming-yu¹, SHU Hua-ru^{2,1}

(1 College of Horticulture, Northw est A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271000, China)

Abstract: The changes of ascorbate-glutathione (ASA-GSH) cycle, ascorbate biosynthesis in the detached leaves of apple (*Malus domestica* Borkh cv. Gala) during leaves senescence (at 0, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 h after cultured with water) were investigated in this paper. The results showed, with increasing content of H₂O₂ and MDA and relative electric conductivity, the activity of monodehydroascorbate reductase (MDHAR) decreased, and the activities of ascorbate peroxidase (APX) and dehydroascorbate reductase (DHAR) all decreased when they reached maximum at the 18th and 30th hour of senescence respectively. L-galactono-γ-lactone dehydrogenase (GALLDH) increased rapidly and the activity reached maximum at 6 h and then decreased. ASA/DHA, ASA pool and GSH pool all increased before 30 h and then decreased along with the senescence, and GSH/GSSG decreased obviously. These indicate that ASA, as a main antioxidant, is maintained and improved by increasing DHAR activity during senescence of apple leaves to impeded senescence.

Key words: apple; detached leaf; ascorbate-glutathione cycle; L-galactono-γ-lactone dehydrogenase