

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)01-0022-04

马铃薯活体与离体叶片中 ROS 清除酶活性变化的比较

张之为¹, 赵君^{1*}, 樊明寿¹, 娜仁¹, 赵丽君²

(1. 内蒙古农业大学农学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古乌海市植保植检站, 内蒙古 乌海 016000)

摘要: 通过对抗马铃薯晚疫病品种紫花白和感病品种夏波蒂活体和离体两种状态下 ROS 清除酶系 (SOD, POD, CAT) 在 0~4 d 取样后酶活性的变化趋势比较, 发现马铃薯不同品种的 ROS 清除酶活性的变化趋势均呈现出先降低后增加的态势, 而且活体和离体条件下的变化趋势趋于一致。因此, 我们认为可以利用马铃薯的离体叶片作为接种材料来间接的反映马铃薯植株活体叶片中的 ROS 清除酶系的活性变化。

关键词: 马铃薯; 活体和离体叶片; ROS 清除酶系的活性

自然界中, 当植物受到生物和非生物的胁迫时会引起细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的积累, 从而会对植物细胞造成一定的伤害, 如 DNA 损伤, 蛋白的变性及脂类的过氧化等, 并且还会引起植物的过敏性坏死反应。然而植物在进化过程中形成了完善的 ROS 清除酶系统, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(POD)、过氧化物酶(CAT)^[1-2]。通过这些清除系统可以使活性氧的浓度处于一个相对平衡的状态^[3-5]。SOD 是生物体内特异清除超氧阴离子自由基的酶, 它是一种含金属的酶, 可以催化两个 O_2^- 发生歧化反应, 生成 H_2O_2 和 O_2 ^[6-7]。CAT 是一种包含血红素的四聚体酶, 存在于所有的植物细胞中, 它可将 H_2O_2 迅速分解为 H_2O 和 O_2 ^[7]。CAT 在细胞中主要存在于过氧化体中, 负责清除过氧化体中产生的 H_2O_2 。POD 广泛存在于植物体内不同组织中, 它作为活性较高的适应性酶, 能够反映植物生长发育的特点、体内代谢状况以及对外界环境的适应性。POD 的作用具有双重性, 一方面, POD 可在逆境或衰老初期表达, 可清除 H_2O_2 , 表现为保护效应, 为细胞活性氧保护酶系统的成员之一^[4]; 另一方面, POD 也可在逆境

或衰老后期表达, 参与活性氧的生成、叶绿素的降解, 并能引发膜脂过氧化作用, 表现为伤害效应, 是植物体衰老到一定阶段的产物, 甚至可作为衰老指标^[8-9]。

植物受到病原物的侵染后, 其抗性主要表现在组织结构抗性和生理生化抗性两个方面。寄主的 ROS 清除酶系的变化属于生理生化抗性。用晚疫病病原菌接种马铃薯抗病品种, 其 CAT 活性迅速升高而与之对照的感病品种的 CAT 或者没有变化, 或者其活性升高的时间延迟; 接种后第一天, 抗病品种与感病品种的 POD 活性差异最大, 以后差异逐渐减小, 抗病品种(紫花白)的 POD 的活性均显著高于感病品种(夏波蒂)^[10]。基于 ROS 清除酶系可以间接的反映马铃薯品种的抗性, 本研究以马铃薯为材料, 比较在离体和活体马铃薯叶片中 SOD、POD、CAT 活性的变化趋势, 从而为今后马铃薯抗性的研究提供一种可行的研究手段。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验以马铃薯抗病品种紫花白和感病品种夏波蒂植株的离体与活体叶片为材料, 比较其 SOD、POD、CAT 的活性变化。马铃薯于 2008 年 5 月 8 日在温室种植, 叶片 7~8 周的马铃薯植株, 取样时从距顶端 3~5 个叶片处收集叶片。活体材料按 0, 1, 2, 3, 4 d 直接从植株上采集; 离体叶片存

收稿日期: 2008-12-16

基金项目: 国家自然科学基金(30760132)。

作者简介: 张之为(1982-), 男, 博士研究生, 主要从事植物逆境生理研究。

* 通讯作者: E-mail: zhaojun02@hotmail.com

于培养皿中, 保湿, 分别于 0, 1, 2, 3, 4 d 取样。每组 3 次重复, 取平均值。

1.2 测定方法

1.2.1 SOD 活性测定

采用李合生^[1]的 NBT 显色法, 用 TU-1901 型紫外可见分光光度计 560 nm 波长下测 OD 值, 以抑制 NBT 光还原 50% 作为 1 个酶活性单位。

1.2.2 POD 活性测定

采用郝再彬等^[12]的愈创木酚法, 略有改动。称取叶片 0.1 克置于预冷的研钵中, 加入预冷的磷酸缓冲液(pH=7.8)1 mL, 在冰浴中研磨成匀浆, 将样品全部转移到 10 mL 容量瓶定容, 离心(12 000 r·min⁻¹, 4℃)25 min, 所得上清液即为粗提酶液。酶活性测定: 反应体系 1 mL 1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液+1 mL 0.8% H₂O₂+0.1% 愈创木酚+1 mL 粗酶液, 37℃ 保温 15 min, 冰浴并加入 2 mL 20% 三氯乙酸终止

反应。用 TU-1901 型紫外可见分光光度计在 470 nm 波长处测定吸光值, 以每分 OD 值变化 0.01 为 1 个酶的活性单位。

1.2.3 CAT 活性测定

采用李合生^[1]的方法, 略有改动。粗酶液提取同 POD 活性的测定。酶活性测定: 反应体系 1.7 mL 磷酸缓冲液(pH 7.8)+1.7 mL 0.1 mol·L⁻¹ EDTA-Na₂+0.2 mL 0.1 mol·L⁻¹ H₂O₂, 加入 0.1 mL 粗酶液立即记时, 用 TU-1901 型紫外可见分光光度计在 240 nm 波长处测定吸光值, 记录 0~4 min 的变化值, 以每 min OD 值变化 0.01 为 1 个酶的活性单位。

2 结果与分析

2.1 活体和离体叶片 SOD 活性变比较

马铃薯抗感品种紫花白和夏波蒂活体和离体叶片中 SOD 活性在不同时间的变化趋势见图 1。

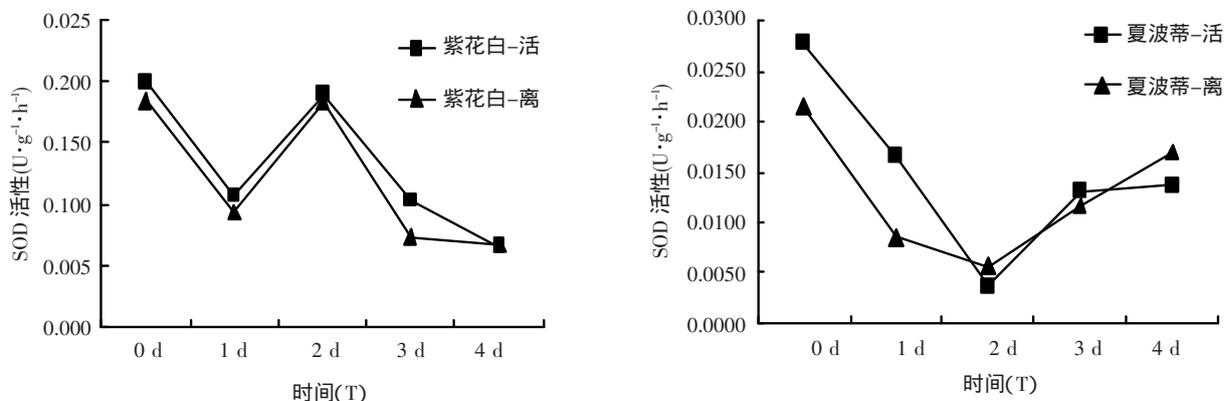


图 1 马铃薯不同时间 SOD 活性变化

图中紫花白和夏波蒂活体与离体叶片中 SOD 活性的变化趋势表现一致, 紫花白的活体与离体叶片的 SOD 活性的变化趋势为先降低后增加然后再降低, 在 2 d 时出现一个峰值; 而夏波蒂活体和离体叶片的趋势是先降低后升高, 第 2 天时活体与离体叶片的 SOD 活性同时达到最低值, 然后 3 d 时开始增加。

2.2 活体和离体叶片 POD 活性变化比较

马铃薯抗感品种紫花白和夏波蒂活体和离体叶片中 POD 活性在不同时间的变化趋势见图 2。

图中紫花白和夏波蒂活体和离体叶片中 POD 活性 0~3 d 的变化趋势基本一致, 均是先降低后增

加, 在第 1 天时两个品种的 POD 活性均出现最低值; 到第 3 天时活体与离体叶片中 POD 活性表现出升高的趋势。只是从第 4 天开始, 紫花白和夏波蒂的 POD 的活性表现出一定的差异, 离体叶片的活性呈增加的态势, 而活体叶片却表现出下降的趋势。

2.3 活体和离体叶片 CAT 活性变化比较

马铃薯抗感品种紫花白和夏波蒂活体和离体叶片中 CAT 活性在不同时间的变化趋势见图 3。紫花白与夏波蒂活体和离体叶片的 CAT 活性变化趋势具有一致性, 在第 1 和 3 天分别出现两个最低峰值, 在第 2 天时出现最高峰。

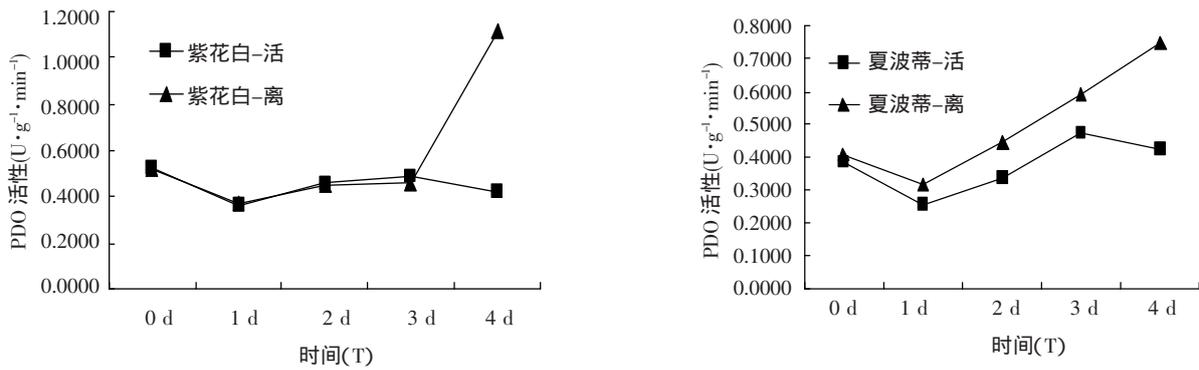


图 2 马铃薯不同时间 POD 活性变化

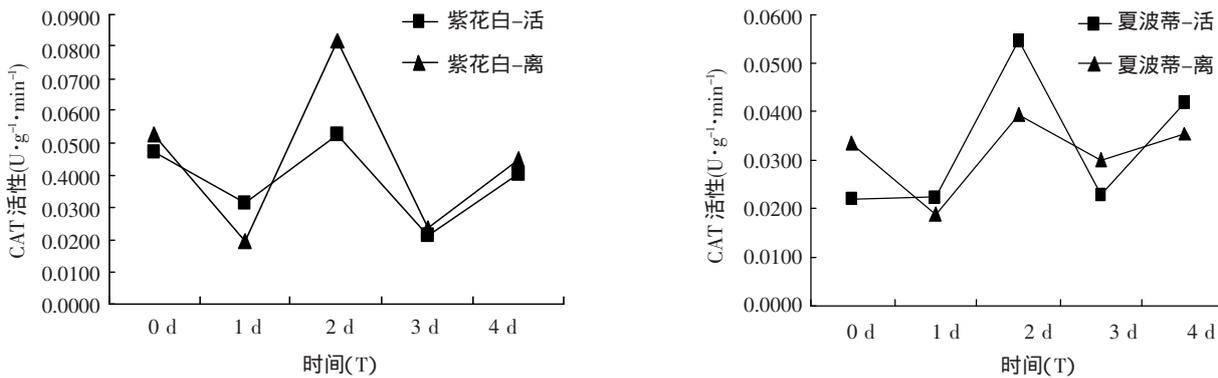


图 3 马铃薯不同时间 CAT 活性变化

3 讨论

通过对马铃薯离体叶片接种晚疫病菌,发现在接种第 3 d 时感病品种已经呈现非常明显的发病症状,所以推测 ROS 清除酶系的变化应该在出现症状之前发生。因此在本试验中我们只是关注 0~3 d 内的 ROS 清除酶活性的变化趋势。通过比较马铃薯晚疫病抗性品种(紫花白)与感病品种(夏波蒂)的三种 ROS 清除酶发现,由于品种的不同,其 ROS 清除酶活性大小在不同的取样点虽然存在差异但是酶系活性的变化趋势基本是一致的,所以我们认为,可以用马铃薯的离体叶片的 ROS 清除酶系的变化趋势代表活体叶片的变化,从而间接的反应马铃薯植株的抗性水平。

对于紫花白和夏波蒂的离体和活体叶片的 POD 的活性在第 4 d 出现差异,可能的原因是不同的 ROS 清除酶在马铃薯的不同的发育阶段发挥着各自的作用。虽然 CAT, SOD 和 POD 统称为 ROS 清除酶,但由于 POD 的作用具有双重性,即清除

H₂O₂ 表现为保护效应和在逆境或衰老后期表现为伤害效应^[9-10],因而使得它的活性变化在抗、感品种活体和离体叶片取样的后期(第 4 d)出现一定的变化。因此,分析 POD 酶的活性时需要考虑植物本身的生长状况,同时还须关注其发挥其功能的最适阶段。

[参 考 文 献]

[1] Beers R F, Sizer I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase[J]. Biol Chem, 1952, 195: 133-140.

[2] 袁朝兴, 丁静. 水分胁迫对棉花叶片中 IAA 含量、IAA 氧化酶和过氧化物酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 1990, 16(3): 179-184.

[3] Allen R D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants[J]. Plant Physiol, 1995, 107: 1049-1054.

[4] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves [J]. Plant phy-

- siol, 1992, 98: 1222-1227.
- [5] 孙红炜, 路兴波, 杨崇良, 等. 不同抗性玉米品种接种甘蔗花叶病毒(SCMV)后 4 种防御酶活性变化研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 181-184.
- [6] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases[J]. Plant Physiol, 1977, 59: 309-314.
- [7] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction[J]. Annul Rev Plant Bio, 2004, 55: 401-427.
- [8] Zhang J X, Kirkham M B. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35(5): 785-791.
- [9] 吴振先, 苏美霞, 陈维信, 等. 贮藏荔枝果皮多酚氧化酶及过氧化物酶与褐变的研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(1): 12-15.
- [10] 张晓荣, 张少英, 梁德霖, 等. 马铃薯防御酶系活性与其抗晚疫病的关系[J]. 中国马铃薯, 2008, 22(3): 129-133.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [12] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验技术[M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 2002.

Comparison of the ROS Scavenge Enzyme Activities between *in vivo* and Detached Potato Leaves

Zhang Zhiwei¹, Zhao Jun¹, Fan Mingshou¹, Naren¹, Zhao Lijun²

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China;

2. Department of Plant Protection and Quarantine, Wuhai, Inner Mongolia 016000, China)

Abstract: Using *in vivo* and detached potato leaves, the ROS scavenge enzyme activities (SOD, POD, and CAT) were compared between the two potato cultivars Zihuabai and Shepody which is resistant and susceptible to potato late blight respectively. The general tendency of the potato ROS scavenge enzyme activities was lowered firstly followed by increasing to the peak, and the tendency between *in vivo* and detached potato leaves was almost the same. Therefore, the detached potato leaves could be used to represent the *in vivo* leaves to analyze the potato ROS scavenge enzyme activities in the future study.

Key Word: potato; detached and *in vivo* leaves; ROS scavenge enzyme activities

关于征集2009年中国马铃薯大会会议论文的通知

为落实 2008 年中国作物学会马铃薯专业委员会学术年会会议纪要精神, 马铃薯专业委员会决定于 2009 年 7 月在陕西榆林市召开 2009 年中国马铃薯大会, 会议主题为——马铃薯产业与粮食安全。为保证这次会议论文的正常出版, 现提前征集, 望广大马铃薯工作者相互转告。具体要求如下:

1. 论文必须是反映近年来各地(单位)科研、生产、开发等方面的成果、信息, 内容要新颖, 文字简练, 论点明确, 书写规范, 数据可靠, 图表清晰, 标点正确。
2. 综述学术及实验性论文一般不超过 6 000 字(含图表), 包括题目、作者姓名、工作单位、地址、邮政编码、中文摘要、关键词、正文、参考文献等。一般性论文(如栽培技术、产业开发、经验交流、品种介绍、病害防治等)要求在 3 000 字左右, 包括题目、作者姓名、工作单位、地址、邮编、正文等。
3. 论文来稿请注明第一作者简介, 包括性别、出生年、职务职称、从事工作或研究方向等, 还请在首页地脚处注明资助该论文的各种基金、课题项目名称及编号, 同时提供联系电话。
4. 论文来稿需提供电子版文档, 并注明“2009 年年会论文”字样。

来稿请寄: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部(150030) E-mail: potatobjb@neau.edu.cn

中国作物学会马铃薯专业委员会