

几种荞麦的抗氧化酶活性研究

龚宁, 陈庆富, 李昌梅, 张以忠

(贵州师范大学 生物技术与工程学院 植物遗传育种研究所, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 测定了荞麦属六种十个居群的SOD、CAT、POD和ASP活性。结果表明:在裁培养麦中,苦荞的抗氧化酶活性高于甜荞;野生荞麦中差异很大,抗氧化酶活性高的有金荞和贵州云台山大野荞。

关键词: 荞麦; 抗氧化酶活性; SOD; CAT; POD; ASP

中图分类号: Q945.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0088-04

Study on antioxidant enzyme activities of buckwheat

GONG Ning, CHEN Qing-fu, LI Chang-mei, ZHANG Yi-zhong

(Institute of Plant Genetics and Breeding, School of Biological Technology and Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: The activities of superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), peroxidase(POD) and ascorbate peroxidase(ASP) in leaves of 10 populations of six buckwheat species were determined. The results show that the antioxidant enzyme activities in *F. tataricum* are higher than those in *F. esculentum*. There are great deviations of the antioxidant enzyme activities among wild buckwheat populations, for example, the antioxidant enzyme activities in *F. cymosum* are much higher than others.

Key words: buckwheat; antioxidant enzyme activity; SOD; CAT; POD; ASP

需氧生物在长期进化中形成了一套抗氧化系统,主要包括抗氧化酶类、修复酶类及一些生物分子(Hodge等,1996;Iturbe-Ormaetxe等,1998)。在这个系统中,以酶系统(包括超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)和抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate Peroxidase, ASP)等)对活性氧的清除较为重要。约90%的 O_2^- 是由SOD清除的。SOD将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 ,POD、CAT、ASP则负责 H_2O_2 的清除。它们在生物体内组成清除活性氧自由基的多酶复合体系,具有抗自由基的联合、协同作用(张政等,1999)。研究证明这些酶与植物抗逆性(Kalir,1981)和抗衰老(Stewart等,1980)均有关系。

荞麦(Buckwheat)属蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*),有约16个种(陈庆富,2001;张以

忠等,2004)。荞麦营养丰富又有较高的药用保健价值,在国际市场上销售很好,因此,目前对荞麦的研究和开发越来越受到人们的重视。

本实验测定和比较了荞麦属六种十个居群的抗氧化酶活性,以期为荞麦育种中亲本的选择和荞麦的开发利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料来源于贵州师范大学植物遗传育种研究所实验园地。于2004年7月15日取生长于田间的处于生长旺盛时期的荞麦中上部健康成熟叶。采用多点取样,混合测定的方法。这些材料的种名及

收稿日期:2005-01-10 修回日期:2005-09-16

基金项目:国家自然科学基金(30270852);贵州省优秀人才基金[黔科教办(2001)3号]资助[Supported by the Natural Science Foundation of China(30270852);Foundation for the Excellent Scholars of Guizhou Province(2001)3]。

作者简介:龚宁(1963-),女,贵州遵义人,硕士,副教授,从事植物生理和细胞生物学的科研教学工作。

来源见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的制备 参照王爱国等(1983)的方法进行。取成熟鲜叶,去主脉,准确称取 2 g,加入预冷的酶提取液(50 mmol/L(pH7.8)磷酸缓冲液,内含

0.1 mmol/L EDTA, 0.3% Triton X-100, 4% PVP)10 mL,冰浴充分研磨,在冰冻离心机以 1.2 万转/min 冰冻离心 20 min,上清液即为粗酶液,冷藏备用。

1.2.2 酶活性测定 (1)超氧化物歧化酶(SOD)活

表 1 供试材料及来源
Table 1 Materials used in this study

名称 Name	编号 Accession	种名 Species name	代号 Symbol	原产 Native to	来源 Sources
Sibano	BW130	甜荞, <i>F. esculentum</i>	E1	德国	QingFu Chen
沿河四倍体甜荞(4×common buckwheat)	BW79	甜荞, <i>F. esculentum</i>	E2	人工合成	QingFu Chen
平荞 2 号(PingQiao 2)	BW131	甜荞, <i>F. esculentum</i>	E3	中国	QingFu Chen
黔苦 2 号(QianKu 2)	BW132	苦荞, <i>F. tataricum</i>	T1	中国威宁	QingFu Chen
西藏 P ₁₋₁ (Tibet P ₁₋₁)	BW50-1	毛野荞, <i>F. pilus</i>	P1	中国西藏	QingFu Chen
西藏 P ₂ (Tibet P ₂)	BW50-2	毛野荞, <i>F. pilus</i>	P2	中国西藏	QingFu Chen
云台山 M ₁ (YunTai Mountain M ₁)	BW110-1	大野荞, <i>F. megaspartanium</i>	M1	中国贵州施秉	QingFu Chen
理县 M ₁ (LiXian M ₁)	BW120-1	大野荞, <i>F. megaspartanium</i>	M2	中国昆明理县	QingFu Chen
Cym ₁₋₁ (JinQiao ₁₋₁)	BW102-1	<i>F. cymosum</i>	C1	中国	QingFu Chen
Gig ₁₋₁ (JuQiao ₁₋₁)	BW103-1	<i>F. gigantium</i>	G1	人工合成	QingFu Chen

性测定:按照王爱国等(1983)的方法。以 PBS 液代替 NBT 作空白,以不加酶液而加等量酶提取液为最大光还原管,以能抑制 NBT 光化还原 50% 为一个 SOD 活力单位。

(2)过氧化氢酶(CAT)活性测定:用 KMnO₄ 滴定法(西北农业大学植物生理生化教研组,1987)。根据 H₂O₂ 的消失量计算 CAT 活性,单位为 (H₂O₂)mg · min⁻¹ · g⁻¹FW。

(3)过氧化物酶(POD)活性测定:采用愈创木酚法(张志良,1990)。以每分钟吸光度变化值表示酶活性大小,单位为 ΔOD₄₇₀ · min⁻¹ · g⁻¹FW。

(4)抗坏血酸过氧化物酶(ASP)活性测定:参照 Dalton 等(1987)的方法略作改进。反应混合液组成为:50 mmol/L PBS(pH7.0)+0.1 mmol/L EDTA-Na₂+0.5 mmol/L AsA+10 mmol/L H₂O₂。取反应混合液 3 mL,加 100 μL 粗酶液启动反应,连续记录 290 nm OD 值的变化,每 10 s 读数一次。以每分钟吸光度变化值表示酶活性大小,单位为 ΔOD₂₉₀ · min⁻¹ · g⁻¹FW。

2 结果与分析

2.1 SOD 活性

对荞麦属六种十个居群的 SOD 活性的测定结果见图 1。结果表明:在栽培荞麦中,苦荞的 SOD 活性大于甜荞;野生荞麦各居群间的 SOD 活性差异

较大,变化范围是 129~287 unit · g⁻¹FW,活性最低的是 P2 和 M2,最高的是贵州云台山大野荞(M1),高者是低者的 2.22 倍;人工合成的巨荞(G1)SOD 活性处于中间水平。SOD 对于清除氧自由基,保护细胞免受氧化损伤具有十分重要的作用,当植物处于逆境条件时,该酶的作用尤为突出(马旭俊等,2003)。图 1 的结果表明在供试的荞麦中,贵州云台山大野荞通过 SOD 清除超氧阴离子自由基的能力最强,其次是黔苦 2 号(T1),说明这两种荞麦可能具有较高的抗逆性。

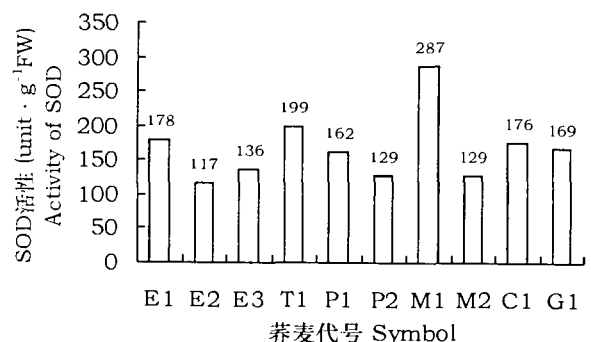


图 1 荞麦属六种十个居群的 SOD 活性
Fig. 1 Activity of SOD in several buckweats

2.2 CAT 活性

荞麦属六种十个居群的 CAT 活性测定结果见图 2。从图中可以看出,栽培荞麦(E1, E2, E3, T1)

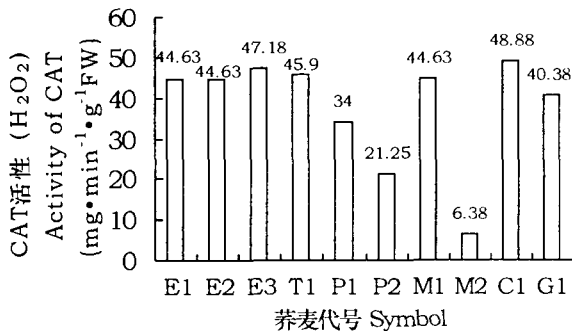


图2 荞麦属六种十个居群的CAT活性

Fig. 2 Activity of CAT in several buckweats

的CAT活性比较接近,都比较高。而野生荞麦的活性差异则较大,变化范围是6.38~48.88(H₂O₂)mg·min⁻¹·g⁻¹FW。其中,活性最低的是原产理县的大野荞(M2),最高的是C1,其活性达到了48.88(H₂O₂)mg·min⁻¹·g⁻¹FW,是M2的7.66倍。贵州云台山山野荞(M1)活性次之,也达到了44.63(H₂O₂)mg·min⁻¹·g⁻¹FW;人工合成的巨荞的活性达到了40.38(H₂O₂)mg·min⁻¹·g⁻¹FW,也比较高。说明通过CAT清除H₂O₂的作用是三种甜荞、黔苦2号、贵州云台山山野荞、金荞(C1)和巨荞(G1)较强,原产西藏的P1和P2次之,理县M2最差。

2.3 POD活性

POD活性的测定结果见图3。由图3可看出,栽培荞麦中三种甜荞的POD活性均很低,尤其是平荞2号,仅有1.0ΔOD₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW,黔苦2号稍高,其活性是平荞2号的16.2倍。野生荞麦的POD活性差距很大,变化范围是8.0~96.6ΔOD₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW。活性最高的是金荞C1,达到了96.6ΔOD₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW。西藏毛野荞P1的活性也较高,为34.4ΔOD₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW。而理县山野荞M2的活性最低,只有8.0ΔOD₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW,是金荞C1的1/12,但比甜荞高,是平荞2号的8.0倍。人工合成的巨荞G2活性为13.6ΔOD₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW,与黔苦2号和云台山M1较接近。说明这些植物通过POD清除H₂O₂的能力是C1最高,P1次之,而其他类型荞麦较低。

2.4 ASP活性

测定结果见图4。图中结果表明,栽培荞麦中甜荞的ASP活性较低,但黔苦2号很高,是供试荞麦中最高的,达到了20.7ΔOD₂₉₀·min⁻¹·g⁻¹FW,

是Sibano的8.63倍。野生荞麦中大部分种的活性高于甜荞,而低于黔苦2号,但有一例外,即理县M1,其活性只有0.9ΔOD₂₉₀·min⁻¹·g⁻¹FW,是供试荞麦中最低的,只有黔苦2号的1/23、sibano的1/2.67。人工合成的巨荞的ASP活性高于甜荞,低于黔苦2号和大部分野生荞麦。ASP是叶绿体内分解H₂O₂的关键酶,对叶绿体具有保护作用(曹宛红,1994),其对H₂O₂的亲合力远远大于CAT(沈文彪等,1997)。图4的结果说明黔苦2号具有很强的清除叶绿体中H₂O₂的潜力,野生荞麦(理县M1除外)和巨荞次之,甜荞较差。

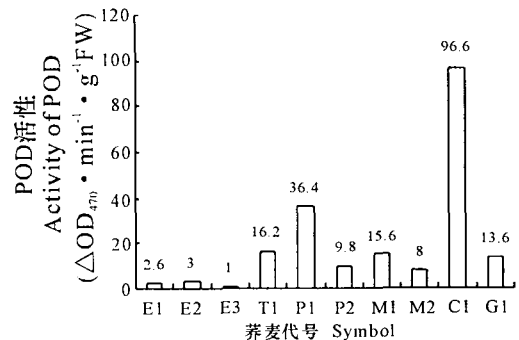


图3 荞麦属六种十个居群的POD活性

Fig. 3 Activity of POD in several buckweats

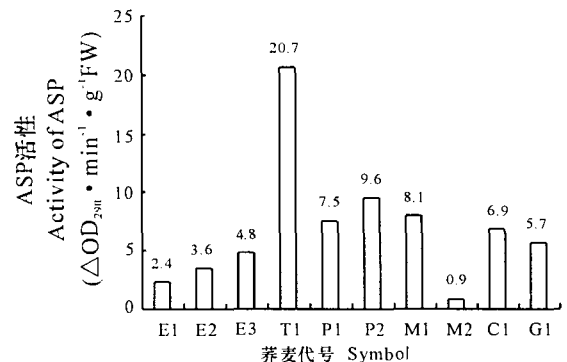


图4 荞麦属六种十个居群的ASP活性

Fig. 4 Activity of ASP in several buckweats

3 讨论

栽培荞麦中苦荞的抗氧化酶活性高于甜荞,说明它的抗病抗旱等抗逆性可能高于甜荞,实践中我们也发现:甜荞易感白粉病,而种植在一起的苦荞则不易。四倍体甜荞的抗氧化酶活性并不高,说明染色体数目加倍未必使酶活性增高。野生荞麦的抗氧

化酶活性差异很大,某些居群的抗氧化酶活性相当高,如金荞、贵州云台山山野荞,可以作为栽培荞麦改良的原始材料或直接开发成食品、保健品及药物。

植物在长期进化中形成的一套内源抗氧化保护酶系统极其复杂,其中 SOD 处于清除活性氧自由基的第一道防线,它催化体内超氧阴离子自由基(O_2^-)歧化,形成氧分子和过氧化氢(余叔文等,1999)。而 H_2O_2 的过量积累也会对植物产生严重伤害。Asada(1992)指出: H_2O_2 的清除是细胞彻底清除活性氧伤害的关键。CAT、POD 和 ASP 是植物体内清除 H_2O_2 的重要酶类。本研究表明,不同的荞麦在这些酶活性上表现很不相同,有的 POD 活性高,有的则是 ASP 活性高。也许不同的荞麦可通过不同的途径清除体内 H_2O_2 。

野生荞麦中,理县大野荞(M2)的几种抗氧化酶活性均较低,但我们发现它并不易染病虫,生长状况良好,这是否表明它具有其它的清除活性氧的途径?或者具有很强的应急能力,在胁迫条件下能迅速增强其抗氧化酶活性? 这些问题有待进一步探讨。

参考文献:

- 西北农业大学植物生理生化教研组. 1987. 植物生理实验指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社,36—38.
- 沈文彪,黄丽琴,徐朗莱. 1997. 植物抗坏血酸过氧化物酶[J]. 生命的化学,17(5):24—26.
- 余叔文,汤章城. 1999. 植物生理与分子生物学[M](第二版). 北京:科学出版社,366—389.
- 张以忠,陈庆富. 2004. 荞麦研究的现状与展望[J]. 种子,23(3):39—42.
- 张志良. 1990. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,88—91.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plant[J]. *Physiol Plant*, 85(2):235—241.
- Cao WH(曹宛红). 1994. Ascorbate peroxidase as a key enzyme of H_2O_2 scavenging system in chloroplasts(作为叶绿体 H_2O_2 分解系统关键酶的抗坏血酸过氧化物酶)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 30(6):452—458.
- Chen QF(陈庆富). 2001. Karyotype analysis of five *Fagopyrum* species native to China(五个中国荞麦种的核型分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 21(2):107—110.
- Dalton DA, Hanus FJ, Russell SA, et al. 1987. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules[J]. *Plant Physiol*, 83:789—794.
- Hodge M, Andrew CJ, Johnson DA, et al. 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines[J]. *Physiol Plant*, 98(4):685—692.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo P R, Arrese-Igor C, et al. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat[J]. *Physiol Plant*, 116:173—181.
- Kalir A. 1981. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione pertulacoides* L. Aelle exposed to high sodium chloride concentrations[J]. *Ann Bot*, 47(1):78—85.
- Ma XJ(马旭俊), Zhu DH(朱大海). 2003. Functional roles of the plant superoxide dismutase(植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展)[J]. *Heredities*(遗传), 25(2):225—231.
- Stewart RG, Bewleg JD. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. *Plant Physiol*, 65:245—248.
- Wang AG(王爱国), Lou GH(罗广华), Shao CB(邵从本), et al. 1983. A study on the superoxide dismutase of soybean seeds(大豆种子超氧歧化酶的研究)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 9(1):77—84.
- Zhang Z(张 政), Wang ZH(王转花), Lin RF(林汝法), et al. 1999. Effect of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} on antioxidant enzyme activities in buckwheat seed(Cu^{2+} , Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 对荞麦种子中抗氧化酶活性的影响)[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学学报), 15(5):848—851.
2002. Studys on tissue culture and rapid propagation of *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣组织培养与快速繁殖研究)[J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Edition)*(四川大学学报(自然科学版)), 39(1):137—140.
- Yi ZJ(易志军). 2001. Callus tissue culture in *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣愈伤组织培养研究)[J]. *Economic Forest Researches*(经济林研究), 9(3):21—22.
- Zhang ZQ(张宗勤), Sha WQ(撒文清), Liu JC(刘建才). 1998. Micropropagation and microtuberization of *Dioscorea collettii* Hook. F.(叉蕊薯蓣的微繁殖及微型薯蓣的离体诱导)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 8(1):18—20.
2002. Studys on tissue culture and rapid propagation of *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣组织培养与快速繁殖研究)[J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Edition)*(四川大学学报(自然科学版)), 39(1):137—140.
- Yi ZJ(易志军). 2001. Callus tissue culture in *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣愈伤组织培养研究)[J]. *Economic Forest Researches*(经济林研究), 9(3):21—22.
- Zhang ZQ(张宗勤), Sha WQ(撒文清), Liu JC(刘建才). 1998. Micropropagation and microtuberization of *Dioscorea collettii* Hook. F.(叉蕊薯蓣的微繁殖及微型薯蓣的离体诱导)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 8(1):18—20.

(上接第 100 页 Continue from page 100)

panthaica Prain et Burkill(黄山药丛生芽诱导与植株快速繁殖)[J]. *Biotechnology*(生物技术), 14(2):53—54.

Meng L(孟 玲), Zhu HT(朱宏涛), Liu XK(刘锡葵), et al. 2000. Micro propagation of *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣的快速繁殖)[J]. *Nat Product Res Development*(天然产物研究与开发), 12(6):17—21.

Robertson GH, Doyle LR, Sheng P, et al. 1989. Diosgenin formation by freely suspended and entrapped plant cell cultures of *Dioscorea deltoidea*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(8):1114—1125.

Yan YC(晏婴才), Lin HH(林宏辉), Dai QL(代其林), et al.