

脱落酸对锁阳茎切口愈合及抗氧化酶活性的影响

段园园, 岳鑫, 陈贵林*

内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特010021

摘要: 为了探讨脱落酸(ABA)对锁阳茎切口愈合及抗氧化酶活性的影响, 测定了锁阳茎3个部位(上部、中部和下部)内源ABA含量和切口愈合能力(抗失水力)以及苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性随切口愈合时间的变化。结果表明, 内源ABA含量随切口愈合天数的增加整体呈上升趋势。外源ABA处理明显增强了锁阳茎3个部位的PAL活性及抗氧化酶活性, 加速了锁阳茎切口愈合, 减少失水也提高了其抗氧化能力。比较3个部位, 各指标均呈现出上部高于中部, 中部高于下部的趋势。

关键词: ABA; 锁阳; 切口愈合; 抗氧化酶

Effect of Abscisic Acid on Wound Healing and Antioxidant Enzyme Activities of *Cynomorium songaricum* Stem

DUAN Yuan-Yuan, YUE Xin, CHEN Gui-Lin*

College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract: In order to study the effect of abscisic acid (ABA) on wound healing and antioxidant enzyme activities of *Cynomorium songaricum* stem, we detected the change of endogenous ABA contents, wound healing ability (resistance to deactivation hydraulic), phenylalanine ammonialyase (PAL), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities of three parts (upper, central and trend) of *C. songaricum* stems with healing time. The results showed that, with healing days increases, the overall increasing rate of the contents of ABA accelerated. Exogenous ABA treatment significantly enhanced PAL activity and antioxidant enzyme activities of three parts of *C. songaricum* stems, which accelerated the wound healing of *C. songaricum* stem, reduced water loss and increased its antidixidant capacity. Having compared 3 parts, each index shows that the upper higher than the central, the central higher than the trend.

Key words: ABA; *Cynomorium songaricum* Rupr.; wound healing; antioxidant enzyme

切口愈合是木栓化及相关的创伤周皮形成的过程。木栓化细胞及相关的疏水结构可抵抗真菌及细菌的侵入和防止水分的流失(Schreiber等2005)。马铃薯块茎切口引起的超氧自由基可以参与过氧化物酶介导的将酚类单体加聚到芳香族木栓质上的氧化偶联反应, 从而起到抵抗微生物入侵的作用(Kumar和Knowles 2003)。而真菌和细菌的入侵以及块茎的氧化又被公认为是引起块茎污染及褐变的主要原因。随着草莓果实储存时间的增加, 果实中苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)活性及产生超氧化物的能力下降, 从而降低果实抵抗微生物侵袭的能力(Jiang和Joyce 2003)。外源脱落酸(abscisic acid, ABA)可诱导马铃薯块茎PAL活性的增加, 并促进块茎的切口愈合(Kumar等2010)。在切口愈合过程中内源

ABA含量不断增加, 而喷施氟啶酮可介导抑制创伤处ABA的合成以及PAL活性, 更重要的是这种抑制作用可通过添加外源ABA而解除, 从而恢复PAL活性和木栓化(Soliday等1978; Lulai等2008)。

植物在遭受逆境胁迫时, 其抗氧化防护能力会提高以使植物度过逆境(杨瑾等2011)。ABA是植物的抗逆诱导因子, 因而被称为植物的“胁迫激素”。ABA预处理可以增强植株在诸如冷害、高温、盐胁迫和水分胁迫条件下的抗氧化防护能力(许树成等2008)。ABA还可介导应答病原体入侵

收稿 2011-12-31 修订 2012-01-23

资助 国家科技支撑计划项目(2011BAI07B07)、内蒙古自然科学基金(2009MS0501)和内蒙古科技创新引导奖励基金项目(2010)。

* 通讯作者(E-mail: guilinchen@yahoo.com.cn; Tel: 0471-4992577)。

和创伤。

锁阳是多年生高等寄生植物, 为我国重要的中药和蒙药植物资源。可作补肾、助阳、益精、润肠药物, 主治阳痿遗精、腰膝酸软、肠燥便秘(Ma等2008)。目前, 锁阳人工种植技术尚未成熟, 随着人们对锁阳需求量日益增加, 野生植物资源面临枯竭。深入开展锁阳组织培养研究势在必行, 本实验室首次建立了锁阳茎和种子的愈伤组织诱导体系(专利授权号: ZL200810240383.4; ZL2008-10240382.X)。制约锁阳组织培养的主要因素是外植体的污染及愈伤组织的褐化。因此研究外源ABA对锁阳茎切口愈合过程的影响, 对防止锁阳组织培养过程中愈伤组织的褐化以及锁阳保鲜和锁阳产品加工过程中的褐化具有借鉴作用。

材料与方法

1 材料

锁阳(*Cynomorium songaricum* Rupr.)采自内蒙古鄂尔多斯市杭锦旗独贵塔拉镇。取30~50 cm长完整新鲜的锁阳, 将锁阳茎分为上(花序部)、中、下3个部位。

2 方法

2.1 锁阳茎切口愈合能力的测定

切口愈合处理采用Kumar等(2010)的方法进行。将每个部位切成直径1.7 cm, 厚3 mm的若干个小圆片, 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ABA中浸泡5 min, 对照组在蒸馏水中浸泡, 然后将锁阳茎小片取出置于放有湿滤纸的培养皿中进行切口愈合(每个培养皿放9片, 每个处理3个培养皿), 然后盖上盖。将培养皿置于培养箱中($23 \text{ }^\circ\text{C}$)暗培养4 d, 期间保持滤纸的湿度在99%以上。已愈合的锁阳茎置于烘箱中脱水($45 \text{ }^\circ\text{C}$)并分别在0、10、20、40和80 min测定其重量的减少。以重量的减少率即失水率表示切口愈合的程度。

2.2 锁阳茎不同部位内源ABA含量的测定

采用López-Ráez等(2010)的方法, 0.5 g锁阳茎提取其内源ABA, 然后进行超高效液相(Waters Acquity UPLC)分析, 条件为: 用含不同百分浓度的乙腈溶液冲洗柱子(BEH C_{18} 2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm), 开始用水溶液冲2 min, 8 min后逐渐变成50%乙腈溶液, 1 min后升到90%, 接着平衡柱子1 min, 0.2

min后乙腈降到0, 然后柱子在当前溶剂状态下平衡2.8 min, 总共运行时间15 min。柱温 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速 $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 取样量 $10 \mu\text{L}$ 。绘制锁阳茎内源ABA含量在不同部位随切口愈合时间的变化图。试验设3次重复。

2.3 锁阳茎PAL活性和抗氧化酶活性的测定

PAL的提取采用Kumar等(2010)的方法, 用Sugimoto等(2000)的方法检测上清液中的PAL活性, 通过标准曲线换算样品中反式肉桂酸的浓度。PAL活性表示为每mg蛋白质每min产生的反式肉桂酸的nmol数。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的测定采用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)还原法(Jiang和Zhang 2002a), 以抑制NBT光化还原50%的酶量为一个酶活力单位(U)。过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性测定采用 H_2O_2 紫外吸收法(Jiang和Zhang 2002b)。抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性测定采用紫外吸收法(Saruyama和Tanida 1995)。以上实验均设3次重复。

实验结果

1 ABA对锁阳茎切口愈合能力的影响

锁阳茎的切口愈合能力用抗失水力来表示, 失水率越小表明其切口愈合能力越强, 失水率越大表明其切口愈合能力越弱。随脱水时间的增加, 经ABA处理的锁阳茎3个部位的失水率均明显低于对照组, 并呈现出随脱水时间延长有差距加大的趋势(图1)。表明ABA处理增强了锁阳茎的抗失水力, 有利于加快切口愈合。同时, 外源ABA对锁阳茎上部切口愈合能力的增强作用比中部和下部的要大。

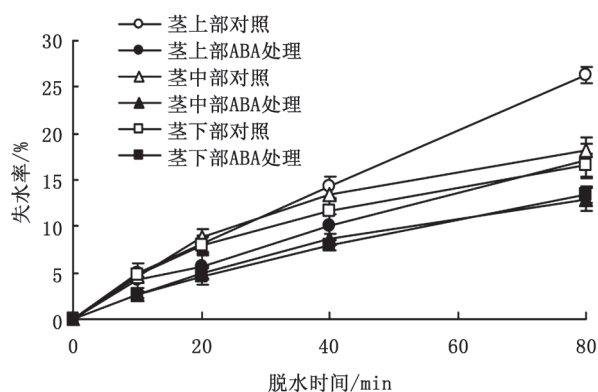


图1 ABA对锁阳茎失水率的影响

Fig.1 Effect of ABA on fresh weight loss of *C. songaricum* stem

2 锁阳茎切口愈合过程中内源ABA含量的变化

从图2可以看出,随着愈合天数的增加,锁阳茎内源ABA含量均呈现先降低后升高的变化趋势。3个部位内源ABA含量为上部高于中部,中部高于下部。愈合第3天茎上部和中部升至最高,随后又有所下降,而茎下部第4天达到最大。愈合第3天时茎上部的ABA含量比中部和下部分别高25.0%和90.2%。

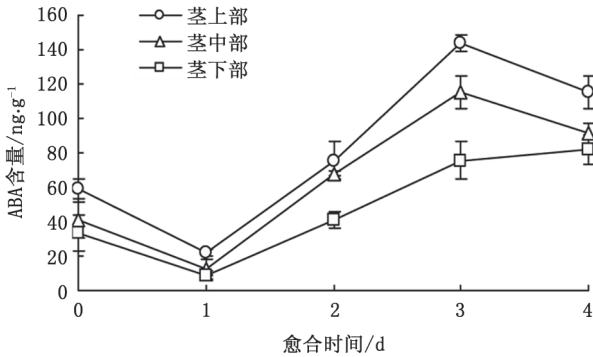


图2 锁阳茎切口愈合过程中内源ABA含量的变化
Fig.2 The change of endogenous ABA contents of *C. songaricum* stem during wound healing

3 ABA对锁阳茎PAL活性的影响

图3可见,无论是ABA处理还是对照组锁阳茎3个部位PAL活性均呈现先升高后降低的变化趋势,经ABA处理的PAL活性均明显高于对照组。愈合第1天,ABA处理的锁阳茎上中下3个部位的PAL活性分别比对照组高47.1%、25.1%和73.8%。这表明ABA处理明显增强了锁阳茎的PAL活性。从而加速了切口愈合处的栓质化。

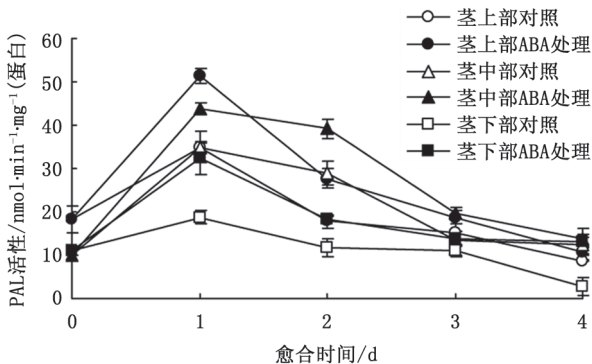


图3 ABA对锁阳茎PAL活性的影响
Fig.3 Effect of ABA on PAL activity of *C. songaricum* stem

4 ABA对锁阳茎抗氧化酶活性的影响

4.1 SOD活性

锁阳茎SOD活性均随愈合天数的增加而增加,经ABA处理的SOD活性明显高于对照组。ABA处理的锁阳茎上部和中部的SOD活性在愈合第1天迅速升高,之后增长趋于平稳,而下部的SOD活性在愈合第2天达到高峰,随后略有下降(图4)。这表明,ABA处理明显增强了锁阳茎切口愈合早期的SOD活性,SOD酶可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞,从而提高了锁阳茎抗氧化的能力。

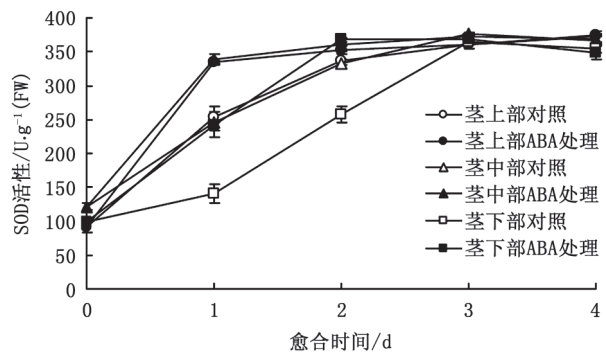


图4 ABA对锁阳茎SOD活性的影响
Fig.4 Effect of ABA on SOD activity of *C. songaricum* stem

4.2 CAT活性

随着愈合天数的增加锁阳茎3个部位CAT活性均呈现先上升后下降的变化趋势,愈合第2天各处理CAT活性均升至最高,ABA处理后的CAT活性明显高于对照组(图5)。愈合第2天,ABA处理后的锁阳茎上中下3个部位的CAT活性分别比对照组高

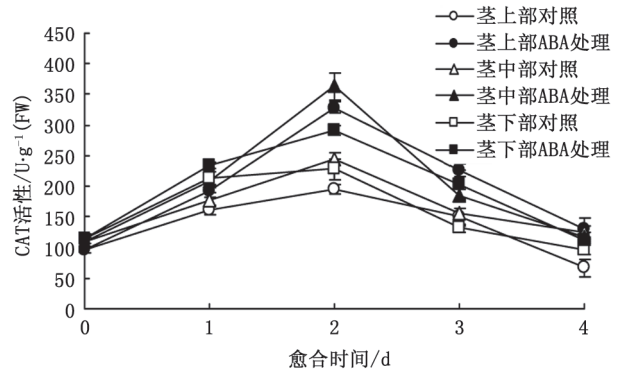


图5 ABA对锁阳茎CAT活性的影响
Fig.5 Effect of ABA on CAT activity of *C. songaricum* stem

68.1%、48.8%和28.2%。这表明, ABA处理明显增强了锁阳茎上中部的CAT的活性, CAT活性的增强可加速分解切口处的过氧化氢, 使切口处的细胞免受氧化损伤。

4.3 APX活性

由图6可见, 随愈合天数的延长, 对照组和ABA处理组的锁阳茎3个部位APX活性均呈现先升高后降低的变化趋势, 并都在处理后第1天升至最高。ABA处理的锁阳茎3个部位的APX活性均明显高于对照组。这表明ABA处理明显增强了锁阳茎的APX活性, 影响程度由大到小依次为茎上部、中部和下部。APX活性的升高进一步加速了锁阳茎分解过氧化氢, 从而有利于锁阳茎抵抗氧化损伤, 增强其抗氧化能力。

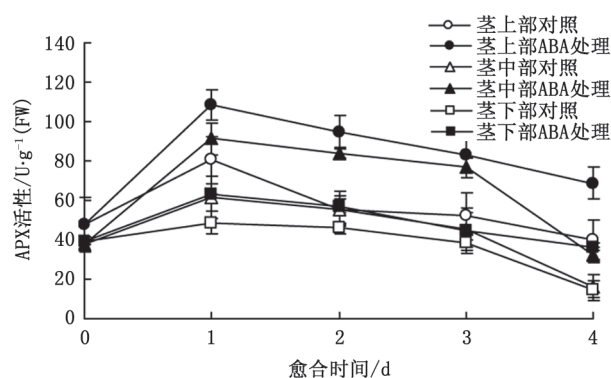


图6 ABA对锁阳茎APX活性的影响

Fig.6 Effect of ABA on APX activity of *C. songaricum* stem

讨论

植物应答创伤切口时产生封闭的木栓化细胞层和周皮, 以增强植物抗失水和抗微生物入侵的能力(Schreiber等2005)。木栓化过程包括聚酚醛(SPP)或聚芳香(SPA)的合成及积累于切口相关的细胞壁上, 木栓化的过程与木质素合成的过程相似, 也需要PAL的参与(Lapierre等1996)。PAL活性可由各种因素诱发, 如病菌入侵, 昆虫啃食, 创伤, 暴露于低温之下(Dixon和Paiva 1995), 并在切口愈合过程中在催化苯丙烷途径中起着关键性作用(Kato等2000)。块茎在应答切口时会启动转录上调机制即PAL机制, 而产生反式肉桂酸和P-香豆酸单体, 最终组成木栓质层的聚酚醛类(SPP)或聚芳香类(SPA) (Lulai 2007), 从而促进切口愈合减少失

水。SPP的积累可以使创伤的马铃薯块茎抵抗细菌感染, 而SPA是负责抗真菌性感染的(Kumar等2010)。此外, ABA处理可促进马铃薯块茎切口处木质化及PAL-1基因的表达, 从而使PAL活性升高, 进而促进切口愈合(Kumar等2010)。本实验中锁阳茎经ABA处理后的PAL活性提高, 失水率明显下降, 表明ABA处理可能通过促进锁阳肉质茎切口细胞木栓化以加速切口愈合从而抵抗失水。植物处于正常发育状态时, 体内ABA含量是处于合成与代谢的平衡水平(Destefano-Betran等2006)。锁阳茎切口愈合过程中, 通过内源ABA的合成增加来应答创伤, 然后通过调控PAL活性来加速木栓化, 从而提高了锁阳茎的切口愈合能力, 这与Kumar等(2010)的结果一致。

当植物受到逆境胁迫时, 体内活性氧增加, 从而诱导了抗氧化酶活性的升高和抗氧化物质含量增加, 进而更加有效清除活性氧, 保护植物细胞免受伤害(邹清成等2011)。当植物受到氮胁迫(杨瑾等2011)、盐胁迫(李向前等2010)以及生物胁迫(台莲梅等2010)时抗氧化酶活性都会升高。而ABA处理也会使其活性升高, ABA处理使玉米胚芽鞘(Gong等1998)包括SOD和POD在内的所有抗氧化防护酶活性增加。Kumar等(2007)研究表明马铃薯块茎切口可诱导产生超氧化物, 超氧化物可促进愈合初期SPA和SPP的加聚反应从而促进愈合, 但过多的超氧化物会使茎受到氧化损伤。本文研究结果显示, ABA处理明显增强了锁阳茎的SOD、CAT和APX活性, 这可能促进了锁阳茎在切口愈合后期清除多余的超氧化物, 使切口处细胞免受氧化损伤, 从而提高其抗氧化能力。茎3个部位的抗氧化酶活性均呈现出上部高于中部, 中部高于下部的趋势, 与PAL活性及抗失水力的差异一致, 这可能由内源ABA含量的差异导致的。

总之, ABA处理明显增强了锁阳茎3个部位的PAL活性以及抗氧化酶活性。PAL活性升高可加速切口处形成木栓化的细胞层和周皮, 抗氧化酶活性升高可使切口处细胞免受氧化损伤, 因此ABA处理既促进了锁阳茎切口愈合又提高了其抗氧化能力而防止氧化损伤。

参考文献

李向前, 鲍乾, 王艳, 古丽奴儿·吐拉西, 王志才, 张富春(2010). 棉花

- 两品种耐盐性与抗氧化能力的相关性. 植物生理学通讯, 46 (11): 1129~1134
- 台莲梅, 梁伟伶, 左豫虎, 金光辉, 靳学慧(2010). 马铃薯不同品种感染早疫病菌后防御酶活性变化. 植物生理学通讯, 46 (11): 1147~1150
- 许树成, 丁海东, 鲁锐, 石彝, 马芳芳(2008). ABA在植物细胞抗氧化防护过程中的作用. 中国农业大学学报, 13 (2): 11~19
- 杨瑾, 王铭, 李涛, 李爱芬, 张成武(2011). 氮胁迫对雨生红球藻色素积累与抗氧化系统的影响. 植物生理学报, 47 (2): 147~152
- 邹清成, 朱开元, 刘慧春, 周江华, 马广莹(2011). 外源茉莉酸甲酯对非生物胁迫下蝴蝶兰幼苗叶绿素荧光和抗氧化指标的影响. 植物生理学报, 47 (9): 913~917
- Destefano-Betran L, Knauber D, Huckle L, Suttle JC (2006). Effect of postharvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism, and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues. *Plant Mol Biol*, 61: 687~697
- Dixon RA, Paiva NL (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085~1097
- Gong M, Li YJ, Chen SZ (1998). Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *Plant Physiol*, 153: 488~496
- Jiang MY, Zhang JH (2002a). Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*, 215: 1022~1030
- Jiang MY, Zhang JH (2002b). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot*, 53: 2401~2410
- Jiang YM, Joyce DC (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regul*, 39: 171~174
- Kato M, Hayakawa Y, Hyodo H, Ikoma Y, Yano M (2000). Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol*, 41 (4): 440~447
- Kumar GNM, Iyer S, Knowles NR (2007). *Strboh A* homologue of NADPH oxidase regulates wound-induced oxidative burst and facilitates wound-healing in potato tubers. *Planta*, 227: 25~36
- Kumar GNM, Knowles NR (2003). Wound-induced superoxide production and PAL activity decline with potato tuber age and wound healing ability. *Physiol Plant*, 117: 108~117
- Kumar GNM, Lulai EC, Suttle JC, Knowles NR (2010). Age-induced loss of wound-healing ability in potato tubers is partly regulated by ABA. *Planta*, 232 (6): 1433~1445
- Lapierre C, Pollet B, Negrel J (1996). The phenolic domain of potato suberin: structural comparison with lignins. *Phytochemistry*, 42 (4): 949~953
- López-Ráez JA, Kohlen W, Charnikhova T, Mulder P, Undas AK, Sergeant MJ, Verstappen F, Bugg TDH, Thompson AJ, Ruyter-Spira C, Bouwmeester H (2010). Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytol*, 187: 343~354
- Lulai EC (2007). The canon of potato science: 43. skin-set and wound-healing/suberization. *Potato Res*, 50: 387~390
- Lulai EC, Suttle JC, Pederson SM (2008). Regulatory involvement of abscisic acid in potato tuber wound-healing. *J Exp Bot*, 59 (6): 1175~1186
- Ma LJ, Chen GL, Jin SW, Wang CX (2008). The anti-aging effect and the chemical compositions of *Cynomorium songaricum* Rupr. *Acta Hort*, 765: 23~30
- Saruyama H, Tanida M (1995). Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 109: 105~113
- Schreiber L, Franke R, Harmann K (2005). Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpirations. *Planta*, 220: 520~530
- Soliday CL, Dean BB, Kolattukudy PE (1978). Suberization: inhibition by washing and stimulation by abscisic acid in potato disks and tissue culture. *Plant Physiol*, 61: 170~174
- Sugimoto M, Toyoda K, Ichinose Y, Yamada T, Shiraishi T (2000). Cytochalasin A inhibits the binding of phenylalanine ammonia-lyase mRNA to ribosomes during induction of phytoalexin in pea seedlings. *Plant Cell Physiol*, 41 (2): 234~238