

## ‘ 砀山酥 ’ 梨果实发育过程中几种酶的谱带和活性变化

刘连妹<sup>1,2</sup>, 王洪涛<sup>1</sup>, 屈海泳<sup>2</sup>, 张绍铃<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学园艺学院, 南京 210095; <sup>2</sup>淮阴工学院生化学院, 江苏淮安 223001

**摘要:** 幼果期间, ‘ 砀山酥 ’ 梨果实中的过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)的总活性高, 同工酶谱带数多, 而后, 随着果实的生长发育而下降并趋于稳定, 花后 90 d 左右出现一条特异性 POD 同工酶条带; 超氧化物歧化酶(SOD)的同工酶谱带和活性在整个发育过程中变化不明显。

**关键词:** ‘ 砀山酥 ’ 梨; 果实; 发育; 同工酶

## Changes of Isoenzyme Patterns and Activities of Several Enzymes during Development of Fruits in Pear cv. ‘Dangshansu’

LIU Lian-Mei<sup>1,2</sup>, WANG Hong-Tao<sup>1</sup>, QU Hai-Yong<sup>2</sup>, ZHANG Shao-Ling<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; <sup>2</sup>College of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 223001, China

**Abstract:** Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), polyphenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1) and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) from each developmental stage of fruits in pear cv. ‘Dangshansu’ were analyzed by SDS-PAGE. The results showed that both the band number of isoenzyme and activities of PODs or PPOs increased during development of young fruits, then decreased and trended to stability. A new special band of POD was observed 90 days after flowering. For SOD, no obvious change was observed throughout the whole development period.

**Key words:** pear cv. ‘Dangshansu’; fruit; development; isoenzyme

植物个体发育的本质是生物的遗传信息在不同时间和空间选择性的表达, 特异的基因表达产生了组织特异的同工酶谱(曾明和杨柏云 2006)。同工酶技术在园艺植物生理学中的应用相当广泛, Scandalions (1974)在分析植物中酶的异质性中曾列出过 46 种同工酶系统, 它们的基因表达谱皆随着植物发育阶段或营养状况而变化。李秉真等 (2001)报道苹果梨中 POD 活性于花芽分化临界期达到最高值, 在花蕾、花萼分化期活性下降, 花瓣、雄蕊、雌蕊分化期 POD 活性变化不大。关军锋(1994)报道, 采后鸭梨果实果心的抗坏血酸氧化酶活性高于果肉, 随着采后天数的延长, 果实的过氧化物含量呈现下降趋势。梨果实整个发育过程中的酶活性变化尚未见报道。本文以 ‘ 砀山酥 ’ 梨为试材, 检测了 ‘ 砀山酥 ’ 梨果实生长发育过程中 POD、PPO、SOD 活性和它们的同工酶谱变化, 探讨这些同工酶的出现和变化与果实发育之间的关系。

### 材料与amp;方法

以南京农业大学梨资源圃中的 ‘ 砀山酥 ’ 梨

(*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. ‘Dangshansu’)为试材, 随机选取 3 株生长健壮、无病虫害的果树, 从花后 10 d 起, 每隔 5 d 采集果实样品 1 次, 每次随机取 10 个发育正常的果实, 用冰盒带回, 冷藏(-20 ℃)。

制备酶液时, 称取 3 克果肉, 加入 3 mL 0.0125 mol·L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8), 研磨后于 4 ℃ 下以 10 080×g 离心 10 min, 取上清液, 即为 POD、PPO 和 SOD 粗提液, 置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

POD、PPO、SOD 同工酶 SDS-PAGE 分析中的凝胶配制和电泳条件参照何忠效和张树政 (1999)书中的方法, 每孔加 20 μL 酶液, 重复 3 次。POD 活性染色采用改良的联苯胺染色方法(何忠效和张树政 1999); PPO 活性染色参照张淑改等(1999)文中的方法; SOD 同工酶 SDS-PAGE 电泳

收稿 2008-01-28 修定 2008-04-07

资助 国家自然科学基金(30270956)和淮阴工学院科研基金(HG0606)。

\* 通讯作者(E-mail: nnzsl@njau.edu.cn; Tel: 025-84396580)。

以及活性染色参照罗广华和王爱国(1983)的方法。

POD活性的测定参照张志良和瞿伟菁(2003)书中的方法,以每克鲜重每分钟吸光值变化 $[\Delta A_{465} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW})]$ 为1个酶活性单位。PPO活性测定参照Dogan和Dogan(2004)文中的方法,以每克鲜重每分钟吸光值变化 $[\Delta A_{420} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW})]$ 为1个酶活性单位。SOD活性测定采用NBT还原法(Wang等2005),以抑制50% NBT光化还原的酶量定为1个酶活性单位。

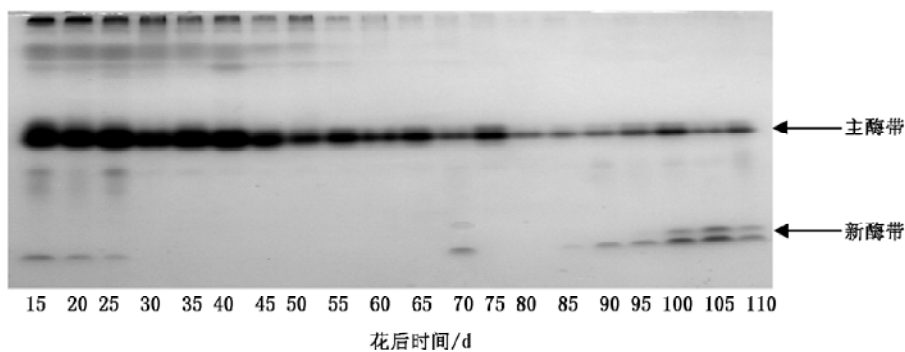


图1 ‘ 砀山酥 ’ 梨果实不同生长发育阶段的 POD 同工酶电泳图谱

Fig.1 Isoenzyme patterns of POD in pear fruits cv. 'Dangshansu' at different development stages

POD同工酶染色深且条带粗,同工酶条带数量比成熟果多;(2)‘砀山酥’梨果实发育过程中存在一条主要的POD同工酶带(图1中箭头所示染色最深的条带),此酶带的活性在幼果期最高,以后随着梨果实的生长发育而下降,与‘砀山酥’梨发育过程中POD总活性呈下降趋势(图2)一致;(3)在‘砀山酥’梨果实发育后期(花后90 d)出现一条小分子量(位于胶板前端)的POD同工酶带(图1箭头所示新酶带)。

此外,POD同工酶总活性随着‘砀山酥’梨果实的生长发育而下降,幼果期POD总活性明显高于成熟果,落花后100 d左右果肉中POD总活性很低,几乎没有活性(图2)。

## 2 ‘砀山酥’梨果实不同发育时期的PPO同工酶谱变化

‘砀山酥’梨发育过程中出现4条明显的PPO同工酶谱带,且有2条酶带在果实发育过程中变化明显(图3),这与鞠志国等(1998)和吴耕西等(1992)在莱阳梨和鸭梨中的检测结果一致。谱带I表达的量随着果实发育而下降,谱带II和III活性

## 结果与讨论

### 1 ‘砀山酥’梨果实不同发育时期的POD同工酶谱变化

过氧化物酶(POD)在植物体内主要有两方面的作用,一方面与植物正常的形态发生和形态的建成有关,另一方面与植物的抗逆性有关(蒋选利和李振歧2001)。「砀山酥」梨果实发育过程中POD同工酶活性条带(图1)呈现以下特点:(1)幼果期的

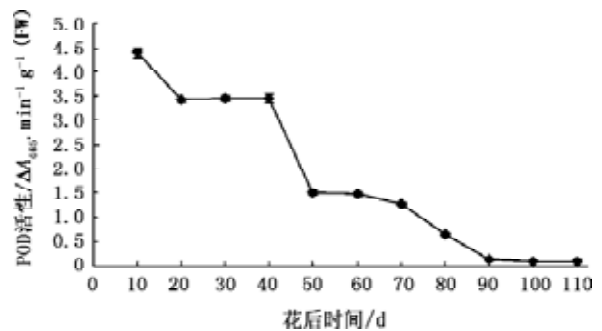


图2 ‘砀山酥’梨生长发育过程中的POD活性变化  
Fig.2 Changes of POD activities during the development of fruits in pear cv. 'Dangshansu'  
每个点表示平均值 ± 标准误。

变化趋势与之相反,它们的表达量随着果实的发育而减少或增加。在果实发育后期(花后85 d),谱带II和III活性明显升高,同时出现一条新的谱带(IV)。此外,随着果实的成熟,‘砀山酥’梨果实中PPO同工酶总活性下降(图4),与肉眼观察到的暴露在空气中的果肉褐变速度变慢的趋势一致,说明PPO活性高低与果肉褐变的速度呈正相关。

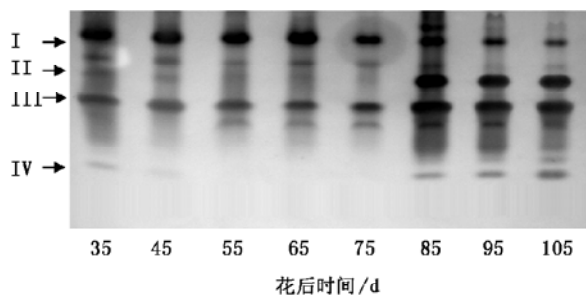


图3 ‘ 砀山酥 ’ 梨果实不同生长发育阶段PPO同工酶电泳图谱

Fig.3 Isoenzyme patterns of PPOs in pear fruits cv. ‘Dangshansu’ at different development stages

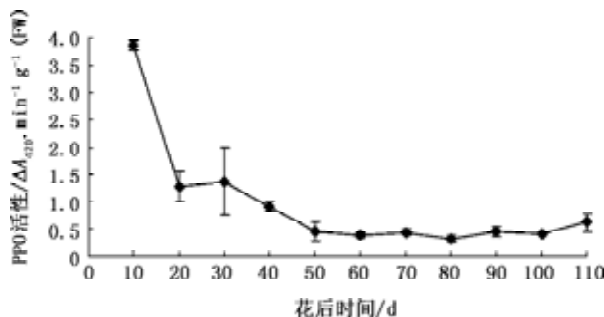


图4 ‘ 砀山酥 ’ 梨生长发育过程中的PPO活性变化  
Fig.4 Changes of PPO activities during the development of fruits in pear cv. ‘Dangshansu’  
每个点表示平均值 ± 标准误。

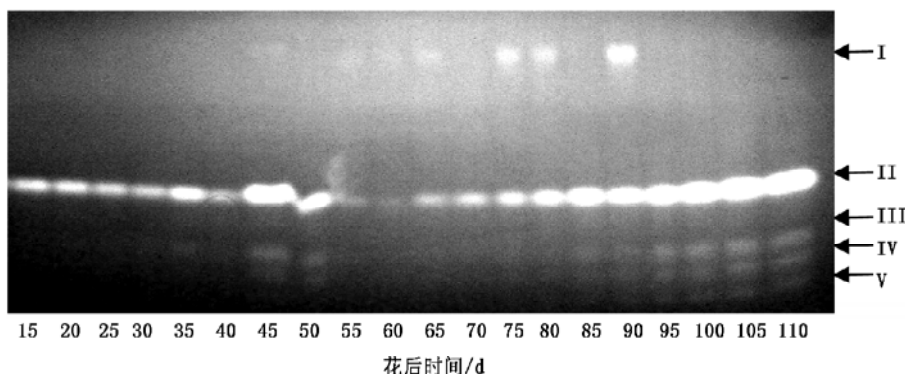


图5 ‘ 砀山酥 ’ 梨果实不同生长发育阶段SOD同工酶电泳图谱

Fig.5 Isoenzyme patterns of SOD in pear fruits cv. ‘Dangshansu’ at different development stages

### 3 ‘ 砀山酥 ’ 梨果实不同发育时期的SOD同工酶谱变化

‘ 砀山酥 ’ 梨果肉有5条SOD同工酶谱带(图5), 其中谱带II染色最深, 暗示编码这条酶带的基因最稳定。随着果实的成熟, 各个酶带表达的量略有上升。图6显示, ‘ 砀山酥 ’ 梨果实生长发育过程中SOD同工酶的总活性变化在总体上比较平缓, 各个发育阶段的SOD同工酶总活性没有明显差异。总体趋势是, 幼果期活性稍低, 而后缓慢上升, 30 d后保持稳定, 70 d左右又略有上升。各个阶段的SOD活性差异不显著。

总之, ‘ 砀山酥 ’ 梨果实发育过程中POD、PPO和SOD三者的同工酶电泳谱带变化与三者的离体活性变化相一致, 三者在果实不同发育阶段均有1(或者2)条主要酶带, 果实接近成熟时, 出现1条新的小分子量的POD同工酶带, 这条新谱带调控哪些生理反应, 它的出现与‘ 砀山酥 ’ 梨

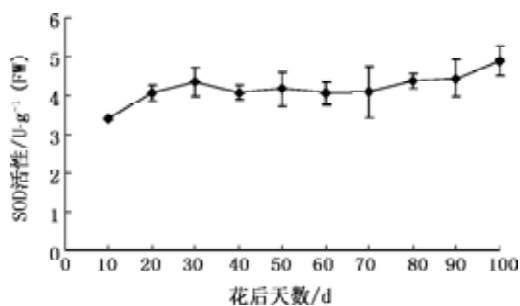


图6 ‘ 砀山酥 ’ 梨生长发育过程中的SOD活性变化  
Fig.6 Changes of SOD activities during the development of fruits in pear cv. ‘Dangshansu’  
每个点表示平均值 ± 标准误。

果实成熟有什么相关性, 还需深入研究。

### 参考文献

关军锋(1994). 采后鸭梨果肉和果心中氧化酶活性与过氧化物含量的变化. 植物生理学通讯, 30 (2): 91-93  
何忠效, 张树政(1999). 电泳. 北京: 科学出版社, 284-300

- 蒋选利, 李振歧(2001). 过氧化物酶与植物抗病性研究进展. 西北农林科技大学学报, 29 (6): 125~129
- 鞠志国, 朱广廉, 曹宗巽(1988). 莱阳茺梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系. 植物生理学报, 14 (4): 356~361
- 李秉真, 李雄, 孙庆林, 张建华, 马青枝(2001). 苹果梨花芽分化期几种酶活性的变化. 园艺学报, 28 (2): 159~160
- 罗广华, 王爱国(1983). 植物SOD的凝胶电泳及活性的显示. 植物生理学通讯, (6): 44~45
- 吴耕西, 周宏伟, 汪建民(1992). 鸭梨酶促褐变的生化机制及底物鉴定. 园艺学报, 19 (3): 198~202
- 曾明, 杨柏云(2006). 同工酶技术在柑桔研究中的应用. 江西科学, 24 (1): 100~104
- 张淑改, 姚延禧, 常明昌, 薛俊杰(1999). 华北落叶松多酚氧化酶动力学特性及其同工酶的研究. 山西农业大学学报, 22 (1): 61~64
- 张志良, 瞿伟菁(2003). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 123~124
- Dogan S, Dogan M (2004). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). Food Chem, 88 (1): 69~77
- Scandalios JG (1974). Isozymes in development and differentiation. Annu Rev Plant Physiol, 25: 225~258
- Wang YS, Tian SP, Xu Y (2005). Effects of high oxygen concentration on pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruits during postharvest periods. Food Chem, 91 (1): 99~104