

## 不同基因型猕猴桃果实中抗坏血酸合成与代谢的差异

原玉林, 同晓蕾, 侯长明, 马锋旺, 李明军\*

西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌712100

**摘要:** 植物中的抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)不仅与植物自身生长发育和抗逆性有关, 而且是人类主要的Vc来源。为了探究不同基因型猕猴桃AsA含量差异机制, 本研究以AsA含量差异较大的8个基因型猕猴桃果实为材料, 测定比较了它们AsA及其代谢物的含量, 分析了关键合成酶L-半乳糖1, 4-内酯脱氢酶(GalLDH)及代谢酶活性与AsA含量的关系。结果表明, 不同基因型猕猴桃果实中AsA和AsA相关代谢物水平存在明显的多样性。总抗坏血酸(T-AsA)含量与AsA/DHA存在显著的相关性, 而与还原型谷胱甘肽(GSH)、草酸(OA)及酒石酸(TA)含量之间无显著相关性。此外, T-AsA合成代谢酶GalLDH及AsA-GSH循环系统相关酶活性在不同基因型猕猴桃中也存在较大差异。其中GalLDH、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)的活性均与AsA含量存在极显著相关性, 并且MDHAR活性分别与AsA含量和抗坏血酸过氧化酶(APX)都有较高的相关性。

**关键词:** 抗坏血酸; AsA-GSH循环; 猕猴桃; 酶活性

抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)即维生素C (Vc), 作为植物体中的一种重要的抗氧化剂, 是一些重要酶的关键辅因子, 并且参与和调控了细胞的分裂和生长(Smirnoff和Wheeler 2000; De Tullio和Arrigoni 2004)。最重要的是, AsA对于人的健康有重要作用。因此, 研究植物体中Vc的形成和调控再生机制, 对植物自身生长发育、抗逆性以及人类健康都有着重要意义。

植物体内AsA含量受合成和再生能力的调控。目前研究表明, 无论是高Vc的猕猴桃(Laing等2004; Bulley等2009)、刺梨(Huang等2014)等, 还是低Vc的苹果(Li等2008), 生物从头合成能力是果实Vc含量的决定因子, 且主要合成途径为L-半乳糖途径, 其中L-半乳糖苷-1, 4-内酯脱氢酶(L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase, GalLDH)是催化AsA合成的最后一步关键酶(Smirnoff和Wheeler 2000)。抗坏血酸-谷胱甘肽(ascorbate-glutathione, AsA-GSH)循环是氧化态AsA得以再生的主要途径, 与植物体内AsA含量密切相关(Foyer和Shigeoka 2011)。在AsA-GSH循环系统中, AsA通过抗坏血酸过氧化酶(ascorbate peroxidase, APX)清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)的同时自身被氧化生成单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDHA), 其中, 一部分MDHA经单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)转化为AsA, 另一部分MDHA进一步氧化生成脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA), 而脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)能以GSH为电子供

体将DHA还原成AsA, 同时生成的氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)能在谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)的作用下生成GSH。如果DHA不能及时的被还原, 就会被进一步氧化生成草酸(oxalic acid, OA)或/和酒石酸(tartaric acid, TA) (Kostman等2001)。目前, 虽然植物体内的AsA合成代谢途径及其调控机制已经有深入研究, 但不同植物或特异植物不同组织器官之间AsA差异的机制尚不清楚。

猕猴桃属(*Actinidia* Lindl)植物是我国原产果树, 果实营养丰富, AsA含量高于大多数水果, 有“Vc之王”的美称。已有研究表明生物合成是猕猴桃果实AsA积累的主要原因, 其果实生长发育过程中AsA含量受合成和再生的共同调控。然而, 猕猴桃种间在Vc水平存在较大的差异, 如阔叶猕猴桃(*A. latifolia*)果实的AsA含量为12~21.4 mg·g<sup>-1</sup> (FW), 毛花猕猴桃(*A. eriantha*)果实的AsA含量为8~16 mg·g<sup>-1</sup> (FW), 是山梨猕猴桃(*A. rufa*) AsA含量的近100倍。为探明猕猴桃不同基因型间AsA含量差异的原因, 本研究以AsA含量差异较大的8个基因型的猕猴桃果实为材料, 测定比较了它们AsA和AsA-GSH循环代谢物的含量, 分析了关键合成酶GalLDH及代谢酶活性与AsA含量的关系, 以探索不同基因型猕猴桃果实中AsA水平差异机制。

收稿 2016-07-08 修定 2016-10-20

资助 陕西省科技统筹创新工程计划(2012KTJD03-01)。

\* 通讯作者(E-mail: limingjun@nwsuaf.edu.cn)。

## 材料与方法

### 1 试验材料

毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha*)、阔叶猕猴桃(*A. latifolia*)、山梨猕猴桃(*A. rufa*)、美味猕猴桃(*A. deliciosa*)品种[‘秦美’猕猴桃(cv. Qinmei)、‘海沃德’猕猴桃(cv. Hayward)和‘金魁’猕猴桃(cv. Jinkui)]和中华猕猴桃(*A. chinensis*)品种[‘红阳’猕猴桃(cv. Hongyang)和‘西选’猕猴桃(cv. Xixuan)]共8种基因型猕猴桃果实取自西北农林科技大学园艺场,于果实成熟期(果实成熟度可溶性固形物含量确定,即在9月中旬开始,每5天测定一次可溶性固形物含量,在其与上一次的数据相比有明显增加趋势时确定为该猕猴桃基因型果实的成熟期,此时可溶性固形物因基因型的差异一般为4.5%至6%)采集果实样品。每个基因型至少5个果实为1个重复,共3个生物学重复。每个样品采集后去皮切取果肉组织,切碎混合,立即用液氮速冻,保存于-80℃冰箱,用于相关指标的测定。

### 2 试验方法

#### 2.1 AsA和DHA含量的测定

AsA和DHA含量的测定参考Kampfenkel等(1995)方法:称取3.0 g猕猴桃果实,加6%三氯乙酸(TCA, *W/V*)于4℃研磨成浆,定容至6 mL, 15 600×g, 2℃离心10 min,收集上清液。测定AsA的4 mL反应体系中含:0.8 mL 0.2 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4), 0.2 mL提取液, 1.0 mL 10% TCA, 0.8 mL 42%磷酸(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 0.8 mL 2% 2, 2'-双吡啶, 0.4 mL 3%三氯化铁(FeCl<sub>3</sub>)。混匀后42℃水浴60 min,测525 nm处的吸光值。测定总抗坏血酸的方法与AsA不同之处是在加10% TCA之前,先加0.2 mL 6 mmol·L<sup>-1</sup>二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)混匀后42℃水浴15 min,再加0.2 mL 0.4% N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM)混匀室温放置2 min。用同样方法作标准曲线,计算总抗坏血酸和AsA的含量。DHA为总抗坏血酸与AsA的差值。

#### 2.2 GSH和GSSG含量的测定

GSH和GSSG含量测定参考Griffith (1980)的方法:测定412 nm处二硫双对硝基苯甲酸(3-carboxy-4-nitrophenyl disulfide, DTNB)的还原。提取液是7%的磺基水杨酸(*W/V*)。测定总谷胱甘肽含量的3 mL反应体系含有0.1 mL 0.2 mol·L<sup>-1</sup> PBS (含5

mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, pH 7.2)、0.2 mmol·L<sup>-1</sup> NADPH、1 U谷胱甘肽还原酶及1 mmol·L<sup>-1</sup> DTNB提取液,27℃反应30 min, 412 nm处比色。GSSG的测定与总谷胱甘肽不同之处是反应体系含0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 乙烯吡啶27℃反应60 min。分别用同样方法作标准曲线,计算总谷胱甘肽和GSSG的含量。GSH为总谷胱甘肽和GSSG的差值。

#### 2.3 OA和TA含量测定

OA和TA含量测定参考高海燕等(2004)的方法采用高效液相色谱仪进行测定。色谱条件为:色谱柱PRONTOSIL 120-10-C18 (10 μm, 4.6 mm i.d.×250 mm);流速0.5 mL·min<sup>-1</sup>;进样体积20 μL;检测波长210 nm;柱温30℃;流动相0.01 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>磷酸盐缓冲液(pH 2.55用磷酸调配)和体积分数3%甲醇。

#### 2.4 APX、MDHAR、DHAR、GR和GalLDH酶活性的测定

MDHAR、DHAR及GR活性参考Ma和Cheng (2003)的方法;APX活性参考Nakano和Asada (1981)的方法;GalLDH酶活性测定参考Ôba等(1995)的方法。

#### 2.5 数据处理

各样品进行3次生物学重复,数据统计分析采用运用SPSS 16.0软件进行统计和相关分析,采用one-way ANOVA方法对每个变量进行Duncan检验( $P<0.05$ ),以平均数±标准差(SD)表示大小。

## 实验结果

### 1 不同基因型猕猴桃果实抗坏血酸水平的多样性

由表1可以看出,不同基因型猕猴桃果实的AsA水平存在着明显的差异,不仅存在于种间也存在于种内。反映AsA库大小的总抗坏血酸(T-AsA)在测定的8个猕猴桃果实样品中毛花猕猴桃、阔叶猕猴桃含量最高,‘红阳’猕猴桃和‘秦美’猕猴桃次之,山梨和‘西选’猕猴桃含量最低。在山梨和‘西选’猕猴桃中T-AsA含量最低仅为2.86和2.32 μmol·g<sup>-1</sup> (FW),而在T-AsA含量最高的毛花猕猴桃中其含量为94.47 μmol·g<sup>-1</sup> (FW),约是山梨猕猴桃和‘西选’猕猴桃的33倍和40倍。用于栽培的美味和中华猕猴桃的T-AsA含量分别为8.26和6.29 μmol·g<sup>-1</sup> (FW)。然而同一种内的品种间T-AsA含量也存在较

表1 不同基因型猕猴桃果实中AsA和GSH水平  
Table 1 Diversity of ascorbic acid and glutathione levels in different genotypes of kiwifruit

种	品种	T-AsA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	AsA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	AsA/DHA比	T-GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	GSH/GSSG比
美味猕猴桃	‘秦美’	9.09±0.29 <sup>bc</sup>	8.31±0.23 <sup>bc</sup>	11.04±2.30 <sup>b</sup>	0.28±0.02 <sup>a</sup>	0.25±0.02 <sup>ab</sup>	9.80±2.56 <sup>b</sup>
	‘海沃德’	3.78±0.82 <sup>cd</sup>	3.31±0.76 <sup>cd</sup>	7.39±2.64 <sup>bcd</sup>	0.32±0.02 <sup>a</sup>	0.23±0.02 <sup>bc</sup>	3.20±1.06 <sup>c</sup>
	‘金魁’	11.90±1.14 <sup>b</sup>	10.68±1.00 <sup>b</sup>	9.13±1.97 <sup>bc</sup>	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.25±0.01 <sup>ab</sup>	4.44±1.53 <sup>c</sup>
中华猕猴桃	‘红阳’	10.25±0.53 <sup>b</sup>	9.09±0.36 <sup>b</sup>	8.38±2.37 <sup>bcd</sup>	0.32±0.03 <sup>a</sup>	0.19±0.04 <sup>bc</sup>	1.64±0.64 <sup>c</sup>
	‘西选’	2.32±0.18 <sup>d</sup>	1.72±0.07 <sup>d</sup>	3.19±1.23 <sup>cd</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>	0.32±0.03 <sup>a</sup>	14.04±1.87 <sup>a</sup>
毛花猕猴桃		94.47±4.00 <sup>a</sup>	91.56±3.78 <sup>a</sup>	31.60±1.42 <sup>a</sup>	0.33±0.02 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>bc</sup>	1.31±0.49 <sup>c</sup>
阔叶猕猴桃		89.62±2.23 <sup>a</sup>	86.82±2.12 <sup>a</sup>	31.09±1.61 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>a</sup>	0.20±0.02 <sup>bc</sup>	1.37±0.32 <sup>c</sup>
山梨猕猴桃		2.86±0.58 <sup>d</sup>	1.90±0.50 <sup>d</sup>	2.05±0.75 <sup>d</sup>	0.31±0.02 <sup>a</sup>	0.15±0.02 <sup>c</sup>	0.91±0.20 <sup>c</sup>

同一列中不同小写字母表示差异达到5%显著水平(下同)。

大差异, ‘金魁’猕猴桃的T-AsA含量[11.90  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]为‘海沃德’猕猴桃[3.78  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]的3.1倍; ‘红阳’猕猴桃的T-AsA含量[10.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]为‘西选’猕猴桃[2.32  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]的4.4倍。

猕猴桃果实中抗坏血酸主要以还原型的AsA形式存在, 其含量在8个基因型果实样品中也表现出了与T-AsA含量一致的种间和品种间的多样性。通过表1可以明确的看出, 8种猕猴桃果实T-AsA和AsA含量差异明显, 毛花和阔叶猕猴桃的最高, ‘金魁’猕猴桃、‘红阳’和‘秦美’猕猴桃次之, ‘海沃德’猕猴桃、山梨和‘西选’猕猴桃最少。山梨和‘西选’猕猴桃中AsA含量最低仅为1.90和1.72  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 而在AsA含量最高的毛花猕猴桃中其含量为91.56  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 是山梨和‘西选’猕猴桃的48.2倍和53.2倍。用于栽培的美味和中华猕猴桃的平均AsA含量分别为7.43和5.41  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 然而种内的品种间AsA含量也存在较为明显的差异。美味猕猴桃果实中‘金魁’的AsA含量[10.68  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]为‘海沃德’[3.31  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]的3.2倍; 而中华猕猴桃果实中‘红阳’的AsA含量[9.09  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]为‘西选’[1.72  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]的5.3倍。

抗坏血酸分为还原态的AsA和氧化态的DHA, 两者的组成比例反映了植物体内抗坏血酸的氧化还原状态。试验发现不同基因型猕猴桃果实中AsA/DHA比值存在明显的差异。通过表1发现, 从8种猕猴桃果实抗坏血酸的氧化还原状态看, AsA/DHA比值最高的为毛花和阔叶猕猴桃。美味猕猴桃‘秦美’和‘海沃德’, 以及中华猕猴桃‘红阳’和‘西选’

猕猴桃次之, 山梨猕猴桃最小。毛花猕猴桃的AsA/DHA比值高达31.60, 是山梨猕猴桃的15.4倍。

## 2 不同基因型猕猴桃果实谷胱甘肽含量的多样性

谷胱甘肽与抗坏血酸偶联形成AsA-GSH循环, GSH作为DHAR还原的电子受体, 经脱氢抗坏血酸还原酶还原重新生成AsA, 与AsA偶联形成AsA-GSH循环。由表1可以看出, 猕猴桃果实的GSH水平存在着明显的多样性, 种间T-GSH差异性较T-AsA差异性要小。8个猕猴桃果实样品的T-GSH含量以‘秦美’猕猴桃最低, 为0.28  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。还原态的GSH含量以山梨猕猴桃为最低, 为0.15  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 以‘西选’猕猴桃[0.32  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]最高, 为山梨猕猴桃的2.1倍。谷胱甘肽的氧化还原状态以GSH/GSSG比值来衡量, 发现‘西选’猕猴桃最高, 为14.04; 山梨猕猴桃最低, 仅为0.91。

## 3 不同基因型猕猴桃果实OA和TA含量的差异

OA和TA作为DHA氧化降解产物, 其含量的测定(图1)对于AsA-GSH循环的研究有重要作用。8种猕猴桃果实的OA含量以‘金魁’猕猴桃最高, 为3.62  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 阔叶和毛花猕猴桃也较高, 分别为3.18和3.16  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), ‘红阳’猕猴桃最低, 仅为1.46  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。TA的含量比OA含量低的多, 以‘西选’猕猴桃含量最高, 为4.10  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), ‘金魁’猕猴桃最低, 为1.07  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。

## 4 不同基因型猕猴桃果实GalLDH活性的差异

GalLDH的活性对于AsA生物合成起调控作用。由图2可以看出, 8个基因型猕猴桃果实中GalLDH活性差异明显。阔叶和毛花猕猴桃的GalLDH活性较高, 分别为3.28和3.19  $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), ‘红阳’和‘秦



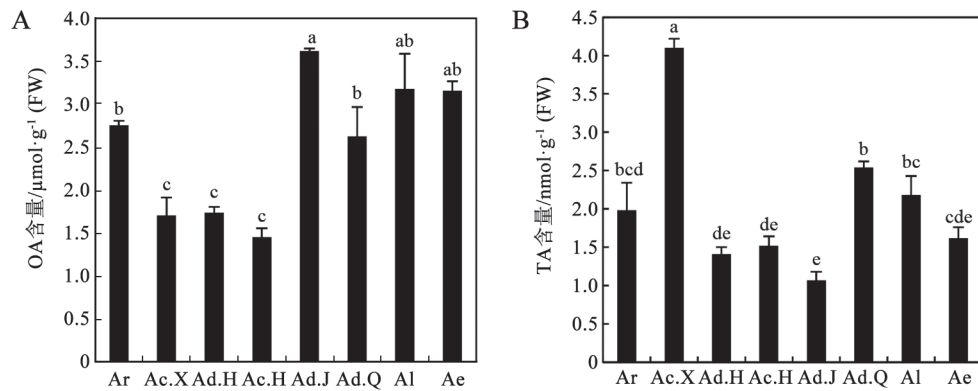


图1 不同基因型猕猴桃果实OA和TA含量的差异

Fig.1 Diversity of concentration of OA and TA in different genotypes of kiwifruit

Ar: 山梨猕猴桃; Ac.X: ‘西选’猕猴桃; Ad.H: ‘海沃德’猕猴桃; Ac.H: ‘红阳’猕猴桃; Ad.J: ‘金魁’猕猴桃; Ad.Q: ‘秦美’猕猴桃; Al: 阔叶猕猴桃; Ae: 毛花猕猴桃(下图同此)。

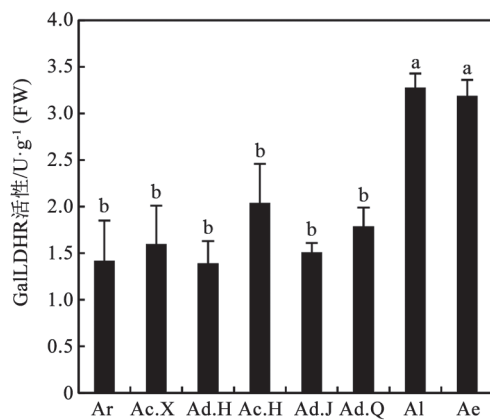


图2 不同基因型猕猴桃果实GalLDH活性的差异

Fig.2 The activity difference of GalLDH in different genotypes of kiwifruit

美’猕猴桃次之,分别为2.04和1.79 U·g<sup>-1</sup> (FW); ‘金魁’、‘西选’、山梨和‘海沃德’猕猴桃较低,活性最低的‘海沃德’猕猴桃仅为1.39 U·g<sup>-1</sup> (FW),是阔叶猕猴桃的42%。

### 5 不同基因型猕猴桃果实DHAR、MDHAR、GR和APX活性的差异

由图3-A可知,毛花和阔叶猕猴桃果实中DHAR的活性都较高,分别为34.80和33.63 U·g<sup>-1</sup> (FW),是山梨猕猴桃[7.94 U·g<sup>-1</sup> (FW)]的4.4倍和4.2倍,8个基因型猕猴桃果实DHAR活性由高到低分别为毛花、阔叶、‘金魁’、‘红阳’、‘秦美’、‘海沃德’、‘西选’和山梨。MDHAR的活性最高的前两个同样是阔叶和毛花猕猴桃,但阔叶猕猴桃的MDHAR活性比毛花

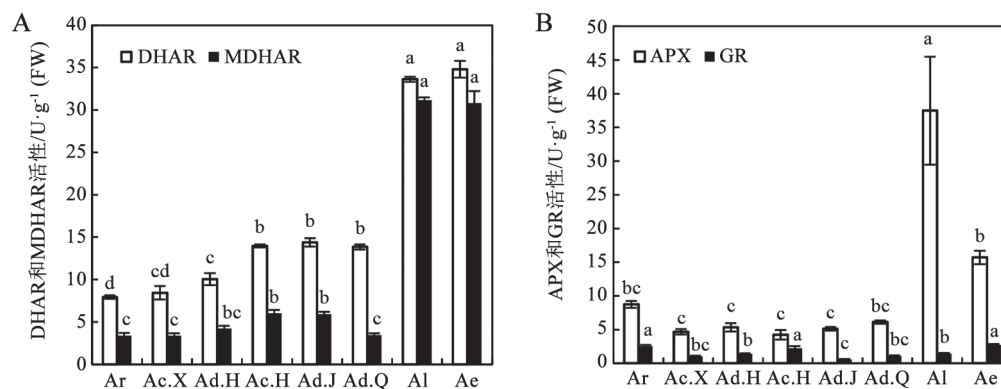


图3 不同基因型猕猴桃果实MDHAR、DHAR、APX和GR活性的差异

Fig.3 The activity difference of MDHAR, DHAR, APX and GR in different genotypes of kiwifruit

略高, 为 $31.15 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW); ‘西选’猕猴桃最低, 为 $3.36 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)。8个基因型猕猴桃果实MDHAR活性由高到低分别为阔叶、毛花、‘红阳’、‘金魁’、‘海沃德’、‘秦美’、山梨和‘西选’猕猴桃。

8个基因型猕猴桃果实GR的活性(图3-B)以毛花、山梨和‘红阳’猕猴桃较高, 分别为 $2.73$ 、 $2.53$ 和 $2.23 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW); 阔叶、‘海沃德’和‘秦美’猕猴桃次之, ‘西选’和‘金魁’猕猴桃较低。‘金魁’猕猴桃的GR活性仅为 $0.56 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 是毛花猕猴桃的20.5%。

阔叶猕猴桃APX活性(图3-B)最高, 为 $37.49 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 其次为毛花猕猴桃[ $15.71 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)], 是阔叶猕猴桃的41.9%。其他由高到低依次为山梨、‘秦美’、‘海沃德’、‘金魁’、‘西选’和‘红阳’猕

猴桃。‘红阳’猕猴桃的APX活性 $4.23 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)仅为阔叶猕猴桃的11.3%。

## 6 不同基因型猕猴桃果实AsA代谢相关指标间的相关性

对8个基因型猕猴桃果实中T-AsA含量与AsA合成代谢相关酶GalLDH、MDHAR、DHAR、GR和APX分别进行相关性分析(表2), 发现T-AsA与GalLDH、DHAR和MDHAR存在极显著的相关性, 与APX存在显著相关性。相关系数分别为0.970、0.989、0.997和0.826。AsA/DHA与GalLDH、DHAR和MDHAR同样存在极显著的相关性, 与APX存在显著相关性, 相关系数分别为0.962、0.995、0.974和0.803。

表2 不同基因型猕猴桃果实T-AsA含量与GalLDH、MDHAR、DHAR、GR和APX的相关系数

Table 2 Relation coefficient among concentration of T-AsA and activity of GalLDH, MDHAR, DHAR, GR and APX in different genotypes of kiwifruit

	T-AsA	AsA	GalLDH	DHAR	MDHAR	APX	GR	AsA/DHA	OA	TA
T-AsA	1									
AsA	1.000**	1								
GalLDH	0.970**	0.970**	1							
DHAR	0.989**	0.989**	0.972**	1						
MDHAR	0.997**	0.997**	0.968**	0.983**	1					
APX	0.826*	0.826*	0.818*	0.799*	0.845**	1				
GR	0.353	0.352	0.376	0.299	0.352	0.129	1			
AsA/DHA	0.982**	0.982**	0.962**	0.995**	0.974**	0.803*	0.261	1		
OA	0.520	0.518	0.381	0.534	0.497	0.464	0.090	0.516	1	
TA	-0.152	-0.150	-0.074	-0.213	-0.156	-0.011	-0.224	-0.207	-0.343	1

\*表示显著水平0.05; \*\*表示显著水平0.01。

## 讨 论

水果和蔬菜是人类主要的天然Vc来源, 但是不同物种之间的Vc含量千差万别。郭新波等(2011)总结了引起Vc差异的主要因素, 即Vc的合成和循环再生机制。因此, 为了提高植物的Vc含量, 对Vc合成和循环机制的研究显得尤为重要。大量的研究倾向于Vc合成机制, 比如Wheeler在1998年提出合成Vc的L-半乳糖途径(Wheeler等1998), 随后在黑醋栗(Hancock等2007)、葡萄(Melino等2009)和番茄(Wang等2014)等植物中对Vc机理的研究已有大量报道。

本研究发现, 不同基因型猕猴桃的抗坏血酸水平存在较大差异, 与之前对柿树叶片中AsA含量

的研究结果相似(Li等2009), 存在明显的种间多样性。在本研究结果中发现: 不但抗坏血酸含量表现出多样性, 其抗坏血酸的氧化还原状态也表现出了与抗坏血酸相似的多样性趋势。不同基因型猕猴桃果实抗坏血酸水平的差异由AsA合成能力、AsA-GSH循环再生能力、降解水平及其还原状态(AsA/DHA比值)等多方面因素决定。结果显示T-AsA含量最高的是毛花猕猴桃, 是含量最低的山梨猕猴桃的58.1倍。AsA/DHA比值是衡量抗坏血酸的氧化还原状态的重要指标, 它主要与植物衰老、防护及逆境有联系, AsA/DHA比值越高, 植物自身氧化还原状态的调控越好。而本试验证实AsA/DHA比值与T-AsA及AsA的含量都表现出显著的相关性。这表明抗坏血酸的氧化还原状态对

抗坏血酸总量的积累和维持有重要意义。因此,抗坏血酸维持高的还原状态可以阻止因自身降解而引起其总量的降低。

GalLDH是L-半乳糖途径的关键酶,且与植物的生长、Vc积累及抵抗逆境胁迫有很强的关系(Liu等2013)。此酶直接氧化L-半乳糖内酯生成AsA,并对底物L-半乳糖-1,4-内酯有很高的特异性。本试验发现在不同基因型猕猴桃果实中GalLDH的活性各不相同,活性最低的‘海沃德’猕猴桃仅为阔叶猕猴桃的42%。通过对数据进行深入分析,我们发现GalLDH的活性与抗坏血酸总量及其氧化还原状态都存在极显著的相关性。这个现象与水稻中该基因的过量表达和沉默结果相似(Liu等2011)。

植物中,AsA含量也受再生系统的高度调控,而AsA-GSH循环系统是植物体内氧化态抗坏血酸再生的重要途径(Foyer和Noctor 2011)。GSH作为这个循环中关键的物质,对于AsA的再生有着重要的影响。本研究发现,虽然不同基因型猕猴桃果实的T-GSH含量存在着差异,但T-GSH含量和T-AsA含量之间并无明显的相关性。对参与这个循环中重要的氧化还原酶APX、DHAR、MDHAR和GR的活性分析发现,在不同基因型猕猴桃果实中DHAR和MDHAR的活性与抗坏血酸总量及其还原状态都存在极显著的相关性。赵宝龙等(2015)和吕新民等(2016)研究也表明,盐胁迫条件下DHAR和MDHAR分别与‘夏黑’葡萄和酸枣AsA再生有关。且之前研究表明,APX活性依赖于AsA浓度,低浓度AsA会导致其活性下降(Ishikawa和Shigeoka 2008)。APX活性也与猕猴桃不同基因型间T-AsA含量存在显著的相关性可能与AsA维持APX蛋白的稳定性有关。经APX等氧化产生的氧化态抗坏血酸若不能及时被MDHAR和DHAR还原,就会在酶促作用下进一步氧化生成酒石酸和草酸。在猕猴桃不同基因型间酒石酸和草酸含量与AsA间不存在相关性,尤其在高APX活性和AsA含量的毛花和阔叶猕猴桃中二者的含量却相对不高,这可能与毛花和阔叶猕猴桃中具有高的DHAR和MDHAR活性有关。综上所述,在不同基因型猕猴桃中APX活性高低是由抗坏血酸决定的,而抗坏血酸的含量受合成和再生能力的共同调控。

## 参考文献

- Bulley SM, Rassam M, Hoser D, Otto W, Schunemann N, Wright M, MacRae E, Gleave A, Laing W (2009). Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J Exp Bot*, 60 (3): 765–778
- De Tullio MC, Arrigoni O (2004). Hopes disillusion and more hopes from vitamin C. *Cell Mol Life Sci*, 61 (2): 209–219
- Foyer CH, Shigeoka S (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol*, 155 (1): 93–100
- Foyer CH, Noctor G (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*, 155 (1): 2–18
- Gao HY, Wang SG, Hu XS (2004). Study on determination of kinds and contents of organic acids in pear juice by high performance liquid chromatography. *Food Ferment Ind*, 30 (8): 96–100 (in Chinese with English abstract) [高海燕, 王善广, 胡小松(2004). 利用反相高效液相色谱法测定梨汁中有机酸的种类和含量. *食品与发酵工业*, 30 (8): 96–100]
- Griffith OW (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*, 106 (1): 207–212
- Guo XB, Tang YL, Sun XF, Tang KX (2011). Metabolic regulation of vitamins C and E in higher plants. *Plant Physiol J*, 47 (8): 731–744 (in Chinese with English abstract) [郭新波, 唐岳立, 孙小芬, 唐克轩(2011). 高等植物维生素C和维生素E代谢调控. *植物生理学报*, 47 (8): 731–744]
- Huang M, Xu Q, Deng XX (2014). L-ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *J Plant Physiol*, 171 (14): 1205–1216
- Hancock RD, Walker PG, Pont SDA, Marquis N, Vivera S, Gordon SL, Brennan RM, Viola R (2007). L-ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by *in situ* biosynthesis via the L-galactose pathway. *Func Plant Biol*, 34 (12): 1080–1091
- Ishikawa T, Shigeoka S (2008). Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci Biotech*, 72 (5): 1143–1154
- Kampfenkel K, Vanmontagu M, Inze D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analy Biochem*, 225 (1): 165–167
- Kostman TA, Tarlyn NM, Loewus FA, Franceschi VR (2001). Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbon 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiol*, 125 (2): 634–640
- Laing WA, Bulley S, Wright M, Cooney J, Jensen D, Barraclough D, Macrae E (2004). A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (48): 16976–16981
- Li MJ, Ma FW, Zhang M, Pu F (2008). Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala.). *Plant Sci*, 174 (6): 606–612
- Li MJ, Liang D, Pu F, Ma FW, Hou CM, Lu T (2009). Ascorbate lev-

- els and the activity of key enzymes in ascorbate biosynthesis and recycling in the leaves of 22 Chinese persimmon cultivars. *Sci Hort*, 120 (2): 250–256
- Liu W, An HM, Yang M (2013). Overexpression of *rosa roxburghii* L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase in tobacco plant enhances ascorbate accumulation and abiotic stress tolerance. *Acta Physiol Plant*, 35 (5): 1617–1624
- Liu YH, Yu L, Wang RZ (2011). Level of ascorbic acid in transgenic rice for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase overexpressing or suppressed is associated with plant growth and seed set. *Acta Physiol Plant*, 33 (4): 1353–1363
- Lü XM, Yang YF, Lu XY, Jin J, Fan XM (2016). Effects of NaCl stress on the AsA-GSH cycle in sour jujube seedlings. *Plant Physiol J*, 52 (5): 736–744 (in Chinese with English abstract) [吕新民, 杨怡帆, 鲁晓燕, 靳娟, 樊新民(2016). NaCl胁迫对酸枣幼苗AsA-GSH循环的影响. *植物生理学报*, 52 (5): 736–744]
- Ma FW, Cheng LL (2003). 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. *Plant Sci*, 165 (4): 819–827
- Melino VJ, Soole KL, Ford CM (2009). Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biology*, 9 (1): 1–14
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22 (5): 867–880
- Ôba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T (1995). Purification and properties of L-galactono-γ-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem*, 117 (s1-2): 120–124
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35 (35): 291–314
- Wang LY, Xia M, Yang DY, Ma NN, Wang GD, Meng QW (2014). Overexpression of tomato GDP-L-galactose phosphorylase gene in tobacco improves tolerance to chilling stress. *Plant Cell Rep*, 33 (9): 1441–1451
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393 (6683): 365–369
- Zhao BL, Liu P, Wang WJ, Sun JL, Ma HX (2015). Effects of 5-aminolevulinic acid on the AsA-GSH cycle in grape leaves under salt stress. *Plant Physiol J*, 51 (3): 385–390 (in Chinese with English abstract) [赵宝龙, 刘鹏, 王文静, 孙军利, 马海新(2015). 5-氨基乙酰丙酸(ALA)对盐胁迫下葡萄叶片中AsA-GSH循环的影响. *植物生理学报*, 51 (3): 385–390]

## Difference of ascorbic acid synthesis and metabolism in different genotypes of kiwifruit

YUAN Yu-Lin, TONG Xiao-Lei, HOU Chang-Ming, MA Feng-Wang, LI Ming-Jun\*  
College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

**Abstract:** Ascorbic acid (AsA) in plants is not only related to its development, growth and stress resistance, but also a main source of vitamin C (Vc) for human. To investigate the mechanisms of AsA concentration difference in the genotypes of kiwifruit, eight genotypes of kiwifruit were used to analyze the relationships between AsA concentration and enzyme activities involved in its biosynthesis (L-galactose-1,4-lactone dehydrogenase, GalLDH) and recycle in fruit. The results indicated that, the levels of AsA and AsA-related metabolites in fruit showed distinct diversity among eight genotypes. Total AsA (T-AsA) concentration showed significant correlation with AsA/DHA ratio, but not with glutathione (GSH), oxalic acid (OA) and tartaric acid (TA). Besides, the activities of T-AsA synthase GalLDH and related enzymes in ascorbate–glutathione (AsA–GSH) recycle system were also significantly different in different genotypes of kiwifruit. The activities of GalLDH, monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) showed extremely significant correlation with AsA concentration, and MDHAR activity had higher relationships with AsA concentration and ascorbate peroxidase (APX) respectively.

**Key words:** ascorbate; AsA–GSH recycle; kiwifruit; enzyme activity

Received 2016-07-08 Accepted 2016-10-20

This work was supported by the Project of Technological Coordination and Innovation Programme in Shaanxi Province (Grant No. 2012KTJD03-01).

\*Corresponding author (E-mail: limingjun@nwsuaf.edu.cn).