

柑橘主要组织SOD分布及其在生长中晚期活性变化

孙志高^{1,2}, 张萌萌^{1,3}, 蒋国玲^{1,3}, 马亚琴^{1,3}, 郭莉^{1,2}, 李勤⁴

(1.中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; 2.南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715;

3.西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 4.四川工商职业技术学院, 四川 都江堰 611830)

摘 要: 以16个柑橘品种为材料, 通过测定叶片、果皮、果肉和种子4种组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性大小, 研究柑橘SOD的分布情况, 以及在柑橘生长过程中SOD活性的变化趋势。结果表明: 柑橘果皮、果肉、种子和叶片4种组织中均存在SOD, 其活性大小依次为: 叶片>种子>果皮>果肉; 柑橘各个组织之间SOD活性呈显著性差异, 个别品种的相同组织之间SOD的活性也呈显著差异。在柑橘生长中后期, 随着果实的逐渐成熟其果皮和果肉组织中SOD的活性变化呈现多样化趋势, 但活性变化幅度较小; 在种子和叶片组织中SOD的活性变化呈持续上升趋势。

关键词: 柑橘; SOD; 活性; 分布

Activity Distribution and Change of Superoxide Dismutase in Major Tissues of Citrus during the Middle and Late Growth Stages

SUN Zhi-gao^{1,2}, ZHANG Meng-meng^{1,3}, JIANG Guo-ling^{1,3}, MA Ya-qin^{1,3}, GUO Li^{1,2}, LI Qin⁴

(1. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China;

2. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;

3. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

4. Sichuan Technology and Business College, Dujiangyan 611830, China)

Abstract: SOD activities in peel, pulp, seed and leaf tissues from 16 citrus varieties were measured. The distribution of SOD activity in citrus tissues and the change of SOD activity during citrus growth period were analyzed. The results showed that SOD activity was detected in all the four citrus tissues with significant differences among them and decreased in the following order: leaf > seed > peel > pulp. Significant differences in SOD activity were observed for the same tissue among some of the citrus varieties studied. During the middle and late growth stages, SOD activity showed diverse changing trends within a narrow range with increasing degree of maturity; SOD activity in seed and leaf tissues revealed an increasing trend.

Key words: citrus; superoxide dismutase; activity; distribution

中图分类号: S38

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0047-06

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)是生物体内一种重要的氧自由基清除剂, 它能专一清除生物体内的超氧阴离子自由基, 从而减轻或消除超氧阴离子自由基对机体的损害^[1]。根据SOD所含金属离子的不同, SOD主要分为3种类型, 分别为Cu/Zn-SOD^[2]、Fe-SOD和Mn-SOD。Kim等^[3-4]从链霉菌中发现两种新的SOD, 即Ni-SOD和Fe/Zn-SOD。作为生物机体防御酶系统的重要组成成分, SOD具有抗炎症、抗肿瘤、抗病毒、防辐射和延缓衰老等功效^[5], 它在化妆品、食品、医药等领域具有广泛的应用前景^[6]。因此, 国内外生物化学与医药保健学界都已把SOD作为新兴技术产品加速开发, SOD基因工程方面亦取得了令人瞩目的成就^[7-10]。目前国

内外有关动植物体内SOD的研究报道较多^[11-15], 但对柑橘SOD的研究报道较少^[16-19]。本实验对16种柑橘品种的叶片、果肉、果皮和种子组织中SOD的分布, 以及柑橘生长期SOD的活性变化规律进行较系统研究, 为柑橘SOD的进一步研究和开发利用等方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试品种为温州蜜柑(兴津、早津)、柚(孟仑早、文旦、沙田柚)、甜橙(黄白皮甜橙、乔伯橙、红毛橙、广西香水橙、1号安江大红甜橙、义安橙、茭发橙、朱砂柑甜

收稿日期: 2012-06-25

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD47B06); 国家星火计划项目(S2012F100026)

作者简介: 孙志高(1964—), 男, 副研究员, 学士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: cpro@163.com

橙、桃叶橙、新会红橙、八楞甜橙),供试用柑橘叶片和果实等均从中国农业科学院柑桔研究所国家柑橘种质资源圃采集。

氯化硝基四氮唑蓝、L-甲硫氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、核黄素 成都市科龙化工试剂厂;乙二胺四乙酸二钠 重庆川东化工(集团)有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

H1850R台式高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;FAZ004B电子天平 上海精密科学仪器有限公司;TU-1901双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;HH恒温水浴锅 江苏金坛市中大仪器厂;MR300电磁搅拌器 德国Heidolph公司;KQ5200B数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;BCD243双开门冰箱 广东科龙电器股份有限公司;CS1012电热恒温鼓风干燥箱 重庆市实验设备厂。

1.3 方法

1.3.1 取样方法

果实:选择大小均匀、成熟度一致、无病虫和机械损伤的健康果实进行采摘,每个品种采5个果实。

叶片:每个品种随机取3株树,每株取生长部位一致、春梢叶片各5片,立即置于冰盒内带回实验室,用蒸馏水洗去叶片表面的泥沙等杂质,并擦拭干净后备用。

1.3.2 采集的品种及时间

兴津、早津、文旦等果实分别于2011年8月22日—11月10日,每隔20d采样1次,共5次;孟仑早、沙田柚、黄白皮甜橙、乔伯橙、红毛橙、广西香水橙、1号安江大红甜橙、义安橙、茛发橙、朱砂柑甜橙、桃叶橙、新会红橙、八楞甜橙等果实分别于2011年9月20日—12月9日,每隔20d采样1次,共5次;叶片组织分别于9月17日—12月7日,每隔20d采样1次,共5次。

1.3.3 SOD粗酶液的制备

取柑橘果皮组织3g(或果肉5g、种子0.5g、叶片1g),加入10mL含1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的0.05mol/L磷酸缓冲液(pH7.8),匀浆,5000r/min离心15min,上清液即为SOD粗酶液,用于测定活性。

1.3.4 SOD活性测定

采用NBT光化还原法^[20]。在3mL反应体系中含有13mmol/L甲硫氨酸、75μmol/L NBT(氯化硝基氮蓝四唑)、2μmol/L 核黄素、100nmol/L EDTA、50mmol/L磷酸缓冲液(pH7.8),以及0~200μL酶提取液。4000lx光照15min,于560nm波长处测定光密度。以抑制NBT光化还原50%所需的酶量作为一个酶活性单位。

1.4 数据处理

实验数据采用SPSS 18.0和Excel进行处理,用邓肯

氏t检验法分析各处理间的差异,当 $P < 0.05$ 时为差异显著,当 $P < 0.01$ 时为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 不同柑橘品种和不同组织中SOD的活性分布

选取柑橘成熟期的叶片、果皮、果肉和种子等4种组织中SOD活性的检测数据,进行不同柑橘品种和不同组织中SOD的活性分布研究,再经邓肯氏t检验方法对数据进行分析处理,其结果见表1。

表1 不同柑橘品种和不同组织中SOD活性比较
Table 1 Comparison of SOD activity in different tissues from different citrus varieties

品种	SOD活力/(U/g)			
	果皮	果肉	种子	叶片
兴津	152.8 ^{CE}	70.3 ^{IF}		1578.1 ^{bBC}
早津	175.6 ^{hB}	60.0 ^{kJ}		1632.6 ^{aA}
孟仑早	172.4 ^{bBC}	72.8 ^{CE}	373.6 ^{bcBC}	1617.6 ^{aAB}
文旦	145.0 ^{EF}	117.2 ^{aA}	387.2 ^{bAB}	1442.2 ^{ghGH}
沙田柚	103.5 ^{gl}	94.2 ^{cC}	321.4 ^{cdE}	1426.9 ^{ghH}
黄白皮甜橙	149.2 ^{efF}	53.8 ^{IK}	301.7 ^{IF}	1168.2 ^j
乔伯橙	144.8 ^{gF}	66.1 ^{hG}	328.8 ^{cd}	1454.7 ^{fgFgh}
红毛橙	164.6 ^{cdD}	71.0 ^{IF}	359.4 ^{dc}	1491.6 ^{deEF}
广西香水橙	145.6 ^{gF}	62.3 ^{hH}	298.3 ^{IF}	1544.5 ^{cCD}
1号安江大红甜橙	126.0 ^{hI}	60.9 ^{hJ}	313.7 ^{cdE}	1523.2 ^{cdDE}
义安橙	137.8 ^{hG}	50.6 ^{ML}	273.8 ^{gG}	1410.3 ^{hH}
茛发橙	167.4 ^{cCD}	67.4 ^{gG}	373.6 ^{bcBC}	1603.8 ^{abAB}
朱砂柑甜橙	161.8 ^{dD}	63.4 ^{hH}	324.2 ^{cdE}	1452.1 ^{fgFgh}
桃叶橙	136.0 ^{hG}	99.3 ^{bb}	406.2 ^{aA}	1519.8 ^{cdDE}
新会红橙	152.4 ^{CE}	79.7 ^{dD}	362.3 ^{cdBC}	1479.1 ^{efFh}
八楞甜橙	181.4 ^{aA}	72.8 ^{CE}	379.4 ^{bcBC}	1258.2 ^{il}

注:同列小写字母不同,表示差异显著($P < 0.05$);同列大写字母不同,表示差异极显著($P < 0.01$)。

由表1可知,柑橘果皮、果肉、种子和叶片等4种组织中均存在SOD,其活性大小依次为:叶片>种子>果皮>果肉,柑橘各个组织之间SOD活性差异显著;有些品种的相同组织之间SOD的活性也存在显著差异。

在不同品种的果皮组织中SOD的活性变化范围是103.5~181.4U/g,变幅为77.9U/g;其中八楞甜橙差异达到极显著水平,其SOD的活性高达181.4U/g。在果肉组织中,不同品种SOD的活性变化范围是50.6~117.2U/g,变幅为66.6U/g;文旦、沙田柚、桃叶橙SOD的活性均较高,分别达到117.2、94.2、99.3U/g;除兴津和红毛橙之间、早津和1号安江大红甜橙之间、孟仑早和八楞甜橙之间SOD的活性差异不显著外,其余品种之间SOD的活性均存在显著差异。在不同品种的种子组织中,SOD的活性变化范围是273.8~406.2U/g,变幅为132.3U/g;桃叶橙SOD的活性最高,差异达到极显著水平,其SOD的活性为406.2U/g,其次是文旦。在不同品种的叶片组织中,SOD的活性变化范围是1168.2~1632.6U/g,变幅为

464.5U/g; 兴津、早津、孟仑早、茭发橙的SOD的活性均比较高, 与其他品种之间差异显著。

2.2 柑橘生长期间SOD的活性变化

经过对柑橘生长中后期近90d的动态取样和SOD活性检测, 分别对16个柑橘品种的果皮、果肉、种子和叶片中SOD的活性变化规律进行研究。

2.2.1 果皮组织中SOD活性变化

2.2.1.1 SOD活性变化呈“下降”趋势

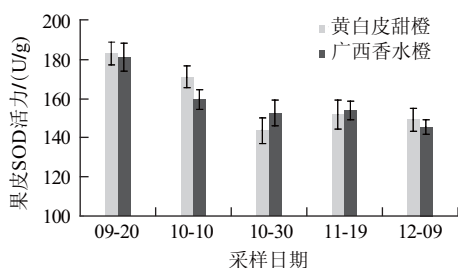


图1 果皮组织在生长过程中SOD活性呈“下降”趋势变化

Fig.1 SOD activity in peel tissue showed a downward trend during the growth period

由图1可知, 随着黄白皮甜橙和广西香水橙果实的逐渐成熟, 其果皮组织中SOD活性呈“下降”趋势。广西香水橙果皮组织中SOD活性在12月9日降到145.6U/g的最低点。

2.2.1.2 SOD活性变化呈“先上升后下降”趋势

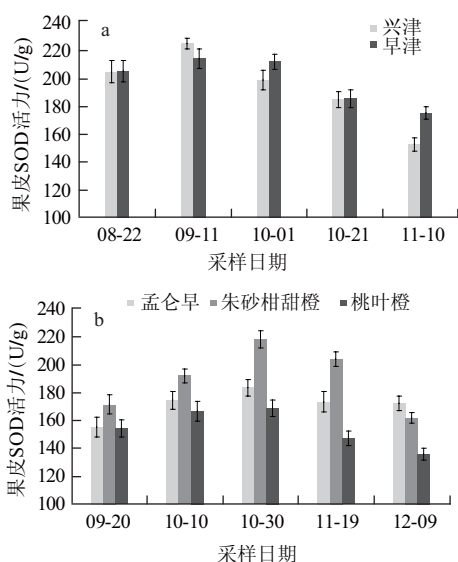


图2 果皮组织在生长过程中SOD活性呈“先上升后下降”趋势变化

Fig.2 SOD activity in peel tissue initially rose and then declined during the growth period

由图2可知, 随着兴津、早津、孟仑早、朱砂柑甜橙和桃叶橙果实的逐渐成熟, 其果皮组织中SOD活性呈“先上升后下降”趋势。其中, 朱砂柑甜橙在10月30日

时活性达到最高点为218.1U/g, 成熟果皮组织中SOD活性则降到了最低点161.8U/g。

2.2.1.3 SOD活性变化呈“降-升-降波动”趋势

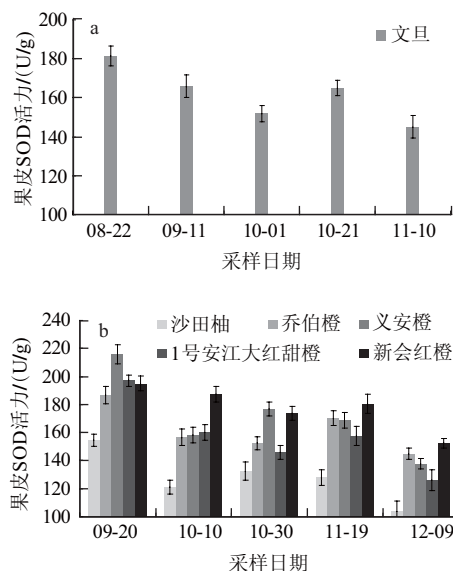


图3 果皮组织在生长过程中SOD活性呈“降-升-降波动”趋势变化

Fig.3 SOD activity in peel tissue initially rose, then declined, and finally rose again during the growth period

由图3可知, 随着文旦、沙田柚、乔伯橙、义安橙、1号安江大红甜橙和新会红橙果实的逐渐成熟, 其果皮组织中SOD活性呈“降-升-降波动”趋势。其中, 沙田柚SOD活性从最初的154.72U/g降到了103.5U/g, 随后略有回升, 之后逐渐下降。

2.2.1.4 SOD活性变化呈“平稳”趋势

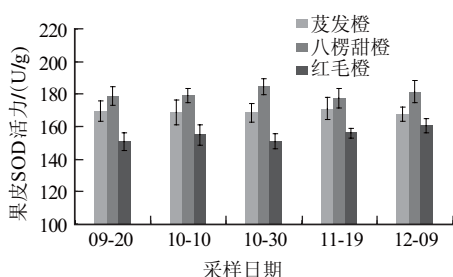


图4 果皮组织在生长过程中SOD活性呈“平稳”趋势变化

Fig.4 SOD activity in peel tissue remained stable during the growth period

由图4可知, 随着茭发橙、八楞甜橙和红毛橙果实的逐渐成熟, 其果皮组织中SOD活性呈“平稳”趋势。其中, 茭发橙果皮组织中SOD活性变化不大, 且一直处于较高水平, 成熟果皮组织中SOD活性为167.4U/g。

2.2.2 果肉组织中SOD的活性变化

2.2.2.1 SOD活性变化呈“上升”趋势

由图5可知, 随着兴津、桃叶橙和新会红橙果实的逐

渐成熟,其果肉组织中SOD活性呈“上升”趋势。其中,成熟的桃叶橙果肉组织中SOD活性达到最高点99.3U/g。

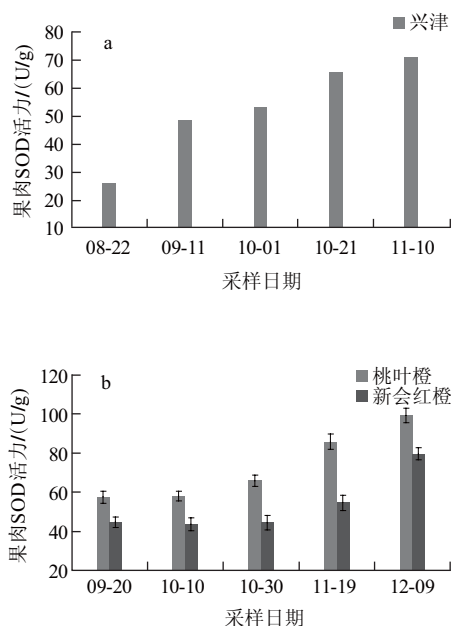


图5 果肉组织在生长过程中SOD活性呈“上升”趋势变化

Fig.5 SOD activity in pulp tissue showed an upward trend during the growth period

2.2.2.2 SOD活性变化呈“下降”趋势

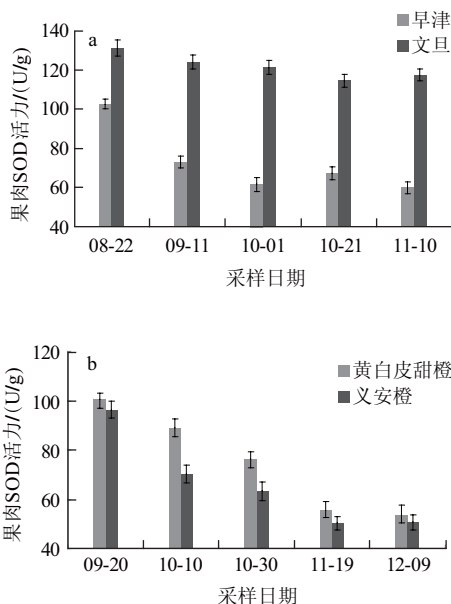


图6 果肉组织在生长过程中SOD活性呈“下降”趋势变化

Fig.6 SOD activity in pulp tissue showed a downward trend during the growth period

由图6可知,随着早津、文旦、黄白皮甜橙和义安橙果实的逐渐成熟,其果肉组织中SOD活性呈“下降”趋势。其中,在成熟的义安橙果肉组织中SOD活性最低,为50.6U/g。

2.2.2.3 SOD活性变化呈“先上升后下降”趋势

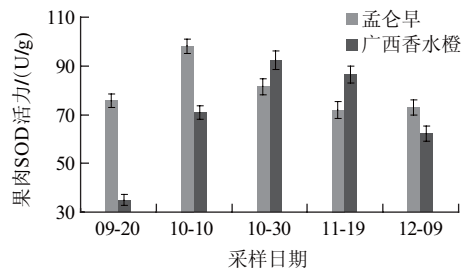


图7 果肉组织在生长过程中SOD活性呈“先上升后下降”趋势变化

Fig.7 SOD activity in pulp tissue initially rose and then declined during the growth period

由图7可知,随着孟仑早和广西香水橙果实的逐渐成熟,其果肉组织中SOD活性呈“先上升后下降”趋势。其中,孟仑早SOD活性最高为98.1U/g,随后下降并趋于平缓。

2.2.2.4 SOD活性变化呈“先下降后略上升”趋势

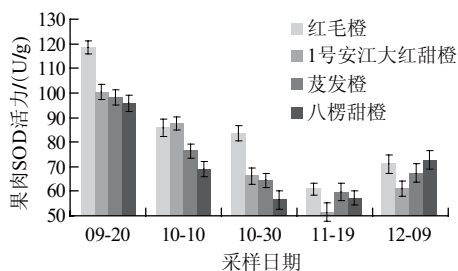


图8 果肉组织在生长过程中SOD活性呈“先下降后上升”趋势变化

Fig.8 SOD activity in pulp tissue initially rose and then declined during the growth period

由图8可知,随着红毛橙、1号安江大红甜橙、荻发橙和八楞甜橙果实的逐渐成熟,其果肉组织中SOD活性呈“先下降后略上升”趋势。

2.2.2.5 SOD活性变化呈“平稳”趋势

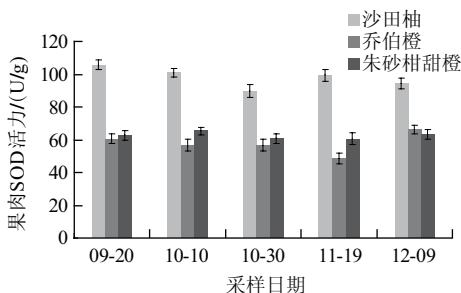


图9 果肉组织在生长过程中SOD活性呈“平稳”趋势变化

Fig.9 SOD activity in pulp tissue initially remained stable during the growth period

由图9可知,随着沙田柚、乔伯橙和朱砂柑甜橙果实的逐渐成熟,其果肉组织中SOD活性呈“平稳”趋势。其中,沙田柚果肉组织中SOD活性一直处于较高水平,且基本保持稳定。

2.2.3 种子组织中SOD的活性变化

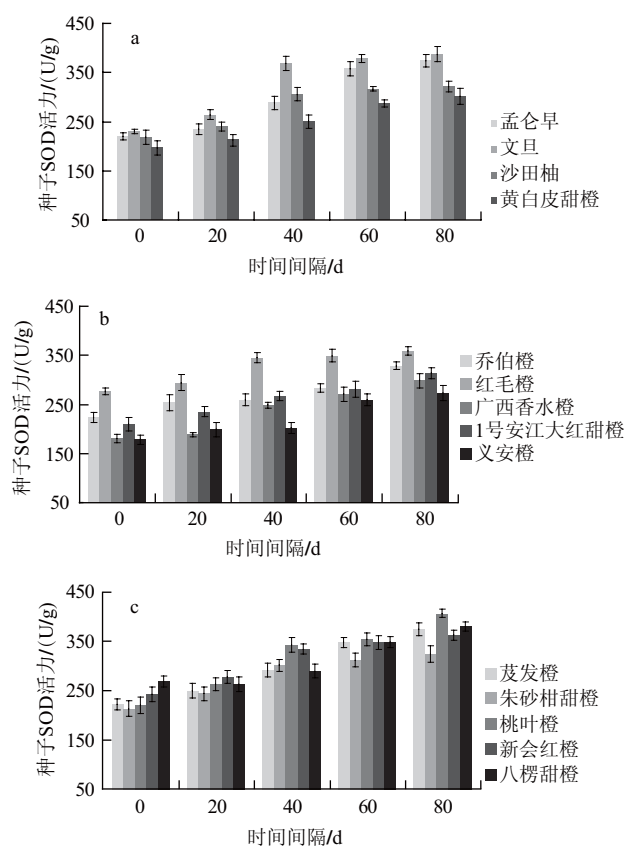


图10 种子组织在生长过程中SOD活性变化

Fig.10 Change of SOD activity in seed tissue during the growth period

由图10可知,在柑橘生长期随着果实的逐渐成熟,16个供试柑橘品种的种子组织中SOD活性均呈上升趋势。其中,桃叶橙种子组织中SOD活性最高,为406.2U/g。

2.2.4 叶片组织中SOD活性变化

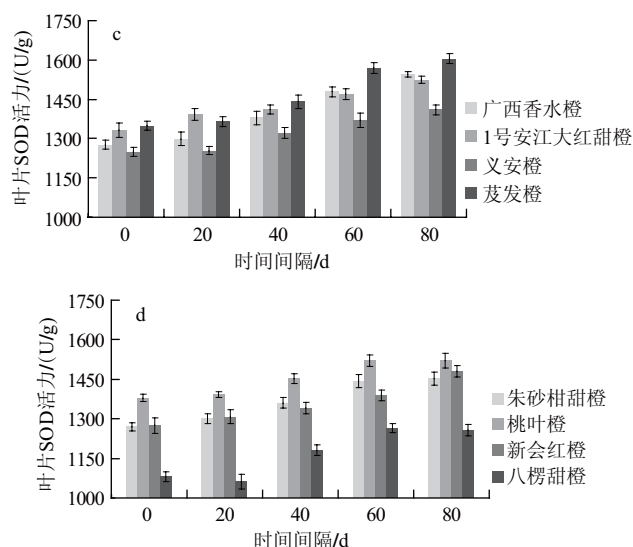
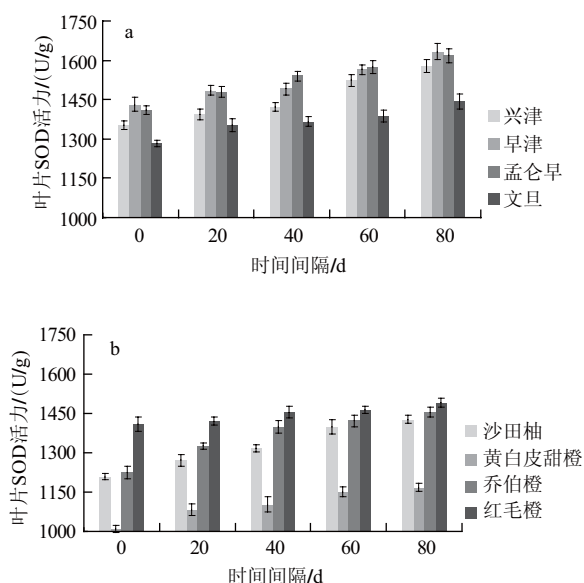


图11 叶片组织在生长过程中SOD活性变化

Fig.11 Change of SOD activity in leaf tissue during the growth period

由图11可知,在柑橘生长过程中,16个供试柑橘品种叶片组织中SOD的活性变化总体呈上升趋势。

3 结论

3.1 柑橘的果皮、果肉、种子和叶片4种组织中均存在SOD,其活性大小依次为:叶片>种子>果皮>果肉;柑橘各个组织之间SOD活性差异显著,有些品种的相同组织之间SOD的活性存在显著差异。

3.2 在柑橘生长期,随着果实的逐渐成熟果皮组织SOD的活性变化呈现多样化趋势,但活性变化幅度较小。SOD活性呈“下降”趋势的有黄白皮甜橙和广西香水橙;SOD活性呈“先上升后下降”趋势的有兴津、早津、孟仑早、朱砂柑甜橙和桃叶橙;SOD活性呈“先下降后上升”趋势的有红毛橙;SOD活性呈“降-升-降波动”趋势的有文旦、沙田柚、乔伯橙、义安橙、1号安江大红甜橙和新会红橙;SOD活性呈“平稳”趋势的有红毛橙、芡发橙和八楞甜橙。在成熟的果皮组织中SOD活性较高的品种有兴津、早津、孟仑早、红毛橙、芡发橙、朱砂柑甜橙、新会红橙和八楞甜橙。

3.3 在柑橘生长期随着果实的逐渐成熟,果肉组织SOD的活性变化呈现多样化趋势。SOD的活性呈“上升”趋势的有兴津、桃叶橙和新会红橙;SOD的活性呈“下降”趋势的有早津、文旦、黄白皮甜橙和义安橙;SOD的活性呈“先上升后下降”趋势的有孟仑早和广西香水橙;SOD的活性呈“先下降后上升”趋势的有红毛橙、1号安江大红甜橙、芡发橙和八楞甜橙;SOD的活性呈“平稳”趋势,基本保持稳定的有沙田柚、乔伯橙和朱砂柑甜橙。

3.4 在柑橘生长期随着果实的逐渐成熟,种子组织中SOD的活性变化呈“上升”趋势。其中,成熟种子组织中孟仑早、文旦、红毛橙、茛发橙、桃叶橙、新会红橙和八楞甜橙的SOD活性较高。

3.5 在柑橘生长过程中,叶片组织SOD的活性变化呈持续“上升”趋势。其中,兴津、早津、孟仑早、广西香水橙、1号安江大红甜橙、茛发橙和桃叶橙SOD的活性较高。

参考文献:

- [1] 马振华,杨红强,杨琼.超氧化物歧化酶(SOD)的功能及应用[J].新学术,2008(4):316-320.
- [2] PATEL R N, SINGH N, SHUKLA K K, et al. Synthesis, structure and biomimetic properties of Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) binuclear complexes: possible models for the chemistry of Cu-Zn superoxide dismutase[J]. J Inorg Biochem, 2005, 99(2): 651-663.
- [3] KIM E J, KIM H P, HAH Y C, et al. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*[J]. Eur J Biochem, 1996, 241: 178-185.
- [4] YOUNG H D, KIM E J, ROE J H, et al. A novel nickel containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp.[J]. Biochem J, 1996, 318: 889-896.
- [5] MCCORD J M, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein[J]. J Biol Chem, 1969, 244: 6049-6055.
- [6] ZHOU Jiangyan, PROGNON P. Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods-the example of superoxide dismutase(SOD)[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 40(5): 1143-1148.
- [7] 刘守安,韩宝瑜,付建玉,等.茶树Mn-SOD基因在大肠杆菌中的高效表达[J].安徽农业大学学报,2008,35(2):234-238.
- [8] 王岁楼,张国超.人Mn-SOD基因及其优化序列在毕赤酵母中的表达[J].食品科学,2008,29(7):311-315.
- [9] BAGNOLI F, GIANNINO D, CAPARRINI S, et al. Molecular cloning, characterisation and expression of a manganese superoxide dismutase gene from peach(*Prunus persica*[L.]Batsch)[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 267(3): 321-328.
- [10] 郭兴,潘登奎,罗晓丽.植物超氧化物歧化酶的研究及其在基因工程中的应用[J].山西农业科学,2008,36(3):3-6.
- [11] 张兰杰,候冬岩,辛广,等.鸡红细胞Cu,Zn-SOD的纯化及部分性质研究[J].食品科学,2008,29(2):266-270.
- [12] 赵文宝,张珍,郭建华,等.牦牛血中超氧化物歧化酶提取工艺研究[J].甘肃农业大学学报,2010,45(1):147-150.
- [13] 曹向宇,刘剑利,朱俊丰,等.右旋糖苷修饰玉米SOD研究[J].食品研究与开发,2010,31(3):17-19.
- [14] 吴素玲,张卫明,孙晓明,等.刺梨SOD活力测定研究[J].食品科学,2005,26(11):58-61.
- [15] HADJI I, MARZOUKI M N, FERRARO D, et al. Purification and characterization of a Cu,Zn-SOD from garlic (*Allium sativum* L.). antioxidant effect on tumoral cell lines[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 143(2): 129-141.
- [16] 程光宇,吴国荣,储慧君.朱橘Mn-SOD的纯化、鉴定及浓度梯度胶电泳在其中的应用[J].植物研究,2004,24(2):240-244.
- [17] 施媚,郑建新,吕东.纽荷尔橙内皮中SOD的纯化及部分性质研究[J].安徽师范大学学报:自然科学版,2009,32(4):354-356.
- [18] 王琦,余亚白,赖呈纯,等.几种台湾水果的抗氧化能力研究[J].福建农业学报,2010,25(6):703-706.
- [19] ALMANSA M S, PALMA J M, YANEZ J, et al. Purification of an iron-containing superoxide dismutase from a citrus plant, *Citrus limonum* R.[J]. Free Radical Research, 1991, 12(1): 319-328.
- [20] GIARMOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutase purification and quantitative relationship with watersoluble protein in seedlings[J]. Plant Physiology, 1977, 59: 315-318.