

白青云,顾振新.低氧胁迫对发芽粟谷抗氧化酶活性及 GABA 含量的影响[J].江苏农业科学,2013,41(12):89-91.

# 低氧胁迫对发芽粟谷抗氧化酶活性及 GABA 含量的影响

白青云<sup>1</sup>,顾振新<sup>2</sup>

(1. 淮阴工学院生化学院,江苏淮安 223003; 2. 南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095)

**摘要:**研究了低氧胁迫对发芽粟谷中活性氧(ROS)、丙二醛、抗氧化酶活性和  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)含量的影响。结果显示,低氧处理下发芽粟谷细胞膜脂过氧化明显加重,活性氧含量增加,并且通气量越低,膜脂过氧化程度越强。低氧胁迫对粟谷抗氧化酶活性起到了不同程度的诱导作用,并且对 SOD 和 POD 活性的促进作用大于对 CAT 的作用。低氧胁迫促进了发芽粟谷中 GABA 的积累,当通气量为 1.5 L/min 时,GABA 含量达到 0.253 8 mg/g,是对照的 1.61 倍。由此表明,低氧胁迫在促进发芽粟谷产生 ROS 的同时,还能提高抗氧化酶活性和 GABA 含量;低氧胁迫下发芽粟谷的 GABA 积累量与 SOD、CAT、POD 活性呈极显著正相关。

**关键词:**低氧胁迫;发芽粟谷;活性氧;抗氧化酶; $\gamma$ -氨基丁酸

**中图分类号:**S515.01;Q945.78 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)12-0089-03

正常情况下,植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生与清除处于平衡状态,不会导致植物细胞受到伤害。逆境引起过量的活性氧自由基产生<sup>[1]</sup>,这些不能被及时清除的 ROS 会攻击生物膜中许多不饱和脂肪酸,从而引发脂质过氧化,并由此形成脂质过氧化产物丙二醛(MDA),加剧生物膜过氧化作用,最终导致新陈代谢紊乱,植株受到伤害<sup>[2]</sup>。为有效防御由胁迫产生的 ROS 及由此带来的损伤,植物在长期的进化过程中形成了一套有效的酶促和非酶促 ROS 自由基清除系统,从而防御活性氧对膜脂的攻击伤害,并有利于维持膜结构的完整性。其中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)在抗氧化代谢中起关键作用。植物受到逆境刺激时, $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)含量可增加几到几十倍,GABA 的积累能够增强植物机体对逆境胁迫的抗逆性<sup>[3]</sup>。研究表明,采用外源 GABA 处理可减轻活性氧对植物的伤害,并提高植物体中抗氧化酶活性<sup>[4-5]</sup>。逆境条件下植物体内富集的 GABA 与活性氧和抗氧化酶活性之间的关系还未见报道。

目前有关植物响应逆境胁迫后抗氧化反应的研究主要集中在其抵抗逆境方面,而对逆境胁迫引起的植物抗氧化酶活性的提高和 GABA 含量的积累在食品中的应用研究报道较少。GABA 是哺乳动物大脑抑制性神经递质,具有降血压、利尿、镇定神经等生理功能<sup>[6]</sup>,抗氧化酶具有抗氧化作用,均为功能食品的功能因子。本研究探讨低氧胁迫对发芽粟谷活性氧、抗氧化酶活性和 GABA 含量的影响,并对低氧胁迫积累的 GABA 和抗氧化酶活性进行相关性分析,旨在探明逆境下粟谷积累的 GABA 与其抗氧化能力之间的关系打下基础,为开发功能性植物源食品提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

粟谷种子(晋谷 34 号),由山西省农业科学院作物遗传研究所提供,种子贮藏于 0~4℃密封环境中备用。GABA 标准品和 PITC(分析纯)为美国 Sigma 公司产品;过氧化氢试剂盒购于南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪(Agilent 公司);DZF-6020 型真空干燥器(上海一恒科技有限公司);UV-2802 型紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];H1650-W 台式高速离心机(湖南湘仪公司);PYX-DHS-50X65-BS-II 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);LZB-3 型空气流量计(浙江余姚工业自动化仪表厂)。

### 1.3 低氧胁迫处理

称取 20 g 粟谷种子,消毒后于 25℃的去离子水中浸泡 8 h,然后转入培养瓶中,用 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 值 5.8)于 32℃黑暗条件下培养,用气泵通入空气,通气量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 L/min,对照通气量为 20 L/min,通气量由空气流量计控制。培养 48 h 后取出样品,用去离子水清洗,吸干表面水分,鲜样用于测定电导率,其他样品液氮速冻后置于 -80℃的超低温冰箱中保存待测。

### 1.4 指标测定与方法

**1.4.1 相对电导率测定** 称取新鲜样品 2.00 g,用去离子水洗涤数次,滤纸吸干后放入小烧杯中,加 40 mL 去离子水搅动浸泡 1 h,用电导率仪测定电导率,然后放在 100℃沸水中煮 15 min,取出后放至室温,测定煮沸后的电导率,以处理样品电导率占煮沸样品电导率的百分比作为相对电导率<sup>[7]</sup>。

**1.4.2 丙二醛(MDA)测定** 采用硫酸巴比妥酸法<sup>[7]</sup>测定新鲜样品的丙二醛含量,MDA 含量用  $\mu\text{mol/g}$  表示。

**1.4.3 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )测定** 采用  $\text{H}_2\text{O}_2$  试剂盒测定。 $\text{H}_2\text{O}_2$  可以与钼酸作用生成一种络合物,在 405 nm 处测定生成量并计算出  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量,单位为  $\mu\text{mol/g}$ 。分别用 2 批试剂

收稿日期:2013-05-13

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2008309)。

作者简介:白青云(1973—),女,山西临汾人,博士,副教授,研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail:baigy@hyit.edu.cn。

盒重复验证,结果取平均值。

1.4.4 抗氧化酶活性测定 (1)酶提取液制备。随机称取 1.00 g 样品,添加经预冷的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.8,内含 0.1 mmol/L EDTA 和 1% PVP)5 mL,冰浴研磨至匀浆,10 000 r/min 4 ℃冷冻离心 20 min,上清液即为酶提取液。

(2)SOD 活性测定。采用 Giannopolitis 等的氮蓝四唑(NBT)光还原法<sup>[7]</sup>测定,以抑制 NBT 光还原 50% 所需的酶量为 1 个酶活性单位(U),酶活性以 U/g 表示。

(3)POD 活性测定。采用愈创木酚氧化法<sup>[8]</sup>测定,以 1 min 吸光度增加 0.01 为 1 个酶活单位(U/g)。

(4)CAT 活性测定。参照 Dhindsa 等的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 法<sup>[8]</sup>,以 1 min 吸光度下降 0.1 为 1 个酶活单位(U/g)。

1.4.5 GABA 含量测定 参照 Bai 等的 HPLC 方法<sup>[9]</sup>测定。

## 1.5 数据统计与分析

试验均重复 3 次,结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,所有化学和生理指标除特别说明外,均以鲜重表示。采用 SPSS 16.0 软件处理

试验数据,进行方差分析和显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 通气量对发芽粟谷 ROS 及膜脂过氧化的影响

从图 1-A 可见,发芽粟谷中 MDA 含量随通气量减小而升高,当通气量为 0.5 L/min 时,MDA 含量比对照提高 163.83%;当通气量为 2.0 L/min 时,MDA 含量比对照提高 31.91%。相对电导率变化趋势与 MDA 相似,0.5 L/min 通气量下相对电导率是对照的 2.12 倍,2.0 L/min 通气量与对照无显著差异(图 1-B)。低氧胁迫下发芽粟谷中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量显著高于对照,随着通气量的增加,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量呈先上升后下降的变化趋势,1.0 L/min 通气量下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量最高,是对照的 3.79 倍(图 1-C)。以上结果表明,低氧胁迫下发芽粟谷细胞膜脂过氧化明显加重,活性氧含量增加,且通气量越小,膜脂过氧化程度越严重。

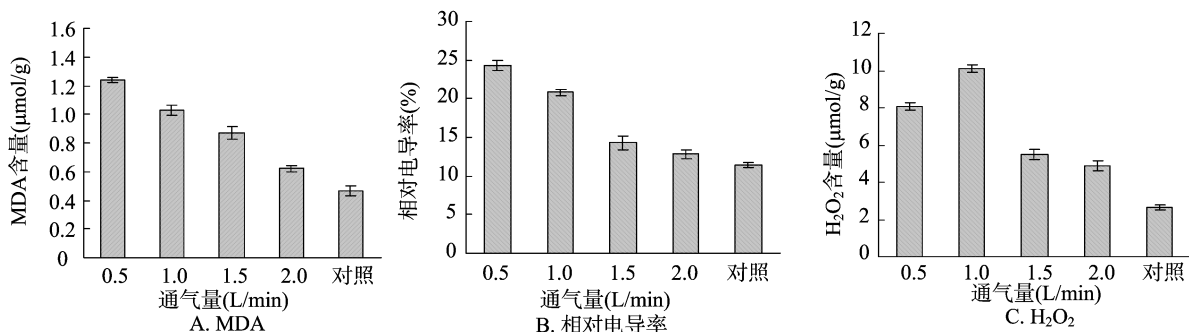


图1 通气量对粟谷MDA、相对电导率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响

### 2.2 通气量对发芽粟谷抗氧化酶活性的影响

低氧胁迫下发芽粟谷中 SOD 活性随通气量的减少呈先增长后降低的趋势,并且均大于对照,1.5 L/min 通气量下 SOD 活性最高,比对照高 113.86% (图 2-A);POD 活性随着通气量的减少也呈现先上升后下降趋势,最大值出现在通气量为 1.0 L/min,此时 POD 活性是对照的 2.06 倍(图 2-B);

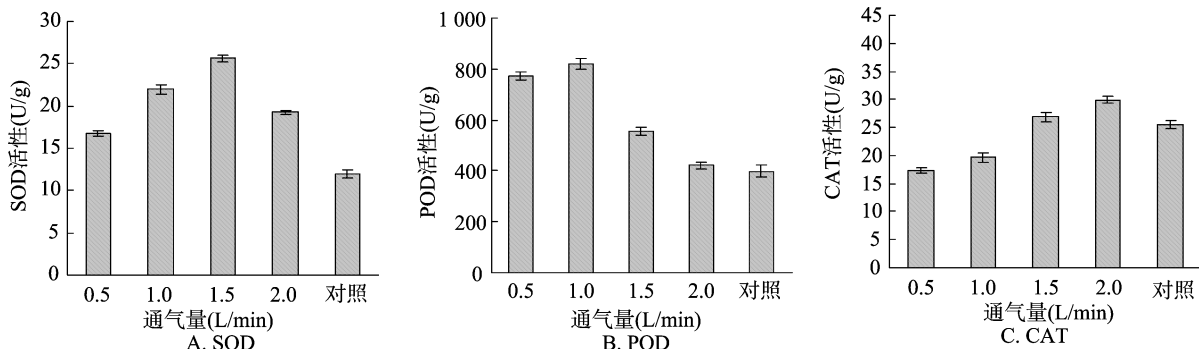


图2 通气量对粟谷SOD、POD和CAT活性的影响

### 2.3 通气量对发芽粟谷 GABA 含量的影响

不同通气量下发芽粟谷中 GABA 含量呈先增加后减少的变化趋势,1.5 L/min 通气量下发芽粟谷中 GABA 含量最高(0.253 8 mg/g),是对照的 1.61 倍(图 3)。

### 2.4 低氧胁迫下发芽粟谷 ROS 和抗氧化酶活性与 GABA 含量相关性分析

由表 1 可知,低氧胁迫下发芽粟谷中 GABA 含量分别与

CAT 活性随通气量的减少呈下降趋势,1.5、2.0 L/min 通气量下 CAT 活性均与对照差异不显著,0.5、1.0 L/min 通气量下 CAT 活性显著低于对照(图 2-C)。这表明低氧胁迫对发芽粟谷抗氧化酶活性有不同程度的诱导作用,并且对 SOD、POD 活性的促进作用大于对 CAT 的作用。

SOD、POD、CAT 活性之间,REL 与 MDA 含量、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量之间,SOD、POD、CAT 等 3 种抗氧化酶活性之间呈极显著相关。由此推断,低氧胁迫使发芽粟谷膜脂过氧化加重,同时抗氧化酶活性提高,GABA 得到积累,以修复机体损伤。

GABA 作为植物抵御逆境的渗透物质,清除活性氧的功能高于脯氨酸和甜菜碱<sup>[10]</sup>。高洪波等发现,外源 GABA 处理促进了低氧胁迫下网纹甜瓜抗氧化酶活性,降低了 ROS 数量,

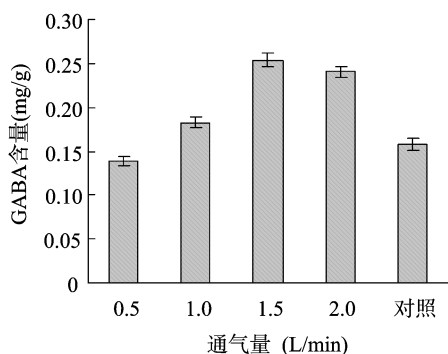


图3 通气量对发芽粟谷 GABA 含量的影响

表1 低氧胁迫下粟谷活性氧和抗氧化酶活性与 GABA 含量相关性分析

指标	相关系数					
	GABA	MDA	REL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SOD	POD
MDA	0.193					
REL	0.208	0.957 **				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.166	0.947	0.945 **			
SOD	0.820 **	0.301	0.233	0.279		
POD	0.785 **	0.410	0.341	0.374	0.922 **	
CAT	0.589 **	0.126	0.079	0.062	0.783 **	0.754 **

注: \*\*、\* 表示在 0.01、0.05 水平上显著相关。

增强了植株的耐低氧能力<sup>[4]</sup>。本研究证实,低氧胁迫下,发芽粟谷体内 GABA 的积累量与其抗氧化酶活性的提高呈显著正相关。

### 3 讨论

#### 3.1 低氧胁迫对发芽粟谷 ROS 和抗氧化酶活性的影响

逆境胁迫引起植物体内 ROS 大量积累,对植物造成伤害,由此激发植物体内抗氧化酶体系,如 SOD、POD、CAT 等保护细胞免受 ROS 伤害<sup>[11]</sup>。低氧胁迫下,黄瓜幼苗根系 ROS 和抗氧化剂以及抗氧化酶活性均显著提高<sup>[12]</sup>,短时间低氧胁迫下玉米叶片 SOD、CAT 等抗氧化酶活性增强<sup>[13]</sup>。本研究表明,低氧处理下,发芽粟谷细胞膜脂过氧化明显加重,活性氧含量增加,并且通气量越低,膜脂过氧化程度越重,此时粟谷中抗氧化酶活性被激活,其中对 SOD 和 POD 活性的促进作用大于对 CAT 的作用。

#### 3.2 低氧胁迫下粟谷 GABA 含量与活性氧和抗氧化酶活性的关系

低氧胁迫下植株体内乳酸发酵增强,细胞质 pH 值降低,产生 H<sup>+</sup>,由此激活 GAD 活性,催化谷氨酸转变成 GABA,缓解低氧胁迫造成的胞质酸化<sup>[14]</sup>。越来越多的证据表明,GABA 在植物的发育、代谢、逆境的响应等过程中起重要作用。GABA 可能与糖、脯氨酸等代谢物质一样,既可作为信号分子,又可作为代谢物质起双重作用<sup>[15]</sup>。GABA 处理使低氧胁迫下网纹甜瓜植株根和叶片 SOD、POD 和 CAT 活性维持在较高水平<sup>[4]</sup>,也能迅速提高盐胁迫下玉米幼苗抗氧化酶活性<sup>[5]</sup>。高洪波等认为,低氧胁迫下,GABA 含量的增加是植物体内有益的生理反应,能够提高抗氧化酶活性,防止 ROS 积累,减轻低氧胁迫对植株的伤害<sup>[4]</sup>。本试验结果表明,低氧胁迫下,发芽粟谷的 GABA 积累量与 SOD、CAT、POD 活性呈极显著正相关,发芽粟谷 GABA 的积累量是否也有促进抗氧

化酶活性的作用有待进一步研究。通过低氧胁迫处理发芽粟谷,使其 GABA 和抗氧化酶活性提高,有可能作为一种功能食品的新原料。

### 4 结论

低氧胁迫下,随着培养液中通气量的减少,粟谷膜脂过氧化和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增加,而 SOD 和 POD 活性呈先增强后减弱的趋势,CAT 活性呈减弱的趋势,低氧胁迫对发芽粟谷 SOD 和 POD 活性的促进作用大于对 CAT 的作用。低氧胁迫促进了发芽粟谷中 GABA 的积累,并且 GABA 含量与 SOD、CAT 和 POD 活性呈极显著正相关。总之,低氧胁迫使发芽粟谷膜脂过氧化加重,由此诱导抗氧化酶活性增强,GABA 积累。

### 参考文献:

- [1] Mittler R S. Antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 9: 405–410.
- [2] Imlay J A. Pathways of oxidative damage[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 395–418.
- [3] Shelp B J, Bown A W, McLean M D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4: 446–452.
- [4] 高洪波,郭世荣. 外源 γ-氨基丁酸对营养液低氧胁迫下网纹甜瓜幼苗抗氧化酶活性和活性氧含量的影响[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(6): 651–659.
- [5] 田小磊,关晓岚,李 云,等. 盐胁迫条件下 γ-氨基丁酸对玉米幼苗 SOD、POD 及 CAT 活性的影响[J]. 实验生物学报, 2005, 38(1): 75–79.
- [6] Okada T, Sugishita T, Murakami T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 2000, 47(8): 596–603.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000: 260–263.
- [8] 曾韶西,王以柔,李美如. 不同胁迫预处理提高水稻幼苗抗寒期间膜保护系统变化比较[J]. 植物学报, 1997, 39(4): 308–314.
- [9] Bai Q, Chai M, Gu Z, et al. Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and γ-aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination[J]. Food Chemistry, 2009, 116: 152–157.
- [10] Smirnov N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28: 1057–1060.
- [11] Blokhina O B, Virolainen E, Fagerstedt K V, et al. Antioxidant status of anoxia-tolerant and intolerant plant species under anoxia and reaeration[J]. Physiologia Plantarum, 2000, 109: 396–403.
- [12] 康云艳,郭世荣,段九菊. 低氧胁迫对不同耐性黄瓜品种根系抗氧化系统的影响[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 630–634.
- [13] Yan B, Dai Q, Liu X, et al. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves[J]. Plant and Soil, 1996, 179: 261–268.
- [14] Fait A, Yellin A, Fromm H. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants[J]. FEBS Letters, 2005, 579(2): 415–420.
- [15] 李银心,侯玉慧,石武良. 一种通过 γ-氨基丁酸诱导提高植物抗盐性的方法: 中国, 200710098727.8[P]. 2007–09–12.