

李春雷. 氟对茶树抗坏血酸-谷胱甘肽循环系统的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1018-1022.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.010

## 氟对茶树抗坏血酸-谷胱甘肽循环系统的影响

李春雷<sup>1,2</sup>

(1. 潍坊科技学院贾思勰农学院, 山东 寿光 262700; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 以一年生福鼎大白扦插苗为材料, 采用水培法, 研究不同浓度氟对茶树抗坏血酸-谷胱甘肽(ASA-GSH)循环中酶及抗氧化物质的影响。结果表明:随着氟处理浓度的增加, 抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性均先升后降;总抗坏血酸(T-ASA)、还原型抗坏血酸(ASA)、脱氢抗坏血酸(DHA)含量显著增加;脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性、总谷胱甘肽(T-GSH)含量、还原型谷胱甘肽(GSH)含量均呈下降趋势;ASA/DHA和GSH/GSSG均显著下降;丙二醛(MDA)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量显著增加。说明,在低氟范围内,ASA-GSH循环对氟胁迫做出了抵御响应,及时清除活性氧(ROS),保护茶树免受伤害,但随着氟浓度的增加,ROS产生量超出了这些酶及抗氧化物质的清除能力,导致过量的ROS积累。

**关键词:** 茶树; 氟; 活性氧; 抗坏血酸-谷胱甘肽循环

**中图分类号:** S571.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1018-05

## ASA-GSH cycle in tea plant exposed to fluoride application

LI Chun-lei<sup>1,2</sup>

(1. Jiasixie College of Agronomy, Weifang University of Science & Technology, Shouguang 262700, China; 2. College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** One-year-old seedlings of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Fudingdabai were grown hydroponically in order to study the effects of fluoride (F) on the activities of relative oxidative enzymes and antioxidation substances in the ascorbate glutathione (ASA-GSH) cycle in tea plant. With increasing F concentrations, ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) activities increased first and decreased afterwards, ascorbate (ASA) and dehydroascorbate (DHA) contents increased significantly, dehydroascorbate reductase (DHAR) activity, total ascorbate (T-GSH) and glutathione (GSH) as well as ASA/DHA and GSH/GSSG declined, and malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) contents increased significantly. In conclusion, at low F concentrations, ASA-GSH cycle could scavenge reactive oxygen species (ROS) to protect cells from free radical injury. However, ROS was accumulated due to incapability of scavenging of ASA-GSH cycle in response to high F concentration.

**Key words:** *Camellia sinensis* (L.); fluoride; reactive oxygen species (ROS); ascorbate-glutathione cycle

茶树是一种富氟植物,成熟叶片和老叶片中的氟含量可达1 000 mg/kg<sup>[1-2]</sup>,茶叶中如此高含量的

氟被摄入人体,容易引起氟骨症、氟斑牙等健康问题<sup>[3]</sup>,同时也对茶树的生理生化、细胞结构等产生影响。Li等前期研究了氟对茶叶品质成分<sup>[4]</sup>、香气<sup>[5]</sup>、超微结构、光合、抗氧化系统<sup>[6-7]</sup>等的影响,发现茶树在氟处理下,抗氧化系统中的氧化酶(SOD、POD、CAT等)在保护茶树不受活性氧(ROS)伤害方面发挥了积极作用。另据报道,植物体内ASA-GSH循环系统在抵御逆境及清除在逆境中产生的ROS

收稿日期:2016-03-31

基金项目:国家自然科学基金项目(31400585);潍坊市科技发展计划项目(2013YD181)

作者简介:李春雷(1979-),男,山东潍坊人,博士,副教授,主要从事茶树栽培生理与生化方面的研究。(E-mail) ligreentea@aliyun.com

方面也有着重要作用<sup>[8-10]</sup>。目前,ASA-GSH 循环系统在茶树体内作用的相关研究较少,关于氟与 ASA-GSH 循环系统的关系研究未见报道。本研究采用营养液培养茶苗,研究外加不同氟浓度处理对福鼎大白茶茶苗 ASA-GSH 循环系统中的酶活性和主要抗氧化物质的影响,以期完善氟影响下茶树清除 ROS 的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验中用到的幼龄茶树为福鼎大白一年生扦插茶苗(茶苗购自湖北省农业科学院果茶研究所)。

### 1.2 试验设计

试验在华中农业大学试验基地玻璃温室进行,选用长势较一致的福鼎大白一年生扦插茶苗,将茶苗根部用自来水洗净后再用去离子水洗,然后移到盛有 1/2 Hoagland+Arnon<sup>[11]</sup> 营养液的营养液瓶小桶中,缓苗后,分别设 0 mg/L (CK)、2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、10 mg/L 5 个氟浓度处理,每个处理重复 5 次,氟源为  $\text{NH}_4\text{F}$ ,在水培期间,每天每盆均用压力泵通气,并调整营养液 pH = 5.5,5 d 换 1 次营养液。处理 30 d 后收集茶树鲜叶测定酶活性等相关指标。

### 1.3 测定项目及方法

**1.3.1 酶液提取** 茶树鲜叶去除主脉后称取 0.50 g,置于预冷的研钵中,加入预冷的 50 mmol/L 的 PBS (pH = 7.8) 5 ml (含有 0.1 mmol/L EDTA, 5% PVP),在冰上研磨至匀浆状,匀浆液于 4 ℃ 下 16 000 g 离心 15 min,取其上清液用于测定 APX (抗坏血酸过氧化物酶)、GR (谷胱甘肽还原酶)、MDHAR (单脱氢抗坏血酸还原酶)、DHAR (脱氢抗坏血酸还原酶) 等酶活力<sup>[12]</sup>。

**1.3.2 测定方法** APX、MDHAR、DHAR 活性测定分别参照 Nakano 等<sup>[13]</sup>、Miyake 等<sup>[14]</sup> 的方法;总抗坏血酸 T-ASA、ASA 和 DHA 含量测定参考 Kampfenkel 等<sup>[15]</sup> 的方法;总谷胱甘肽 (T-GSH)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量根据陈建勋等<sup>[16]</sup> 的方法测定;GR 活性和过氧化氢含量均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定。丙二醛 (MDA) 含量采用硫代巴比妥酸法<sup>[17]</sup> 测定。

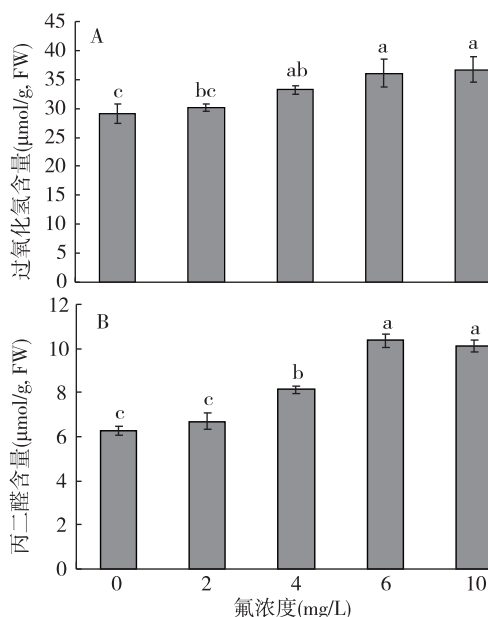
### 1.4 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据计算和作图,采用 SAS 软件进行 LSD 显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 氟处理对茶树叶片中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 及 MDA 含量的影响

由图 1 可以看出,随着氟处理浓度的增加,鲜叶中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量和 MDA 含量的变化趋势一致,均显著升高。 $\text{H}_2\text{O}_2$  含量在氟处理浓度为 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、10 mg/L 时分别比对照高 3.80%、14.19%、24.09%、26.06%。MDA 含量在氟浓度为 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、10 mg/L 时分别比对照高 1.97%、24.18%、57.77%、53.94%。



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

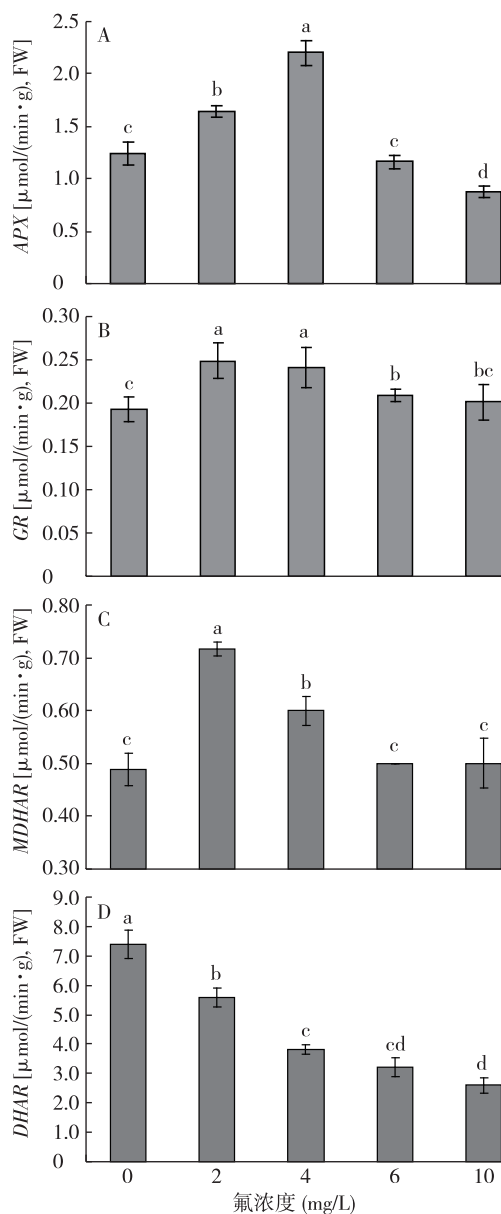
图 1 氟对茶苗叶片中  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量的影响

Fig.1 Effect of F on the contents of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and MDA in tea leaves

### 2.2 氟处理对茶树叶片 ASA-GSH 循环系统相关酶活性的影响

由图 2 A 可以看出,在低氟(氟浓度为 2 mg/L、4 mg/L)处理时,APX 活性升高,在氟浓度为 4 mg/L 时达到最大值,随后开始下降,其中氟浓度为 2 mg/L、4 mg/L 时,分别比对照高 32.27% 和 77.47%,差异显著;氟浓度为 6 mg/L、10 mg/L 时,分别比对照低 6.43% 和 29.01%。GR、MDHAR 活性在氟浓度为 2 mg/L 时达到峰值,此时,GR、MDHAR 活性分别比对照高 29.15% 和 46.50%,差异显著(图 2B、图 2C)。DHAR 活性随着氟浓度的增加呈

明显下降趋势,在氟浓度为 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、10 mg/L 时分别比对照降低 24.31%、48.64%、56.74%、64.86%,差异显著(图 2 D)。



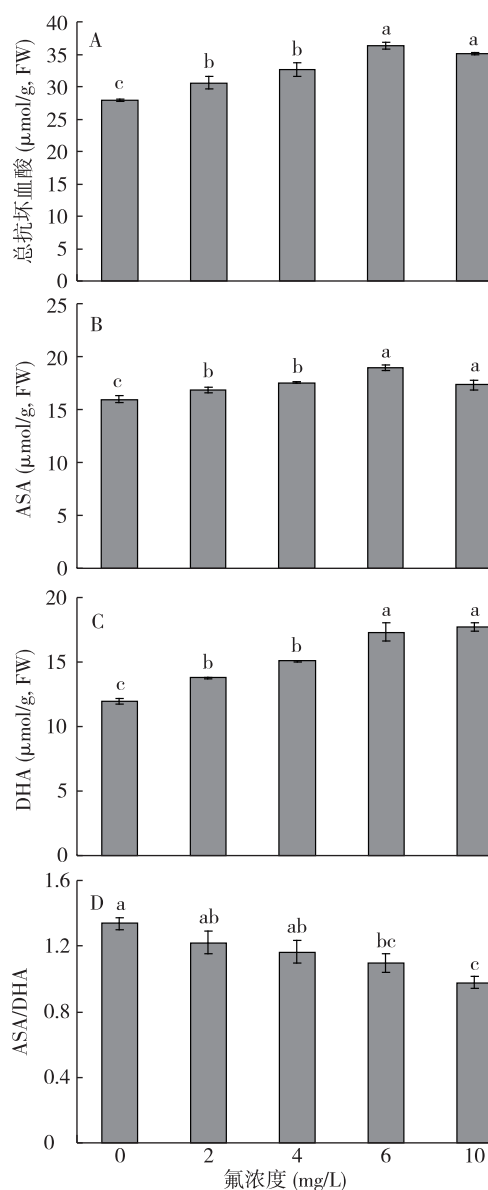
不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图 2 氟对茶苗叶片中 APX、GR、MDHAR、DHAR 活性的影响

Fig.2 Effect of F on the activities of APX, GR, MDHAR and DHAR in tea leaves

### 2.3 氟处理对茶树叶片 ASA 和 DHA 含量的影响

图 3A 和图 3B 显示,氟浓度在 0~6 mg/L 时,随着氟浓度的增加,总抗坏血酸(T-ASA)和还原型抗坏血酸(ASA)的含量均显著升高,T-ASA 在氟浓度为 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L 时分别比对照高 9.71%、



不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图 3 氟对茶苗叶片中总 ASA、ASA、DHA 含量和 ASA/DHA 比值的影响

Fig.3 Effect of F on total ASA, ASA, DHA contents and ASA/DHA in tea leaves

17.03%、30.02%, 差异显著; ASA 在氟浓度为 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L 时分别比对照高 5.36%、9.96%、18.73%, 差异显著。当氟浓度为 10 mg/L 时,二者均略有下降,但仍显著高于对照。由图 3C 可以看出,随着氟浓度的增加,脱氢抗坏血酸(DHA)含量不断增加,在氟浓度为 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、10 mg/L 时分别比对照高 15.52%、26.50%、45.14%、48.73%, 差异显著。图 3D 反映

了 ASA 与 DHA 的比率变化,随着氟浓度增加,ASA/DHA 不断降低,在氟浓度为 6 mg/L、10 mg/L 时分别比对照降低 18.20%、26.97%,差异显著。

#### 2.4 氟处理对茶树叶片 GSH 和 GSSG 含量的影响

由图 4 可知,随着氟浓度的增加,总谷胱甘肽含量呈现下降趋势,GSH(还原型谷胱甘肽)含量、GSH/GSSG 均显著下降,与对照差异显著 ( $P <$

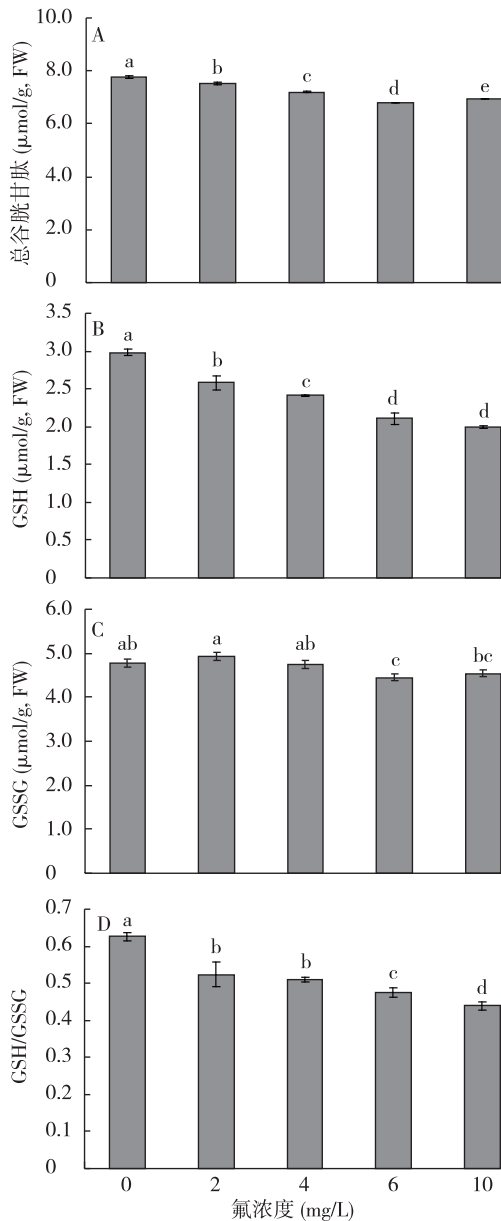
0.05),最大降幅分别比对照降低 33.06% 和 29.75%。GSSG(氧化型谷胱甘肽)含量在氟浓度为 2 mg/L 时略微升高,但与对照差异不显著,随后降低,在氟浓度为 6 mg/L 时 GSSG 含量显著低于对照。

### 3 讨论

在逆境胁迫下,植物体内的 ASA-GSH 循环系统在清除过多的活性氧自由基方面起着重要作用。APX 以 ASA 为电子供体将叶绿体内的  $H_2O_2$  转变为  $H_2O$ ,从而消除  $H_2O_2$  的毒性。本研究中 APX 活性先升高后降低,在氟浓度为 4 mg/L 时达到峰值,说明在低氟浓度时 APX 在清除活性氧方面发挥了积极作用,但随着氟胁迫程度的加大, $H_2O_2$  的量已经超出了 APX 的清除能力,过量的  $H_2O_2$  对茶树细胞膜等细胞结构造成伤害,这也与我们前期超微结构的试验结果一致,在氟浓度低于 4 mg/L 时细胞超微结构受害较轻,出现质壁分离、脂质球增多等现象,高于 4 mg/L 时细胞超微结构受害严重,如叶绿体扁形严重,叶绿体被膜破裂,类囊体扭曲严重,线粒体出现空化现象等<sup>[6]</sup>。MDA 是膜脂过氧化反应的终产物,MDA 含量的不断升高也说明了细胞遭受了伤害。

APX、GR、MDHAR 活性在低氟浓度下升高,随后下降,说明茶树 ASA-GSH 循环中酶活性是对外界逆境的一种抵御能力,是对茶树自身的一种保护功能。GSSG 被还原为 GSH 主要依靠 GR 酶活性,本研究中 GR 活性与 GSH 含量变化趋势并不一致,说明 GSH 可能还受其他途径的调控。GSH 和 ASA 作为植物体内主要的抗氧化物质,GSH 含量的下降不利于茶树抵御外来逆境。ASA 含量显著增大,对于清除 ROS 起到了积极作用,而 ASA 的再生需要 MDHAR 和 DHAR,低浓度氟处理条件下,MDHAR 活性升高,将有利于 ASA 的再生,DHAR 活性的降低则不利于 DHA 向 ASA 转化,造成了 DHA 含量的升高,过量的 DHA 将最终降解为草酸和(或)酒石酸<sup>[18]</sup>。

植物对逆境的抵御不仅仅与 ASA 和 GSH 含量以及它们中任何一个的氧化含量或者还原含量的增加或者减少相关,而是与植物体内整个氧化还原库中还原态和氧化态的氧化还原势有关<sup>[19-20]</sup>,因此,植物体内 ASA 和 GSH 的保护作用更多的是通过整



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 4 氟处理下茶苗叶片中总 GSH、GSH、GSSG 含量和 GSH/GSSG 的变化

Fig.4 Effect of F on total GSH, GSH, GSSG contents and GSH/GSSG in tea leaves

个氧化还原势的调控来实现的,ASA与DHA比值和GSH与GSSG比值可以作为清除ROS的调控信号<sup>[9]</sup>,ASA与DHA比值的升高和GSH与GSSG比值的升高表明植株对逆境抵抗能力的提高<sup>[21]</sup>,本研究中,在氟处理条件下ASA与DHA比值和GSH与GSSG比值均显著下降,表明茶树体内积聚的ROS对茶树细胞结构造成了伤害,MDA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的增加也说明了细胞膜受到了伤害。

### 参考文献:

- [1] 陈瑞鸿,梁月荣,陆建良,等.茶树对氟富集作用的研究[J].茶叶,2002,28(4):187-190.
- [2] FUNG K F, ZHANG Z Q, WONG J W C, et al. Fluoride contents in tea and soil from tea plantations and the release of fluoride into tea liquor during infusion[J]. Environmental Pollution, 2011, 30(104):197-205.
- [3] SOFUOGLU S C, KAVCAR P. An exposure and risk assessment for fluoride and trace metals in black tea[J]. J Hazard Mater, 2008, 158(2/3):392-400.
- [4] LI C L, NI D J. Effect of fluoride on chemical constituents of tea leaves[J]. Fluoride, 2009, 42(3):237-243.
- [5] LI C L, YANG X, HU J H, et al. Effect of fluoride on aroma of tea leaves[J]. Fluoride, 2013, 46(1):25-28.
- [6] LI C L, ZHENG Y N, ZHOU J R, et al. Changes of leaf antioxidant system, photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluorine[J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(3):563-566.
- [7] 李春雷,倪德江.氟对幼龄茶叶叶绿素含量及抗氧化酶活性的影响[J].江苏农业学报,2015,31(5):1149-1153.
- [8] NOCTOR G, ARISI A C M, JOUANIN L, et al. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants[J]. J Exp Botany, 1998, 49(321):623-647.
- [9] 马玉华.逆境胁迫对苹果抗坏血酸代谢相关酶活性及基因表达的影响[D].杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [10] 王华华,黄俊骏,杨丽丹.大豆幼苗中抗坏血酸和谷胱甘肽对干旱胁迫的生理响应[J].江苏农业科学,2014,42(5):86-88.
- [11] HOAGLAND D R, ARNON D I. The water culture method for growing plants without soil[J]. Calif Agric Exp Stn Circ, 1950, 347(2):32.
- [12] PEREIRA G, MOLINA S, LEA P, et al. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea* [J]. Plant Soil, 2002, 239:123-132.
- [13] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant & Cell Physiology, 1980, 22(5):867-880.
- [14] MIYAKE C, ASADA K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids[J]. Plant & Cell Physiology, 1992, 33(5):541-553.
- [15] KAMPFENKEL K, VAN MONTAGU M, INZÈ D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue[J]. Anal Biochem, 1995, 225(1):165-167.
- [16] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导[M].广州:华南理工大学出版社,2002.
- [17] DHINDSA R S, PLUMB-DHINDSA P, THORPE T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. J Exp Bot, 1981, 32(1):93-101.
- [18] GREEN M A, FRY S. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate[J]. Nature, 2005, 433(7021):83-87.
- [19] SHALATA A, MITTOVAV, VOLOLCITA M, et al. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system[J]. Physiol Plantarum, 2001, 112(4):487-494.
- [20] AMOR N B, Jiménez A, MEGDICHE W, et al. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima* [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 126(3):446-457.
- [21] 李晓云,王秀峰,吕乐福,等.外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J].应用生态学报,2013,24(4):1023-1030.

(责任编辑:陈海霞)