

## 植物叶片中抗坏血酸含量与草酸积累的关系

李宝盛 彭新湘\*

华南农业大学生命科学学院分子植物生理研究室, 广州 510642

**提要** 不同植物和不同生长期烟草叶片中抗坏血酸含量变化与相应的草酸含量变化之间都无显著的相关性; 喂饲外源抗坏血酸后的水稻和荞麦叶中草酸含量提高不明显。据此推测: 尽管不能排除抗坏血酸可能是植物草酸合成的前体, 但其内源含量高低不一定影响植物中草酸积累。

**关键词** 植物; 抗坏血酸; 草酸

## Relationship between Oxalate Accumulation and Ascorbate Content in Plant Leaves

LI Bao-Sheng, PENG Xin-Xiang\*

Laboratory of Molecular Plant Physiology, College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract** Ascorbate content and the corresponding oxalate content were determined in the leaves of various species and tobacco leaves at different growth stages. It was shown that no significant correlation existed between the two organic acids in tobacco leaves at various growth stages, and similar result was obtained for the leaves of different species. In addition, feeding rice and buckwheat with ascorbate through roots failed to increase oxalate content in the leaves. Based the above results, it is inferred that ascorbate content in plant leaves may not affect oxalate accumulation though the possibility can not be ruled out that ascorbate served as a precursor for oxalate synthesis.

**Key words** plants; ascorbate; oxalate

草酸普遍存在于动植物组织中。研究证明, 草酸不仅具有促进硝酸还原、诱导植物抗病性等生理功能(彭新湘和李明启1987; 张宗申等1998; 杨荣金等2000), 而且在提高植物对磷的吸收及抗铝毒中也起作用(徐锐和彭新湘2002)。因此, 系统地研究草酸的合成及调控机制有一定的理论与实际意义。

前人研究认为, 草酸合成的主要途径有2条: 一是光呼吸乙醇酸途径, 即在乙醇酸氧化酶的作用下, 乙醇酸氧化生成乙醛酸, 乙醛酸再进一步氧化生成草酸(Richardson和Tolbert 1961; Davies和Asker 1983); 二是抗坏血酸途径, 即抗坏血酸分子 $C_2/C_3$ 裂解后生成草酸和酒石酸, 但其生理生化反应机制尚不十分清楚(Loewus和Stafford 1958; Nuss和Loewus 1978; Kazumi等1992)。同位素示踪技术证实草酸来自于抗坏血酸, 据此, 有人认为抗坏血酸是植物草酸合成的前体之一(Yang和Loewus 1975; Horner等2000; Kostman等2001)。但植物中草酸积累量大小是否

受内源抗坏血酸水平的影响, 尚未见报道。本研究抗坏血酸与草酸积累的关系, 以期能为阐明植物草酸的合成代谢和调控机制提供参考。

### 材料与方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘中烟90’由广东省农业科学院作物研究所提供。

烟草种子先用1%  $CuSO_4$ 溶液消毒15 min, 再用40℃的温水浸泡20 min和蒸馏水浸种24 h后放入培养皿中, 置于25℃培养箱内催芽2~3 d, 发芽后播于蛭石中, 幼苗长至3~4片叶时移至大田, 从苗期至开花后期每隔10 d取生长一致、相同叶位的叶片进行测定。

水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘湘中粘2号’,

收稿 2005-05-08 修定 2005-11-09

资助 国家自然科学基金(30270799)和华南农业大学校长资金(4600-K01181)。

\*通讯作者(E-mail: xpeng@scau.edu.cn, Tel: 020-85282023)。

发芽后点播于尼龙网, 长至2~3片真叶后, 移栽至含4 L木村B营养液(N: 1.65 mmol·L<sup>-1</sup>)的塑料盆中, 于网室预培养5 d后更换营养液, 分别作(1)硝态氮处理: 以Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>代替(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 其它成分与木村B营养液相同; (2)铵态氮处理: 以(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和CaCl<sub>2</sub>代替Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 其它成分与木村B营养液相同; (3)铵态氮+抗坏血酸处理: 在铵态氮处理下加入抗坏血酸(5 mmol·L<sup>-1</sup>)。生长期间, 3种处理营养液的pH均维持在5.0。

荞麦(*Fagopyrum esculentum* M.)品种‘美国荞’, 播种于蛭石中, 待2片子叶展开时移栽至含4 L 1/5Hoagland营养液(N: 3 mmol·L<sup>-1</sup>)的塑料盆中, 预培养5 d后更换营养液, 分别作(1)硝态氮处理: 1/5Hoagland营养液; (2)铵态氮处理: 以(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和CaCl<sub>2</sub>代替Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 其它成分与1/5Hoagland营养液相同; (3)铵态氮+抗坏血酸处理: 在铵态氮处理下加入抗坏血酸(5 mmol·L<sup>-1</sup>)。生长期间, 3种处理营养液的pH均维持在6.0。

菠菜(*Spinacia oleracea* L.)、西兰花(*Brassica oleracea* var. *gemmifera* Zenker)、香菱(*Coriandrum sativum* L.)、皱叶芥菜(*Brassica juncea* var.)、甘蓝(*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.)均种于农场。挑选生长旺盛的新鲜叶片进行测定, 每种样品取3个重复。

草酸含量测定参考Baker (1954)的方法并加以改进。称取0.5 g新鲜叶片, 加入3 mL 6 mol·L<sup>-1</sup> HCl, 研磨成匀浆后移入试管, 用12 mL蒸馏水分次洗涤研钵后并入匀浆液中, 放入沸水浴中15~20 min, 冷却后转入50 mL离心管中, 放置过夜。次日离心(12 000×g, 10 min), 取上清液加入5 mL磷钨酸试剂, 室温放置5 h后离心(12 000×g, 10 min), 上清液转入另一只离心管中, 加入5 mL含钙醋酸缓冲液(pH 4.5), 再用浓氨水调pH值至4.5, 于4℃下放置16 h后离心(12 000×g, 10 min), 弃去上清液, 沉淀中加入10 mL淋洗液, 充分震荡, 离心(12 000×g, 10 min), 弃去上清液。向沉淀中加入5 mL 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 振荡, 充分溶解后放在沸水浴中加热2 min, 转入三角瓶中, 立刻用2.5 mmol·L<sup>-1</sup>的KMnO<sub>4</sub>滴定至粉红色, 以30 s内不褪色为终点(以滴定5 mL 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>为对照)。

抗坏血酸含量用偶联酶法测定(Jung和Wells 1998)。

## 实验结果

### 1 烟苗移栽后叶中抗坏血酸与草酸含量的变化

表1显示, 烟苗移栽后, 叶中草酸和抗坏血酸含量变化之间并无相关性( $y=15.234x+1.897$ ,  $r=0.353$ ,  $P>0.05$ , 图1)。

表1 不同生长期烟苗叶中抗坏血酸和草酸含量的变化  
Table 1 Changes in ascorbate and oxalate contents in the tobacco leaves during different growth periods

移栽后 时间/d	草酸含量/ mg·g <sup>-1</sup> (FW)	抗坏血酸含量/ mg·g <sup>-1</sup> (FW)
10	1.428±0.354	0.039±0.003
20	2.361±0.229	0.070±0.002
30	2.695±0.225	0.028±0.008
40	2.031±0.247	0.055±0.006
50	4.293±0.325	0.080±0.001
60	4.238±0.205	0.056±0.006
70	2.980±0.159	0.072±0.001
80	3.222±0.269	0.082±0.001
90	2.644±0.327	0.097±0.003

数据为3个取样重复的平均值±S.E.,  $r=0.353$ 。

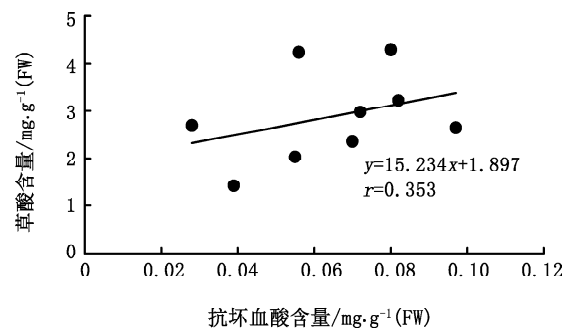


图1 烟草叶片中抗坏血酸含量与草酸含量的相关性  
Fig. 1 Correlation between ascorbate and oxalate contents in tobacco leaves

### 2 不同植物叶片中草酸和抗坏血酸含量的变化

从表2可以看出, 不同植物叶片中草酸含量差异很大。菠菜叶中草酸含量很高, 但其抗坏血酸含量却很低, 与草酸含量较低的西兰花和甘蓝中抗坏血酸含量相当; 在测定的6种植物叶片中, 还原型与氧化型抗坏血酸含量之比多数为

表2 不同植物叶片中的抗坏血酸和草酸含量

Table 2 Ascorbate and oxalate contents in leaves of different plants

植物种类	草酸含量 / mg·g <sup>-1</sup> (FW)	抗坏血酸含量 / mg·g <sup>-1</sup> (FW)		
		还原型	氧化型	总含量
烟草	1.111±0.136		0.070	0.070±0.002
西兰花	0.030±0.007	0.061±0.000	0.051	0.112±0.012
菠菜	5.052±0.304	0.062±0.011	0.054	0.116±0.011
香菱	0.048±0.008	0.046±0.007	0.116	0.162±0.010
皱叶芥菜	0.049±0.021	0.047±0.002	0.052	0.099±0.001
甘蓝	0.062±0.008	0.054±0.000	0.066	0.120±0.004

1:1左右,但烟草叶片中未检测到还原型抗坏血酸,香菱中以氧化型抗坏血酸为主。

### 3 外源抗坏血酸对水稻和荞麦叶片中草酸积累的影响

在铵态氮营养条件下,水稻和荞麦的草酸含量明显低于硝态氮培养的;铵态氮营养液中添加抗坏血酸对这两种植物中草酸含量无明显影响(表3)。

表3 外源抗坏血酸对水稻和荞麦叶片中草酸积累的影响

Table 3 Effect of exogenous ascorbate on oxalate accumulation in leaves of rice and buckwheat

处理	草酸含量 / mg·g <sup>-1</sup> (FW)	
	水稻	荞麦
硝态氮	4.560±0.336	8.565±1.435
铵态氮	0.687±0.028	0.519±0.015
铵态氮 + 抗坏血酸	0.980±0.162	0.498±0.161

## 讨 论

有研究认为,抗坏血酸是草酸合成的有效前体之一。草酸积累型植物菠菜中抗坏血酸形成草酸的转化率可达50%左右,而草酸含量低的植物烟草的转化率只有2%~19%(Yang和Loewus 1975; Horner等2000; Kostman等2001)。本文结果表明:烟草中草酸的积累并不受内源抗坏血酸含量的影响(图1);草酸积累型植物菠菜中的抗坏血酸含量并不高,与草酸含量较低的西兰花、甘蓝相当(表2);生长在铵态氮下的植物中草酸含量显著

低于硝态氮下的,外源抗坏血酸并不明显提高叶片中草酸含量(表3)。根据这些结果可以推测:植物中抗坏血酸水平的高低并不影响其草酸积累。因此,即使是抗坏血酸可能作为合成草酸的有效前体,但也仅可能是抗坏血酸下游代谢的酶促反应会限制草酸积累。其酶学机制尚未完全弄清楚,值得深入探究。

## 参考文献

- 彭新湘,李明启(1987).光呼吸代谢物乙醇酸、乙醛酸和草酸对烟草叶片硝酸还原的影响.植物生理学报,13(2):182~189
- 徐锐,彭新湘(2002).草酸在提高大豆磷的利用效率及抗铝性中的作用.西北植物学报,22(2):291~295
- 杨荣金,彭新湘,姜子德,郭振飞,李明启(2000).草酸诱导黄瓜抗炭疽病的机理研究.植物病理学报,30(2):153~157
- 张宗申,彭新湘,李明启(1998).非生物诱抗剂草酸对黄瓜叶片中过氧化物酶的系统诱导作用.植物病理学报,28(2):145~151
- Baker CJL (1954). The determination of oxalates in fresh plant materials. Analyst, 77: 340~344
- Davies DD, Asker H (1983). Synthesis of oxalic acid by enzymes from lettuce leaves. Plant Physiol, 72: 134~138
- Horner HT, Kausch AP, Wagner BL (2000). Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture. J Plant Sci, 161(1): 861~868
- Jung CH, Wells WW (1998). Spontaneous conversion of *L*-dehydroascorbic acid to *L*-ascorbic acid and *L*-erythroascorbic acid. Arch Biochem Biophys, 355(1): 9~14
- Kazumi S, Frank A, Loewus FA (1992). Conversion of *D*-glucosone to oxalic acid and *L*-(+)-tartaric acid in detached leaves of pelargonium. Phytochemistry, 31: 3341~3344
- 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: 634~640
- Loewus FA, Stafford HA (1958). Observations on the incorporation of <sup>14</sup>C into tartaric acid and the labeling pattern of *D*-glucose from an excised grape leaf administered *L*-ascorbic acid-6-<sup>14</sup>C. Plant Physiol, 33: 155~156
- Nuss RF, Loewus FA (1978). Further studies on oxalic acid biosynthesis in oxalate-accumulating plants. Plant Physiol, 61: 590~592
- Richardson KE, Tolbert NE (1961). Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase. J Biol Chem, 236: 1280~1284
- Yang JC, Loewus FA (1975). Metabolic conversion of *L*-ascorbic acid to oxalic acid in oxalate-accumulating plants. Plant Physiol, 56: 283~285