

铁核桃叶片多酚含量与相关酶活性及抗氧化能力的关系

张睿, 史斌斌, 张文娥, 李雪, 潘学军*

(贵州大学, 贵州省果树工程技术研究中心, 贵阳 550025)

摘要:以铁核桃‘黔核7号’叶片为试材,研究了叶片发育过程中多酚含量、多酚代谢相关酶活性、抗氧化能力变化以及它们之间的调控关系。结果表明:(1)‘黔核7号’叶片中酚酸和黄酮类物质是主要的抗氧化多酚;DAPHS、PAL、C4H和4CL等4种酶在多酚合成中发挥着重要作用;而叶片发育后期多酚分解代谢相关酶(POD、PPO)活性较高,且PPO在多酚氧化中起主要作用。(2)叶片发育进程中,叶片多酚提取液对ABTS及DPPH自由基清除能力总体表现为降低趋势,而对FRAP和铁氰化钾还原能力(PFRAP)则表现为上升趋势。(3)叶片发育进程中,其酚酸含量与PAL和C4H活性呈显著正相关关系,与DAPHS活性的正相关性也较高;PPO活性与酚酸及黄酮类化合物含量呈显著负相关关系。(4)叶片酚酸含量与4种抗氧化能力指标的相关性均达到显著或极显著水平,合成酶中的PAL、C4H和CHI活性与抗氧化能力指标之间的相关性也强于其他酶,其中与ABTS及DPPH自由基清除能力呈正相关关系,与FRAP和PFRAP呈负相关关系;而氧化酶PPO和POD活性与ABTS及DPPH自由基清除能力呈负相关关系,与FRAP和PFRAP呈正相关关系。

关键词:核桃叶片;多酚;多酚代谢酶;抗氧化活性;相关性

中图分类号:Q946.5; Q946.82 **文献标志码:**A

Relationship between Polyphenol Content and Enzymes Activities and Antioxidant Capacity in *Juglans sigillata* Dode Leaves

ZHANG Rui, SHI Binbin, ZHANG Wen'e, LI Xue, PAN Xuejun*

(Guizhou Engineering Research Center for Fruit Crops, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The relations among phenolics content, activities of enzymes related to phenolics metabolism and antioxidant activity in leaves of *Juglans sigillata* Dode. cv. ‘Qianhe 7’ were explored at different development periods. The results showed: (1) the phenolic acids and flavonoids were the most content compounds of phenolics, and four kinds of enzymes, namely DAPHS, PAL, C4H and 4CL play the important roles in the phenolics biosynthesis. While POD and PPO related decomposition were higher at leaf mature period, and the PPO is responsible for polyphenol oxidation. (2) With the development of leaves, the total polyphenol extract of the leaves showed a decreasing trend on the ABTS and DPPH free radical, while the reduction capacity of PFRAP and PFRAP increased continuously, reaching a peak in early August, and then remained at a high level. (3) With the development of leaves, phenolic acids were positively correlated to activities of PAL, C4H, the content of phenolic acids and flavonoids were strongly correlated to activities of DAPHS. Furthermore, the total contents of phenolic acids and flavonoids were negatively correlated to PPO. (4) The phenolic acids content was significant or extremely significant correlated to four

收稿日期:2019-01-18;修改稿收到日期:2019-03-26

基金项目:贵州省高层次创新型人才培养项目(黔科合人才[2016]4038号);贵州省生物学一流学科建设项目(GNYL[2017]009)

作者简介:张睿(1992-),男,在读硕士研究生,主要从事果树生理和分子生物学研究。E-mail:1520654969@qq.com

*通信作者:潘学军,博士,教授,主要从事果树种质资源评价与育种研究。E-mail:pxjun2050@aliyun.com

kinds of antioxidant activity, the correlations between PAL, C4H, CHI and antioxidant activity were stronger than those of others EAB. The activities of PAL, C4H and CHI were positively correlated to IC₅₀ values of DPPH and ABTS⁺, and negatively correlated to values of FRAP and PFRAP. While the activities of PPO and POD were negatively correlated to IC₅₀ values of DPPH and ABTS⁺, and positively correlated to values of FRAP and PFRAP.

Key words: walnut leaf; polyphenol; enzymes related to polyphenol metabolization; antioxidant activity; correlation

多酚是植物体内重要的次生代谢物,核桃中多酚类化合物含量丰富,主要有酚酸类、黄酮类、萘醌类^[1]。酚酸类化合物是指由肉桂酸和苯甲酸 2 个基团构成的羟基衍生物,最常见的羟基肉桂酸是绿原酸、咖啡酸、对香豆酸和阿魏酸,而羟基苯甲酸衍生物主要以葡萄糖苷形式存在^[2]。黄酮类化合物是一类具有 2-苯基色原酮结构的植物次级代谢产物,在植物体内通常与糖类结合形成配基形式的苷类。核桃叶片中多酚除酚酸类和黄酮类外,还含有丰富的萘醌类物质^[3]。萘醌类化合物也是一类天然生物活性分子,根据母体结构的不同可分为萘茜类(5,8-二羟基-1,4-萘醌)、1,4-萘醌类和-1,2-萘醌类等^[4],植物酚酸类和黄酮类物质具有较强的抗氧化性,在多酚氧化酶的作用下可高效生成萘醌类化合物,并产生自由基^[5-7]。胡桃醌是核桃中主要的萘醌类物质,主要集中在叶片、青皮等器官中。植物中的多酚类化合物具有很强的生物活性,可清除人体内过剩的自由基,防止 DNA、蛋白质和脂质等生物大分子氧化,从而有效预防癌症、糖尿病和心脑血管疾病的发生^[8-9];同时在植物生长发育过程中作为重要的信号分子和化感物质,可抵御紫外线、低温、干旱及昆虫啃食等逆境伤害或与其他植物产生互作^[10-11],对植株的生理代谢过程和生长与发育有着重要的作用^[12]。

酚类化合物合成的前体物质主要来源于莽草酸和苯丙烷途径,其含量受代谢途径相关酶的调控。苯丙烷途径中 L-苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanin ammono-nialyase, PAL)、查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)等酶已在猕猴桃^[13]、柑橘^[14]、茶叶^[15]、紫心甘薯^[16]及橄榄^[17]等园艺植物上得到广泛研究,而莽草酸途径中仅见 DAHPS 活性的相关研究^[18]。尽管核桃多酚含量丰富,但关于酚类物质代谢相关酶研究较少,主要涉及到 GGT、PPO 和 PAL 3 种酶^[6,19-20],且不同研究者的结论差异较大。作为核桃中重要的次生代谢产物,多酚类物质的代谢、抗氧化能力与遗传背景、通路调控、外界环境调节等密切相关。因此,对核桃多酚类物质含量变化与代谢通

路中相关酶活性的研究,可进一步明晰核桃多酚代谢的调控机制。铁核桃(*Juglans sigillata*)具有原始坚果特征,可能是半驯化或原始种,仅在中国南方部分地区分布,并以贵州和云南 2 省栽培面积最广^[21]。迄今,有关于核桃科植物多酚类物质的研究主要集中在核桃(*J. regia*)上,而对铁核桃多酚种类、含量、代谢酶活性及抗氧化能力的研究仅有少量报道^[22]。近年来,随着铁核桃种植面积的扩大,铁核桃叶片、青皮等附加产品的开发利用成为研究的重点。本研究以中国西南地区特有的铁核桃优良新品种‘黔核 7 号’(*J. sigillata* Dode cv ‘Qianhe-7’)为试材,探讨叶片发育过程中多酚类物质代谢相关酶活性变化规律及其与酚酸类、黄酮类及萘醌类物质的含量和抗氧化能力间的关系,为铁核桃多酚类化合物的代谢调控、抗氧化代谢的研究、叶片的深度开发利用、功能性评价及新品种的选育奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为铁核桃优良品种‘黔核 7 号’母株,树龄 40 年(盛果期),材料取自贵州省毕节市赫章县财神镇(27.13 N, 104.71 E)。试验于 2015 年 12/4、25/4、11/5、7/6、6/7、1/8、21/8、2/9、19/9(日/月)采集树冠中部外围枝条复叶基部第 2 片小叶,用冰盒带回实验室,按测定指标分样液氮速冻,置-80℃冰箱保存备用。

1.2 指标测定

1.2.1 叶片多酚类物质的提取及含量的测定 叶片酚酸类、黄酮类及萘醌类物质的提取及测定方法采用史斌斌等^[3]的方法,进行 3 次生物学重复。

1.2.2 叶片酚类物质代谢相关酶活性及抗氧化能力的测定 PPO 活性测定参照张建光等^[23]的方法; POD 活性测定采用愈创木酚法并参考韩艳文等^[24]的方法; PAL 和 CHI 活性测定参照 Lister 等^[23]的方法; 4CL 活性测定参考陈建业^[25]的方法; DAHPS、CS、CM、CHS、C4H 活性测定采用酶联免疫试剂盒(深圳子科生物科技有限公司)。抗氧化能

力的测定及表示方法采用史斌斌等^[3]。上述指标进行3次生物学重复。

1.3 数据统计分析

统计分析用 SPSS 21.0 软件,用 Excel 2013 作图。

2 结果与分析

2.1 铁核桃叶片发育进程中多酚类物质的变化特征

铁核桃‘黔核7号’叶片发育过程中酚类物质变化特征如图1所示。叶片发育过程中酚酸类物质含量总体上呈下降趋势,并在叶片发育初期(12/4)含量最高(389.63 mg·100 g⁻¹),叶片衰老期(19/9)降至最低(87.96 mg·100 g⁻¹)。同时,叶片中黄酮类物质含量最高值(389.63 mg·100 g⁻¹)也出现在叶片发育初期(12/4),之后显著降低,并在11/5、1/8和2/9出现3个小高峰,于叶片衰老期(19/9)含量下降,但其最低值(227.87 mg·100 g⁻¹)出现在21/8。另外,叶片萘醌类物质含量在叶片发育过程中呈波动变化,叶片发育初期(12/4)含量最低(4.19 mg·100 g⁻¹),之后迅速升高,7/6、1/8和2/9含量均显著下降,最高值(61.53 mg·100 g⁻¹)出现在叶片成熟期(6/7)。此外,三类多酚物质相比较,铁核桃叶片发育过程中黄酮类物质含量显著高于酚酸和萘醌类物质含量。

2.2 铁核桃叶片发育过程中酚类物质代谢相关酶活性的变化

2.2.1 莽草酸途径相关酶活性 莽草酸代谢途径中,经过7步酶促反应生成分支酸后进入苯丙烷代谢途径,其中的3-脱氧-D-阿拉伯糖型-庚酮糖酸-7-磷酸合成酶(DAHPS)是莽草酸途径的起始酶,催化

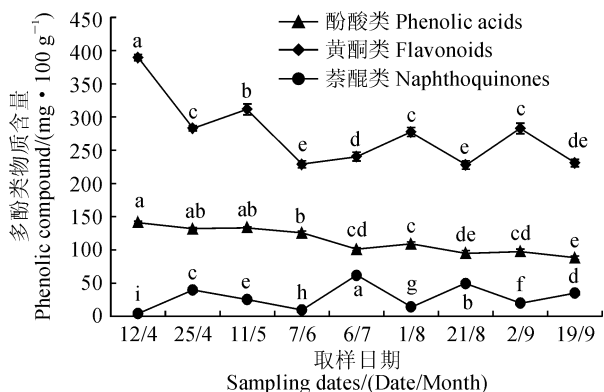


图1 ‘黔核7号’叶片发育过程中酚类物质含量的动态变化

Different letters refer to the significant differences among different sampling stages ($P < 0.05$); The same as below

Fig. 1 Changes of phenolic compound contents during leaf development in ‘Qianhe-7’

磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(E4P)合成3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP),经系列反应后在分支酸合成酶(CS)和分支酸变位酶(CM)的作用下进入苯丙烷代谢途径。如图2所示,铁核桃‘黔核7号’叶片发育过程中体内 DAHPS、CS 和 CM 3 种酶活性的变化趋势基本一致。其中,在展叶期(12/4),3 种酶活性均较高,之后 CS 和 CM 活性缓慢降低,DAHPS 活性出现小幅波动,三者均在1/8均出现第2次高峰,且 CM 活性达到最大值;在叶片快速生长期(11/5)及前衰老期(2/9~19/9),DAHPS 和 CS 活性均最低,而 CM 活性在2/9~19/9反而有所升高。另外,在整个叶片发育进程中 DAHPS 活性始终明显高于 CM 和 CS,而后两者比较接近,但 CM 活性仍始终高于 CS 活性。

2.2.2 苯丙烷代谢途径相关酶活性 苯丙烷代谢的主要催化酶有苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸羟化酶(C4H)、4-香豆酰 CoA 连接酶(4CL)、查耳酮合成酶(CHS)、查耳酮异构酶(CHI)等。‘黔核7号’叶片发育过程中,叶片 PAL 活性在展叶期(12/4)至叶片快速生长期(25/4)保持较高的活性,之后活性降低,在7/6和21/8出现2次高峰(图3,A)。叶片 CHI、C4H 和 CHS 活性变化规律基本一致,从展叶期(12/4)至叶片快速生长期(25/4),酶活性显著提高,之后大幅降低;CHI、C4H 和 CHS 3 种酶活性最高值均出现在25/4(分别为2.04、8.06、10.94 U·mg⁻¹),C4H 活性的最低值出现在19/9(1.04 U·mg⁻¹),而 CHS 和 CHI 在11/5活性最低(分别为2.17 U·mg⁻¹、0.65 U·mg⁻¹);此外,上述3种酶活性在功能期(7/6~21/8)有小幅回升(图3,A、

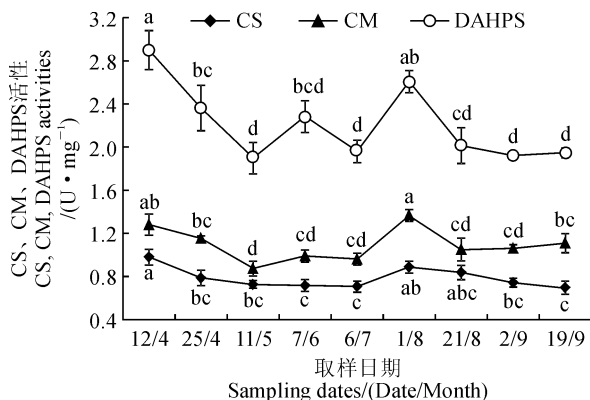


图2 ‘黔核7号’叶片发育过程中 DAHPS、CS、CM 活性变化

Fig. 2 Changes of DAHPS, CS, and CM activities of shikimic acid biosynthesis pathway during leaf development in ‘Qianhe-7’

B)。叶片 4CL 活性自展叶期(12/4)逐渐升高,在 7/6 达到最高值($20.96 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$),之后活性降低,于 1/8 降至最低值($18 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$),后在 21/8~1/9 4CL 活性有所回升(图 3, B)。

2.2.3 酚类物质氧化相关酶活性 多酚氧化酶(PPO)及过氧化物酶(POD)是参与多酚氧化的主要酶,‘黔核 7 号’叶片发育过程中 PPO 和 POD 的变化趋势如图 4 所示。其中,从展叶期(12/4)到 6/7,二者活性的变化规律相同,均在 25/4 和 6/7 酶活性出现小高峰;但从 6/7 后,POD 活性大幅升高,于 21/8 前后达到最高值($2109.53 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),然后快速下降至最低值,19/9 及展叶期 POD 活性均较低。同时,PPO 活性在叶片发育过程中整体表现为上升趋势,在展叶期最低($3.56 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),6/7~1/8 保持稳定,1/8~19/9 逐渐升高,19/9 时达到最大值($25.04 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),此时为展叶期的 7.24 倍。

2.3 铁核桃叶片发育过程中多酚提取液抗氧化能力的变化特征

在‘黔核 7 号’叶片发育过程中,叶片多酚提取液的 ABTS 及 DPPH 自由基清除活性在发育初期活性较高,其 ABTS 自由基清除能力自 12/4 至 7/6 逐渐降低,6/7 显著回升,之后又呈降低趋势,1/9 出现第 2 次高峰。其 DPPH 自由基清除能力总体上为降低趋势,但在 7/6 和 2/9 时出现两次小高峰(图 5, A、B)。相反,叶片多酚提取液的 FRAP 铁氧化钾还原能力(PFRAP)总体上随叶片发育呈升高趋势,自展叶期(12/4)起 FRAP 和 PFRAP 逐渐上升,7/6 至 6/7 小幅回落,之后快速升至最高值(分别为 $0.32 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $2.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$);1/8 至 2/9 有所降低,而后活性回升(图 5, C、D)。

2.4 铁核桃叶片酚类物质含量、代谢酶活性以及抗氧化能力间相关性

2.4.1 多酚类物质含量与其代谢相关酶活性的相关性 ‘黔核 7 号’叶片中酚酸类、黄酮类及萜醌类物质含量与不同代谢相关酶活性的相关性存在差异(表 1)。其中,酚酸类含量与 PAL 和 C4H 活性呈显著正相关关系($P < 0.05$);黄酮类含量与 DAHPS、CS、CM、PAL、C4H、CHS 及 CHI 7 种酶活性均表现为正相关关系。酚酸类、黄酮类含量均与 PPO 活性呈显著负相关($P < 0.05$),而两者与 POD 活性间的相关性较弱;萜醌类含量与莽草酸及苯丙烷途径中的所有酶活性均呈负相关关系,与 PPO 及 POD 活性均呈正相关关系,但均未达显著水平。

2.4.2 抗氧化能力与酚类物质含量及代谢相关酶活性的相关性

如表 2 所示,‘黔核 7 号’叶片中酚

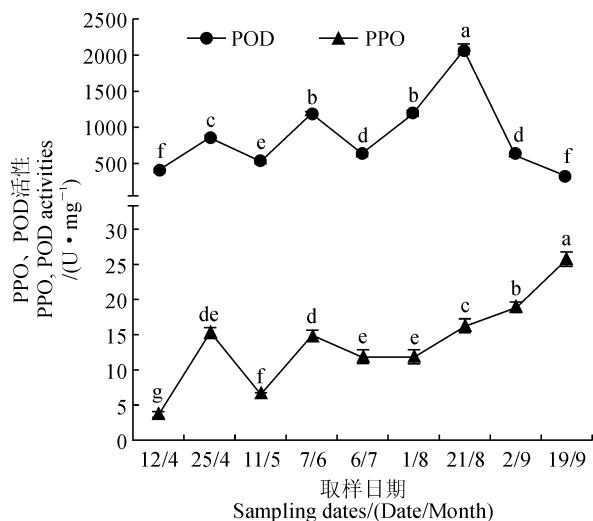


图 4 铁核桃‘黔核 7 号’叶片中 PPO、POD 活性变化
Fig. 4 Changes of PPO and POD activities during leaf development in ‘Qianhe-7’

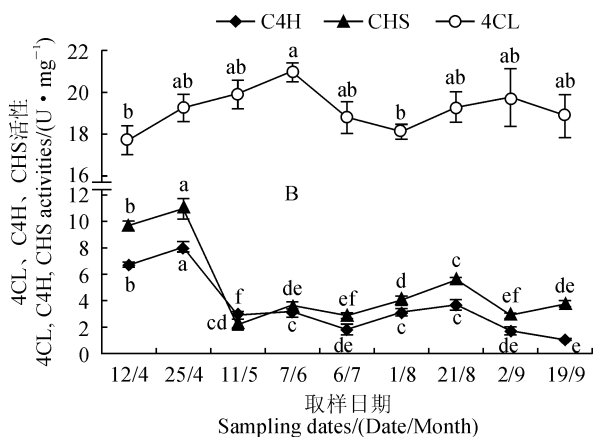
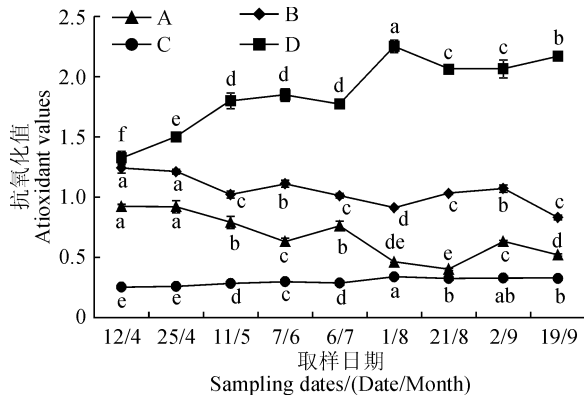


图 3 ‘黔核 7 号’叶片发育过程中苯丙烷途径相关酶活性变化

Fig. 3 Changes of relative enzyme activities of phenylpropanoid biosynthesis pathway during leaf development in ‘Qianhe-7’

酸和黄酮类总量与 DPPH 及 ABTS 自由基清除能力呈正相关关系,与 FRAP、铁氰化钾还原能力(PFRAP)



A. 清除 ABTS 的 IC_{50} 值/($mg \cdot mL^{-1}$); B. 清除 DPPH 的 IC_{50} 值/($mg \cdot mL^{-1}$); C. FRAP 抗氧化值/($mmol \cdot g^{-1}$); D. PFRAP 抗氧化值/($mg \cdot g^{-1}$)

图 5 铁核桃叶片多酚提取液抗氧化活性动态变化

A. The IC_{50} values of ABTS/($mg \cdot mL^{-1}$); B. The IC_{50} values of DPPH/($mg \cdot mL^{-1}$); C. The FRAP values/($mmol \cdot g^{-1}$); D. The PFRAP values/($mg \cdot g^{-1}$)

Fig. 5 Antioxidant activity of walnut leaf phenolics extraction

表 1 ‘黔核 7 号’叶片酚类物质含量与酚类物质代谢相关酶活性的相关系数

Table 1 Correlation coefficient between phenolic contents and metabolization enzyme activities of ‘Qianhe-7’ leaves

多酚种类 Polyphenol type	酚类物质代谢相关酶 Phenolics metabolization enzyme activity									
	DAHPS	CS	CM	PAL	C4H	4CL	CHS	CHI	PPO	POD
酚酸类 Phenolic acids	0.59	0.39	0.08	0.70*	0.72*	0.03	0.51	0.62	-0.76*	-0.22
黄酮类 Flavonoids	0.63	0.68	0.38	0.56	0.55	-0.48	0.48	0.45	-0.73*	-0.46
萘醌类 Naphthoquinones	-0.59	-0.44	-0.43	-0.11	-0.18	-0.02	-0.1	-0.22	0.31	0.21

注: * 和 ** 分别表示 0.05 ($P < 0.05$) 和 0.01 ($P < 0.01$) 水平的显著性, $n = 9$; 下同

Note: * and ** indicate significant correlation at 0.05 ($P < 0.05$) and 0.01 ($P < 0.01$) level, respectively, $n = 9$; The same as below

表 2 ‘黔核 7 号’抗氧化能力与酚类物质含量及相关酶活性的相关系数

Table 2 Correlation coefficient between antioxidant activity and phenolic contents and related enzyme activities of ‘Qianhe-7’ leaves

多酚类物质和相关酶 Polyphenol and enzyme	抗氧化能力 Antioxidant activity			
	DPPH(IC_{50})	ABTS(IC_{50})	FRAP	PFRAP
酚酸类 Phenolic acids	0.74*	0.76*	-0.80**	-0.79*
黄酮类 Flavonoids	0.57	0.66	-0.58	-0.65
萘醌类 Naphthoquinones	-0.26	-0.11	0.03	0.11
DAHPS	0.48	0.31	-0.38	-0.47
CS	0.41	0.12	-0.22	-0.34
CM	0.06	-0.08	0.09	0.01
PAL	0.83**	0.69	-0.83**	-0.87**
C4H	0.80**	0.62	-0.73*	-0.77*
4CL	0.06	-0.1	0.11	0.15
CHS	0.70*	0.53	-0.64	-0.70*
CHI	0.84**	0.67	-0.71*	-0.77*
PPO	-0.53	-0.56	0.6	0.62
POD	-0.01	-0.6	0.37	0.33

呈现负相关关系;萘醌类总量与 DPPH、ABTS 自由基清除能力及 FRAP、铁氰化钾还原能力的相关性与之相反,且相关性从高到低表现出酚酸类 ($P < 0.05$) > 黄酮类 ($P > 0.05$) > 萘醌类 ($P > 0.05$)。此外, DPPH 自由基清除能力与苯丙烷代谢途径中 PAL、C4H、CHS 和 CHI 4 种酶活性相关性达到显著或极显著水平。FRAP 和铁氰化钾还原能力与 C4H 和 CHI 2 种酶活性均呈显著负相关关系,与 PAL 活性呈极显著的负相关关系;而 FRAP 和铁氰化钾还原能力与 CM 和 4CL 2 种酶活性均呈正相关关系,但相关性较低。PPO、POD 的活性与 DPPH 及 ABTS 自由基清除能力呈负相关关系,而与 FRAP 和铁氰化钾还原能力则表现为正相关性,但同样未达显著水平。

3 讨论

多酚类物质作为重要的次生代谢物存在于植物的整个生命周期中,影响着植物的生命进程^[26]。幼嫩组织生长旺盛,多酚合成代谢大于分解代谢,且旺盛生长的器官中生长素的含量较高,贮存器官中酚

类化合物调运迅速^[27]。多数研究表明植物幼嫩组织中多数酚类物质的含量显著高于成熟组织^[28-29]。本研究中发现‘黔核7号’叶片中酚酸类和黄酮类化合物含量在展叶期最高,这与前人的研究结论一致。植物多酚类化合物合成的前体物质主要来源于糖酵解和磷酸戊糖途径,受多种合成酶的调控^[30]。而莽草酸途径是链接糖代谢和次生代谢的主要桥梁和枢纽^[26],DAHPS是莽草酸途径的起始酶,催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(E4P)合成3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP)。后经多步酶促反应并在CS的催化下生成的分支酸,之后在CM的催化下走向苯丙烷和酪氨酸途径合成类黄酮及酚酸类物质^[31]。核桃中,在相关酶的催化下通过合成芳香族氨基酸所必需的途径莽草酸能直接合成没食子酸(GA)^[32]。本研究发现,在‘黔核7号’叶片发育过程中,DAHPS一直保存较高的活性,且与酚酸和黄酮类均呈正相关关系,又说明DAHPS在铁核桃叶片多酚合成中发挥着重要作用,是从糖合成途径转向莽草酸途径的关键酶,直接决定着叶片中多酚类物质含量高低。此外,CS、CM活性也与叶片中酚酸、黄酮类的含量呈正相关,说明铁核桃叶片中的酚酸及类黄酮合成的前体物质主要来源于上游的莽草酸途径。PAL是酚类物质代谢调控网络中的关键限速酶^[33];C4H、CHS和CHI在多酚及类黄酮合成中也发挥着重要作用^[17]。各酶活性存在时空特异性,植物幼嫩组织中PAL和CHI的活性显著高于成熟组织^[13,15-16,34]。在铁核桃幼嫩叶片中PAL、C4H、CHS、CHI活性均最高,幼叶中较高的酶活性为酚类物质的合成准备了充足的前体物质,开启了叶片中酚酸类、黄酮类物质的合成^[35];这也是铁核桃展叶期叶片中酚酸及黄酮类物质含量较高的主要原因。但相关性分析表明,铁核桃叶片中多酚类物质含量与PAL、C4H活性的相关性高于与CHS和CHI的相关性。这一方面说明了PAL和C4H在铁核桃叶片多酚合成中发挥重要作用,叶片发育过程中PAL开启了类黄酮的生物合成,之后在C4H的催化下走向下游多酚物质的合成。另一方面可能与酶活性发挥作用的时间差异有关,PAL和C4H发挥作用要早于CHS和CHI,在荔枝研究上也有相同的报道^[36],猕猴桃中CHS、CHI的表达与花青苷含量的一致性也不强^[13,37]。本研究中,萘醌类物质含量与莽草酸及苯丙烷途径中的关键酶(DAHPS、CS、CM、PAL、C4H、4CL、CHS、CHI)活性均为负相关关系,表明铁核桃中萘醌类物质合成

代谢途径可能与酚酸及黄酮类物质不同。植物中的多酚氧化酶(PPO)可发挥一元酚单氧酶或邻二酚氧化酶的作用,高效催化酚酸类和黄酮类物质氧化为高活性的醌类物质^[5-6];过氧化物酶(POD)在过氧化氢(H₂O₂)存在的条件下也可氧化酚类物质为醌类物质^[7,10,38]。本实验中发现铁核桃叶片生长发育过程中,PPO和POD活性整体呈上升趋势,且PPO与酚酸类及黄酮类含量呈显著负相关关系,而萘醌类物质与PPO和POD活性正相关。进一步说明了PPO催化的多酚氧化是导致多酚含量降低的主要原因之一,这与PPO是引起果蔬褐变的主要酶类的研究结论一致^[33];同时也印证了PPO在核桃多酚氧化过程中的主导作用^[6]。

核桃超强的抗氧化能力及自由基清除能力与酚酸及黄酮类物质密切相关,且是多种酚类物质共同作用的结果^[3,39-40]。本实验中发现‘黔核7号’叶片中的酚酸含量与4种方法测得的叶片提取液抗氧化能力相关性强于黄酮类,均达到显著水平。其中酚酸类、黄酮类物质含量与DPPH和ABTS+清除能力正相关,与FRAP和铁氰化钾还原能力呈负相关。Zhang等^[41]的研究也表明酚酸类和黄酮类物质的种类和含量的差异会导致抗氧化评价方法及评价结论的不同,不同单体酚对植物抗氧化能力的贡献也不同,各种单体酚在总抗氧化能力中可能存在拮抗作用^[42]。同时,本研究中叶片中DPPH清除能力与苯丙烷代谢途径中PAL、C4H、CHS和CHI4种酶活性的相关性较显著;此外,ABTS+清除能力与DAHPS、CS、PAL、C4H、CHS、CHI的活性也呈正相关关系,但FRAP和铁氰化钾还原能力与上述酶的关系则与之相反。PAL、C4H、CHS和CHI的酶活性与抗氧化能力的相关性强于其他酶的;进一步表明,苯丙烷代谢途径中较高的酶活性有利于酚酸类和黄酮类物质的合成,从而提高了铁核桃叶片抗氧化能力。酚酸类和黄酮类物质在PPO、POD的催化下氧化为萘醌类,并产生新的自由基^[6-7],所以萘醌类含量及PPO、POD活性与DPPH和ABTS清除能力呈负相关关系,与FRAP和铁氰化钾还原能力正相关,但均未达到显著水平。进一步说明了多酚代谢调控、对抗氧化能力贡献值及抗氧化评价体系之间的复杂性。例如,有研究表明在酚类物质合成通路中,PPO除催化酚类物质氧化形成醌类外,还可催化香豆酸转化为咖啡酸,是酚类物质合成的另一关键酶^[43-44],因此,如此复杂的调控网络一定程度上削弱了酶活性、代谢物质及功能表现

之间的关系。

总之,铁核桃叶片中多酚类物质含量丰富,其中酚酸类和黄酮类化合物是主要抗氧化物质,尤其是酚酸类化合物在叶片抗氧化能力中起主导作用,萜醌类是主要的多酚类化合物的氧化产物。莽草酸代

谢途径、苯丙烷代谢途径及多酚氧化相关酶的活性与多酚类物质含量和抗氧化能力之间关系密切,其中 DAPHS、PAL、C4H 和 4CL 对多酚的合成代谢及抗氧化能力的贡献较大,而 PPO 对酚酸类、黄酮类化合物的氧化分解代谢贡献强于 POD。

参考文献:

- [1] JAY A C, DROURT, A. Polyphenole und Enzymeals biochemische Verjüngung bei Walnut [J]. *Erwerbs-Obstbau*, 1989, 31: 63-69.
- [2] TARNAWSKI M, DEPTA K, GREJCIUN D, et al. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract-a natural immunomodulator [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(1): 182-188.
- [3] 史斌斌, 张文娥, 李 雪, 等. 铁核桃叶片多酚类物质含量及其抗氧化活性 [J]. 园艺学报, 2017, 44(1): 23-32.
SHI B B, ZHANG W E, LI X, et al. Phenolics content and antioxidant activity of walnut (*Juglans sigillata*) leaves [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(1): 23-32.
- [4] SOARES A S, BARBDSA F L, RUDIGER A L, et al. Naphthoquinones of *sinningia reitzii* and anti-inflammatory/antinociceptive activities of 8-hydroxydehydrodunnione [J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(6): 1 837-1 843.
- [5] SOLAR A, COLARIC M, USENIK V, et al. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.) [J]. *Plant Science*, 2006, 170: 453-461.
- [6] ARAJI S, GRAMMER T A, GERTAEN R, et al. Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(2): 1 191-1 203.
- [7] 周向军, 杨金龙, 路宛如. 莴笋多酚氧化酶、过氧化物酶的特性及抑制作用研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 166-170.
ZHOU X J, YANG J L, LU W R. Properties and inhibitions of polyphenoloxidase and peroxidase from *Asparagus plettuce* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(5): 166-170.
- [8] TREUTTER D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis [J]. *Plant Biology*, 2005, 7(6): 581-591.
- [9] VAZHAPPILLY C G, Graham D H P, Vasantha R. Plant flavonoids in cancer chemoprevention; role in genome stability [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2017, 45(3): 1-14.
- [10] CHRZANOWSKI G, LESZCZY ŃSKI B, CZERNIEWICZ P, et al. Effect of phenolic acids from black currant, sour cherry and walnut on grain aphid (*Sitobion avenae* F.) development [J]. *Crop Protection*, 2012, 35: 71-77.
- [11] LAURA A, VAZQUEZ-FLORES A A, ALVAREZ-PARRILLA E, et al. Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 219-228.
- [12] RUDNICKA M, POLAK M, KARZ W. Cellular responses to naphthoquinones: juglone as a case study [J]. *Plant Growth Regulation*, 2014, 72(3): 239-248.
- [13] 黄春辉, 葛翠莲, 等. ‘红阳’猕猴桃突变体果实花青苷合成相关结构基因的表达分析 [J]. 果树学报, 2014, 31(2): 169-174.
HUANG C H, GE C L, et al. Expression analysis of structural genes related to anthocyanin synthesis in a mutant of ‘Hongyang’ kiwifruit [J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(2): 169-174.
- [14] 陈嘉景, 彭昭欣, 石梅艳, 等. 柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展 [J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 384-400.
CHEN J J, PENG Z X, SHI M Y, et al. 2016. Advances in on flavonoid composition and metabolism in citrus [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(2): 384-400.
- [15] 周天山, 王新超, 余有本, 等. 紫芽茶树类黄酮生物合成关键酶基因表达与总儿茶素、花青素含量相关性分析 [J]. 作物学报, 2016, 42(4): 525-531.
ZHOU T S, WANG X C, YU Y B, et al. Correlation analysis between total catechins (or anthocyanins) and expression levels of genes involved in flavonoids biosynthesis in tea plant with purple leaf [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(4): 525-531.
- [16] 李云萍, 郭晋雅, 高峰. 紫心甘薯花青素积累与 PAL 活性的关系 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(2): 68-72.
LI Y P, GUO J Y, GAO F. The relationship between anthocyanidin accumulation and phenylalanine ammonialyase activity in purple-fleshed sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] [J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2010, 32(2): 68-72.
- [17] 唐亚琴, 梅抗抗, 陈 瑶, 等. 油橄榄类黄酮生物合成相关酶的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(5): 2 110-2 117.
TANG Y Q, MEI K K, CHEN Y, et al. Research progress of biosynthesis related enzymes of flavonoid in *Olea europaea* L. [J]. *Genom Appl Biol*, 37(5): 2 110-2 117.
- [18] 赵 真. 茶树莽草酸途径相关基因的克隆与表达分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [19] XU F, DENG G, CHENG S, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonialyase gene from *Juglans regia* [J]. *Molecules*, 2012, 17(7): 7 810-7 823.
- [20] PEDRO J M G, MARC W C, DANIELA P, et al. The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols [J]. *The Plant Journal*, 2016, 87(5): 507-532.
- [21] ARADHYA M K, POTTER D, SIMON C J. Cladistic biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on chloroplast DNA intergenic spacer sequences [M]//: Motley T. J., Zerega N. Cross H. Darwin’s Harvest-New Approaches to the Origin, Evolution, and Conservation of Crops. New York: Columbia University Press, 2006: 143-170.
- [22] SHI B, ZHANG W, LI X, et al. Seasonal variations of phenolic profiles and antioxidant activity of walnut (*Juglans sigillata* Dode) green husks [J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(3): 2 635-2 646.

- [23] 张建光, 陈少春, 李英丽, 等. 高温强光胁迫对苹果果皮 PPO 活性的影响 [J]. 生态学报, 2008, **28**(10): 4 645-4 651.
ZHANG J G, CHEN S C, LI Y L, *et al.* Effect of high temperature and excessive light stresses on PPO activity in apple [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, **28**(10): 4 645-4 651.
- [24] 韩艳文, 廉双秋, 等. 不同采收成熟度和降温方式对鸭梨 POD 活性及果心褐变的影响 [J]. 食品工业科技, 2016, 14: 320-323.
HAN Y W, LIAN S Q, *et al.* Effect of different harvest maturity and cooling methods on POD activity and browning of Yali pear [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 14: 320-323.
- [25] LISTER C E, LANCASTER J E, WALKER J R L. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, **71**(3): 313-320.
- [26] 陈建业. 葡萄酒中酚酸及葡萄果实苯丙烷类代谢途径研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [26] 陈志杰, 吴嘉琪, 马燕, 等. 植物食品原料中酚酸的生物合成与调控及其生物活性研究进展 [J]. 食品科学, 2017, **2**(1): 1-11.
CHEN Z J, WU J Q, MA Y, *et al.* Biosynthesis, metabolic regulation and bioactivity of phenolic acids in plant food materials [J]. *Food Science*, 2017, **2**(1): 1-11.
- [27] 王勇, 宋宇琴, 韩玉虎, 等. 核桃枝条中总酚、黄酮类化合物含量研究 [J]. 果树学报, 2007, **24**(5): 626-629.
WANG Y, SONG Y Q, HAN Y H, *et al.* Study on the content of total phenol and flavonoids in walnut shoot [J]. *Journal of Fruit Science*, 2007, **24**(5): 626-629.
- [28] 李晓英, 薛梅, 樊汶樵. 蓝莓花、茎、叶酚类物质含量及抗氧化活性比较 [J]. 食品科学, 2017, **38**(3): 142-147.
LI X Y, XUE M, FAN W Q. Comparison of antioxidant activity and phenolic contents of blueberry flowers, stems and leaves [J]. *Food Science*, 2017, **38**(3): 142-147.
- [29] 张小双, 郑迎春, 曹玉芬, 等. ‘早酥’和‘南果梨’16个部位多酚物质组成及含量分析 [J]. 中国农业科学, 2017, **50**(3): 545-555.
ZHANG X S, ZHENG Y C, CAO Y F, *et al.* The composition and content of polyphenols in 16 parts of ‘Zaosu’ and ‘Nanguoli’ [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, **50**(3): 545-555.
- [30] MAEDA H, DUDAREVA N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, **63**: 73-105.
- [31] 李小溪, 问亚琴, 李春兰, 等. 低温对葡萄果实莽草酸途径入口酶及后分支酸途径关键酶基因表达的影响 [J]. 热带生物学报, 2011, **2**(3): 250-255.
LI X X, WEN Y Q, LI C L, *et al.* Effects of low temperature on the expression of key enzymes in the shikimate pathway and the post-branched acid pathway in grape fruit [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2011, **2**(3): 250-255.
- [32] MUIR R M, IBÁÑEZ A M, URATSU S L, *et al.* Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*) [J]. *Plant molecular biology*, 2011, **75**(6): 555-565.
- [33] 阚娟, 林仙佩, 等. 不同溶质型桃果实成熟过程中酚类代谢与抗氧化能力的研究 [J]. 现代食品科技, 2017, **33**(6): 74-79.
KAN J, LIN X P, *et al.* Study of phenolic metabolism and antioxidant activities of two peach cultivars during maturation [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, **33**(6): 74-79.
- [34] 刘金, 魏景立, 等. 早熟苹果花青苷积累与其相关酶活性及乙烯生成之间的关系 [J]. 园艺学报, 2012, **39**(7): 1 235-1 242.
LIU J, WEI J L, *et al.* The Relationships between the enzyme activity of anthocyanin biosynthesis, ethylene release and anthocyanin accumulation in fruits of precocious apple cultivars [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, **39**(7): 1 235-1 242.
- [35] 文菁, 赵书岗, 王红霞, 等. 核桃硬壳发育期果皮木质素与相关酶活性的变化 [J]. 园艺学报, 2015, **42**(11): 2 144-2 152.
WEN J, ZHAO S G, WANG H X, *et al.* Changes of lignin content and its related enzyme activities in endocarp during walnut shell development period [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, **42**(11): 2 144-2 152.
- [36] 王惠聪, 黄旭明, 胡桂兵, 等. 荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究 [J]. 中国农业科学, 2004, **37**(12): 2 028-2 032.
WANG H C, HUANG X M, HU G B, *et al.* Studies on the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes in litchi pericarp [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, **37**(12): 2 028-2 032.
- [37] 张亮, 满玉萍, 姜正旺, 等. 猕猴桃花青素合成途径基因 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2012, **39**(11): 2 124-2 132.
ZHANG L, MAN Y P, JIANG Z W, *et al.* Cloning and expression of anthocyanin pathway genes, *AcCHS* and *AcLDOX*, in *Actinidia chinensis* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, **39**(11): 2 124-2 132.
- [38] MOHAMMADI M, KAZEMI H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance [J]. *Plant Science*, 2002, **162**(4): 491-498.
- [39] 赵金伟, 李范洙, 张先. 苹果酚类物质抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2010, **31**(17): 170-172.
ZHAO J W, LI F Z, ZHANG X. Antioxidant activity study of phenolic compounds from pingguoli pear peels [J]. *Food Science*, 2010, **31**(17): 170-172.
- [40] 李丽梅, 赵哲, 何近刚, 等. 不同品种梨果实酚类物质和抗氧化性能分析 [J]. 食品科学, 2014, **35**(17): 83-88.
LI L M, ZHAO Z, HE J G, *et al.* Analysis of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits from different pear cultivars [J]. *Food Science*, 2014, **35**(17): 83-88.
- [41] ZHANG X M, LIU Y G, ZHU Z Y, *et al.* Total polyphenols, flavonoids and antioxidant activities in mulberry (*Morus alba*) leaves and fruit at different maturities [J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, **36**(5): 166-170.
- [42] 卢娟芳, 刘盛雨, 芦旺, 等. 不同类型桃果肉酚类物质及抗氧化活性分析 [J]. 中国农业科学, 2017, **50**(16): 3 205-3 214.
LU J F, LIU S Y, LU W, *et al.* Phenolic profiles and antioxidant activity of fruit pulp from different types of peaches [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, **50**(16): 3 205-3 214.
- [43] CAMPBELL M M, SEDEROFF R. Variation in lignin content and composition (mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants) [J]. *Plant physiology*, 1996, **110**(1): 3-12.
- [44] SHARMA R R, GOSWAMI A M, SINGH C N, *et al.* Catecholase and cresolase activities and phenolic content in mango (*Mangifera indica* L.) at panicle initiation [J]. *Scientia Horticulturae*, 2001, **87**(1-2): 147-151.