

文章编号: 1674-7054(2016)02-0199-05

文心兰切花花被不同开放阶段酶活性的变化

黄浩宇, 肖云骁, 石乐松, 田晓岩, 刘进平

(海南大学 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/农学院, 海口 570228)

摘要: 以文心兰苗种(*Oncidium Gower Ramsey*) ‘黄金2号’鲜切花为实验材料, 对其花被不同开放阶段花被酶活性进行了研究。结果表明, 花瓣与花萼的过氧化物酶活性在花发育和衰老过程中不断上升, 超氧化物歧化酶活性在花盛开前期上升至峰值, 之后呈现下降趋势, 而花瓣与花萼的蛋白酶活性在花发育初期缓慢升高, 分别在盛开前期和半开放期达到最大值, 之后急剧下降。本研究揭示了3种酶活性在文心兰切花不同开放阶段的变化模式, 不仅可以用来阐述文心兰切花的衰老机理, 还可为延长文心兰切花寿命的基因工程育种提供依据。

关键词: 文心兰; 过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 蛋白酶

中图分类号: S 682.31 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdswwb.2016.02.010

文心兰系兰科(*Orchidaceae*) 文心兰属(*Oncidium*) 的总称, 又名舞女兰、跳舞兰。文心兰花序分枝良好, 花形优美, 花色亮丽, 具有较高的观赏价值, 是重要的切花种类, 被插花界誉为切花“五美人”之一, 具有巨大的市场潜力^[1]。切花花朵衰老快慢决定植物花期观赏时期的长短, 因此成为评价其品质好坏的一个重要指标。加强采后衰老研究是减少切花采后损失, 延缓切花衰老进程的重要基础。花瓣衰老过程涉及一系列复杂的生理生化变化, 这些变化在相关酶的活性变化上有所体现^[2-3]。文心兰切花采后衰老进程中酶活性的研究, 对文心兰保鲜与栽培技术有重要的意义。文心兰切花衰老过程中的一个重要事件是细胞膜透性丧失, 而活性氧(ROS, reactive oxygen species)的产生与清除平衡系统受到破坏是造成膜系统损伤, 加速衰老进程的一个重要原因。ROS在生物的生长、发育和抗逆保护性反应中发挥重要的调控作用, 因此细胞维持ROS适当水平是十分必要的。过氧化物酶(POD, peroxidase)和超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)是生物体内重要的抗氧化酶, 可以对过量的ROS进行清除和解毒。当ROS的产生和清除失衡以至于稳态水平提高时, 就会产生氧化胁迫(oxidative stress), 而这是衰老发生的重要原因^[4-5]。此外, 蛋白酶活性也参与了衰老过程, 因为在花衰老过程中, 通常伴随着较强的蛋白质代谢, 蛋白酶活性也表现增加或降低趋势^[6]。笔者通过测定文心兰切花衰老过程中过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和蛋白酶3种酶活性变化, 旨在探讨文心兰切花衰老的生理机理, 为鲜切花保鲜及生物技术育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 以文心兰苗种(*Oncidium Gower Ramsey*) ‘黄金2号’鲜切花为实验材料, 在文心兰商品鲜切花同一或不同花序上选取处于不同开放阶段的花瓣和花萼, 进行生理测定。根据文心兰花各器官的形态变化, 将花期分为8个阶段: 花苞期(A), 花苞未绽开, 完全由花被包裹; 花苞绽口期(B), 花苞绽开1个口, 不能看到唇瓣; 半开放期(C), 花处于半开放, 见唇瓣、花萼、蕊柱、侧瓣等器官, 花被未完全伸展开,

收稿日期: 2015-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560573); 2015年度海南省普通高等学校研究生创新科研课题

作者简介: 黄浩宇(1992-), 女, 海南大学农学院2010级生物技术本科生. E-mail: 1114762478@qq.com

通信作者: 刘进平(1970-), 男, 教授. 研究方向: 热带植物遗传育种. E-mail: liu3305602@163.com

微微上扬,唇瓣呈微向里合拢状,顶萼与侧瓣紧贴一起未分离开来;盛开前期(D),花处于盛开前期,完全伸展开,顶萼与侧瓣微微上扬,唇瓣完全伸展开;盛花期(E),花处于盛花期,花完全开放,各器官完全伸展;衰老初期(F),花开始出现萎蔫信号,唇瓣出现皱缩痕,但是花梗处于绿色状;衰老期(G),花唇瓣萎蔫,出现脱水皱缩,花梗变黄,萼片干枯,呈透明状,但未从花枝上脱落;脱落干枯期(H),花从花枝上脱落各器官干枯。

1.2 过氧化物酶活性的测定 采用愈创木酚法,参照赵世杰等^[8]的方法进行。称取 0.4 g 花瓣与花萼,分别用适量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH6.0)研磨成匀浆,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,将上清液转入 50 mL 烧杯中,残渣再用 5 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.0)提取 1 次,上清液并入烧杯中,将提取的酶液稀释到 40 mL,贮于低温下备用。测定过氧化物酶活性时,以 3 mL 反应混合液[含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.0)、愈创木酚、过氧化氢]和 1 mL 酶液(如酶活性过高可稀释之)用紫外分光光度计(UV-2100 型)测量波长 470 nm 下吸光度值,隔 1 min 读数 1 次,并记录。以 3 mL 反应混合液和 1 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH6.0)作为对照。

1.3 超氧化物酶活性的测定 超氧化物歧化酶活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[9]。称量 0.4 g 花瓣与花萼,加入适量的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液(pH7.8),加入少量石英砂,于冰浴中的研钵内将花瓣与花萼分别研磨成匀浆,定容至 4 mL,分装到 2 支 2 mL 的离心管中,于 8 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (10 000 g) 冷冻离心 30 min,上清液即为 SOD 酶粗提液。以不加酶液作为空白对照,测定不同酶液量的各反应系统 [$0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液(pH7.8) 0.65 ~ 0.9 mL, $0.026 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋氨酸磷酸钠缓冲液 1.5 mL, $7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NBT 溶液 0.3 mL, $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 和 $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素溶液 0.3 mL] 中抑制 NBT 光还原的相对百分率。以 50% 抑制率的酶液量(μL) 作为 1 个酶活力单位(U),计算 SOD 酶活力。

1.4 蛋白酶活性的测定 采用改进的 kunit 法^[9] 测定。取文心兰花期不同发育阶段的花瓣和花萼 1 g,于研钵中研磨,研磨时加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液(pH7.8) 2 mL 及石英砂少许,于冰浴中仔细研磨,再加入 3 mL 同样的磷酸盐缓冲液,继续研磨至匀浆,于 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 15 min,弃沉淀,收集上清液,用上述磷酸缓冲液定容至 10 mL,所得溶液为粗酶液用于酶活力测定。取 0.2 mL 上述粗酶液,加入 0.8 mL 激活剂(浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.8 的磷酸盐缓冲液,内含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CYS, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 10 min,加入已预热到 37 $^{\circ}\text{C}$ 的酪蛋白(1 g 酪蛋白溶解于 100 mL 上述磷酸盐缓冲液中),反应 10 min 后立即加入 3 mL TCA 溶液(内含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCA, $0.22 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc, $0.33 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc) 终止反应,静置 30 min 以 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液在 275 nm 波长下测定光吸收值。在此条件下,每分钟光吸收值增加 0.01 个单位的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。每克植物样品中蛋白酶活力以 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

本实验设 3 次重复,用 Excel 计算平均值和标准差。

2 结果与分析

2.1 花萼与花瓣的过氧化物酶活性变化 由图 1 可知,花瓣与花萼的过氧化物酶变化趋势较为一致,都是随着花期的推移呈现不断上升的趋势。花瓣与花萼的过氧化物酶活性在 B 期(绽口期)时最低,分别为 15.333 和 17.333 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, G 期(衰老期)达到了最高值。花瓣的过氧化物酶活性在 G 期达到了 172.3 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 同 B 期的花瓣相比过氧化物酶的活性增加了 10.24 倍;花萼的过氧化物酶活性在 G 期达到了 1 001.8 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 同 B 期的花萼相比过氧化物酶的活性增加了 56.80 倍。花萼与花瓣两者活性相比,相同时期内花萼的活性始终高于花瓣。花瓣过氧化物酶活性变化的上升趋势相对平稳,而花萼在 F 期(衰老初期)到 G 期活性大幅度上升, G 期同 F 期增长了 3.47 倍,这可能与花萼与花瓣发育及衰老程度不同有关。从外观上看, G 期花萼呈干枯透明状,花瓣则呈萎蔫状态,也就是说花萼衰老程度要远比花瓣严重。

2.2 花萼与花瓣的超氧化物歧化酶活性变化 花瓣与花萼的超氧化物歧化酶活性变化趋势较为一致,都呈现单峰曲线,都在 B 期(绽口期)至 D 期(盛开前期)呈上升趋势, D 期后急剧下降,呈现下降趋势(图

2)。花瓣与花萼的超氧化物歧化酶活性在 D 期达到最大值,分别为 254.267 和 $157.567 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; G 期活性最低,分别为 12.025 和 $10.475 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。花萼与花瓣相比较,两者最小值接近,但花瓣超氧化物歧化酶活性的最大值比花萼高,且下降幅度也较花萼大;花瓣 F 期同 D 期相比下降 95.27% ,花萼 F 期同 D 期相比下降 93.35% 。在相同时期内花瓣的活性基本高于花萼。这表明文心兰花 B 期开始到 D 期 SOD 活性逐渐增加,可以及时清除代谢过程中形成的活性氧,有利于花的正常发育,而随着 D 期的到来, SOD 活性开始降低,花内活性氧增加,达到一定程度后,导致膜脂过氧化作用增强和膜系统受损,最后加速花的衰老进程。

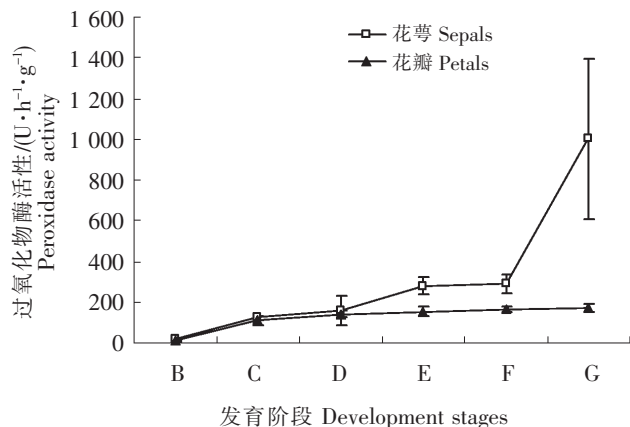


图1 文心兰发育和衰老过程中花萼与花瓣的过氧化物酶活性变化

Fig. 1 Changes in POD activity of petals and sepals during the development and senescence of *Oncidium* cut flowers

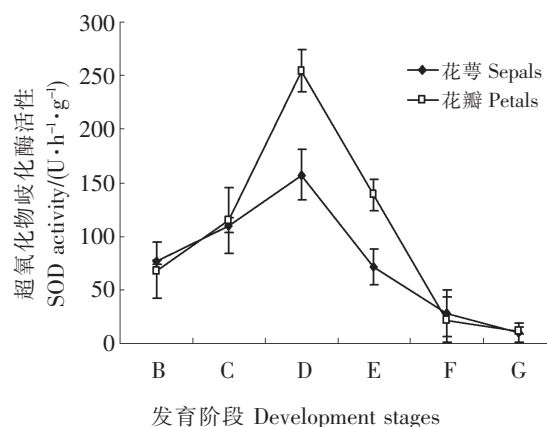


图2 文心兰发育和衰老过程中花萼与花瓣的超氧化物歧化酶活性变化

Fig. 2 Changes in SOD activity of petals and sepals during the development and senescence of *Oncidium* cut flowers

2.3 花萼与花瓣的蛋白酶活性变化 花瓣与花萼蛋白酶活性变化基本上是先升后降,但变化情况不完全相同(图3)。花萼的蛋白酶活性先急剧增加,在 C 期(半开放期)达到最大值($103.25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),然后急剧下降;而花瓣蛋白酶活性则缓慢升高,在 D 期(盛开前期)达到最大值,为 $89.83 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。花瓣及花萼蛋白酶活性均在 H 期(脱落干枯期)下降到最低值,分别为 19.67 和 $17.50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。在花的发育和衰老过程中存在着活跃的蛋白质代谢和周转,不同阶段蛋白质的合成和分解情况也不同。花萼和花瓣的蛋白酶活性分别在 C 期和 D 期达到最大值,随后下降到 H 期的最低值,这可能与花萼与花瓣发育及衰老程度并不同步有关,但都随着衰老的进程蛋白分解活动减弱。

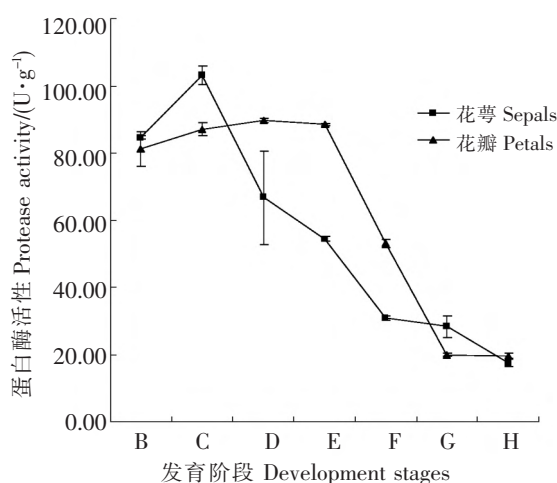


图3 文心兰花萼及花瓣发育和衰老过程中蛋白酶活性变化
Fig. 3 Changes in protease activity of petals and sepals during the development and senescence of *Oncidium* cut flowers

3 讨论

过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内酶清除活性氧系统的重要成分,通过清除高的活性氧来维持活性氧平衡及防止植物细胞免受活性氧胁迫损害,从而在植物抗胁迫和抗衰老中发挥重要作用。过高的活性氧水平会引发或加剧膜脂过氧化作用、蛋白修饰及 DNA 损伤,尤其是膜脂过氧化会造成细胞膜损伤和降解,使得膜完整性和功能的丧失,代谢紊乱,而这正是细胞衰老初期的基本特征^[10-12]。使用抗氧化剂可以延迟康乃馨花的衰老也可能表明活性氧平衡失衡与花衰老有关^[13-14]。

Paulin 和 Droillard^[15]及 Droillard 等^[16]对康乃馨的研究表明,花瓣中过氧化氢酶活性从开始阶段到萎

萼阶段一直上升,而总的 SOD 活性则在衰老过程中急剧下降。王支槐^[17]的研究结果表明,蜡梅开花和衰老过程中 POD 和 SOD 酶活性变化趋势不同。POD 活性先降后升,中蕾期较强,而后迅速降低到盛开花时的最低水平,继后随花的萎蔫而活性升高,花萎蔫时达最高;而 SOD 酶活性则先升后降,从中蕾期开始迅速升高,花刚开放时达到最高,随花的盛开和萎蔫而逐渐降低。而刘雅莉等^[18]对亚洲百合的研究结果表明,SOD 活性随着花的发育级别先升后降,而 POD 活性则持续升高。沈漫等^[19]对地被菊(*Dendranthema × grandiflorum* Kitamura)的研究结果表明,在地被菊开花前期,花瓣内的 SOD 活性在 12 d 左右达到最高值,后随着花朵开始萎蔫,花瓣中 SOD 活性逐渐下降。苏军等^[20]研究结果也表明,切花菊贮藏过程中 POD 活性持续升高。本研究结果表明,花瓣与花萼中这两种酶的活性均呈现类似的变化趋势,POD 活性变化趋势均随着花期的推移而不断上升,而 SOD 活性变化则先升后降。这表明不同种类的花在发育和衰老过程中,这两种酶活性变化是一致的。SOD 是清除超氧自由基(O_2^-)的第 1 道防线,因为超氧自由基(O_2^-)的产生会引发更多的活性氧,从而引发膜脂过氧化及细胞衰弱。SOD 通过催化超氧自由基歧化反应,产生氧气(O_2)和过氧化氢(H_2O_2),从而消除细胞内的超氧自由基,在维持细胞活性氧化代谢的平衡中发挥重要作用。 H_2O_2 在包括衰老等一系列生理过程中发挥关键性的调控因子作用,这种调控具有双重性:当 H_2O_2 浓度低时,可作为信号分子,引发对各种生物和非生物胁迫的适应性信号转导;当浓度高时,则会导致氧化胁迫(oxidative stress)和细胞程序性死亡(PCD),而 POD 可具有代谢过氧化氢的功能^[5-6]。花衰老过程中,SOD 活性下降和 POD 活性上升,可能是由于细胞内 SOD 清除超氧自由基的能力下降和 O_2^- 的积累,膜脂过氧化作用增强,引起膜不稳定,并导致膜的破坏和细胞死亡。

在花发育和衰老过程中,蛋白质水解不仅可除去功能受损的蛋白质,还可以对衰老器官中蛋白质周转以转运出必需氨基酸加以再利用。蛋白酶的活性水平反映了蛋白质水解的活跃程度。本实验结果表明,文心兰切花发育和衰老过程中,花萼和花瓣的蛋白酶活性分别在 C 期和 D 期上升至最大值,之后持续下降。显示蛋白质水解活性随着衰老而逐渐减弱。番薯属(*Ipomoea*)花瓣衰老过程中蛋白酶活性没有检测到上升^[21-22],而萱草^[23]、鸢尾^[24]、矮牵牛^[25]和桂花^[26]衰老过程中,蛋白水解酶活性大量增加。蛋白酶活性在花衰老过程中的变化情况不同可能与不同物种在衰老过程中的蛋白质代谢模式有关。

参考文献:

- [1] 刘晓荣,王碧青,朱根发. 文心兰研究进展 [J]. 亚热带植物科学,2007,36(3):85-90.
- [2] 王凤兰,张昭其. 切花花瓣衰老机理研究进展 [J]. 浙江农业学报,2011,23(5):1063-1068.
- [3] 田煦,熊兴耀,尹邦奇. 鲜切花衰老机理及保鲜技术研究进展 [J]. 湖南农业大学学报,1995,21(4):414-419.
- [4] Bartosz G. Oxidative stress in plants [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 1997, 19(1):47-64.
- [5] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010(48):909-930.
- [6] Lushchak V I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2011(153):175-190.
- [7] Van Doorn W G, Woltering E J. Physiology and molecular biology of petal senescence [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(3):453-480.
- [8] 赵世杰,史国安,董新纯. 植物生理学实验指导 [M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2002:134-139.
- [9] 郭圣茂,杜天真,邱业先,等. 亚热带植物叶蛋白酶活性研究 [J]. 中药现代化技术,2006,23(9):887-890.
- [10] Chakrabarty D, Chatterjee J, Datta S K. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in *Chrysanthemum florets* [J]. Plant Growth Regular, 2007, 2(53):107-115.
- [11] Bartoli C G, Simontacchi M, Guiamet J J, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* Ram petals [J]. Plant Science, 1995(104):161-168.
- [12] Bartoli C G, Simontacchi M, Montaldi E, et al. Oxidants and antioxidants during aging of *chrysanthemum petals* [J]. Plant Science, 1997, 129:157-165.
- [13] Baker J E, Wang C Y, Lieberman M, Hardenburg R. Delay of senescence in carnations by a rhizohitoxine analog and sodium benzoate [J]. Hort Sci, 1977, 12:38-39.
- [14] Panlin A, Droillard M, J, Bureau J M. Effect of a free radical scavenger, 3,4,5-trichlorophenol, on ethylene production and

- on changes in lipids and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*) [J]. *Physiol Plant*, 1986, 67: 465–471.
- [5] Paulin A, Droillard M J. Membrane peroxidation during the senescence of cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. *Act Hort (ISHS)*, 1989, 261: 51–58.
- [6] Droillard M J, Paulin A, Massot J C. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*) [J]. *Plant Physiol*, 1987, 71: 197–202.
- [7] 王支槐. 蜡梅花开花和衰老过程中的生理生化变化 [J]. *北京林业大学学报*, 1995, 17(增刊1): 118–122.
- [8] 刘雅莉, 王飞, 张恩让, 等. 百合花不同发育期生理变化与衰老关系的研究 [J]. *西北农业大学学报*, 2000, 28(1): 109–112.
- [9] 沈漫, 高遐虹, 程继鸿, 等. 地被菊开花过程中生理生化变化的初步研究 [C]. *中国园艺学会第七届青年学术讨论会论文集: 园艺学进展(第七辑)*, 2006: 610–614.
- [10] 苏军, 孙自然, 于梁, 等. 预处理对切花菊贮藏中含糖量及过氧化物酶活性的影响 [J]. *园艺学报*, 1991, 18(1): 294–296.
- [11] Winkenbach F. Zum Stoffwechsel der aufblühenden und welkenden Korolle der Prunkwinde *Ipomoea purpurea*. I. Beziehung zwischen Gestaltwande l, Stofftransport, Atmung und Invertaseaktivität [J]. *Berichte der schweizerischen botanischen Gesellschaft*, 1970, 80: 374–390.
- [12] Winkenbach F. Zum Stoffwechsel der aufblühenden und welkenden Korolle der Prunkwinde *Ipomoea purpurea*. II. Funktion und de novo Synthese lysosomaler Enzyme beim Welken [J]. *Berichte der schweizerischen botanischen Gesellschaft*, 1970, 80: 391–406.
- [13] Stephenson P, Rubinstein B. Characterization of proteolytic activity during senescence in daylilies [J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 104: 463–473.
- [14] Pak C, van Doorn W G. Delay of Iris flower senescence by protease inhibitors [J]. *New Phytologist*, 2005, 165: 473–480.
- [15] Jones M L, Chaffin G S, Eason J R, et al. Ethylene-sensitivity regulates proteolytic activity and cysteine protease gene expression in petunia corollas [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56: 2733–2744.
- [16] 朱诚, 曾广文. 桂花花衰老过程中的某些生理生化变化 [J]. *园艺学报*, 2000, 27(5): 356–360.

Changes in Enzyme Activities of Perianth of Cut-flower *Oncidium* Orchid at Different Opening Stages

HUANG Haoyu, XIAO Yunxiao, SHI Lesong, TIAN Xiaoyan, LIU Jinping

(Ministry of Education Key Laboratory of Protection and Development Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources (Hainan University);
College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: An attempt was made to determine the changes in enzyme activities of petals and sepals of cut-flower *Oncidium* orchid at different opening stages to study the physiological mechanism of senescence of orchid cut flowers. The results showed that peroxidase (POD) activity continuously increased during the whole life span of the flower, and that superoxide dismutase (SOD) activity rose to the peak at the pre-blooming stage and then decreased, while protease activity of the petals and sepals increased slowly, reached a maximum value at the pre-blooming and half-opened stage, then decreased sharply in the petals and sepals during the development and senescence of *Oncidium* orchid cut flower, respectively. This study reveals the changing modes of activities of three enzymes in the petals and sepals of cut flowers of *Oncidium* orchid at different opening stages. The results can be used to explain the mechanism of *Oncidium* flower senescence and provide the basis for varietal improvement of *Oncidium* orchid with longer vase life through genetic engineering in the future.

Keywords: *Oncidium*; peroxidase; superoxide dismutase; protease