

干旱胁迫下平邑甜茶各器官中山梨醇的累积

孟艳玲, 韩振海, 闫建河, 孙春玉, 许雪峰*

中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094

摘要: 检测聚乙二醇6000 (PEG6000)模拟干旱下的水培苗、自然干旱下的盆栽苗和离体叶片自然失水后平邑甜茶不同器官中山梨醇含量和相关代谢酶活性的结果表明, 轻度和中度干旱胁迫下的平邑甜茶叶中山梨醇含量、6-磷酸山梨醇脱氢酶(S6PDH)和6-磷酸山梨醇磷酸酶(SorPP)活性以及韧皮部中山梨醇含量显著增加; 根和韧皮部中山梨醇含量平行上升, 山梨醇脱氢酶(SDH)活性随之下降。

关键词: 干旱胁迫; 山梨醇累积; 代谢酶活性; 平邑甜茶

Sorbitol Accumulation in Different Organs of *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd under Drought Stress

MENG Yan-Ling, HAN Zhen-Hai, YAN Jian-He, SUN Chun-Yu, XU Xue-Feng*

College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: The sorbitol content and its relative metabolic enzymes activities in different organs of *Malus hupehensis* were determined by three different drought stress treatments, polyethylene glycol inducing water deficit, potted seedlings without supplying water, and the detached leaves with water loss at room temperature. On the conditions of mild and moderate stress, the sorbitol content in leaves and phloem, sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (S6PDH) and sorbitol-6-phosphate phosphatase (SorPP) activities in leaves increased significantly. The sorbitol content in roots increased with that in phloem, while sorbitol dehydrogenase (SDH) activity in roots decreased.

Key words: drought stress; sorbitol accumulation; metabolic enzyme activity; *Malus hupehensis*

山梨醇是蔷薇科果树主要的光合产物、运输形式和可溶性贮藏物质, 与植物抗逆性有密切关系(Kobashi等2000; Li和Li 2005, 2007; Wang和Stutte 1992)。山梨醇在成熟叶片中合成, 通过韧皮部运输到库器官中(果实、梢尖、根系)分解(Bieleski 1969)。山梨醇的生物合成由两步完成, 即: 6-磷酸葡萄糖在6-磷酸-山梨醇脱氢酶(sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, S6PDH)催化下生成6-磷酸-山梨醇, 6-磷酸-山梨醇在6-磷酸山梨醇磷酸酶(sorbitol-6-phosphate phosphatase, SorPP)催化下生成山梨醇。运输到库器官的山梨醇分别在山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)和山梨醇氧化酶(sorbitol oxidase, SOX)作用下, 生成果糖或葡萄糖(Grant和Rees 1981)。近几年来, 有关山梨醇及其代谢酶在逆境下的变化逐渐引起人们关注, 但多数研究仅限于源(叶片)或库(果实或梢尖)的代谢(柴成林等2001; Bianco等2000), 并未从植株整体水平(源-运输-库)上

进行探讨。此外, 有关催化山梨醇合成的最后一步即 SorPP 的调节作用至今尚无报道。为此, 我们以平邑甜茶为材料, 采用 PEG 模拟干旱下的水培苗、自然干旱下的盆栽苗和离体叶片自然失水三种处理方式, 检测了干旱胁迫下平邑甜茶不同器官中山梨醇含量和相关酶的活性变化。

材料与方法

将4 下层积处理后的平邑甜茶[*Malus hupehensis* (Pamp) Rehd]种子播于蛭石中, 2~3片真叶时移入蒸馏水中培养一周, 再转入1/2Hoagland营养液培养一周, 而后以全量Hoagland营养液培养于培养室, 光照14 h·d⁻¹, 光照强度400 μmol·m⁻²·s⁻¹, 温度25~28 。

收稿 2007-09-06 修定 2007-11-02

资助 北京市自然科学基金(6041002)。

* 通讯作者(E-mail: xuefengx@cau.edu.cn; Tel: 010-62733758)。

实验处理有三类:

(1) PEG 模拟干旱胁迫处理: 苗龄 3 个月的水培苗高 20 cm 左右, 具 8~9 片真叶时, 选取生长一致的水培苗分别移入含有 10%、20% 和 30% 聚乙二醇 6000 (PEG6000) 的 Hoagland 营养液(10% PEG6000 培养下的水培苗叶水势为 $-1.1 \sim -0.8$ MPa, 20% PEG 为 $-1.6 \sim -1.3$ MPa, 30% PEG 为 $-2.3 \sim -1.8$ MPa) 中模拟轻度、中度和重度干旱胁迫处理, 正常营养液水培(叶水势为 $-0.89 \sim -0.8$ MPa) 为对照, 每个处理重复 3 次, 采用随机区组设计, 30 株为一小区。于处理后 4 h、8 h、12 h、1 d、2 d、4 d 和 6 d 取样, 分别取叶片、根系和韧皮部(用手术刀片将韧皮部与木质部剥离, 弃掉淡褐色表皮, 取淡绿色韧皮部)。从每小区中取的不同器官样品充分混合后, 一半经液氮冷冻后存放于 -40 冰箱中用于酶活性测定; 另一半经 105 杀青 30 min, 80 下烘干至恒重后用于测定山梨醇含量。

(2) 盆栽苗自然干旱胁迫处理: 采用一年生、长势均一的盆栽实生苗为试材, 地上部高 1.5 m 左右, 具 20~25 片真叶, 盆径 25 cm, 盆高 21 cm。每盆按腐殖土: 蛭石 = 3:1 装盆, 并混拌 $2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ 尿素。栽后定量浇水, 每盆间土壤水分状况一致。干旱处理前一天傍晚浇透水后停止浇水, 让盆土自然干旱至不同的胁迫程度: 至轻度胁迫时盆栽苗在日出前的叶水势为 $-1.06 \sim -0.98$ MPa; 中度胁迫的叶水势为 $-1.96 \sim -1.79$ MPa; 重度胁迫的叶水势为 $-2.23 \sim -2.1$ MPa; 以未经胁迫处理的苗为对照, 其叶水势为 $-0.84 \sim -0.80$ MPa。随机区组设计, 单株小区, 每处理 6 盆苗。当植株分别呈现上述干旱胁迫状态时, 于下午 5:00~5:30 取叶片、韧皮部和根系, 充分混合后, 烘干、冷藏供测定用。

(3) 离体叶片自然失水处理: 取苗龄 3 个月的水培苗顶部第 2~3 片成熟叶片, 室温下($25 \sim 28$) 令其自然失水达鲜重的 10%、20% 和 30% 时取样, 以未失水叶片为对照。每处理 30 片叶, 重复 3 次。样品烘干、冷藏供测定用。

水势测定用压力室法(ZIS-1 型植物水势仪为中国空间飞行器总体部制造)。

山梨醇的提取参考 Negm 和 Loescher (1981) 文

中方法, 稍加改动。样品磨碎过筛后, 加入 10 mL 80% 乙醇于 80 水浴中提取 10 min, 以 $2500 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液, 沉淀物用 80% 乙醇再提取 2 次。收集的上清液以旋转蒸发仪上蒸干后, 加 2 mL 蒸馏水溶解, 过 C_{18} 固相萃取小柱, 滤液过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜后测试。

山梨醇用高效液相色谱法(HPLC)测定。液相色谱仪 Waters 系统, 泵 Waters 600, 色谱柱 SCR-101C, 规格为 $7.9 \text{ mm} \times 30 \text{ cm}$, 外加保护柱。柱温 80 ; 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 示差检测器 Waters 410, 工作温度 45 ; 流动相为脱气的蒸馏水; 每次进样量为 $5 \mu\text{L}$ 。根据样品峰面积和山梨醇化物的标准曲线计算其含量。

酶液的提取参照 Keller 和 Ludlow (1993) 文中方法。提取的酶液在稀释 10 倍的提取液(去除 TritonX-100)透析 16 h 后用于酶活性测定。S6PDH 活性参照 Negm 和 Loescher (1981) 文中方法测定, 稍加改动。酶反应液总体积为 3 mL, 其中含 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.8)、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ G6PNa₂ 和酶提取液。SorPP 活性参照 Zhou 等(2003)文中方法测定。SDH 活性参照 Yamaguchi 等(1994)文中方法测定, 稍加改动。反应液总体积为 3 mL, 内含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD⁺、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 9.0) 和 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D- 山梨醇。

蛋白含量测定用 Bradford (1976) 方法, 以 BSA 为标准样品。

统计分析用 SPSS 数据统计软件, 单因素变异系数法(one-way ANOVA)分析。

结果与讨论

1 干旱胁迫对平邑甜茶叶中山梨醇含量和相关酶活性的影响

从图 1~3 可见:(1) 10% PEG 和 20% PEG 处理的山梨醇含量均显著增加, 20% PEG 比 10% PEG 处理更明显, 4 d 后, 20% PEG 处理的叶中山梨醇含量急剧下降, 比未经胁迫处理的明显低。而 30% PEG 处理的叶中山梨醇含量仅在处理 4 h 稍高于未经胁迫处理的, 以后随着胁迫时间的延长而急剧下降, 显著低于未经胁迫处理的(图 1-a)。

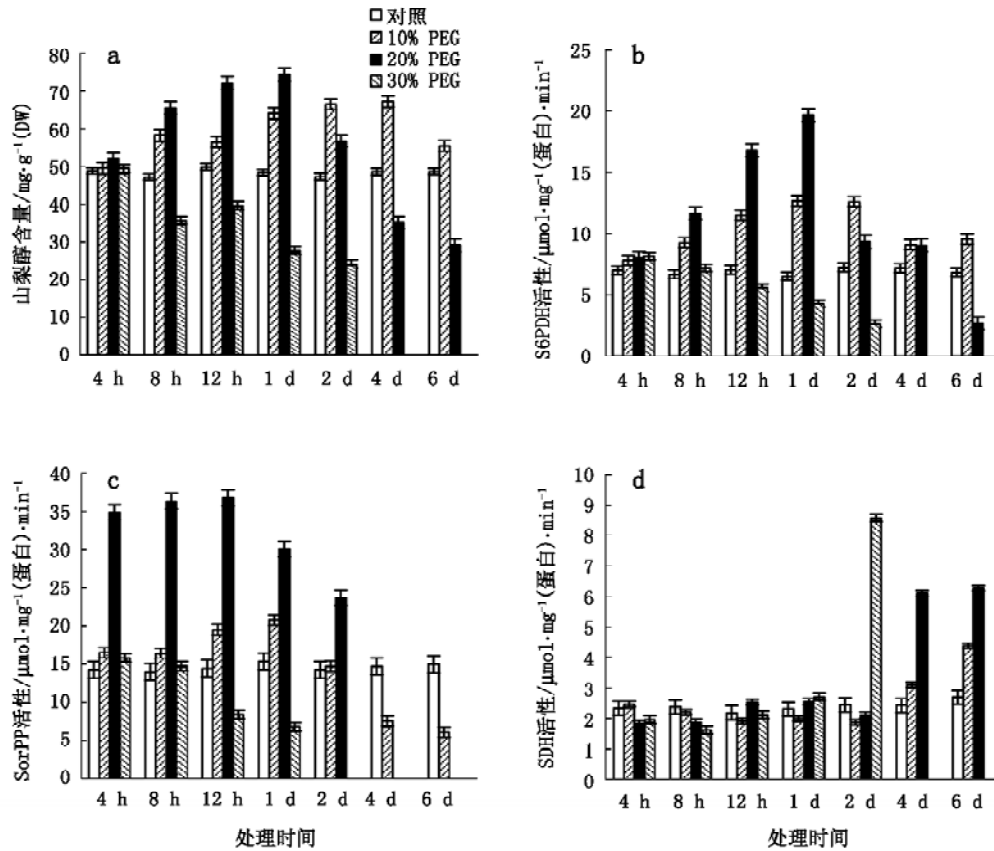


图1 不同浓度PEG处理下的平邑甜茶水培苗叶中山梨醇含量、S6PDH、SorPP和SDH的活性变化

Fig.1 Changes in sorbitol content, S6PDH activity, SorPP activity, and SDH activity in leaves of water cultured seedlings of *M. hupehensis* treated by PEG with different concentrations

PEG模拟干旱处理同样还影响与山梨醇代谢相关的酶活性(图1-b、c、d)。S6PDH和SorPP活性变化趋势相似。处理1d, 10% PEG和20% PEG处理下的S6PDH和SorPP活性均显著上升, SorPP出现峰值比S6PDH早, 20% PEG处理的效果比10% PEG更为显著。随着胁迫时间的延长, 2种合成酶活性逐渐下降, 但SorPP活性变化更为剧烈, 20% PEG处理4d后, SorPP已丧失活性。30% PEG处理4h时, 2种酶活性稍高于未经胁迫处理, 而后随着胁迫时间的延长活性急剧下降, SorPP活性比S6PDH早丧失。10% PEG和20% PEG处理2d和30% PEG处理1d的SDH活性变化趋势相对平稳, 较未经胁迫处理的稍有下降; 而后, SDH活性分别升至为未经胁迫处理的1.63、2.33和3.51倍。

(2) 不同程度的自然干旱胁迫也影响平邑甜茶盆栽苗叶中的山梨醇含量以及S6PDH、SorPP和

SDH三者活性。轻度和中度干旱胁迫下, 山梨醇含量、S6PDH活性和SorPP活性升高, SDH活性下降, 这显然有利于叶中山梨醇的合成; 重度干旱胁迫下, 虽然S6PDH活性仍显著高于未经胁迫处理的, 但SorPP活性已下降至未经胁迫处理的38%, 且SDH活性升至为未经胁迫处理的2.15倍(图2), 显示山梨醇合成受阻而分解作用加强。

(3) 在离体叶片自然失水达10%和20%时, S6PDH和SorPP活性增加, SDH活性下降; 失水30%时, 虽然SorPP活性下降、SDH活性上升, 但与未经失水处理的差异不显著, 加之S6PDH活性显著高于其它处理, 因此与之对应的山梨醇含量仍显著高于未经失水处理的(图3)。

2 干旱胁迫对平邑甜茶韧皮部中山梨醇含量的影响
图4、5显示:(1) 10% PEG和20% PEG处理的平邑甜茶水培苗韧皮部中山梨醇含量均增加, 20% PEG处理的山梨醇含量峰值出现和下降时间

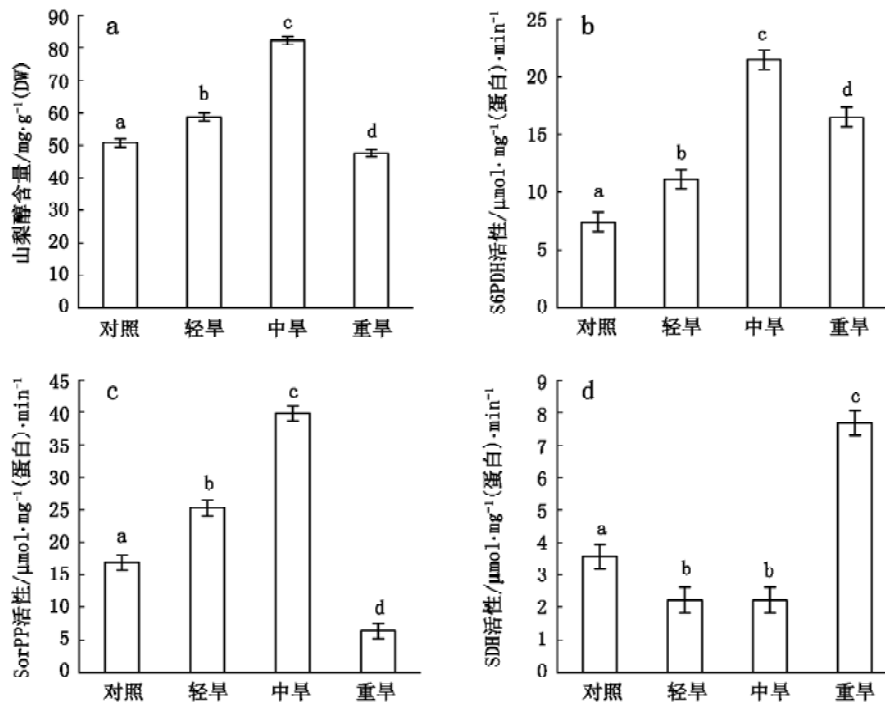


图2 自然干旱下的平邑甜茶盆栽苗叶中山梨醇含量、S6PDH、SorPP和SDH的活性变化

Fig.2 Changes in sorbitol content, S6PDH, SorPP, and SDH activities in leaves of potted seedlings of *M. hupehensis* under drought condition

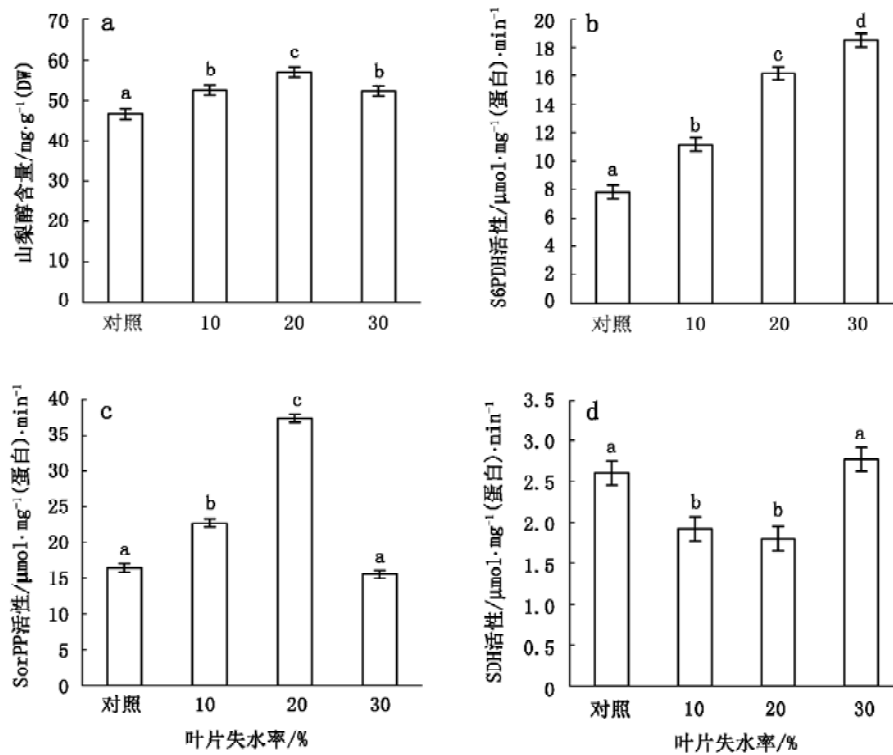


图3 不同失水程度下的平邑甜茶离体叶中山梨醇含量、S6PDH、SorPP和SDH的活性变化

Fig.3 Changes in sorbitol content, S6PDH, SorPP, and SDH activities in detached leaves of *M. hupehensis* with water loss

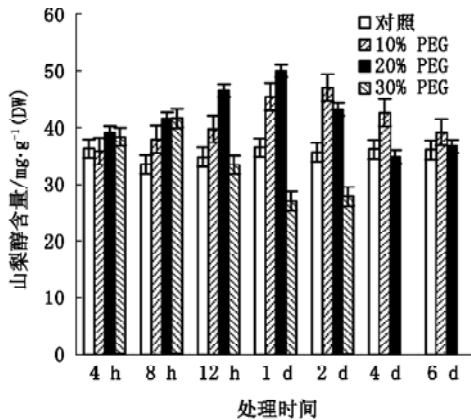


图4 不同浓度PEG处理下的平邑甜茶水培苗韧皮部中山梨醇含量变化

Fig.4 Changes in sorbitol content in phloem of water cultured seedlings of *M. hupehensis* treated by PEG with different concentrations

皆早于10% PEG处理。处理2 d后,与叶中山梨醇含量下降相呼应的是,韧皮部中山梨醇的含量逐渐下降至未经胁迫处理的水平。30% PEG处理8 h的韧皮部中山梨醇含量稍高于未经胁迫处理的(但与未经胁迫处理的基本上无差异),而后随着胁迫时间的延长急剧下降,显著低于未经胁迫处理的(图4)。

(2)轻度和中度干旱胁迫下的平邑甜茶盆栽苗韧皮部中山梨醇含量增加,重度胁迫下的稍有下降,与未经胁迫处理的差异不显著(图5)。

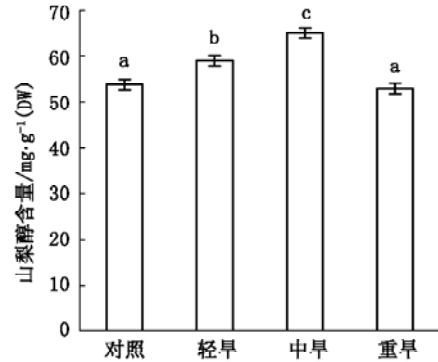


图5 自然干旱下的平邑甜茶盆栽苗韧皮部中山梨醇含量变化

Fig.5 Changes in sorbitol content in phloem of potted seedlings of *M. hupehensis* without supplying water

3 干旱胁迫对平邑甜茶根中山梨醇含量和相关酶活性的影响

图6、7的结果表明:(1)10% PEG处理的平邑甜茶根中山梨醇含量始终显著高于未经胁迫处理的;20% PEG处理1 d的山梨醇含量显著高于未经胁迫处理和10% PEG处理,之后随着胁迫时间的延长而下降。30% PEG处理的根中山梨醇含量显著下降(图6-a)。

10% PEG和20% PEG处理2 d的根中SDH活性下降,但两种处理之间差异不大;30% PEG处理12 h的SDH活性下降,而后急剧上升,1 d后活性丧失。根中SDH活性比叶中变化明显一些

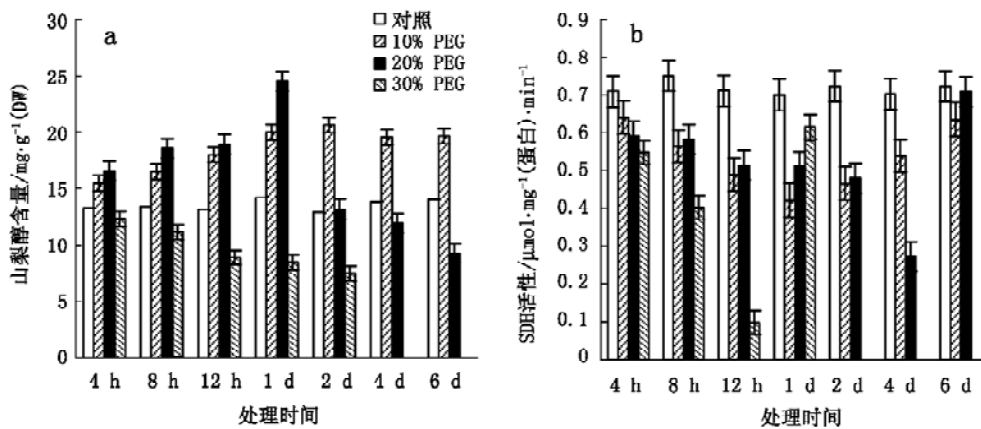


图6 不同浓度PEG处理下的平邑甜茶水培苗根中山梨醇含量和SDH的活性变化

Fig.6 Changes in sorbitol content and SDH activity in roots of water cultured seedlings of *M. hupehensis* treated by PEG with different concentrations

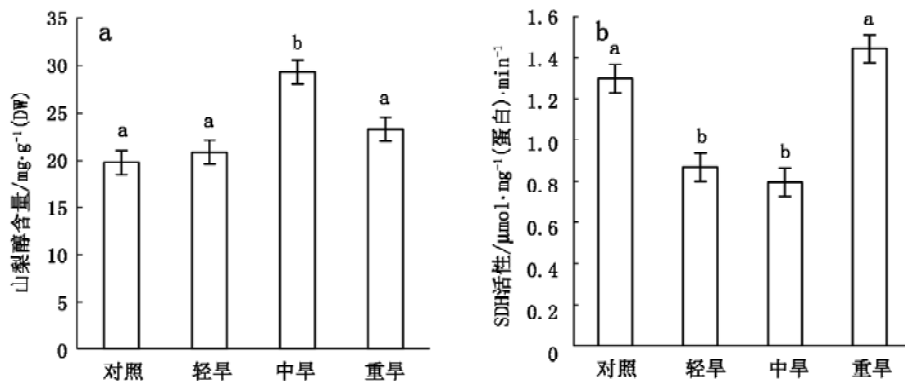


图7 自然干旱下的平邑甜茶根中山梨醇含量和SDH的活性变化

Fig.7 Changes in sorbitol content and SDH activity in roots of potted seedlings of *M. hupehensis* without supplying water

(图 6-b)。

(2)轻度和中度自然干旱下根中山梨醇含量均提高,SDH 活性降低,中度干旱的根中山梨醇含量增加显著。重度自然干旱的根中SDH 活性稍高于未经胁迫处理的,但与相对应的是山梨醇含量并没有下降反而稍高于未经胁迫处理的(图7)。

综上所述,本文结果说明了三点:

(1)本文采用的PEG模拟干旱处理平邑甜茶水培苗、自然干旱处理盆栽苗和离体叶片自然失水3种干旱胁迫方式基本上一致证明,即在植物可以忍受的范围内(轻度胁迫和中度胁迫前、中期),叶中的S6PDH和SorPP对水分胁迫较为敏感,能迅速上调其活性,而起分解作用的SDH活性下降,这种变化显然更利于叶中合成更多的山梨醇以应对干旱胁迫。但随着胁迫的加剧,SorPP活性丧失,山梨醇合成受阻,加之此时SDH活性急剧上升,山梨醇分解更为加剧,以致中度干旱胁迫后期和严重干旱胁迫下叶中的山梨醇含量呈下降趋势(图1~3)。因此,我们认为源叶中S6PDH和SorPP2个合成酶活性的“上调”是导致叶中山梨醇含量增加的主要原因,SDH也发挥作用,但相对不明显。Li和Li(2005,2007)曾提出,用PEG处理的苹果组培苗叶中山梨醇含量和A6PR(即S6PDH)活性均增加,SDH活性下降,但SDH活性受水分胁迫影响远高于A6PR,他们认为叶中山梨醇的积累是A6PR和SDH共同作用的结果。Bianco等(2000)则认为干旱胁迫下库器官(梢尖)中SDH活性下降后,山梨醇消耗呈减少,从而导致桃叶片中山梨醇积累。这些差异可

能是植物材料(平邑甜茶水培苗和盆栽苗/富士组培苗/桃实生苗)、干旱处理方式(3种胁迫方法/PEG处理/灌水量控制)、胁迫程度和持续时间等所致。

(2)根系是平邑甜茶的库器官。本文中轻度和中度胁迫处理前期,根中的SDH活性下降、山梨醇含量上升(图6、7),而与之对应的是韧皮部运输的山梨醇增加(图4、5);但在轻度处理水培苗后期和盆栽苗受严重干旱胁迫时,根系SDH活性虽然上升,但山梨醇含量并未减少,而是保持在原水平或仍稍高于未经干旱胁迫处理的,并且与此对应的是韧皮部中山梨醇含量也呈相同的变化趋势。因此,我们认为干旱胁迫下,根中的SDH和韧皮部运输是协同作用的,库消耗的“下调”和源运输的“上调”的共同作用而导致山梨醇在根系中积累。Kobashi等(2000)在四年生桃树经干旱处理时曾观察到,桃果实中的山梨醇氧化酶(SOX)活性上升,库增强导致果实中的山梨醇含量增加。据此我们认为,两种试材不同的山梨醇代谢类型(SDH/SOX)和代谢强度(根系弱库/果实强库)可能是导致上述差异的原因。

(3)SorPP催化山梨醇合成的最后一个步骤,其活性受山梨醇的反馈抑制,表明SorPP可能参与山梨醇合成过程的调节(Zhou等2003)。本文结果也显示:(1)SorPP活性的变化趋势与山梨醇含量和S6PDH活性变化相平行;(2)SorPP对干旱逆境较为敏感,其活性的下降或丧失总是先于S6PDH变化。据此我们认为,为防止干旱胁迫下叶中山梨醇积累过高以致代谢失调,应当重视,

叶中山梨醇过饱和前 SorPP 活性的调节以保持植物体内的代谢平衡。

参考文献

- 柴成林, 李绍华, 徐迎春(2001). 水分胁迫期间及胁迫解除后桃树叶片中的碳水化合物的代谢. 植物生理学通讯, 37 (6): 495~498
- Bianco RL, Rieger M, Sung SJ (2000). Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiol Plant*, 108: 71~78
- Bieleski RL (1969). Accumulation and translocation of sorbitol in apple phloem. *Aust J Biol Sci*, 22: 611~620
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- Grant CR, Rees T (1981). Sorbitol metabolism by apple seedlings. *Phytochemistry*, 20: 1505~1511
- Keller F, Ludlow MM (1993). Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J Exp Bot*, 44: 1351~1359
- Kobashi K, Gemma H, Iwahori S (2000). Abscisic acid content and sugar metabolism of peaches growth under water stress. *J Amer Hort Sci*, 125 (4): 425~428
- Li TH, Li SH (2005). Leaf responses of micropropagated apple plants to water stress: nonstructural carbohydrate composition and regulatory role of metabolic enzymes. *Tree Physiol*, 25 (4): 495~504
- Li TH, Li SH (2007). Enzymatic regulation of sorbitol metabolism in micropropagated apple plants in response to water stress. *Euro J Horticult Sci*, 72 (1): 12~19
- Negm FB, Loescher WH (1981). Characterization and partial purification of aldose-6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate: NDAP 1-oxidoreductase) from apple leaves. *Plant Physiol*, 67: 139~142
- Wang Z, Stutte GW (1992). The role of carbohydrates in active osmotic adjustment in apple under water stress. *J Amer Soc Hort Sci*, 117: 816~823
- Yamaguchi H, Kanayama Y, Yamaki S (1994). Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant Cell Physiol*, 35 (6): 887~892
- Zhou R, Cheng L, Wayne R (2003). Purification and characterization of sorbitol-6-phosphate phosphatase from apple leaves. *Plant Sci*, 165: 227~232