

干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥抗坏血酸含量及其代谢相关酶的影响

郑清岭^{1,2}, 杨忠仁¹, 张晓艳¹, 张凤兰^{1,*}, 郝丽珍^{1,*}

¹内蒙古农业大学农学院, 内蒙古野生特有蔬菜种质资源与种质创新重点实验室, 呼和浩特010019

²南阳师范学院农业工程学院, 河南省菌类食品工程技术研究中心, 河南南阳473061

摘要: 以沙芥和斧形沙芥为试材, 采用盆栽控水干旱法, 研究不同干旱胁迫强度对其根和叶的抗坏血酸含量及其代谢相关酶活性的影响, 探讨沙芥属植物抗坏血酸代谢对干旱胁迫的响应机制, 揭示沙芥属植物抗坏血酸代谢方面的抗旱机理, 评价沙芥和斧形沙芥抗旱性强弱。实验结果表明: 随着干旱胁迫强度的加剧, 沙芥和斧形沙芥的根和叶中抗坏血酸(ASA)、总抗坏血酸(T-ASA)含量均先增加后减少, 脱氢抗坏血酸(DHA)、谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)以及总谷胱甘肽(T-GSH)含量逐渐增加, ASA/DHA、GSH/GSSG比值逐渐降低; ASA合成途径的L-半乳糖脱氢酶(GalDH)和L-半乳糖-1,4-内酯脱氢酶(GalLDH)以及再生途径的脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、抗坏血酸氧化酶(AAO)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性均先升高后降低。不同干旱胁迫下斧形沙芥根和叶中ASA含量、GalLDH、MDHAR活性以及叶中GSH含量、GalDH、GR活性和根中DHAR活性均高于沙芥, 根中GSH含量、GalDH、AAO、GR活性和叶中DHAR、AAO活性均与沙芥相近, 说明干旱胁迫下斧形沙芥能够维持较高的ASA合成和再生能力, 其抗坏血酸代谢能清除更多的活性氧物质, 抗旱性强于沙芥。

关键词: 沙芥; 斧形沙芥; 根; 叶; 干旱胁迫; 抗坏血酸代谢

抗坏血酸(ascorbic acid, ASA)又称维生素C(vitamin C, VC)是植物和绝大多数动物体内合成的一类己糖内酯化合物(郭新波等2011), 为人类提供丰富的维生素C源, 具有治疗坏血病、预防癌症、防治贫血等功效, 能增强人体免疫力(董今等2017)。ASA在植物自身的抗氧化作用、调节生长发育、影响碳氮代谢、作为某些还原酶的辅因子以及提高抗逆性等方面具有非常重要的生理功能(石永春等2015; 俞乐等2016)。高等植物的不同器官或不同生长发育阶段, ASA的生物合成途径不同, 目前研究认为ASA在植物体内共有4条合成途径和1条再生途径: L-半乳糖途径是被公认为高等植物合成ASA的最主要的途径, L-半乳糖醛酸途径是辅助途径, 古洛糖途径和肌醇途径是补充途径, 抗坏血酸-谷胱甘肽(ascorbic acid-glutathione, ASA-GSH)循环途径是再生途径(董今等2017)。植物组织器官中ASA可氧化分解, 同时循环再生, 合成、分解和再生构成ASA完整的代谢网络, 共同调控着植物体内ASA的含量(邹礼平和陈锦华2009)。ASA再生途径存在于细胞的多种亚细胞器中, 如细胞质、叶绿体、线粒体等(Mittler 2002), 是调控ASA含量的一种重要形式, 也是植物体积累ASA的主要方式(董今等2017), 同时该途径是植物体内清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)的重要途

径, 能直接或间接清除因干旱等逆境胁迫而产生的ROS(丁顺华等2016), 从而保护植物有机体正常代谢免受或减轻氧化胁迫造成的伤害。

沙芥和斧形沙芥多生长在干旱或半干旱地区的荒漠沙地上, 为典型的沙生植物类群, 是一类优质抗旱种质资源, 具有菜用、饲用、药用、保健和防风固沙等功能(郑清岭等2017; Wang等2017)。沙芥属植物是富含ASA的沙生蔬菜, 而与之有关的ASA代谢的研究还未见报道。本文通过研究干旱胁迫下沙芥和斧形沙芥ASA含量及其代谢相关酶的变化趋势, 分析沙芥属植物ASA合成和再生途径对干旱胁迫的响应, 探讨干旱胁迫下沙芥和斧形沙芥ASA代谢的差异, 评价沙芥和斧形沙芥抗旱性强弱, 明确沙芥属植物ASA代谢方面的抗旱机理, 填补沙芥属植物ASA代谢调控机制的空白, 为沙芥属植物抗旱栽培和抗旱育种提供理论指导, 促进珍稀特有的沙芥属蔬菜野生资源的开发利用, 丰富日常餐桌饮食, 补充人体必需营养。

收稿 2018-06-01 修定 2018-11-28

资助 国家自然科学基金项目(31760570、31101541、31160393)、公益性行业(农业)科研专项(201203004)和内蒙古自然科学基金(2018MS03053)。

* 共同通讯作者: 张凤兰(zhangfenglan041105@163.com)、郝丽珍(haolizhen_1960@163.com)。

1 材料与方法

1.1 试验材料处理

将发芽的沙芥 [*Pugionium cornutum* (L.) Gaertn.] 和斧形沙芥 (*Pugionium dolabratum* Maxim.) 种子点播在塑料盆 (内径 13 cm, 高 13 cm, 质量 0.05 kg) 中, 置于智能温室。基质为过筛沙子和腐熟羊粪 (4:1, V/V), 混合后土壤初始含水量为 (3.68±0.18)%, 田间持水量为 (21.45±0.39)%。出苗后正常水分管理, 并保持土壤相对含水量 (soil relative water content, SRWC, 即实际含水量占田间持水量的百分数) 为 70%~75%。幼苗六叶一心时开始自然干旱至不同处理水平, 称重控制土壤水分含量, 并于每天下午 18:00 补充水分至不同干旱胁迫水平, 干旱处理 10 d, 不同干旱胁迫处理的植株叶片受害程度出现明显差异, 重度干旱处理的植株叶片出现严重萎蔫时结束试验。次日早晨 7:30 取样, 叶片取植株最外层的 2~3 片完全成熟叶, 根系取主根中部以下部分, 测定相关生理指标以及各处理的土壤含水量。

沙芥和斧形沙芥各设轻度 (50%~55%)、中度 (40%~45%) 和重度 (30%~35%) 干旱胁迫 3 个土壤水分处理, 以正常供水 (70%~75%) 为对照, 每个处理 20 盆, 每盆留苗 6 株, 重复 4 次。经过测定, 沙芥对照和 3 个处理的 SRWC 分别为 (73.64±4.42)%、(52.17±1.11)%、(46.08±0.92)%、(34.83±2.68)%; 斧形沙芥相应的 SRWC 分别为 (74.29±2.07)%、(54.00±3.10)%、(44.95±1.48)%、(30.07±0.61)%。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 抗坏血酸含量的测定

抗坏血酸 (ascorbic acid, ASA)、脱氢抗坏血酸 (dehydroascorbic acid, DHA) 和总抗坏血酸 (total-ascorbic acid, T-ASA) 的含量采用 Kampfengel 等 (1995) 和李明军等 (2010) 的 Fe^{3+} 还原法。

1.2.2 谷胱甘肽含量的测定

谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG)、总谷胱甘肽 (total-glutathione, T-GSH) 的含量测定参考 Ma 和 Cheng (2003) 的方法。

1.2.3 GalDH 和 GalLDH 活性的测定

L-半乳糖脱氢酶 (L-galactose dehydrogenase, GalDH, EC 1.1.1.316) 的活性测定参考 Gatzek 等 (2002) 和李明军等 (2010) 的方法; L-半乳糖-1,4-内

酯脱氢酶 (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, GalLDH, EC 1.3.2.3) 活性测定, 参考 Ôba 等 (1995) 和李明军等 (2010) 的方法。

1.2.4 DHAR、MDHAR、AAO、APX、GR 活性的测定

酶液的提取: 称取 0.2 g 叶片或根系, 加入 2 mL 50 mmol·L⁻¹ PBS (pH 7.5, 含 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.3% tritonX-100, 2% PVP) 在冰上研磨成匀浆, 2°C 下 16 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清液即为酶液, 用来测定以下各种酶的活性: 脱氢抗坏血酸还原酶 (dehydroascorbate reductase, DHAR, EC 1.8.5.1) 和单脱氢抗坏血酸还原酶 (monodehydroascorbate reductase, MDHAR, EC 1.6.5.4) 以及谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR, EC 1.8.1.7) 活性参考 Ma 和 Cheng (2003) 的方法测定; 抗坏血酸氧化酶 (ascorbic acid oxidase, AAO, EC 1.10.3.3) 活性参照 Esaka 等 (1990) 的方法测定; 抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX, 1.11.1.11) 活性参考 Nakano 和 Asada (1981) 的方法测定。

1.3 数据处理与分析

采用 Excel 2013 整理数据, Origin 9.0 软件作图, SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析和相关性分析。

2 实验结果

2.1 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥抗坏血酸含量的影响

由表 1 可知, 随着干旱胁迫强度的加剧, 沙芥和斧形沙芥的根和叶中 ASA 和 T-ASA 含量均先增加后减少, DHA 含量逐渐增加, 而 ASA/DHA 比值逐渐降低。

不同干旱处理下沙芥叶 ASA 含量与斧形沙芥叶相近, 沙芥根 ASA 含量低于斧形沙芥根; 中度干旱胁迫时, 沙芥和斧形沙芥的根和叶中 ASA 和 T-ASA 含量达到最大值, 且斧形沙芥根和叶均高于沙芥。

沙芥和斧形沙芥的根和叶中 DHA 含量在重度干旱时达到最大值且显著高于对照; 沙芥根和叶中 ASA/DHA 比值均在轻度干旱时显著降低, 而斧形沙芥根和叶均在中度干旱时显著降低。

2.2 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥谷胱甘肽含量的影响

由表 2 可知, 随着干旱胁迫强度的加剧, 沙芥

表1 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥抗坏血酸含量的影响

Table 1 Effect of drought stress on ascorbic acid contents of *P. cornutum* and *P. dolabratum*

组织	干旱处理	ASA含量/mg·g ⁻¹		DHA含量/mg·g ⁻¹		T-ASA含量/mg·g ⁻¹		ASA/DHA	
		沙芥	斧形沙芥	沙芥	斧形沙芥	沙芥	斧形沙芥	沙芥	斧形沙芥
叶	对照	1.07±0.08 ^c	1.05±0.11 ^b	0.12±0.01 ^d	0.11±0.01 ^c	1.19±0.09 ^d	1.16±0.12 ^c	8.85±0.28 ^a	9.85±0.13 ^a
	轻度	1.45±0.04 ^{ab}	1.57±0.09 ^a	0.20±0.01 ^c	0.17±0.01 ^b	1.65±0.05 ^b	1.73±0.11 ^b	7.14±0.04 ^b	9.48±0.25 ^a
	中度	1.59±0.07 ^a	1.71±0.05 ^a	0.23±0.01 ^b	0.19±0.01 ^b	1.82±0.07 ^a	1.90±0.04 ^a	6.94±0.43 ^b	8.80±0.63 ^b
	重度	1.22±0.07 ^{bc}	1.02±0.09 ^b	0.30±0.01 ^a	0.26±0.03 ^a	1.51±0.08 ^c	1.28±0.12 ^c	4.08±0.19 ^c	3.89±0.06 ^c
根	对照	0.96±0.07 ^b	1.18±0.09 ^b	0.12±0.01 ^c	0.12±0.01 ^c	1.08±0.08 ^c	1.31±0.09 ^b	7.88±0.58 ^a	9.72±0.24 ^a
	轻度	1.13±0.13 ^{ab}	1.30±0.02 ^{ab}	0.19±0.02 ^b	0.14±0.01 ^c	1.32±0.15 ^b	1.44±0.02 ^b	6.01±0.11 ^b	9.28±0.44 ^a
	中度	1.27±0.07 ^a	1.50±0.15 ^a	0.23±0.03 ^a	0.18±0.01 ^b	1.50±0.08 ^a	1.68±0.15 ^a	5.63±0.49 ^b	8.29±0.66 ^b
	重度	1.09±0.06 ^{ab}	1.18±0.06 ^b	0.25±0.02 ^a	0.24±0.03 ^a	1.33±0.08 ^b	1.42±0.09 ^b	4.44±0.23 ^c	5.01±0.32 ^c

不同小写字母表示同一材料不同处理间在 $P<0.05$ 水平下差异显著。下表同此。

表2 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥谷胱甘肽含量的影响

Table 2 Effect of drought stress on glutathione contents of *P. cornutum* and *P. dolabratum*

组织	干旱处理	GSH含量/mg·g ⁻¹		GSSG含量/mg·g ⁻¹		T-GSH含量/mg·g ⁻¹		GSH/GSSG	
		沙芥	斧形沙芥	沙芥	斧形沙芥	沙芥	斧形沙芥	沙芥	斧形沙芥
叶	对照	0.62±0.06 ^c	1.81±0.12 ^b	0.40±0.04 ^d	0.66±0.05 ^d	1.02±0.10 ^d	2.47±0.26 ^c	1.53±0.04 ^a	2.73±0.16 ^a
	轻度	0.96±0.08 ^b	1.90±0.03 ^b	0.98±0.12 ^c	0.83±0.06 ^c	1.94±0.20 ^c	2.72±0.13 ^c	0.98±0.04 ^b	2.30±0.16 ^b
	中度	1.14±0.07 ^{ab}	2.12±0.14 ^b	1.38±0.09 ^b	1.04±0.06 ^b	2.52±0.15 ^b	3.16±0.18 ^b	0.82±0.01 ^c	2.03±0.10 ^c
	重度	1.24±0.14 ^a	2.55±0.04 ^a	1.78±0.04 ^a	1.37±0.01 ^a	3.02±0.18 ^a	3.92±0.03 ^a	0.70±0.06 ^d	1.87±0.05 ^c
根	对照	0.33±0.02 ^c	0.23±0.03 ^c	0.37±0.03 ^d	0.26±0.04 ^d	0.69±0.05 ^d	0.49±0.07 ^d	0.91±0.06 ^a	0.87±0.07 ^a
	轻度	0.52±0.02 ^b	0.43±0.02 ^{bc}	0.66±0.01 ^c	0.59±0.04 ^c	1.17±0.01 ^c	1.02±0.06 ^c	0.79±0.04 ^b	0.73±0.02 ^b
	中度	0.72±0.05 ^a	0.57±0.04 ^b	1.07±0.10 ^b	0.91±0.04 ^b	1.79±0.15 ^b	1.49±0.06 ^b	0.67±0.03 ^c	0.63±0.04 ^c
	重度	0.77±0.05 ^a	0.81±0.03 ^a	1.22±0.07 ^a	1.54±0.08 ^a	1.99±0.12 ^a	2.34±0.13 ^a	0.63±0.01 ^d	0.52±0.06 ^d

和斧形沙芥的根和叶中GSH、GSSG以及T-GSH含量逐渐增加,而GSH/GSSG比值逐渐降低。

不同干旱处理下沙芥叶以及重度干旱时沙芥根的GSH含量均低于斧形沙芥根;与对照相比,沙芥根和叶的GSH含量均在轻度干旱时开始显著增加,而斧形沙芥根和叶在中度和重度干旱时开始显著增加。

随着干旱胁迫强度加剧,沙芥和斧形沙芥的根和叶中的GSSG含量显著增加,GSH/GSSG比值显著降低;沙芥根和叶以及斧形沙芥根中T-GSH含量均在轻度干旱时显著增加,而斧形沙芥叶T-GSH含量在中度干旱时显著增加。

2.3 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥GalDH和GalLDH活性的影响

由图1-A~D可知,沙芥和斧形沙芥的根和叶中GalDH和GalLDH活性随着干旱胁迫强度的加剧呈先升高后降低的趋势,且均在中度干旱胁迫时达到最大值。

由图1-A和B可知,不同干旱胁迫下斧形沙芥叶以及中度干旱胁迫时斧形沙芥根的GalDH活性均高于沙芥。不同干旱处理的沙芥(轻度、中度、重度干旱时)和斧形沙芥(轻度、中度干旱)的根和叶GalDH活性显著高于对照,其中在中度干旱胁迫下,沙芥和斧形沙芥的叶的GalDH活性分别比对照增加了80.40%和82.35%,根分别增加了60.08%和115.22%,可知,斧形沙芥根和叶的GalDH活性增加幅度大于沙芥。

由图1-C和D可知,不同干旱胁迫下斧形沙芥叶和根的GalLDH活性均高于沙芥。不同干旱处理的沙芥(轻度、中度、重度干旱)和斧形沙芥(轻度、中度干旱)的根和叶GalLDH活性显著高于对照,其中在中度干旱胁迫下,沙芥和斧形沙芥的叶中GalLDH活性分别比对照增加了29.03%和33.76%,根分别增加了40.62%和52.61%,可知,斧形沙芥根和叶的GalLDH活性增加幅度大于沙芥。

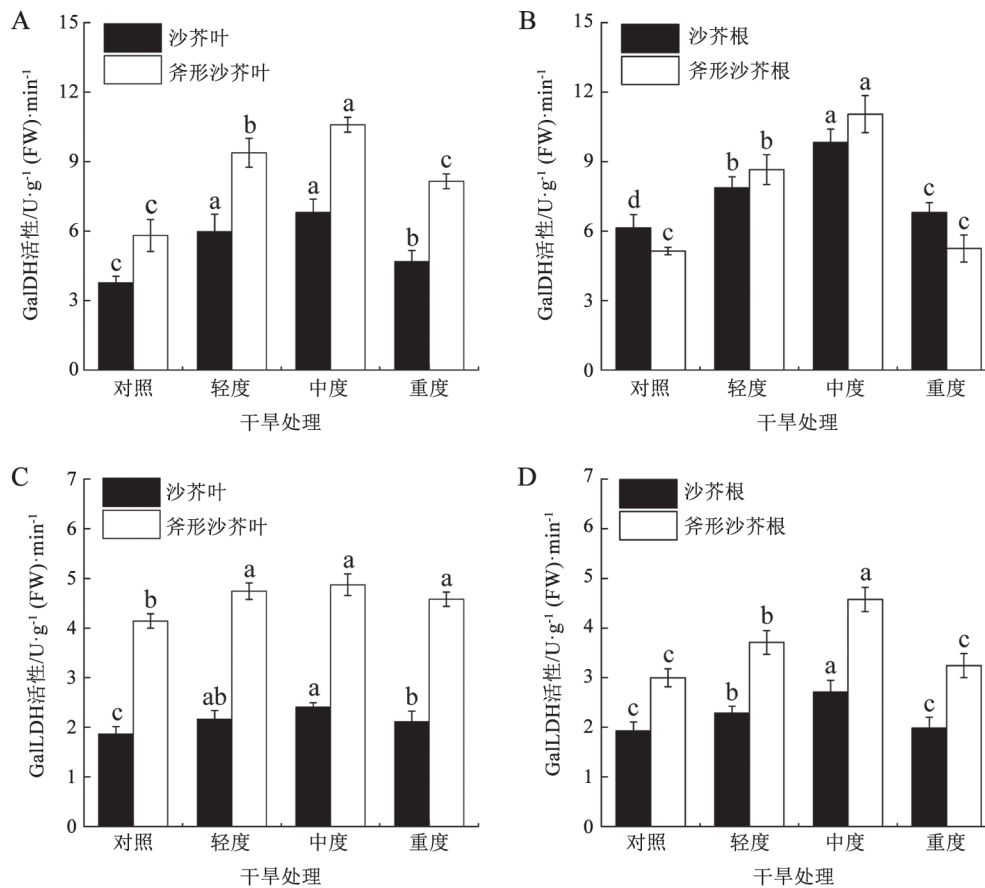


图1 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥GalDH和GalLDH活性的影响

Fig.1 Effects of drought stress on GalDH and GalLDH activities of *P. cornutum* and *P. dolabratum*

不同小写字母表示同一材料不同处理间在 $P<0.05$ 水平下差异显著。下图同此。

2.4 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥DHAR、MDHAR、AAO、APX和GR活性的影响

由图2和3可知,沙芥和斧形沙芥的根和叶中DHAR、MDHAR、AAO、APX活性以及叶中GR活性随着干旱胁迫强度的加剧呈先升高后降低的趋势,而根中GR活性先降低后升高。

由图2-A和B可知,沙芥和斧形沙芥的根和叶中DHAR活性均从轻度干旱胁迫时就显著升高,中度干旱时达到最大值。不同干旱胁迫下沙芥叶的DHAR活性与斧形沙芥叶相近,而沙芥根的DHAR活性均低于斧形沙芥根。

由图2-C和D可知,沙芥和斧形沙芥的叶中MDHAR活性在中度干旱胁迫时达到最大值,而根在轻度干旱时达到最大值。不同干旱胁迫下沙芥的根和叶中MDHAR活性低于斧形沙芥。

由图2-E和F可知,沙芥和斧形沙芥的根和叶

中AAO活性在中度干旱胁迫时达到最大值,沙芥和斧形沙芥的根和叶AAO活性在干旱胁迫时均显著高于对照。不同干旱胁迫下沙芥根和叶中AAO活性均高于斧形沙芥。

由图2-G和H可知,沙芥和斧形沙芥的根和叶中APX活性在中度干旱胁迫时达到最大值,显著高于对照;沙芥根和叶与斧形沙芥叶的APX活性在中度干旱时显著增加,斧形沙芥根在轻度干旱时显著增加。沙芥叶在对照、轻度、中度干旱时APX活性高于斧形沙芥,重度干旱时低于斧形沙芥,不同干旱胁迫下沙芥根APX活性均高于斧形沙芥根。

由图3可知,沙芥和斧形沙芥的叶分别在轻度和中度干旱时的GR活性达到最大值;根GR活性均在重度干旱时达到最大值,沙芥叶GR活性在轻度干旱时显著增加,沙芥根、斧形沙芥根和叶的GR

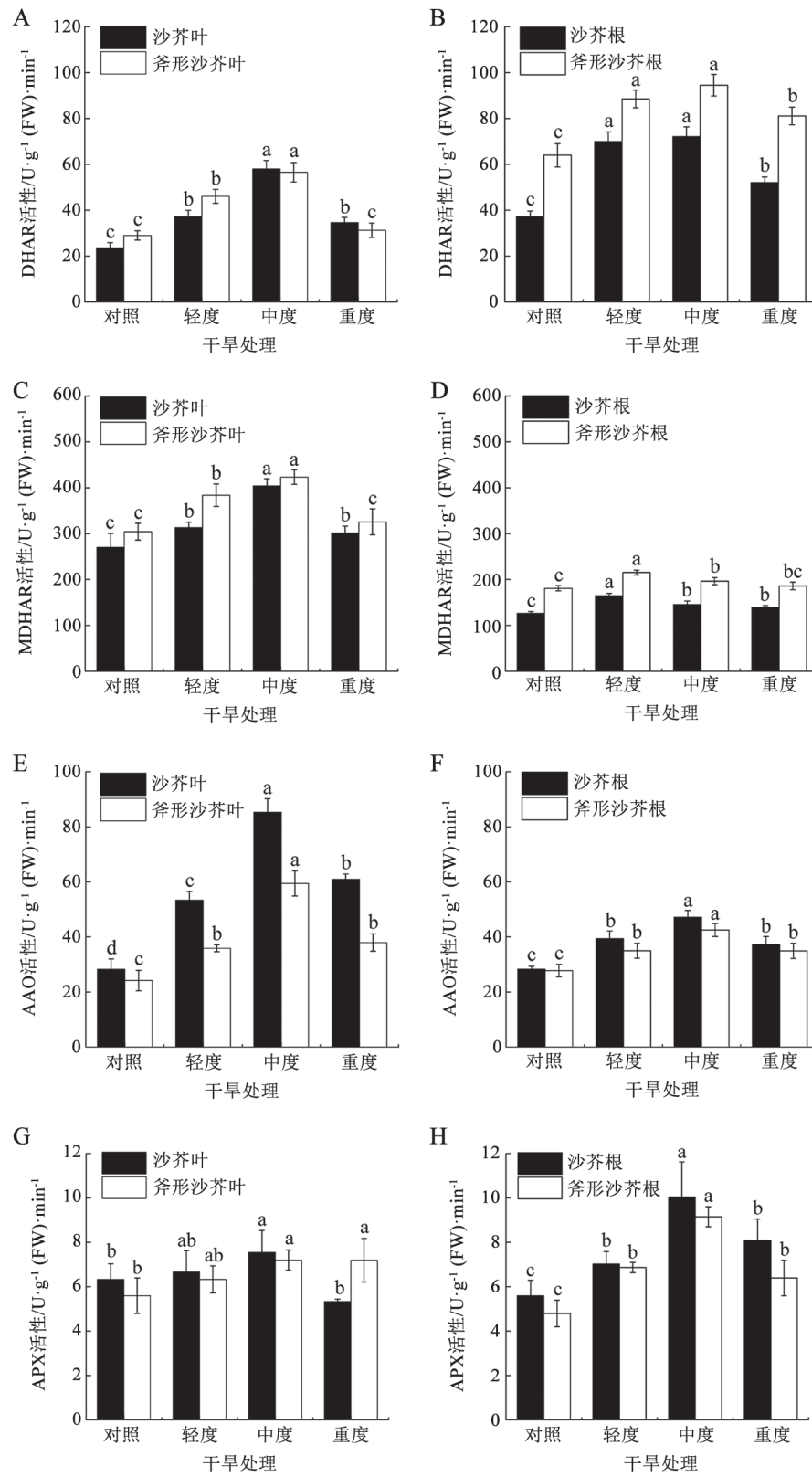


图2 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥DHAR、MDHAR、AAO和APX活性的影响

Fig.2 Effects of drought stress on DHAR, MDHAR, AAO, APX, GR activities of *P. cornutum* and *P. dolabratum*

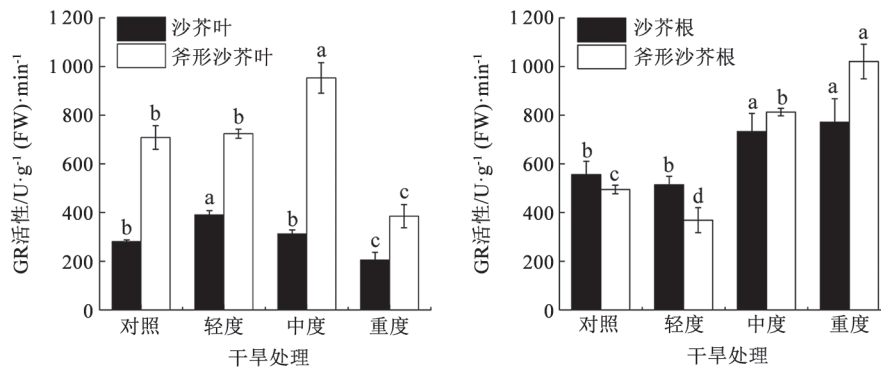


图3 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥GR活性的影响

Fig.3 Effect of drought stress on GR activities of *P. cornutum* and *P. dolabratum*

活性均在中度干旱时显著增加。不同干旱胁迫下沙芥叶GR活性均低于斧形沙芥叶,沙芥根GR活性在中度、重度时低于斧形沙芥根。

2.5 沙芥和斧形沙芥根和叶中ASA含量与ASA代谢相关酶相关性分析

沙芥和斧形沙芥的叶中ASA与ASA代谢相关酶的相关性分析如表3所示,沙芥和斧形沙芥的叶中ASA都与GalDH、GalLDH、MDHAR、DHAR、AAO极显著相关,与APX显著相关;而沙芥叶中ASA与GR显著相关,斧形沙芥叶中ASA与GR极显著相关。

沙芥和斧形沙芥的根中ASA与ASA代谢相关酶的相关性分析如表4所示,沙芥和斧形沙芥的根中ASA都与GalDH、DHAR、APX极显著相关;而沙芥根中ASA与GalLDH显著相关,与AAO极显著相关,斧形沙芥根中ASA与GalLDH极显著相关,与AAO显著相关。

3 讨论

3.1 沙芥和斧形沙芥ASA和GSH对干旱胁迫的响应

ASA和GSH是植物体内高丰度小分子抗氧化物质,是抗氧化系统的重要组成部分,能直接清除植物体内因胁迫产生的ROS,也能通过ASA-GSH循环间接清除H₂O₂ (Shao等2008; Asada 1992)。沙芥和斧形沙芥的根和叶中ASA和GSH含量随着干旱胁迫强度加剧开始逐渐增加,说明干旱胁迫促进了沙芥属植物根和叶中ASA和GSH的大量产生。正常供水时沙芥和斧形沙芥的叶ASA含量非常接近,斧形沙芥根中ASA含量比沙芥根中高

22.92%;中度干旱时斧形沙芥根和叶中ASA含量大于沙芥,与对照相比,斧形沙芥叶ASA的增加量(62.49%)也大于沙芥叶中ASA增加量(48.09%),说明沙芥和斧形沙芥在ASA含量方面具有种间差异性,干旱胁迫能促使斧形沙芥叶中产生更多的ASA。

ASA和GSH有利于维持细胞内氧化还原平衡,还原型/氧化型比率可以作为清除ROS机制调控信号(Mittler 2002);较高的ASA/DHA和GSH/GSSG能维持植物体内的氧化还原环境,减少胁迫所造成的伤害(Liu等2011)。本文中干旱加剧沙芥和斧形沙芥根和叶中ASA含量先上升后下降,ASA/DHA和GSH/GSSG比值一直降低,这一结论与单长卷等(2011)和马玉华等(2008)在冰草和苹果叶片中的研究结果相同。沙芥和斧形沙芥的叶中ASA/DHA以及根中GSH/GSSG比值较为相近,而斧形沙芥根中的ASA/DHA和叶中GSH/GSSG比值均大于沙芥,综合分析斧形沙芥的还原力大于沙芥,这也印证了斧形沙芥的抗旱性强于沙芥的结论,与前人研究结果(抗旱性强的品种的还原力大于抗旱性弱的品种)相一致。

3.2 沙芥和斧形沙芥ASA合成途径相关酶对干旱胁迫的响应

GalDH和GalLDH是植物体内L-半乳糖途径中合成ASA最后两步反应的关键酶,其活性高低与ASA含量存在一定的关系,也有研究表明催化GalDH和GalLDH活性对ASA含量调控极其重要(马玉华等2008)。沙芥和斧形沙芥的根和叶中GalDH和GalLDH活性均随着干旱胁迫强度的加剧呈先升高后降低的趋势,且在中度干旱胁迫时达到最大值,说明干旱胁迫促进了沙芥和斧形沙芥

表3 沙芥叶(左下)和斧形沙芥叶(右上)中ASA与ASA代谢相关酶相关性分析

Table 3 The correlation analysis on ASA and ASA metabolic enzymes in leaves of *P. cornutum* (bottom left) and *P. dolabratum* (top right)

指标	ASA	GSH	GalLDH	GalDH	MDHAR	DHAR	AAO	APX	GR
ASA	1	-0.238	0.649**	0.861**	0.815**	0.933**	0.684**	0.570*	0.775**
GSH	0.474	1	0.272	0.107	-0.093	-0.120	0.330	0.516*	-0.531*
GalLDH	0.821**	0.550*	1	0.682**	0.656**	0.725**	0.710**	0.382	0.308
GalDH	0.942**	0.509*	0.804**	1	0.855**	0.913**	0.913**	0.548*	0.697**
MDHAR	0.850**	0.494	0.630**	0.795**	1	0.930**	0.777**	0.485	0.600*
DHAR	0.847**	0.601*	0.807**	0.831**	0.885**	1	0.784**	0.382	0.719**
AAO	0.779**	0.800**	0.761**	0.787**	0.854**	0.951**	1	0.710**	0.514*
APX	0.608*	-0.167	0.265	0.486	0.726**	0.484	0.327	1	0.047
GR	0.551*	-0.236	0.211	0.542*	0.248	0.198	0.024	0.539*	1

*表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关, **表示在0.01 水平(双侧)上显著相关。下表同此。

表4 沙芥根(左下)和斧形沙芥根(右上)中ASA与ASA代谢相关酶相关性分析

Table 4 The correlation analysis on ASA and ASA metabolic enzymes in roots of *P. cornutum* (bottom left) and *P. dolabratum* (top right)

指标	ASA	GSH	GalLDH	GalDH	MDHAR	DHAR	AAO	APX	GR
ASA	1	0.068	0.739**	0.784**	0.268	0.637**	0.605*	0.715**	0.064
GSH	0.560*	1	0.217	0.034	0.004	0.477	0.562*	0.429	0.820**
GalLDH	0.517*	0.381	1	0.906**	0.497	0.729**	0.822**	0.895**	0.120
GalDH	0.800**	0.634**	0.805**	1	0.561*	0.794**	0.763**	0.875**	-0.069
MDHAR	0.450	0.230	0.382	0.639**	1	0.501*	0.405	0.361	-0.450
DHAR	0.753**	0.540*	0.753**	0.904**	0.758**	1	0.820**	0.893**	0.219
AAO	0.856**	0.671**	0.789**	0.950**	0.478	0.861**	1	0.920**	0.397
APX	0.693**	0.724**	0.698**	0.829**	0.200	0.595*	0.864**	1	0.319
GR	0.359	0.781**	0.126	0.261	-0.221	0.119	0.420	0.621*	1

植物体内L-半乳糖途径的合成, 中度干旱胁迫时ASA合成速率达到最大, ASA含量达到最大值, 可见干旱环境下沙芥属植物ASA含量与GalDH、GalLDH活性有一定的相关关系, 与相关性分析的结果(沙芥和斧形沙芥的根和叶中ASA与GalDH、GalLDH显著或极显著相关)相一致; 这也说明了沙芥和斧形沙芥植物体内ASA的合成均以L-半乳糖途径合成ASA为主。本文中, 不同干旱胁迫下斧

形沙芥叶的GalLDH和GalDH活性以及根的GalLDH活性均高于沙芥, 中度干旱胁迫时斧形沙芥根的GalDH活性高于沙芥根, 说明斧形沙芥比沙芥能合成更多的ASA, 印证了斧形沙芥根和叶中ASA含量高于沙芥的结论。

3.3 沙芥和斧形沙芥ASA再生途径相关酶对干旱胁迫的响应

ASA-GSH循环途径如图4所示, 由一系列抗

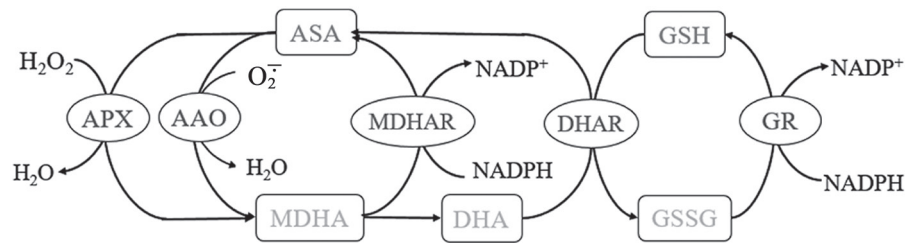


图4 抗坏血酸-谷胱甘肽循环

Fig.4 ASA-GSH cycle

本图改编自Noctor和Foyer (1998)、Mittler (2002)和丁顺华等(2016)文献。

氧化酶包括APX、AAO、DHAR、MDHAR、GR和2种重要的抗氧化剂ASA、GSH以及氧化型的MDHA、DHA、GSSG组成(Gill和Tuteja 2010)。该途径中ASA被AAO或APX氧化成MDHA, MDHA可歧化生成DHA或在MDHAR作用下生成ASA, 而DHAR利用GSH作为电子供体可将DHA还原为ASA, 从而完成清除ROS并再生ASA的过程(董今等2017; Mittler 2002)。ASA-GSH循环是ASA再生途径, 也是植物抗氧化代谢的重要组成部分(Foyer和Noctor 2011); 本文结果表明, 随干旱胁迫强度的加剧, 沙芥和斧形沙芥的根和叶中DHAR、MDHAR、AAO、APX活性开始升高, 中度干旱胁迫时达到最大值, 随后开始降低, 与根和叶中ASA含量变化趋势相一致。AAO和APX以ASA为电子供体清除ROS的关键酶, 在植物抗氧化系统中起重要作用, 而该抗氧化系统是植物体内清除ROS的关键途径(Gill和Tuteja 2010)。中度干旱胁迫时, 根和叶中ASA含量最高, AAO和APX的活性也达到最大值, 被氧化的ASA的增加, 致使根和叶中MDHA含量增加, 一部分MDHA随着MDHAR活性的升高进一步还原为ASA, 另一部分MDHA发生歧化反应生成的DHA在逐渐升高的DHAR作用下还原为ASA。干旱胁迫下沙芥和斧形沙芥的根和叶中ASA-GSH循环发生的一系列反应说明随干旱胁迫加剧, ROS含量增加, 激发了沙芥属植物体内抗坏血酸防御系统, 使清除H₂O₂的APX以及清除O⁻的AAO和加快ASA循环再生的MDHAR、DHAR酶活性升高, 从而缓解干旱对植物的伤害。

许馨露等(2018)发现在重度干旱胁迫下四季桂ASA-GSH循环代谢相关酶(DHAR、MDHAR、APX、GR)活性呈先上升后下降的趋势; 冰草(单长卷等2011)、嘎拉苹果(马玉华等2008)、新疆野苹果和平邑甜茶(马春花等2011)以及大豆(董守坤等2018)的叶片在干旱胁迫下的DHAR、MDHAR、APX、GR活性的变化均呈现先上升后下降的趋势, 且中度干旱时达到最大值。本实验中随干旱胁迫强度的加剧, 沙芥和斧形沙芥的根和叶中DHAR、MDHAR、AAO、APX以及叶中GR活性先升高后降低并在中度干旱胁迫时达到最大值; 这一结论与前人研究结果相一致, 说明不同科属的植物体内的ASA-GSH循环代谢对干旱胁迫具有相类似的响应; 而由相关性分析可知根和叶中ASA都与DHAR、

AAO、APX显著或极显著相关, 与MDHAR、GR的相关性在根和叶中并不一致, 说明沙芥属植物根和叶中的ASA代谢途径中有相同之处, 也有一定的差异, 这可能是由于其他代谢通路产生的代谢物质参与了ASA的再生途径, 影响了该途径中物质的含量, 而具体的异同还需要进一步的深入研究。

抗旱性强的新疆野苹果叶片的ASA、T-ASA、GSH和T-GSH的增加幅度大于抗旱性弱的平邑甜茶, 新疆野苹果比平邑甜茶具有更高的GalLDH、DHAR、GR活性和ASA/DHA、GSH/GSSG比值(马春花等2011)。耐旱型大豆品种‘黑农44’在ASA-GSH循环中的抗氧化剂含量和抗氧化酶活性高于敏感型大豆品种‘黑农65’(董守坤等2018)。干旱胁迫下斧形沙芥的根和叶中ASA含量、GalLDH和MDHAR活性以及叶中GSH含量、GalDH、GR活性和根中DHAR活性均高于沙芥, 而根中GSH含量、GalDH、AAO、GR活性和叶中DHAR、AAO活性均与沙芥相近, 所以从ASA和GSH含量以及ASA-GSH循环代谢关键酶活性的高低来看, 干旱胁迫下斧形沙芥能够维持较高的ASA合成和再生能力, 抗坏血酸代谢能清除更多的ROS, 其抗旱性强于沙芥。

参考文献(References)

- Asada K (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, 85 (2): 235–241
- Ding SH, Chen S, Lu CM (2016). Research progress on functions of glutathione reductase in chloroplasts of plants. *Plant Physiol J*, 52 (11): 1703–1709 (in Chinese with English abstract) [丁顺华, 陈珊, 卢从明(2016). 植物叶绿体谷胱甘肽还原酶的功能研究进展. *植物生理学报*, 52 (11): 1703–1709]
- Dong J, Cao DY, Tian HQ, et al (2017). Research progress on improving the AsA content using plant metabolic pathways. *J Chin Insti Food Sci Technol*, 17 (8): 197–202 (in Chinese with English abstract) [董今, 曹东艳, 田慧琴等(2017). 利用植物代谢途径提高AsA含量的研究进展. *中国食品学报*, 17 (8): 197–202]
- Dong SK, Ma YL, Li S, et al (2018). Effect of drought stress and re-watering on ascorbate-glutathione cycle of soybean. *J Northeast Agric Univ*, 49 (1): 10–18 (in Chinese with English abstract) [董守坤, 马玉玲, 李爽等(2018). 干旱胁迫及复水对大豆抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响. *东北农业大学学报*, 49 (1): 10–18]
- Esaka M, Hattori T, Fujisawa K, et al (1990). Molecular

- cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells. *Eur J Biochem*, 191 (3): 537–541
- Foyer CH, Noctor G (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*, 155 (1): 2–18
- Gatzek S, Wheeler GL, Smirnov N (2002). Antisense suppression of l-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. *Plant J*, 30 (4): 541–553
- Gill SS, Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 48 (12): 909–930
- Guo XB, Tang YL, Sun XF, et al (2011). Metabolic regulation of vitamins C and E in higher plants. *Plant Physiol J*, 43 (2): 351–357 (in Chinese with English abstract) [郭新波, 唐岳立, 孙小芬等(2011). 高等植物维生素C和维生素E代谢调控. *植物生理学报*, 47 (8): 731–744]
- Kampfenkel K, Van MM, Inzé D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem*, 225 (1): 165–172
- Li MJ, Gao J, Ma FW, et al (2010). Relationship between expressions of GalDH and GalLDH and ascorbate content in apple fruits. *Sci Agric Sin*, 43 (2): 351–357 (in Chinese with English abstract) [李明军, 高静, 马锋旺等(2010). 苹果果实GalDH和GalLDH基因的表达与AsA的关系. *中国农业科学*, 43 (2): 351–357]
- Liu C, Liu Y, Guo K, et al (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environ Exp Bot*, 71 (2): 174–183
- Ma CH, Li MJ, Li CY, et al (2011). Response of ascorbic acid metabolism in apple rootstocks leaves under drought stress. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31 (8): 1596–1602 (in Chinese with English abstract) [马春花, 李明军, 李翠英等(2011). 不同抗性苹果砧木叶片抗坏血酸代谢对干旱胁迫的响应. *西北植物学报*, 31 (8): 1596–1602]
- Ma FW, Cheng L L (2003). The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Sci*, 165 (4): 819–827
- Ma YH, Ma FW, Ma XW, et al (2008). Effects of drought stress on ascorbic acid contents and activities of related metabolic enzymes in apple leaves. *J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed)*, 36 (3): 150–154 (in Chinese with English abstract) [马玉华, 马锋旺, 马小卫等(2008). 干旱胁迫对苹果叶片抗坏血酸含量及其代谢相关酶活性的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 36 (3): 150–154]
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7 (9): 405–410
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22 (5): 867–880
- Noctor G, Foyer CH (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49 (49): 249–279
- Ôba K, Ishikawa S, Nishikawa M, et al (1995). Purification and properties of L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem*, 117 (1): 120–124
- Shao HB, Chu LY, Shao MA, et al (2008). Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol*, 331 (6): 433–441
- Shan CJ, Han RL, Liang ZS (2011). Responses to drought stress of the biosynthetic and recycling metabolism of glutathione and ascorbate in *Agropyron cristatum* leaves on the Loess Plateau of China. *Chinese J Plant Ecol*, 35 (6): 653–662 (in Chinese with English abstract) [单长卷, 韩蕊莲, 梁宗锁(2011). 黄土高原冰草叶片抗坏血酸和谷胱甘肽合成及循环代谢对干旱胁迫的生理响应. *植物生态学报*, 35 (6): 653–662]
- Shi YC, Yang YY, Xue RL, et al (2015). Research advance of biological function of ascorbic acid in plants. *Plant Physiol J*, 51 (1): 1–8 (in Chinese with English abstract) [石永春, 杨永银, 薛瑞丽等(2015). 植物中抗坏血酸的生物学功能研究进展. *植物生理学报*, 51 (1): 1–8]
- Wang P, Wang F, Yang J (2017). De novo assembly and analysis of the *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. transcriptome and identification of genes involved in the drought response. *Gene*, 626: 290–297
- Xu XL, Li DD, Ma YD, et al (2018). Responses of the antioxidant defense system of *Osmanthus fragrans* cv. ‘Tian Xiang TaiGe’ to drought, heat and the synergistic stress. *Chin Bull Bot*, 53 (1): 72–81 (in Chinese with English abstract) [许馨露, 李丹丹, 马元丹等(2018). 四季桂抗氧化防御系统对干旱、高温及协同胁迫的响应. *植物学报*, 53 (1): 72–81]
- Yu L, Liu YH, Yuan WC, et al (2016). Recent advances in the study of accumulation of ascorbic acid and its molecular mechanism in plants. *Chin Bull Bot*, 51 (3): 396–410 (in Chinese with English abstract) [俞乐, 刘拥海, 袁伟超等(2016). 植物抗坏血酸积累及其分子机制的研究进展. *植物学报*, 51 (3): 396–410]
- Zheng QL, Yang DY, Liu JW, et al (2017). Effects of drought stress on growth and antioxidant system of *Pugionium cornutum* and *P. dolabratum* seedlings. *Plant Physiol J*, 53 (4): 600–608 (in Chinese with English abstract) [郑清岭, 杨冬艳, 刘建文等(2017). 干旱胁迫对沙芥和斧形沙芥幼苗生长及抗氧化系统的影响. *植物生理学报*, 53 (4): 600–608]
- Zou LP, Chen JH (2009). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid and regulation of related genes in plants. *Plant Physiol J*, 45 (9): 925–930 (in Chinese with English abstract) [邹礼平, 陈锦华(2009). 植物抗坏血酸的合成和代谢以及相关酶基因的调控. *植物生理学报*, 45 (9): 925–930]

Effects of drought stress on ascorbic acid contents and metabolism related enzymes of *Pugionium cornutum* and *P. dolabratum*

ZHENG Qing-Ling^{1,2}, YANG Zhong-Ren¹, ZHANG Xiao-Yan¹, ZHANG Feng-Lan^{1,*},
HAO Li-Zhen^{1,*}

¹College of Agronomy Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia Key Laboratory of Germplasm and Germplasm Enhancement of Wild and Special Vegetable Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China

²College of Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Henan Engineering Technology Research Center of Fungi Food, Nanyang, Henan 473061, China

Abstract: The *Pugionium cornutum* and *P. dolabratum* were chosen as the specimens and the potted water controlling and drying method was conducted to investigate the effects of drought stress on ascorbic acid contents and activities of metabolism related enzymes in roots and leaves, to discuss the response mechanism of ascorbic acid metabolism on drought stress, to explore the drought resisting mechanism in ascorbic acid metabolism, and to evaluate the drought resisting ability of two specimens. The results showed that the increasing intensification of drought stress led that the contents of ascorbic acid (ASA) and total ascorbic acid (T-ASA) were increased initially and decreased subsequently, the contents of dehydroascorbic acid (DHA), glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and total glutathione (T-GSH) were increased gradually, however, both the ratio of ASA/DHA and GSH/GSSG were decreased. Besides, the activities of L-galactose dehydrogenase (GalDH), L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) in the ASA biosynthetic pathway, and dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), ascorbic acid oxidase (AAO), and ascorbate peroxidase (APX) in roots and leaves during the ASA regeneration pathway were increased initially and decreased gradually. In addition, the content of ASA and the activities of GalLDH, MDHAR in roots and leaves, the content of GSH, the activities of GalDH, GR in leaves and the DHAR in roots of *P. dolabratum* were higher than those in *P. cornutum*. Furthermore, the content of GSH and the activities of GalDH, AAO and GR in roots, the DHAR, AAO in leaves of *P. dolabratum* were close to that in *P. cornutum*. Furthermore, the results also indicated that comparing with *P. cornutum*, the *P. dolabratum* could maintain the higher ASA biosynthesis ability and the higher regeneration capacity, the ascorbic acid metabolism in *P. dolabratum* could remove more reactive oxygen species, and also the drought resistance of *P. dolabratum* was stronger.

Key words: *Pugionium cornutum*; *Pugionium dolabratum*; roots; leaves; drought stress; ascorbic acid metabolism

Received 2018-06-01 Accepted 2018-11-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31760570, 31101541, 31160393), the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (201203004), the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2018MS03053).

*Co-corresponding author: Zhang FL (zhangfenglan041105@163.com), Hao LZ (haolizhen_1960@163.com).