

干旱胁迫下甘蔗叶类黄酮及相关酶活性的变化

周 桂^{1,2,3,4}, 李杨瑞^{1,3,4*}, 杨丽涛^{1,4}, 韦雪雪², 丘佩玲²

(1. 广西大学广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西 南宁 530005;

2. 广西民族大学化学与生态工程学院, 广西 南宁 530006;

3. 广西农业科学院广西作物遗传改良生物技术重点实验室, 广西 南宁 530007;

4. 中国农业科学院甘蔗研究中心, 广西 南宁 530007)

摘 要: 以两个抗旱性不同的甘蔗品种 ROC 22 和 ROC 16 为试材, 采用聚乙二醇模拟干旱胁迫, 研究了甘蔗幼苗在干旱胁迫下叶片中类黄酮含量及相关酶活性的变化。结果表明, 与对照相比, 10% PEG 胁迫 2 h 至 14 h, 耐旱性强的 ROC 22 品种类黄酮含量降低, 耐旱性弱的 ROC 16 品种类黄酮含量先降后升; 2 个品种幼苗叶片中苯丙氨酸解氨酶活性呈现先降低后升高的变化规律。ROC 22 叶片多酚氧化酶活性呈先升后降的变化, ROC 16 叶片多酚氧化酶活性下降; 2 个品种甘蔗叶过氧化物酶活性持续下降。

关键词: 甘蔗; 聚乙二醇胁迫; 类黄酮; 苯丙氨酸解氨酶; 多酚氧化酶; 过氧化物酶

中图分类号: S 566.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009) 06-0185-04

广西甘蔗区主要分布在旱坡地, 约 90% 甘蔗区基本无灌溉条件, 干旱是制约甘蔗生产的重要因素^[1]。探明甘蔗抗旱机制, 选育抗旱优良品种有极其重要的意义。植物在干旱胁迫下体内会发生复杂的生理生化变化, 植物抗旱性与植物抗氧化能力及抗氧化物质含量密切相关^[2,3]。类黄酮是植物体内重要的抗氧化物质^[4], 研究表明类黄酮在消除和减轻由干旱等逆境引发的活性氧伤害方面直接或间接发挥作用。有报道表明水稻类黄酮合成酶基因在脱水胁迫中诱导表达^[5]; Tattini 等^[6]报道欧洲女贞类黄酮作为抗氧化剂响应强光与干旱胁迫; Yang 等^[7]报道甘草植物干旱胁迫下类黄酮含量增加。有关甘蔗干旱胁迫下类黄酮的变化未见报道。

本研究以抗旱性不同的 2 个品种甘蔗为材料, 探讨干旱胁迫处理对甘蔗苗期叶中类黄酮积累及其代谢相关酶苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶(Peroxidase, POD) 活性的影响, 为深入了解甘蔗抗旱能力与类黄酮参与的抗氧化反应之间的关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.) 品种新台糖 22 号(ROC 22, 抗旱性较强)、新台糖 16 号(ROC 16, 抗

旱性弱)^[8], 组培苗温室大棚沙培育苗, 自然光照, 定期浇灌营养液, 当幼苗长至 4~6 片真叶, 茎高约 25 cm 时进行处理。

1.2 聚乙二醇 polyethylene glycol (PEG) 胁迫处理

采用含 10%(W/V) PEG 6000 的 Hoagland 营养液培养甘蔗幼苗模拟干旱处理。将长势一致的甘蔗幼苗从沙基中取出, 用蒸馏水将根系冲洗干净并用滤纸吸净根上粘附的水分, 再将幼苗根系放入盛有含 10% PEG 6000 的 Hoagland 营养液的圆形塑料桶中, 塑料桶高径比为 15 cm:18 cm, 每桶盛装 2 L 营养液, 每桶 6 穴, 每穴 2 株幼苗。在 HP 1000GS-B 人工气候箱中培养, 昼夜温度为 30℃/20℃, 相对湿度 75%。PEG 6000 处理后不同时间采叶样(+1, +2, +3 叶), 叶片用蒸馏水迅速冲洗干净并用滤纸吸干表面水分后置入-80℃低温冰箱保存备用。对照为 Hoagland 营养液培养。

1.3 甘蔗叶类黄酮的提取与测定

将不同处理的叶样品在 100℃干燥 12 h。干燥叶样品采用粉碎机粉碎后称取 0.5 g 置于 50 mL 离心管中, 加入 70%乙醇 10 mL, 超声波提取 15 min 后离心, 取上清液再过滤, 滤液 70℃蒸发浓缩后用 70%乙醇溶解并定容到 10 mL 备用。类黄酮的测定以芦丁为标样, 采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[9]测定, 3 次重复。类黄酮含量用单位提取物干重所含类黄酮重表示(mg/g)。

收稿日期: 2009-05-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD30B03); 广西科技攻关项目(0782004-3)

作者简介: 周 桂(1969-), 女, 湖北宜昌人, 副教授, 博士生, 从事植物生理及分子生物学研究。

* 通讯作者: 李杨瑞(1957-), 男, 广西北流人, 教授, 博士, 博士生导师。E-mail: liyr@caas.net.cn

1.4 相关酶的提取与活性测定

取不同处理的鲜叶样品进行酶的提取与活性测定,3次重复。PAL 的提取与活性测定参照薛应龙方法^[10],酶活性单位定义为每克鲜重叶片每小时在 290nm 波长处吸光值的变化 $U/(h \cdot g)$ 。POD 的提取与活性测定参照李杨瑞的方法^[11],酶活性单位定义为每克鲜重叶片 1min 内在 470nm 处吸光值的变化 $U/(min \cdot g)$ 。PPO 的提取与活性测定参照杨丽涛等的方法^[12],酶活性单位定义为每克鲜重叶片 1min 内在 398nm 波长处吸光值的变化 $U/(min \cdot g)$ 。

2 结果与分析

2.1 PEG 模拟干旱胁迫下甘蔗叶类黄酮含量的变化

由图 1 可知:耐旱性强的 ROC 22 品种类黄酮含量高于耐旱性弱的 ROC 16 品种。由图 1-a 可知:在处理时间范围内,PEG 胁迫处理引起耐旱性强的

ROC 22 品种甘蔗叶片类黄酮含量降低,差异显著 ($P < 0.05$)。

对于耐旱性弱的 ROC 16 品种,由图 1-b 可知在 PEG 胁迫过程中甘蔗叶片类黄酮含量的变化是先降低后升高 ($P < 0.05$)。在胁迫处理的 2h 到 11h 之间,类黄酮含量低于对照,而 14h 时高于对照 18.4%。处理间差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

2.2 PEG 模拟干旱胁迫下甘蔗叶 PAL 活性的变化

由图 2-a 可知,与对照相比,除 PEG 胁迫 2h 初期 PAL 活性显著下降之外,耐旱性强的 ROC 22 甘蔗叶 PAL 活性均高于对照,差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。PEG 胁迫 8h, PAL 活性达到最大值。而耐旱性弱的 ROC 16 品种 PEG 胁迫初期 2h、5h 内,蔗叶 PAL 活性与对照无显著性差异 ($P > 0.05$); 8h PAL 活性显著下降 ($P < 0.05$); 8h 后随着 PEG 胁迫时间延长,蔗叶 PAL 活性逐渐升高,11h、14h 显著高于对照 ($P < 0.05$)。

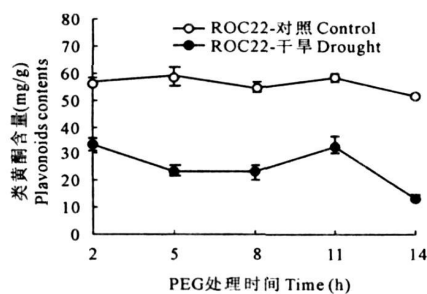


图1-a

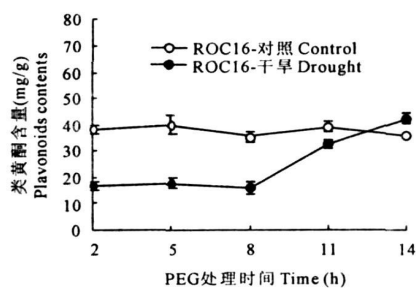


图1-b

图 1 PEG 胁迫下两个品种甘蔗叶中类黄酮含量的变化

Fig. 1 Changes of flavonoids content in leaves of two sugarcane cultivars under PEG stress

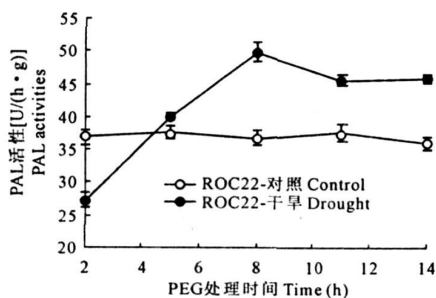


图2-a

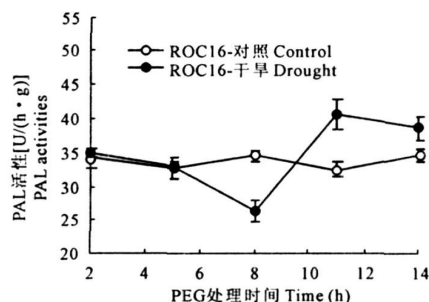


图2-b

图 2 PEG 胁迫下两个品种甘蔗叶 PAL 活性的变化

Fig. 2 Changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in leaves of two sugarcane cultivars under PEG stress

从以上结果分析,PEG 胁迫引起 2 个品种甘蔗幼苗叶中 PAL 活性呈现先降低后升高的总体变化规律。耐旱性强的 ROC 22 品种 PEG 胁迫下高 PAL 活性比耐旱性弱的 ROC 16 品种持续时间长。PAL

是苯丙烷类代谢途径与类黄酮合成代谢途径的关键酶和限速酶^[13]。高 PAL 活性可以激发苯丙烷代谢途径相关次生代谢产物合成,从而提高植物的抗性。

2.3 PEG 模拟干旱胁迫下甘蔗叶PPO 活性的变化

由图 3 可知,与对照相比,PEG 胁迫 2 h 时,ROC 22 甘蔗叶PPO 活性迅速升高,但 2h 后,PPO 活

性降低,并低于对照。而 ROC 16 品种PEG 胁迫期间,甘蔗叶PPO 活性均低于对照。处理间差异达到显著水平($P<0.05$)。

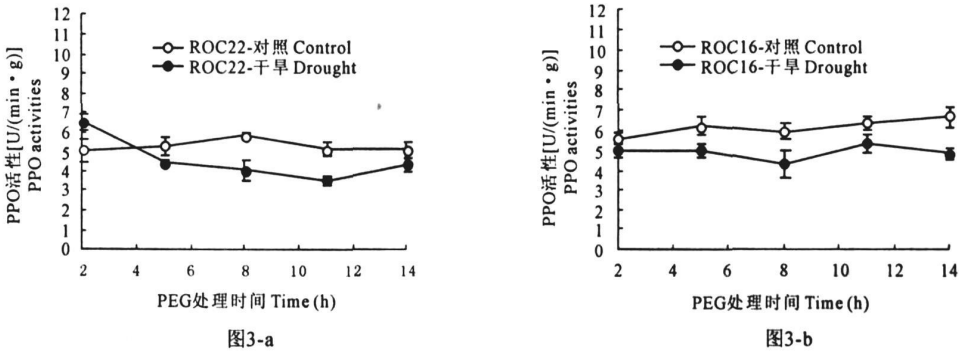


图 3 PEG 胁迫下两个品种甘蔗叶PPO 活性的变化

Fig. 3 Changes of polyphenol oxidase activity in leaves of two sugarcane cultivars under PEG stress

有报道指出,芝麻在干旱胁迫下PPO 活性增加,并且在抗旱性强的品种中表现明显^[14]。这与本研究结果不同,可能与植物品种、胁迫强度等相关。

2.4 PEG 模拟干旱胁迫下甘蔗叶POD 酶活性的变化

由图 4 可知,耐旱性强的 ROC 22 品种比耐旱性

弱的 ROC 16 品种POD 酶活性水平要低。PEG 胁迫引起 2 个品种甘蔗叶POD 活性降低,与对照差异显著($P<0.05$)。耐旱性强的 ROC 22 品种比耐旱性弱的 ROC 16 品种总体降低幅度小。

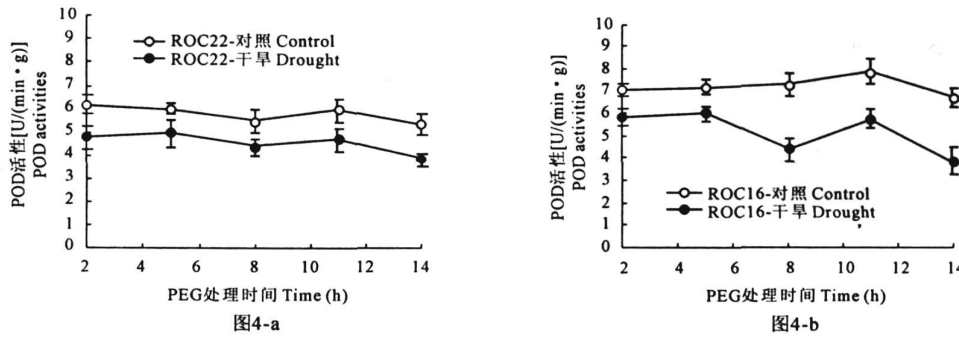


图 4 PEG 胁迫下两个品种甘蔗叶POD 活性的变化

Fig. 4 Changes of peroxidase activity in leaves of two sugarcane cultivars under PEG stress

干旱胁迫下植物的抗旱能力和受伤害程度与 POD 酶活性变化密切相关^[13]。有关干旱胁迫下 POD 酶活性变化相关报道较多。有报道指出,芒果、大豆苗以及灰枣经干旱胁迫处理POD 活性出现先升高后降低的变化^[16~18]。而花生以及北方旱区树种经干旱胁迫处理POD 活性增强^[19,20]。董永华^[20]报道小麦在干旱胁迫中POD 活性降低,这与本研究结果一致。分析甘蔗叶片POD 活性降低可能只反映了甘蔗受胁迫的伤害程度,耐旱性强的 ROC 22 比耐旱性弱的 ROC 16 的POD 酶活性总体降低幅度小,受到活性氧伤害的程度低。活性氧变化对植物的伤害程度与植物本身及胁迫强度、时间密切相关。因此植物抗氧化酶系统的变化也因植物品种和胁迫程

度不同存在着差别。

3 讨 论

干旱胁迫下植物通过调节体内抗氧化物质含量来消除或减轻由干旱引发的活性氧伤害是很多植物抵抗干旱胁迫的有效方式之一^[3]。类黄酮是一种广泛存在于植物体内的次生代谢产物,泛指两个苯环通过中央三碳链(即C6—C3—C6 骨架)连接而成的一类化合物,一般都带有较多的酚羟基,属多酚类物质,由于类黄酮物质本身具有较强的抗氧化活性,可通过酚羟基与氧自由基在相关氧化酶的催化下反应生成较稳定的半醌式自由基,捕捉干旱胁迫产生的活性氧自由基,降低干旱胁迫产生的活性氧自由

基对植物的伤害。

本实验观察到干旱胁迫引起耐旱性强的 ROC 22 品种类黄酮含量降低,耐旱性弱的 ROC 16 品种类黄酮含量先降后升。前人报道指出适度水分胁迫会提高甘草、荞麦、小麦中类黄酮含量^[7,22,23]。这与前人的研究结果不同,可能与植物本身及胁迫强度、时间等相关。

PAL 作为苯丙烷类代谢途径及类黄酮合成代谢途径的关键酶和限速酶与植物的抗胁迫能力相关,据报道,植株受到逆境胁迫时,PAL 活性升高^[24]。在本研究中 PEG 胁迫引起 2 个品种甘蔗幼苗叶中 PAL 活性呈现先降低后升高的趋势。ROC 16 品种中类黄酮含量增加同步于 PAL 活性的增加。说明 PEG 胁迫下 PAL 酶活性和类黄酮含量变化可能存在一定的相关性以及 PEG 胁迫下类黄酮合成代谢的复杂性。

PPO 是植物中重要的氧化酶,是引起类黄酮、多酚类物质氧化的主要催化酶^[23]。其活性高低不仅反映植物受胁迫的伤害程度与抗氧化能力,也可能与类黄酮代谢相关。PEG 胁迫 2h 引起 ROC 22 甘蔗叶 PPO 活性迅速升高可能与类黄酮的氧化有关。而 ROC 16 品种 PEG 胁迫期间甘蔗叶 PPO 活性降低也可能利于胁迫后期类黄酮的积累。

POD 作为一种抗氧化酶能催化多种底物发生氧化反应,已知的 POD 催化反应底物超过 200 种^[25]。Badiani^[27]报道小麦幼苗 POD 同工酶具有酚氧化酶活性,PEG 胁迫引起 2 个品种甘蔗叶 POD 活性的降低,也可能与类黄酮的氧化分解代谢相关。

本研究的结果可为深入了解甘蔗抗旱能力与类黄酮以及相关酶参与的抗氧化反应之间的关系提供参考,但类黄酮以及相关酶在甘蔗抗旱中的作用机制比较复杂,相关研究还需进一步深入。

参考文献:

- [1] Li Y R. Research and development strategies to improve sugar productivity in China[C] // Li Y R, Solomon S. Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries. Beijing: China Agriculture Press, 2006:7-14.
- [2] Zgalai H, Steppe K, Lemeur R. Effects of different levels of water stress on leaf water potential, stomatal resistance, protein and chlorophyll content and certain anti-oxidative enzymes in tomato plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(6): 679-685.
- [3] Kranner I, Birtic S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance[J]. Integr Comp Bio, 2005, 45(5): 734-740.
- [4] Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2006, 4(3): 147-157.
- [5] Ithal N, Reddy A R. Rice flavonoid pathway genes: OsDfr and Os

Abs, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, OsC1-MYB[J]. Plant Science, 2004, 166(6): 1505-1513.

- [6] Tattini M, Galardi C, Rnelli P, et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of Ligustrum vulgare under excess light and drought stress[J]. New Phytologist, 2004, 163(3): 547-561.
- [7] Yang Y, He F, Yu L, et al. Influence of drought on oxidative stress and flavonoid production in cell suspension culture of Glycyrrhiza inflata Batal[J]. Journal of Biosciences, 2007, 62(5-6): 410-416.
- [8] 潘世明,陈义强,吴水金,等.甘蔗抗旱种质资源的筛选与评价[J].江西农业大学学报,2006,28(6): 838-844.
- [9] 周桂,邓光辉,梁达文.超声波法水提取山楂叶中黄酮的研究[J].西南农业大学学报,2005,27(5): 605-607.
- [10] 薛应龙.植物生理学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1985:191-192.
- [11] 李杨瑞.甘蔗组织中过氧化物酶活性及其与生长和工艺成熟的关系初探[J].广西农学院学报,1990,9(1): 13-18.
- [12] 杨丽涛,李杨瑞,莫家让.硝酸镧、混合稀土对甘蔗叶片多酚氧化酶和过氧化物酶活性的影响[J].广西农学院学报,1990,9(3): 80-84.
- [13] 欧阳光察,薛应龙.植物苯丙烷代谢的生理意义及调控[J].植物生理学通讯,1988,24(3): 9-16.
- [14] Fazeli F, Ghorbarli M, Nknam V. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(1): 98-103.
- [15] 蒋明义,郭绍川.水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J].植物生理学通讯,1996,32(2): 144-150.
- [16] 陈由强,朱锦慧,叶冰莹.水分胁迫对芒果(Mangifera indica L.)幼苗细胞活性氧伤害的影响[J].生命科学研究,2000,4(1): 60-64.
- [17] 王启明.干旱胁迫对大豆苗期叶片保护酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J].农业环境科学学报,2006,25(4): 918-921.
- [18] 毕会涛,黄付强,邱林,等.干旱胁迫对灰枣保护性酶活性及膜脂过氧化的影响[J].中国农学通报,2007,23(2): 151-153.
- [19] 应朝阳,吕亮雪,刘国道,等.干旱胁迫对多年生落花生生长和活性氧代谢的影响[J].热带作物学报,2006,27(1): 17-20.
- [20] 陈吉虎,余新晓,孙明高,等.北方旱区不同树种抗氧化酶活性变化及与抗旱性的关系[J].干旱地区农业研究,2006,24(5): 120-124.
- [21] 董永华,史吉平,周慧欣.6-BA 对小麦幼苗抗旱性的影响[J].植物营养与肥料学报,1999,5(1): 72-75.
- [22] 蔡娜,淡荣,陈鹏.水分胁迫对苦荞幼苗黄酮类物质含量的影响[J].西北农业学报,2008,17(4): 91-93.
- [23] 冯虎元,安黎哲,陈书燕,等.增强 UV-B 辐射与干旱复合处理对小麦幼苗生理特性的影响[J].生态学报,2002,(9): 1564-1567.
- [24] Lafuente MT, Sala J M, Zacarias L. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 3606-3611.

(下转第 203 页)

Impacts of the applied period and depth of desulfurized gypsum on improving the alkaline soil

XIAO Guo ju , LUO Cheng ke , ZHANG Feng ju , QIN Ping
(New Technology R & D Center , Ningxia University , Yinchuan , Ningxia 750021, China)

Abstract : A research on the period and depth of desulfurized gypsum being used in improving the alkalized soil is taken by applying desulfurized gypsum and planting oil sunflower on a piece of typical alkalized land in Xidatan of Ningxia . The experimental results show that applying desulfurized gypsum in different periods and depths has different effects on promoting the growth and yield of sunflower . If the desulfurized gypsum is applied in autumn other than in spring , the effect will be more distinct as the survival rate of sunflower seedlings can be improved by 21.2%~45.5% , and the yield can be increased by 16.2%~52.6% . If the desulfurized gypsum is deeply (25cm) applied other than shallowly (10cm) applied , the survival rate of sunflower seedlings and the yield can be respectively improved by 1.2%~5.4% and 1.2%~11.7% . When the desulfurized gypsum is applied in a different combination of period and depth , it will bring a different effect in improving the survival rate and yield . The effect on improving the growth of sunflower will be more distinct if the desulfurized gypsum is applied deeply in autumn , better than shallowly in autumn , deeply in spring or shallowly in spring . When it is applied deeply in autumn other than shallowly in autumn , deeply in spring or shallowly in spring , the survival rate of seedlings are respectively improved by 12.0% , 25.6% and 21.5% , and the yield are respectively improved by 14.4% , 32.7% and 29.9% . As the soil in Xidatan of Ningxia is deeply (25cm) ploughed in autumn after harvest and is watered in winter , it is recommended that the desulfurized gypsum shall be applied deeply in autumn to improve alkalized soil .

Key words : desulfurized gypsum ; alkaline soil ; period of application ; depth of application ; sunflower ; seedling rate ; yield

(上接第 188 页)

[25] Mayer A M . Polyphenol oxidases in plants and fungi : Going places ? [J] . *Phytochem* , 2006 , 67 (21) : 2318—2331 .

[26] 田国忠 , 李怀方 , 裴维蕃 . 植物过氧化物酶研究进展 [J] . 武汉植物学研究 , 2001 , 19 (4) : 332—344 .

[27] Badani M . De Basi M G , Felici M . Soluble peroxidase from winter wheat seedling with phenoloxidase activity [J] . *Hort Physiol* , 1999 , 92 : 489—494 .

Changes in flavonoids content and related enzyme activity of sugarcane leaves under PEG stress

ZHOU Gui ^{1,2,3,4} , LI Yang rui ^{1,3,4} , YANG Li tao ^{1,4} ,
WEI Xue xue ² , QU Pei ling ²

(1 . Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization , Guangxi University , Nanning 530005 , China ;
2 . College of Chemistry and Ecological Engineering , Guangxi University for Nationalities , Nanning 530006 , China ;
3 . Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab , Guangxi Academy of Agricultural Sciences , Nanning 530007 , China ;
4 . Sugarcane Research Center , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Nanning 530007 , China)

Abstract : The content of flavonoids and related enzyme activities in the young plants were studied in order to analyze the effect of PEG treatment on drought resistance of two sugarcane cultivars ROC22 and ROC16 . The results indicated as follows : PEG stress could decrease the content of flavonoids in ROC22 with high drought resistance , whereas the content of flavonoids in ROC16 with low drought resistance showed decreasing first and increasing later . During the course of PEG stress , the phenylalanine ammonia-lyase activity in ROC22 and ROC16 decreased for some time but increased afterwards . The polyphenol oxidase activity showed rising first and dropping later in ROC22 but always decreasing in ROC16 . The peroxidase activities in ROC22 and ROC16 decreased continuously .

Key words : sugarcane ; PEG stress ; flavonoids ; phenylalanine ammonia-lyase ; polyphenol oxidase ; peroxidase