

淹水对甜樱桃根系呼吸和糖酵解末端产物的影响

陈 强¹, 郭修武², 胡艳丽¹, 毛志泉^{1,2*}, 郝云红¹, 张玉帅¹, 王远征¹

(¹ 山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; ² 沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

摘 要: 以甜樱桃美早 (*Prunus avium* L.) /东北山樱桃 (*P. serulata* G. Don) 和美早/马哈利 (*P. mahaleb* L.) 为试材, 研究淹水过程中褐色木质根呼吸速率和糖酵解末端产物的变化。结果显示, 淹水过程中, 两种砧木根系呼吸速率呈下降趋势, 胁迫至 120 h 时, 东北山樱桃和马哈利的根系呼吸速率分别为淹水前的 73.86% 和 80.71%; 二者根系中乙醛和乙醇含量均呈升高趋势, 马哈利乙醛含量高于东北山樱桃, 而乙醇含量相反; 东北山樱桃丙酮酸含量先升后降, 马哈利变幅较小; 两种砧木乳酸和琥珀酸含量均呈先升后降趋势, 东北山樱桃乳酸、琥珀酸含量出现峰值早且含量大于马哈利; 苹果酸含量均呈下降趋势, 东北山樱桃下降幅度大于马哈利; 二者根系中丙氨酸含量均显著升高, 马哈利升幅大于东北山樱桃; 天冬氨酸和谷氨酸含量皆下降, 其中马哈利下降幅度大于东北山樱桃; 脯氨酸含量均先升后降, 马哈利的峰值延迟且含量更高。两种砧木对淹水胁迫反应存在差异, 东北山樱桃呼吸速率下降较快、细胞碱化能力弱, 表明其对淹水更敏感。

关键词: 甜樱桃; 淹水; 根系; 砧木; 呼吸; 糖酵解末端产物

中图分类号: S 662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 02-0169-06

Effects of Waterlogging on Respiration and Glycolytic End Products in Roots of Sweet Cherry

CHEN Qiang¹, GUO Xiu-wu², HU Yan-li¹, MAO Zhi-quan^{1,2*}, HAO Yun-hong¹, ZHANG Yu-shuai¹, and WANG Yuan-zheng¹

(¹ State Key Laboratory of Crop Biology, College of Horticultural Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ² College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Changes of respiratory rate and glycolytic end products in brown lignified roots of sweet cherry, Meizao (*Prunus avium* L.) /Dongbei Shanyingtao (*P. serulata* G. Don) and Meizao/Mahaleb (*P. mahaleb* L.), were studied under waterlogging conditions. The results indicated that root respiratory rate of two kinds of rootstocks, Dongbei Shanyingtao and Mahaleb, decreased gradually, and dropped to 73.86% and 80.71%, respectively, after treatment for 120 h. Content of acetaldehyde and ethanol increased obviously. The acetaldehyde content of Mahaleb was higher than that of Dongbei Shanyingtao, while the ethanol content was lower. The pyruvate content of Dongbei Shanyingtao increased initially and then decreased, but that of Mahaleb didn't change much. The content of lactate and succinate in roots of the two kinds of rootstocks increased at first and then decreased, and Dongbei Shanyingtao peaked earlier and higher than Mahaleb. The malate content of Dongbei Shanyingtao more than Mahaleb. The alanine content increased and Mahaleb was higher than that of Dongbei Shanyingtao. Contents of aspartate and glutamate decreased obviously and that of Meizao/Mahaleb decreased more. The proline content increased at first and then decreased, and Mahaleb reached the maximum later and proline content was much higher than that of Dongbei Shanyingtao. These results

收稿日期: 2007 - 11 - 06; 修回日期: 2008 - 01 - 07

基金项目: 山东省良种工程项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: mzhiquan@sdau.edu.cn)

suggested that the response of the two kinds of sweet cherry rootstocks to waterlogging was different. Since its respiratory rate decreased more rapidly, and intracellular alkalization ability was lower, Dongbei Shanyingtao is more sensitive to waterlogging than Mahaleb.

Key words: sweet cherry; waterlogging; root; rootstock; respiration; glycolytic end products

甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 抗涝性差是制约其生产的重要原因。已有研究表明: 在低氧或缺氧条件下, 植物根系中有许多糖酵解末端产物 (乙醛、乙醇、有机酸和氨基酸等) 积累 (Menegus et al, 1989; Waters et al, 1991; Good & Muench, 1993; Zhang & Greenway, 1994; Hisashi, 2000), 其中乙醛和乙醇对细胞有直接伤害作用 (Barclay & Crawford, 1981; Mizutani et al, 1982; Perata & Api, 1991; Nilsen & Orcutt, 1996; 陈立松和刘星辉, 2003), 乳酸、谷氨酸和天冬氨酸等引起细胞 pH 急降也可造成细胞伤害 (Roberts et al, 1984a, 1984b; Nilsen & Orcutt, 1996), 而丙氨酸、脯氨酸、 γ -氨基丁酸等则可以阻止细胞 pH 下降 (Nilsen & Orcutt, 1996; Ricoult et al, 2005)。

2001年和 2003年由于降雨偏多, 造成山东烟台地区大片甜樱桃受害, 甚至某些果园成片死亡 (韩文璞等, 2004), 破坏了正常的农业生产, 而研究淹水导致果树受害的原因, 尤其对甜樱桃根系影响的报道 (陈强等, 2007) 较少。作者以耐涝性有差异的两种甜樱桃砧木——东北山樱桃 (*P. sernulata* G. Don) 和马哈利 (*P. mahaleb* L.) 为试材, 探讨淹水过程中其根系呼吸速率和糖酵解末端产物变化的差异, 以加深对果树涝害生理的认识。

1 材料与方法

2006年 3月将分别嫁接在东北山樱桃和马哈利的 1年生美早甜樱桃植株定植于土壤为褐土的泥瓦盆中 (上口径 25 cm, 下口径 22 cm, 深 20 cm)。2006年 8月 7日选取长势基本一致的盆栽美早 / 东北山樱桃和美早 / 马哈利植株采用“双套盆法”进行淹水处理, 即将种有植株的泥瓦盆置于直径为 30 cm, 深 28 cm 的塑料桶内, 在塑料桶内加水至完全浸没盆土并保持水层距盆土表面 2 cm 左右。2株为 1小区, 3次重复, 分别在淹水 0、24、48、72、96、120 h 时取根样测定。

呼吸速率的测定参照毛志泉等 (2004) 和 Bouma 等 (2001) 的方法, 取长 3~5 cm、直径 1.5 mm 左右的褐色木质根 (下同), 测定时迅速称取 0.1 g 左右鲜样, 用双面刀将根切成 2 mm 左右根段, 放入反应杯, 加盖并启动测定程序, 反应杯中温度用恒温浴控制在 25℃。仪器采用英国 HANSA TECH 公司生产的液相 OxyLab 氧电极。

乙醛和乙醇的测定参照田世平 (2000) 的方法, 称取 1 g 左右根系鲜样, 用 1 mL 浓度为 20% TCA 冰浴研磨后置于青霉素小瓶中, 加盖密封。测定时先将样品置于 45℃ 热水浴中 1 h, 用注射器在瓶顶部抽取 0.5 mL 气样, 用装有 FD 的日本岛津 Shimadzu GC-9A 型气相色谱仪测定乙醛、乙醇含量。柱温 100℃, 检测温 200℃, 载气 N_2 和 H_2 流速 30 mL \cdot min⁻¹, 样品浓度采用外标法计算。

有机酸的测定参照赵尊行等 (1995) 的方法, 称取 3 g 左右根系冻样, 用 20 mL 80% 乙醇研磨, 转移至 50 mL 离心管中于 75℃ 下浸提 25 min, 然后于 1700 $\times g$ 离心 10 min, 转移上清液至 50 mL 容量瓶中, 同样条件分两次用 15 mL 80% 乙醇洗残渣, 再离心收集上清液, 合并, 定容至 50 mL。摇匀后取 6 mL 蒸干, 残渣用 2 mL 流动相溶解后经 0.22 μm 滤膜过滤, 移至 1.5 mL 离心管中保存备用。用美国 Waters 510 型高效液相色谱仪测定乳酸、丙酮酸、苹果酸和琥珀酸。波长 210 nm, 色谱柱为 ODS C18 反相柱, 检测器 Waters 2487, 用重蒸水配制的 18 mmol \cdot L⁻¹ KH_2PO_4 (pH 2.55) 过 0.22 μm 膜后作流动相, 流速 0.8 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30℃, 进样量 10 μL 。有机酸含量采用外标法计算。

氨基酸的测定参照 GB/T18246-2000, 采用氨基酸自动分析仪测定根系 (干样) 中丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和脯氨酸含量。干样制备: 将 3 g 左右根系置 105℃ 的烘箱内杀青 1 h, 80℃ 烘干至恒

质量以供测定。

试验数据采用 Duncan's 多重比较法 ($P < 0.05$) 研究同一砧木在不同淹水时间的差异显著性; 用 t 检验分析同一时间两种不同砧木间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 淹水对根系呼吸速率的影响

随淹水胁迫处理时间的延长, 两种砧木根系的呼吸速率均呈下降趋势 (图 1), 东北山樱桃淹水 24 h 即显著低于淹水前, 而马哈利在淹水胁迫 72 h 时才显著降低。淹水前东北山樱桃呼吸速率高于马哈利, 淹水胁迫至 48 h 时马哈利高于东北山樱桃, 之后东北山樱桃下降较快, 在淹水胁迫 72 h 时二者之间差异显著; 淹水胁迫至 120 h 时东北山樱桃为淹水前的 73.86%, 而马哈利为淹水前的 80.71%, 东北山樱桃下降幅度显著大于马哈利。

2.2 淹水对根系乙醛和乙醇含量的影响

淹水过程中, 两种砧木根系中乙醛和乙醇的含量均呈升高趋势, 显著高于淹水前 (图 2)。马哈利乙醛含量高于东北山樱桃 (淹水 96 h 时除外), 淹水胁迫至 24 h 时东北山樱桃乙醛含量为 $27.11 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 为淹水前的 60.24 倍, 而马哈利为 $62.84 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 是淹水前的 571.27 倍, 之后马哈利变化趋势变缓, 淹水胁迫至 120 h 时为 $88.36 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 是东北山樱桃的 1.18 倍。东北山樱桃乙醇含量高于马哈利, 淹水胁迫至 120 h 时为 $128.48 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 是同期马哈利的 1.36 倍。

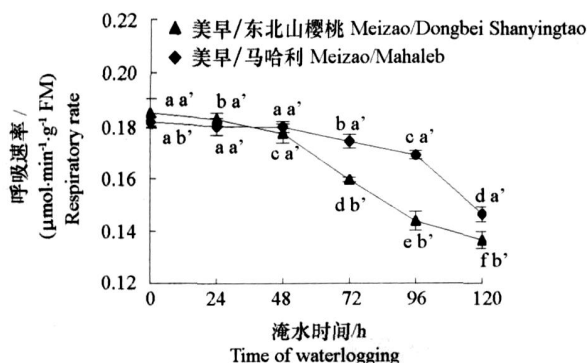


图 1 淹水对甜樱桃根系呼吸速率的影响
a ~ f 表示同一砧木在不同淹水时间上的差异显著性 ($P < 0.05$, 邓肯氏法); a', b' 表示同一时间两种砧木间的差异显著性。下同。

Fig. 1 Effect of waterlogging on respiratory rate in sweet cherry roots

a - f denote a rootstock statistical significance at different time of waterlogging ($P < 0.05$). a', b' denote two kind of rootstocks statistical significance at the same time of waterlogging. The same below.

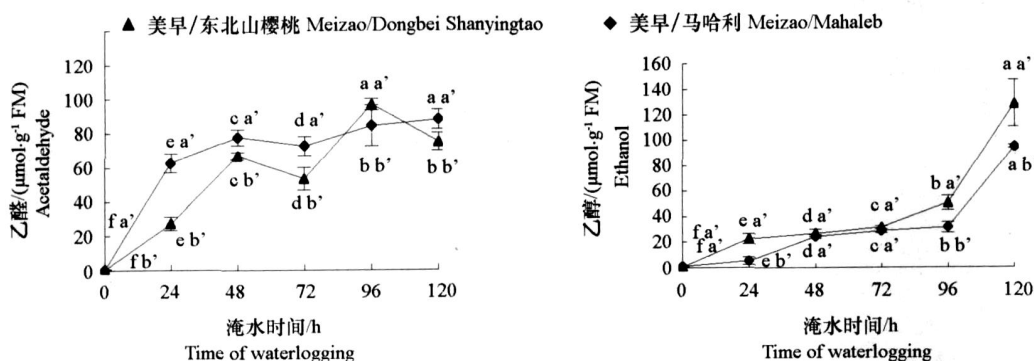


图 2 淹水对甜樱桃根系中乙醛和乙醇含量的影响

Fig. 2 Effect of waterlogging on the content of acetaldehyde and ethanol in sweet cherry roots

2.3 淹水对根系有机酸含量的影响

两种砧木根系中有机酸的累积存在显著差异 (图 3)。淹水胁迫过程中东北山樱桃丙酮酸含量变化较大, 至 48 h 时含量高达 $1.40 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 为淹水前的 23.33 倍; 而马哈利变化幅度较小。淹水过程中东北山樱桃乳酸含量亦呈现先上升后下降趋势, 至 48 h 时达最大值为 $0.44 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$, 之后

急剧下降;而马哈利在胁迫的前 72 h 乳酸含量变化平缓,至 96 h 时才达最大值为 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$,后略有下降。胁迫过程中两种砧木琥珀酸含量变化相似,均呈先升后降趋势,东北山樱桃变化幅度大于马哈利,且达峰值时间早。淹水使东北山樱桃苹果酸含量呈下降趋势,胁迫 120 h 时为 $1.76 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$,是淹水前的 32.47%;而马哈利在胁迫的前 72 h 变化不大,淹水 120 h 时降至 $2.11 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$,下降幅度显著小于东北山樱桃。

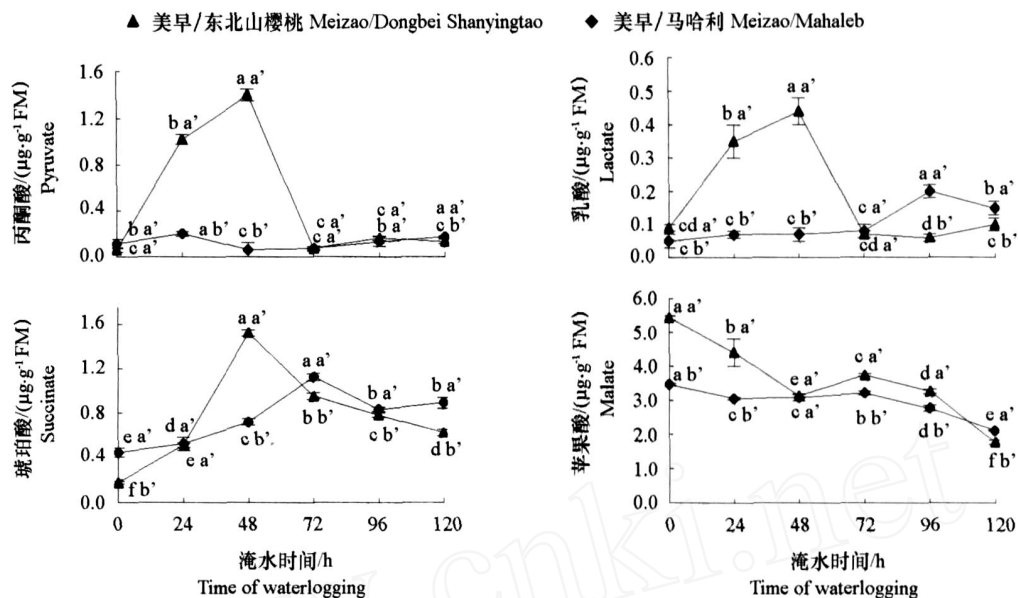


图 3 淹水对甜樱桃根系中有机酸含量的影响

Fig. 3 Effect of waterlogging on the content of organic acids in sweet cherry roots

2.4 淹水对根系氨基酸含量的影响

淹水胁迫过程中,两种砧木丙氨酸含量均呈上升趋势(图 4),胁迫 120 h,东北山樱桃丙氨酸含量为 1.01%,马哈利为 1.12%,马哈利丙氨酸含量大于东北山樱桃。

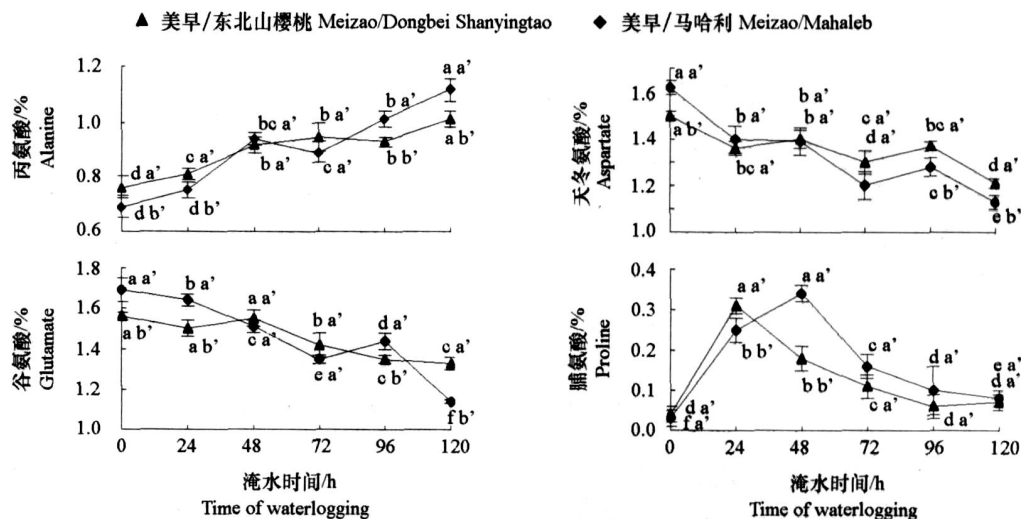


图 4 淹水对甜樱桃根系中氨基酸含量的影响

Fig. 4 Effect of waterlogging on the content of amino acids in sweet cherry roots

两种砧木根系天冬氨酸和谷氨酸含量随胁迫时间延长呈下降趋势 (图 4), 马哈利下降幅度均大于东北山樱桃, 胁迫至 120 h 时, 东北山樱桃天冬氨酸含量为淹水前的 80.67%, 而马哈利天冬氨酸含量为淹水前的 69.75%。

淹水胁迫后两种砧木根系中脯氨酸含量均呈先升后降趋势 (图 4), 东北山樱桃在胁迫 24 h 时达 0.31%, 为淹水前的 7.75 倍, 之后逐渐下降, 胁迫至 120 h 时为 0.07%, 仍高于淹水前; 而马哈利在淹水胁迫 48 h 时高达 0.34%, 为淹水前的 11.33 倍, 升幅大于东北山樱桃。

3 讨论

淹水处理过程中, 东北山樱桃根系呼吸速率下降幅度大于马哈利, 这可能由二者有机酸和氨基酸代谢不同造成的。东北山樱桃苹果酸含量在淹水过程中下降明显, 而丙酮酸含量在淹水 48 h 内明显升高, 推测苹果酸和丙酮酸可能存在转化, 因为苹果酸在苹果酸酶催化下转化为丙酮酸 (McMannon & Crawford, 1971), 之后丙酮酸含量迅速下降, 而乙醛、乙醇含量升高, 表明较多丙酮酸进入乙醇发酵途径, 造成呼吸底物消耗较多, 东北山樱桃呼吸速率下降较快, 因为呼吸底物的下降是降低呼吸速率的原因 (Saglio & Pradet, 1980)。马哈利根系中苹果酸和丙酮酸含量在淹水过程中整体变化不大, 表明马哈利可以较稳定地提供丙酮酸, 减缓了呼吸底物的消耗速率, 表现出呼吸速率下降较慢。此外, 乳酸的积累可引起细胞质酸化, 进而破坏液泡膜和线粒体结构 (Roberts et al, 1984a; Nilsen & Orcutt, 1996; 魏和平等, 2000), 而琥珀酸的合成能削弱细胞质酸化效果 (Menegus et al, 1989)。试验结果表明, 东北山樱桃在淹水前 48 h 与马哈利相比, 乳酸/琥珀酸比值较大, 表明细胞质酸化较重, 有可能对其细胞线粒体结构造成更严重的破坏, 这种破坏是否加剧了根系呼吸速率下降还需进一步研究。

已有研究表明, 丙氨酸合成途径与乳酸发酵途径竞争丙酮酸, 限制乳酸积累引起的细胞质酸化 (Ricoult et al, 2005)。同时, 丙氨酸、脯氨酸、 γ -氨基丁酸等含量增加以及谷氨酸、天冬氨酸及其酰胺的下降是细胞碱化过程的一部分 (陈立松和刘星辉, 2003)。本研究发现, 淹水过程中马哈利根系中丙氨酸含量上升幅度大于东北山樱桃, 能够更有效地减缓细胞质酸化, 减轻对线粒体的破坏。逆境条件下, 脯氨酸增加可保护酶和膜系统免受伤害, 增强植物的抗涝性 (王义强等, 2005)。从淹水 48 h 开始, 马哈利脯氨酸含量大于东北山樱桃, 表明脯氨酸能较大程度地保护马哈利酶和膜系统。天冬氨酸可转化为谷氨酸, 而谷氨酸又可转化为丙氨酸。本研究结果显示, 天冬氨酸和谷氨酸含量均下降, 与东北山樱桃相比, 马哈利下降幅度较大, 结合上面提到的丙氨酸含量变化趋势, 可知马哈利根系细胞能更好地通过减少酸性氨基酸积累和碱化作用减缓细胞质酸化, 从而减轻细胞受害程度。

生产实践中, 马哈利比东北山樱桃较耐涝, 本研究结果部分揭示了二者耐涝性差异的生理原因: 淹水过程中, 东北山樱桃呼吸速率下降幅度较大, 过早积累较多乳酸以及碱化能力弱, 导致细胞质酸化程度较重。

References

- Barclay A M, Crawford R M M. 1981. Temperature and anoxic injury in pea seedlings J Exp Bot, 32 (5): 943 - 949.
- Bouma T J, Yanai R D, Elkin A D, Hartmond U, Flores-Alva D E, Eissenstat D M. 2001. Estimating age-dependent costs and benefits of roots with contrasting life span: comparing apples and oranges New Phytologist, 150: 685 - 695.
- Chen Li-song, Liu Xing-hui. 2003. Fruit Stress Physiology Beijing: China Agricultural Press (in Chinese)
- 陈立松, 刘星辉. 2003. 果树逆境生理. 北京: 中国农业出版社.
- Chen Qiang, Guo Xiu-wu, Hu Yan-li, Li Jing, Gao Xiang-bin, Wang Chuang, Hao Yun-hong, Zhao Lin, Mao Zhi-quan. 2007. Effects of water-logging on anaerobic respiration enzymes and fermentation products in roots of two kinds of sweet cherry rootstocks Acta Ecologica Sinica, 27 (11): 4925 - 4931. (in Chinese)

- 陈 强, 郭修武, 胡艳丽, 李 静, 高相彬, 王 闯, 郝云红, 赵 林, 毛志泉. 2007. 淹水对两种甜樱桃砧木根系无氧呼吸酶及发酵产物的影响. 生态学报, 27 (11): 4925 - 4931.
- Good A G, Muench D G. 1993. Long-term anaerobic metabolism in root tissue: Metabolic products of pyruvate metabolism. Plant Physiol, 101 (4): 1163 - 1168.
- Han Wen-pu, Ma Li-zhi, Yang Xiu-guang, Shao Qiao-hong, Huang Shi-hai. 2004. The reasons and solutions of waterlogging causing sweet cherry hurt. Yantai Fruits, (2): 35. (in Chinese)
- 韩文璞, 马立直, 杨秀光, 邵巧红, 黄世海. 2004. 大樱桃受涝害原因与对策. 烟台果树, (2): 35.
- Hisashi Kato-Noguchi. 2000. Absciscic acid and hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of lettuce seedlings. J Exp Bot, 51 (352): 1939 - 1944.
- Mao Zhi-quan, Wang Li-qin, Shen Xiang, Shu Huai-rui, Zou Yan-mei. 2004. Effect of organic materials on respiration intensity of annual *Malus Hupehensis* Rehd. root system. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 10 (2): 171 - 175. (in Chinese)
- 毛志泉, 王丽琴, 沈 向, 束怀瑞, 邹岩梅. 2004. 有机物料对平邑甜茶实生苗根系呼吸强度的影响. 植物营养与肥料学报, 10 (2): 171 - 175.
- McMannon M, Crawford R M M. 1971. A metabolic theory of flooding tolerance: The significance of enzyme distribution and behaviour. New Phytologist, 70 (2): 299 - 306.
- Menegus F, Cattaruzza L, Chersi A, Fronza G. 1989. Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. Plant Physiol, 90 (1): 29 - 32.
- Mizutani F, Yamada M, Tomana T. 1982. Differential water tolerance and ethanol accumulation in *Prunus* species under flooded conditions. J Japan Soc Hort Sci, 51: 29 - 34.
- Nilsen E T, Orcutt D M. 1996. The physiology of plants under stress. New York: John Wiley & Sons.
- Perata P, Alpi A. 1991. Ethanol-induced injuries to carrot cells: The role of acetaldehyde. Plant Physiol, 95 (3): 748 - 752.
- Ricoult C, Cliquet J B, Linam I A M. 2005. Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume *Medicago truncatula* contribute to anoxia stress tolerance. Plant Physiol, 123 (1): 30 - 39.
- Roberts J K M, Callis J, Wemmer D, Walbot V, Jardetzky O. 1984a. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA, 81 (11): 3379 - 3383.
- Roberts J K M, Callis J, Jardetzky O, Walbot V, Freeling M. 1984b. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 81 (19): 6029 - 6033.
- Saglio P H, Pradet A. 1980. Soluble sugars, respiration, and energy charge during aging of excised maize root tips. Plant Physiol, 66: 516 - 519.
- Tian Shiping. 2000. Effects of ultra low O_2 treatment on ethanol, acetaldehyde and methanol contents in sweet cherries in low temperature storage. Plant Physiology Communications, 36 (3): 201 - 204. (in Chinese)
- 田世平. 2000. 冷藏条件下超低氧处理对甜樱桃果实中乙醇、乙醛和甲醇含量的影响. 植物生理学通讯, 36 (3): 201 - 204.
- Wang Yi-qiang, Gu Wen-zhong, Yao Shui-pan, Tang Long-ping, Jiang Shun-cun. 2005. Variation of the main biochemistry index of *Ginkgo* under flooding stress. Journal of Central South Forestry University, 25 (3): 78 - 80. (in Chinese)
- 王义强, 谷文众, 姚水攀, 唐隆平, 蒋舜村. 2005. 淹水胁迫下银杏主要生化指标的变化. 中南林学院学报, 25 (3): 78 - 80.
- Waters I, Morell S, Greenway H, Colmer D. 1991. Effects of anoxia on wheat seedlings. Influence of O_2 supply prior to anoxia on tolerance to anoxia, alcoholic fermentation and sugar levels. J Exp Bot, 42 (244): 1437 - 1447.
- Wei He-ping, Li Rong-qian, Wang Jian-bo. 2000. Ultrastructural changes in leaf cells of submerged maize. Acta Botanica Sinica, 42 (8): 811 - 817. (in Chinese)
- 魏和平, 利容千, 王建波. 2000. 淹水对玉米叶片细胞超微结构的影响. 植物学报, 42 (8): 811 - 817.
- Zhang Q, Greenway H. 1994. Anoxia tolerance and anaerobic catabolism of aged beetroot storage tissues. J Exp Bot, 45 (274): 567 - 575.
- Zhao Zun-hang, Sun Yan-hua, Huang Hua-cheng. 1995. Research of soluble sugars and organic acids in apple of Shandong. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition, 26 (3): 355 - 360. (in Chinese)
- 赵尊行, 孙衍华, 黄化成. 1995. 山东苹果中可溶性糖、有机酸的研究. 山东农业大学学报: 自然科学版, 26 (3): 355 - 360.