

# IAA、GA和 ABA对苹果果实山梨醇代谢相关酶活性的影响

单守明 王永章\* 董晓颖 刘成连 原永兵

(莱阳农学院果树分子及发育生物学实验室, 莱阳 265200)

**摘要:** 以‘新红星’苹果果实为试材, 采用果肉圆片孵育技术, 研究了 IAA、GA 和 ABA 对 SDH 和 SOX 活性的影响以及二者之间的相关性。结果表明: 苹果果实发育过程中 SOX 活性与 IAA、GA 和 ABA 含量间存在显著的负相关关系, 而 SDH 活性只与 GA 含量有显著的负相关关系。外源 IAA 和 GA 均显著诱导果实 SOX 活性增加, 对发育前期果实的诱导作用最为显著; ABA 仅对发育后期果实的 SOX 活性具有显著的诱导作用。果实发育前期和发育后期 SDH 活性受到外源 ABA 的显著激活; 而外源 IAA 仅提高发育前期果实的 SDH 活性。

**关键词:** 苹果; 激素; 山梨醇; 山梨醇脱氢酶; 山梨醇氧化酶

**中图分类号:** S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-0990-04

## Effects of IAA, GA and ABA on Activities of Related Enzymes of Sorbitol Metabolism in Developing Apple Fruit

Shan Shouming, Wang Yongzhang\*, Dong Xiaoying, Liu Chenglian, and Yuan Yongbing

(Laboratory of Molecular Developmental Biology of Fruit Trees, Laiyang Agricultural College, Laiyang 265200, China)

**Abstract:** The regulating effects of IAA, GA and ABA on activities of SDH and SOX were studied in the fruits of ‘Starkrimson’ apple through disk incubation technique. The results showed that the activities of SOX had significant negative correlation with the concentrations of IAA, GA and ABA during fruit developmental period. However, the activities of SDH only had significant negative correlation with GA contents. The results also indicated that exogenous IAA and GA highly increased the activities of SOX in apple fruit, especially to the fruit at early developmental period. Moreover, the exogenous ABA showed the highest regulating effects on SOX activity in the fruit at late developmental stage. On the other hand, exogenous ABA increased the SDH activity significantly, however, IAA only increased the activities of SDH.

**Key words:** Apple; Hormone; Sorbitol; Sorbitol dehydrogenase; Sorbitol oxidase

山梨醇作为苹果光合同化产物的主要运输形式<sup>[1, 2]</sup>, 在叶片中占可溶性总糖的 80%, 而在果实中仅占总糖的 3%~8%, 表明山梨醇可在果实内被迅速转化<sup>[2]</sup>。山梨醇脱氢酶 (SDH) 和山梨醇氧化酶 (SOX) 是参与山梨醇代谢的关键酶。其中 SDH 将山梨醇转化成果糖, SOX 将山梨醇氧化成葡萄糖<sup>[2, 3]</sup>。Archbold 的研究表明, 苹果果实的生长速率取决于果实获取山梨醇的能力以及山梨醇的转化效率<sup>[4]</sup>, 因此, SDH 和 SOX 对苹果果实的生长发育和品质的形成过程具有重要的调控作用<sup>[2, 4, 5]</sup>。但苹果果实发育过程中 SDH 和 SOX 活性变化的生理机制尚不清楚。鉴于碳水化合物从“源”(叶)到“库”(果实等)的运输、分配及其在库器官积累与代谢的各个环节都有激素的参与调控<sup>[6, 7]</sup>, 为阐明植物激素对山梨醇代谢相关酶的影响, 作者以‘新红星’苹果果实为试材, 采用果肉圆片试验体系, 对 IAA、GA 和 ABA 与山梨醇代谢之间的关系进行了探讨与分析。

收稿日期: 2004-12-27; 修回日期: 2005-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270920, 03-2-JZP-8); 山东省自然科学基金项目 (6620250); 教育部研究课题 (02086)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangyzh304@tom.com)

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

试验于 2002 ~ 2003 年在莱阳农学院果树实验中心进行。以 ‘新红星’ 苹果 (*Malus domestica* Borkh ‘Starkrimson’) 为试材, 从花后开始每 15 d 取样 1 次, 直到果实成熟。每次随机取 10 个果实, 果肉用液氮速冻后置 -80 °C 超低温冰箱贮存备用。

## 1.2 外源激素孵育果肉圆片试验

果肉圆片试验参照 Beruter 等的方法<sup>[8]</sup>略有改动。将花后 50 d 和 100 d 的果实分割成直径 1.0 cm, 厚 0.1 cm 的圆片, 在平衡缓冲液 (MES 50 mmol · L<sup>-1</sup>, pH 5.5, 含 CaCl<sub>2</sub> 5 mmol · L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 5 mmol · L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol · L<sup>-1</sup>, 维生素 C 5 mmol · L<sup>-1</sup> 和甘露醇 200 mmol · L<sup>-1</sup>) 中平衡 30 min 后进行外源激素孵育试验。取 5 g 果肉圆片与 20 mL 平衡缓冲液 (分别加入 IAA 50 mg · L<sup>-1</sup>、GA 50 mg · L<sup>-1</sup> 和 ABA 50 μmol · L<sup>-1</sup>) 混合, 放入 50 mL 的三角瓶中, 在摇床上振荡反应 16 h (25 °C), 测定 SDH 和 SOX 的活性。所有处理均重复 3 次。

## 1.3 酶液的制备及活性测定

称取 1 g 果肉于研钵内, 加少量石英砂和 HEPES 提取缓冲液 5 mL (HEPES-NaOH 50 mmol · L<sup>-1</sup>, pH 7.5, 含 MgCl<sub>2</sub> 10 mmol · L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol · L<sup>-1</sup>, DTT 2.5 mmol · L<sup>-1</sup>, 维生素 C 10 mmol · L<sup>-1</sup> 和不溶性 PVPP 5%), 冰浴研磨匀浆, 12 000 ×g (4 °C) 离心 20 min。上清液用稀释 10 倍的提取缓冲液 (不含 PVPP) 透析 15 h 用于山梨醇脱氢酶 (SDH) 和山梨醇氧化酶 (SOX) 活性的测定<sup>[5]</sup>, 以 NADP μmol · h<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup> FM 表示 SDH 活性, 以 glucose μmol · h<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup> FM 表示 SOX 活性。

## 1.4 激素含量的测定

果实内源激素的测定参照吴颂如等<sup>[9]</sup>的方法。ELISA 试剂盒由中国农业大学化控研究室提供。

# 2 结果与分析

## 2.1 苹果果实发育过程中山梨醇代谢相关酶活性及激素含量的变化

图 1 表明, 在苹果果实的发育前期, 参与山梨醇代谢相关酶 (SDH 和 SOX) 的活性均较低。从花后 45 d 开始, SDH 活性增加显著, 到花后 75 d, SDH 活性达到最高, 之后又迅速下降。从花后 105 d 开始, SDH 活性又有所增加, 之后继续下降, 直至果实成熟。与 SDH 的活性变化相比, 在整个发育过程中 SOX 活性的变化幅度较小。在发育前期, SOX 与 SDH 活性差异不显著。从花后 45 d 开始, SOX 活性缓慢上升, 到花后 120 d 达到最大值, 但显著低于 SDH 的活性。

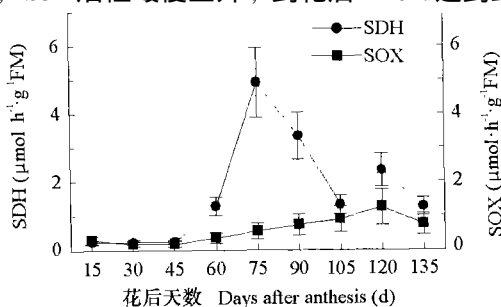


图 1 新红星苹果果实发育过程中山梨醇脱氢酶 (SDH) 和山梨醇氧化酶 (SOX) 活性的变化

Fig. 1 Changes of SDH and SOX activities in developing ‘Starkrimson’ apple fruits

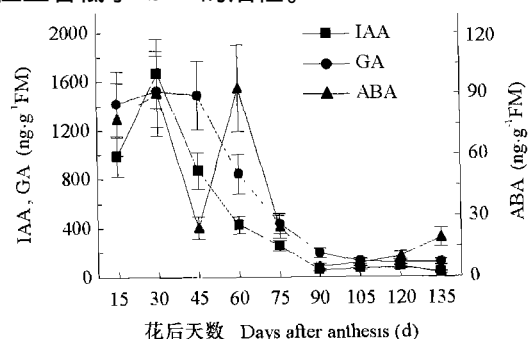


图 2 新红星苹果果实发育过程中 IAA、GA 和 ABA 含量的变化

Fig. 2 Changes of IAA, GA and ABA contents in developing ‘Starkrimson’ apple fruit

从图 2 可以看出, 果实发育早期 GA 含量较高。随着果实的发育, 其含量逐渐下降, 但始终高于 IAA 和 ABA 的含量。IAA 的变化规律与 GA 类似, 在花后 30 d 含量达到最高, 之后逐渐下降, 到果

实成熟时降到最低值。纵观果实发育全过程，ABA含量最低。ABA与IAA和GA的变化规律相类似，也是在果实发育前期含量较高，随着果实的发育其含量逐渐下降，在花后60 d，ABA有一显著的增高高峰，从花后105 d开始，ABA含量又有所增加。

2.2 苹果果实发育过程中山梨醇代谢相关酶活性与激素含量间的相关性

从表1可以看出：苹果果实发育过程中，SDH的活性变化与IAA和ABA含量间不存在显著相关关系，与GA间存在显著的负相关关系。

在果实整个发育过程中，SOX的活性变化与IAA、GA和ABA间都存在显著负相关关系，由此表明植物激素参与调控苹果果实中山梨醇的代谢。其中以GA和IAA与SOX间的相关性最高，相关系数分别为-0.8890和-0.7860，均达到极显著水平。而ABA与SOX间也存在显著的负相关关系。

表1 新红星苹果果实发育过程中激素含量与山梨醇代谢相关酶活性间的相关性

Table 1 Correlation and linear analysis of hormone contents and activities of related enzymes of sorbitol metabolism in developing 'Starkrimson' apple fruit

激素 Hormone	山梨醇脱氢酶 Sorbitol dehydrogenase (SDH)		山梨醇氧化酶 Sorbitol oxidase (SOX)	
	直线回归方程 Linear regression	相关系数 Correlation coefficient	直线回归方程 Linear regression	相关系数 Correlation coefficient
脱落酸 ABA	y = 2.5172 - 0.0214x	- 0.4924	y = 0.8456 - 0.0069x	- 0.7091 *
吲哚乙酸 IAA	y = 2.5175 - 0.0017x	- 0.5996	y = 0.8057 - 0.0006x	- 0.7860 * *
赤霉素 GA	y = 2.7902 - 0.0016x	- 0.6362 *	y = 0.9286 - 0.0005x	- 0.8890 * *

2.3 IAA、GA和ABA对苹果果实山梨醇氧化酶和山梨醇脱氢酶活性的影响

分别用IAA 50 mg · L<sup>-1</sup>、GA 50 mg · L<sup>-1</sup>和ABA 50 μmol · L<sup>-1</sup>孵育果肉圆片16 h诱导SOX活性发生变化，但不同激素间存在差异。从图3中可以看出，IAA和GA显著提高发育前期苹果果实的SOX活性，与对照相比，其活性分别增加了9.00倍和6.50倍。而ABA处理与对照相比，差异不显著。对于发育后期的苹果果实，IAA、GA和ABA处理均促进SOX活性的增加，但以ABA的诱导作用最为显著，与对照相比，其活性增加了1.82倍；而IAA和GA处理，其活性仅分别增加了0.69倍和1.29倍。

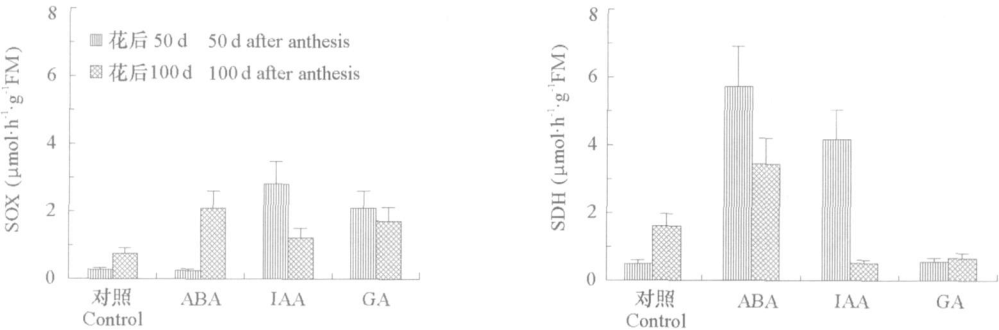


图3 外源IAA、GA和ABA对不同发育时期新红星苹果果实山梨醇氧化酶(SOX)和山梨醇脱氢酶(SDH)活性的影响

Fig. 3 Effects of exogenous IAA, GA and ABA on activity of sorbitol oxidase (SOX) and sorbitol dehydrogenase (SDH) in 'Starkrimson' apple fruit at different developmental period

与SOX的活性变化规律不同，SDH活性只受到IAA和ABA的调控。对于发育前期和发育后期的苹果果实，其SDH活性均不受GA的调节，与对照相比，二者间的活性差异不显著。发育前期的苹果果实，其SDH活性受到ABA和IAA的显著激活，与对照相比，其活性分别增加了10.49倍和7.35倍，差异极显著。而发育后期的苹果果实，其SDH活性只受ABA的调控，与对照相比，其活性增加了1.13倍，IAA处理与对照相比，差异也不显著。

3 讨论

在苹果的年生长发育周期中，叶片和果实中的山梨醇含量呈现一定的季节性变化，幼叶中山梨醇

的含量较低,成熟叶中较高,老叶中的含量又急剧下降<sup>[2, 10]</sup>。随着果实的发育与成熟,果实中的山梨醇含量也逐渐降低<sup>[2, 3]</sup>。由图 1可以看出,在果实发育前期,SDH和 SOX的活性都较低,可能原因在于:发育早期,幼叶以生长发育为主,其自身的光合能力较弱,所以合成与外运到果实中的山梨醇较少。同时,发育早期的幼果又是主要的代谢库,需要大量的碳水化合物,而山梨醇可作为代谢基质用于呼吸代谢、细胞分裂和细胞形成<sup>[2]</sup>。随着果实的生长发育和品质形成,需要碳水化合物的不断供给,多数叶片在此期也发育成为代谢源<sup>[10]</sup>。苹果“源(叶片)-库(果实)”关系的建立,从叶片转运来的山梨醇在糖代谢相关酶的作用下转化成暂时性贮存物(淀粉),维持了果实的库强,保证了光合同化产物从源叶向果实的不断输入。而代谢库(果实)对山梨醇需求量的增加,导致山梨醇的卸载能力增强,所以,在果实的发育中期,SDH和 SOX活性逐渐升高,其中 SDH活性的增加最为显著,这与苹果果实中果糖含量的增加是相关联的<sup>[3]</sup>。而在果实的发育后期,随着果实的成熟和果实内积累淀粉的大量水解,导致果实的库强相对变弱,随之这两种酶的活性均有所下降。

本试验采用外源激素孵育果肉圆片技术进行了研究,结果表明:外源激素参与调控 SOX的活性(图 3)。在果实的发育前期,IAA和 GA显著提高 SOX的活性。由于发育前期果实中 IAA和 GA的相对含量较高,果实的细胞分裂和细胞形成需要较多的葡萄糖作为代谢底物或用于形态建成,IAA和 GA诱导 SOX活性的升高以适应细胞代谢的需要。在果实的发育后期,由于 IAA和 GA含量的急剧下降,所以对 SOX活性的调控相对减弱。在整个生长发育过程中,SOX的活性较低且变幅较小,可能不是果实中山梨醇代谢的关键酶,这与 Yamaki等在元帅苹果上的研究结果<sup>[3]</sup>一致。本试验结果表明,SDH的活性只受 IAA和 ABA的影响。ABA作为果实成熟的信号调控因子,在果实糖代谢中具有重要的调控作用<sup>[6, 11]</sup>。发育后期果实 ABA含量的相对增加,提高了 SOX和 SDH的活性,有利于促进山梨醇向葡萄糖和果糖的转化。激素调控苹果果实山梨醇代谢的具体生理机制正在深入的研究之中。

#### 参考文献:

- 1 Benuter J. Sugar accumulation and changes in the activities of related enzymes during development of apple fruit. *Journal of Plant Physiology*, 1985, 121: 331 ~ 334
- 2 周 睿,束怀瑞. 高等植物中的山梨醇及其代谢. *植物生理学通讯*, 1993, 29 (5): 384 ~ 390  
Zhou R, Shu H R. Sorbitol and its metabolism in higher plant. *Plant Physiology Communications*, 1993, 29 (5): 384 ~ 390 (in Chinese)
- 3 Yamaki S, Ishiwaka K. Role of four sorbitol related enzymes and invertase in the seasonal alteration of sugar metabolism in apple tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1986, 111 (1): 134 ~ 137
- 4 Archbold D D. Carbohydrate availability modifies sorbitol dehydrogenase activity of apple fruit. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105: 391 ~ 395
- 5 Benuter J, Feusi M E. The effect of gridling on carbohydrate partitioning in the growing apple fruit. *Journal of Plant Physiology*, 1997, 151: 277 ~ 285
- 6 夏国海,张大鹏,贾文锁. IAA、GA和 ABA对葡萄果实<sup>14</sup>C蔗糖输入与代谢的调控. *园艺学报*, 2000, 27 (1): 6 ~ 10  
Xia G H, Zhang D P, Jia W S. Effects of IAA, GA and ABA on <sup>14</sup>C-sucrose import and metabolism in grape berries. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27 (1): 6 ~ 10 (in Chinese)
- 7 张大鹏,许雪峰,张子连,贾文锁. 葡萄果实始熟机理的研究——缓慢生长期外施激素和环剥的效应. *园艺学报*, 1997, 24 (1): 1 ~ 7  
Zhang D P, Xu X F, Zhang Z L, Jia W S. Studies on the veraison mechanisms: physiological and biochemical responses of grape berries to exogenous hormone treatment and girdling during the lag phase of berry growth. *Acta Horticulturae Sinica*, 1997, 24 (1): 1 ~ 7 (in Chinese)
- 8 Benuter J, Monika E, Feusi S. Comparison of sorbitol transport in excised tissue discs and cortex tissue of intact apple fruit. *Plant Physiology*, 1995, 146: 95 ~ 102
- 9 吴颂如,陈婉芬,周 燮. 酶联免疫法(ELISA)测定内源植物激素. *植物生理学通讯*, 1988, 5 (1): 53 ~ 57  
Wu S R, Chen W F, Zhou X. Determination the inner plant hormone with ELISA method. *Plant Physiology Communications*, 1988, 5 (1): 53 ~ 57 (in Chinese)
- 10 Loescher W H, Marlow G C, Kennedy R A. Sorbitol metabolism and sink-source inter conversions in developing apple. *Plant Physiology*, 1982, 70: 335 ~ 339
- 11 Benuter J. Effect of abscisic acid on sorbitol uptake in growing apple fruits. *Journal of Experimental Botany*, 1983, 34: 737 ~ 743