

低温胁迫下肋果沙棘试管苗黄酮类化合物合成关键酶的活性

张宏涛, 陈 纹, 李小伟, 苏 雪, 孙 坤

(西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要:以青藏高原特有植物肋果沙棘试管苗为试材,研究了 4℃低温胁迫(0~72 h)对其叶片黄酮类化合物合成关键酶苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸 4-羟基化酶(C4H)及 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)活性的影响。结果表明:短期的低温胁迫显著影响肋果沙棘试管苗叶片 PAL、C4H 和 4CL 的活性。胁迫初期, PAL 和 C4H 活性波动较大, PAL 活性在 12 h 达到最高值, 24 h 时活性最低, 比对照降低了 63.514%, 之后其活性逐渐恢复; C4H 活性在处理 12 h 时降到最低, 此后逐渐升高, 72 h 时其活性是对照的 447.2%; 4CL 活性在胁迫 6 h 时达到最高值, 比对照高出了 36.285%, 之后缓慢下降并最终低于对照。肋果沙棘试管苗叶片 PAL、C4H 和 4CL 以不同的方式对低温胁迫进行了响应, 苯丙烷类代谢被激活, 调控黄酮类等次生代谢物质的合成。

关键词:肋果沙棘(*Hippophae neurocarpa*); 试管苗; 低温胁迫; PAL; C4H; 4CL; 酶活性

中图分类号:S 793.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)10-0005-04

苯丙烷代谢途径是植物黄酮类化合物等次生代谢产物最重要的合成途径之一。研究发现有多种酶参与黄酮类化合物合成上游苯丙烷类代谢途径, 主要有苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸 4-羟基化酶(C4H)及 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(ChS)等, 且苯丙烷类代谢酶系可通过调控次生代谢物质合成来调节植物对逆境的适应性反应^[1]。已有研究证实 PAL、C4H 和 4CL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶^[2-4], 可有效调节与之相应的黄酮类化合物等次生代谢产物的合成^[1,5]。这些酶的活性易受温度等环境因子的影响^[6-7], 其活性可以作为植物抗性的一个生理指标^[1]。近年来, 有关苯丙烷类代谢途径产生的黄酮类化合物及相关酶活性对逆境胁迫响应的研究已受到广泛关注^[1,6-7]。肋果沙棘(*Hippophae neurocarpa*)属胡颓子科沙棘属落叶灌木或小乔木, 为一个仅生长在青藏高原高海拔地区的类群, 是群落演替的先锋物种, 各器官中均富含黄酮类化合物^[8], 具有重要的生态和经济价值; 该地区气候寒冷, 年平均气温低于 5℃。研究表明, 植物的次生代谢产物在

提高其自我保护、协调与环境关系和生存竞争能力上充当着重要的角色^[9-10]。但迄今为止, 沙棘黄酮类化合物合成代谢途径关键酶活性对低温等环境胁迫响应机制的研究尚鲜见报道。鉴于此, 以青藏高原特有植物肋果沙棘(*H. neurocarpa*)试管苗为试材, 研究低温胁迫对其叶片黄酮类化合物合成关键酶 PAL、C4H 和 4CL 活性的影响, 以期对低温环境下肋果沙棘黄酮类化合物代谢及其响应低温环境的机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将肋果沙棘种子去皮后用 70% 的酒精浸泡 2 min, 2% 的次氯酸钠消毒 30 min, 无菌水冲洗 5 次后放在培养皿中, 并置于光照培养箱(20℃、光周期 12 h、光强 2 000 lx)中培养。7 d 后根长 2 cm 左右时接种于 MS+0.5 mg/L 6-BA 培养基中诱导丛生芽, 继代培养接种于 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IAA+30 g/L 蔗糖+7.8 g/L 琼脂, pH 5.8, 150 mL 广口三角瓶中进行试管苗丛生芽增殖培养, 每隔 15 d 左右继代 1 次, 继代 3~4 次后, 试管苗作为供试材料用于试验。

1.2 试验方法

选择大小一致、长势旺盛、苗龄 60 d 的肋果沙棘试管苗置于 4℃进行低温胁迫, 胁迫时间分别为 6、12、24、48、72 h(72 h 时试管苗生长已出现一定的受损现象), 收集不同胁迫时间段的叶片进行 PAL、C4H 和 4CL 活性

第一作者简介:张宏涛(1986-), 男, 硕士研究生, 研究方向为逆境植物进化与发育。

责任作者:陈纹(1978-), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向为植物分子遗传学。E-mail: skychw@nwnu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30160046, 30960029)。

收稿日期:2015-01-22

的测定。以 20℃ 条件下培养的肋果沙棘试管苗叶片为对照组。

1.3 项目测定

1.3.1 PAL 活性的测定 PAL 活性测定参照文献[7]方法并改进。称取肋果沙棘新鲜叶片 0.2 g, 加入少许石英砂研碎, 加入 0.1 mol/L pH 8.8 硼酸缓冲液(10% 甘油、巯基乙醇 5 mmol/L、1 mmol/L EDTA) 2 mL, 在冰浴中研磨匀浆, 匀浆于 4℃ 下 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液用于酶活力检测。反应液包括上清液 0.1 mL, 3 mL 0.02 mol/L 苯丙氨酸缓冲液, 对照不加苯丙氨酸缓冲液。混匀后于 45℃ 恒水浴中反应 30 min, 加入 6 mol/L 盐酸溶液 0.5 mL 终止反应。在 290 nm 处测定吸光度 OD 值。以每小时每毫升酶液在 290 nm 处吸光度变化 0.1 OD 所需的酶量为 1 个酶活单位 U(相当于 1 mL 反应混合物形成 1 μg 肉桂酸)。

1.3.2 C4H 和 4CL 活性的测定 C4H 和 4CL 活性测定参照陈雷等[7]的方法。

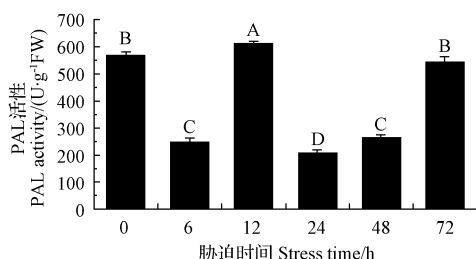
1.4 数据分析

所有试验均重复 3 次, 数据统计分析和作图由 SPSS 21.0 和 Originpro 7.5 软件完成, 用 Duncan 多重比较法进行差异显著性检验, 检验显著性水平为 0.01。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对 PAL 活性的影响

低温胁迫对肋果沙棘试管苗叶片中黄酮类化合物合成代谢途径中的关键酶 PAL 活性有较大的影响。胁迫初期(0~24 h) PAL 活性波动很大(图 1)。胁迫处理 6 h 时, PAL 活性较对照下降了 56.373%, 胁迫 12 h 时, 其活性较对照升高了 7.764%, 处理 24 h 时 PAL 活性最低, 是对照的 36.486%, 此后随胁迫时间延长 PAL 活性逐渐恢复。结果说明, 短期的低温胁迫明显影响肋果沙棘试管苗 PAL 活性, 随胁迫时间延长, 苯丙烷代谢激活, PAL 活性升高。



注: 图中不同大写字母代表极显著性差异结果($P < 0.01$), 下同。

Note: The different capital letters show very significant difference at 0.01 level, the same as below.

图 1 低温胁迫下肋果沙棘试管苗 PAL 活性

Fig. 1 The activity of PAL in *H. neurocarpa* under low temperature

2.2 低温胁迫对 C4H 活性的影响

低温胁迫对肋果沙棘试管苗叶片 C4H 活性影响较为明显。在胁迫初期, C4H 活性波动较大(图 2)。其中, 胁迫处理 6 h 时 C4H 的活性显著增强, 较对照升高了 138.514%, 胁迫 12 h 时 C4H 活性最低, 比对照降低了 38.562%, 之后随胁迫时间的增加, C4H 活性迅速提高, 并且持续增加, 胁迫 72 h 时 C4H 活性达到最高, 是对照的 447.2%。说明 C4H 对低温胁迫进行了快速积极的响应, 在肋果沙棘响应低温胁迫中充当了的重要角色。

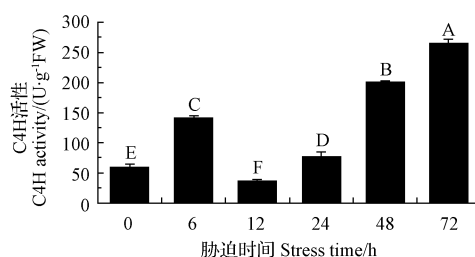


图 2 低温胁迫下肋果沙棘试管苗 C4H 活性

Fig. 2 The activity of C4H in *H. neurocarpa* under low temperature

2.3 低温胁迫对 4CL 活性的影响

低温胁迫明显影响了肋果沙棘试管苗叶片中黄酮类化合物合成代谢途径中的关键酶 4CL 的活性。随着胁迫时间的增加, 4CL 活性呈先上升后下降的趋势。在胁迫处理 6 h 时, 4CL 活性达到最大值, 与对照相比差异极显著, 比对照高出了 36.285%, 此后 4CL 活性开始缓慢下降并最终低于对照(图 3)。说明肋果沙棘试管苗叶片中 4CL 对低温胁迫不敏感, 短时间(0~12 h)的低温胁迫使其活性显著增加, 但较长时间(24~72 h)的低温胁迫则在一定程度上抑制了其活性。

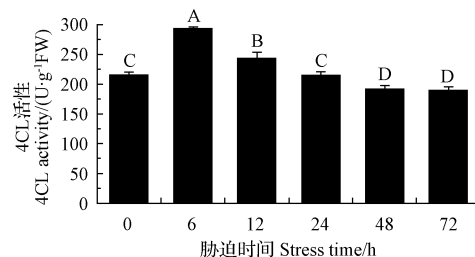


图 3 低温胁迫下肋果沙棘试管苗 4CL 活性

Fig. 3 The activity of 4CL in *H. neurocarpa* under low temperature

3 讨论

在黄酮类化合物合成代谢过程中, 酶的研究十分踊跃。其中 PAL、C4H 和 4CL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶[2-4], 催化植物体内多种具有防御功能的黄酮类等次生代谢产物的合成[11-13]。多数植物在遭受寒冷、伤害、紫外辐射、干旱等逆境时, 防卫系统特别是苯丙烷类

代谢会被激活,表现为 PAL、C4H 和 4CL 等关键酶活性的升高^[6,13-18],并且伴随着体内黄酮类化合物等次生代谢产物含量的增加^[12,16-18]。PAL、C4H 和 4CL 活性受到抑制,类黄酮含量下降^[17]。因此,PAL、C4H 和 4CL 活性可以作为评价植物抗逆境能力的相关生理指标^[1]。

青藏高原年均气温低于 5℃,低温是其主要的环境因子之一。该研究显示,短期的低温胁迫显著影响肋果沙棘试管苗叶片 PAL、C4H 和 4CL 的活性,但 3 种酶活性的变化规律存在很大差异。Carolyn 等^[19]认为 PAL 是黄酮类化合物合成代谢途径最关键的限速酶,对合成代谢途径非常关键^[20],PAL 活性下降的同时,植物对逆境的抗性降低^[12]。祁连圆柏和圆柏在低温季节具有较高的 PAL 活性^[15]。而对红叶芥的研究发现,在 8℃低温胁迫处理前期(2~10 h)PAL 活性下降,在处理约 24 h 后其活性迅速上升,PAL 基因表达也呈现出先降后升的趋势^[21]。肋果沙棘试管苗与红叶芥类似:低温胁迫明显影响肋果沙棘试管苗 PAL 活性,胁迫初期(0~24 h),试管苗叶片 PAL 活性波动较大,之后随胁迫时间延长,PAL 活性逐渐升高,并且最终与对照没有明显差异。说明不同植物中 PAL 酶对低温胁迫的响应方式存在差异。此外,有研究表明,5℃/15℃的变温处理提高了银杏叶片 PAL 活性^[7];但黄芩种子在萌发过程中 15℃低温胁迫下 PAL 活性比室温处理低^[22]。由此可见,PAL 酶在不同温度下活性存在差异。

C4H 是催化苯丙氨酸途径的第 2 步反应,将反式肉桂酸催化生成对-香豆酸。当植物受到外界环境胁迫时,C4H 活性上升,进而产生更多的木质素等能够减少外界不良环境对植物组织造成伤害的物质,以保护植物组织^[14]。对银杏的研究发现,低温处理显著提高了银杏叶片 C4H 活性并影响了类黄酮的积累^[7,17]。肋果沙棘试管苗在低温胁迫 6 h 时 C4H 的活性显著增强,12 h 时其活性降到最低,之后随胁迫时间的增加,其活性迅速增加,且相比对照均有大幅提高。说明肋果沙棘在 4℃低温下,苯丙烷类代谢中 C4H 途径被激活,C4H 活性增加,对低温胁迫进行了快速积极的响应,在肋果沙棘苯丙烷类代谢中充当响应低温胁迫的重要角色。

4CL 是苯丙烷类化合物生物代谢总途径中最后一个酶,直接控制着黄酮类次生代谢物质的合成^[23]。对玉米的研究发现,10℃时玉米幼苗 4CL 的基因转录水平在前 6 h 大幅增加^[24];低温胁迫下枇杷果肉和银杏叶片中 4CL 的活性均呈先升后降的趋势^[6-7,17]。肋果沙棘试管苗在低温胁迫前 6 h 叶片 4CL 活性显著升高,之后缓慢降低并最终低于对照。以上结果均表明,4CL 在胁迫初期活性升高,但较长时间的低温胁迫则在一定程度上抑制了其活性。

可见,当肋果沙棘试管苗受到低温胁迫时,PAL、

C4H 和 4CL 这 3 种酶以不同的方式对低温胁迫进行了响应,苯丙烷类代谢被激活,调控黄酮类等次生代谢产物的合成。下一步课题组将围绕低温胁迫下肋果沙棘试管苗黄酮类化合物代谢进行研究。

参考文献

- [1] 陈建业. 葡萄酒中酚酸及葡萄果实苯丙烷类代谢途径研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [2] Brenda W S. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways[J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 107(1): 142-149.
- [3] Weisshaar B, Jenkins G L. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation[J]. *Current Opinion in Biology*, 1998, 1(3): 251-257.
- [4] 诸姮, 胡宏友, 卢昌义. 植物体内的黄酮类化合物代谢及其调控研究进展[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2007, 46(1): 136-143.
- [5] 李莉, 赵越, 马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、C4H、4CL 研究新进展[J]. *生物信息学*, 2006, 5(4): 187-189.
- [6] 吴锦程, 唐朝晖, 陈群, 等. 不同贮藏温度对枇杷果肉木质化及相关酶活性的影响[J]. *武汉植物学研究*, 2006, 24(3): 235-239.
- [7] 陈雷, 常丽, 曹福亮, 等. 银杏叶黄酮类化合物含量及相关酶活性对温度和干旱胁迫的响应[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(4): 755-762.
- [8] Rongsen L. Flavonoids content in berries and leaves of *Seabuckthorn* (*Hippophae* ssp.) [J]. *Acad J Med Plants*, 2013, 1(7): 122-136.
- [9] 汪贵斌, 郭旭琴, 常丽, 等. 温度和土壤水分对银杏叶黄酮类化合物积累的影响[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(11): 3077-3083.
- [10] 阎秀峰, 王洋, 李一蒙. 植物此生代谢及与环境的关系[J]. *生态学报*, 2007, 27(6): 2554-2562.
- [11] Zhao J, Davis L C, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites[J]. *Biotechnology Advances*, 2005, 23(4): 283-333.
- [12] Solecka D, Kacperska A. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold[J]. *Physiology Plant*, 2003, 119(2): 253-262.
- [13] Sgarbi E, Fornasiero R B, Lins A P, et al. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf[J]. *Plant Science*, 2003, 165(5): 951-957.
- [14] 金丽萍, 崔世茂, 杜金伟, 等. 干旱胁迫对不同生态条件下蒙古扁桃叶片 PAL 和 C4H 活性的影响[J]. *华北农学报*, 2009, 24(5): 118-122.
- [15] 简启亮, 文晓英, 陈拓, 等. 祁连圆柏和圆柏色素含量及其花青苷合成酶活性的季节性变化[J]. *植物学报*, 2010, 45(6): 698-704.
- [16] Janas K M, Cvikrova M, Palagiewicz A, et al. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2000, 38(7): 587-593.
- [17] 常丽. 温度和土壤水分对银杏叶类黄酮合成的影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
- [18] Dixon R A, Achnine L, Kota P, et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3(5): 371-390.
- [19] Carolyn E L, Jane E L, John R L W. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars[J]. *J Sci Food Agri*, 1996, 71(3): 313-320.
- [20] Brenda W S. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress[J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2002, 5(3): 218-223.
- [21] 孙梓健, 汤青林, 宋明, 等. 红叶芥低温胁迫下苯丙氨酸解氨酶活性及其基因的克隆表达[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2010, 32(2): 90-94.
- [22] 刘金花. 环境因子对黄芩植株代谢的影响[D]. 济南: 山东中医药大学, 2008.

[23] Allina S M, Pri-Hadash A, Theilmann D A. 4-coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar: properties of native enzymes, DNA cloning, and analysis of recombinant enzymes[J]. Journal of Plant Physiology, 1998, 116(2): 743-754.

[24] Christie P J, Alfennito M R, Walbot V. Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation maize seedlings[J]. Planta, 1994, 194(4): 541-549.

The Activity of Key Enzymes Related to Flavonoids in Test-tube Plantlets of *Hippophae neurocarpa* Under Low Temperature

ZHANG Hong-tao, CHEN Wen, LI Xiao-wei, SU Xue, SUN Kun

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: Test-tube plantlets leaves of *Hippophae neurocarpa* was used as materials, activities of three key enzymes related to flavonoids, phenylalanine ammonialyase (PAL), 4-hydroxy cinnamic acid enzyme (C4H) and 4-Coumadin acid coenzyme A ligase (4CL) were tested under low temperature in test-tube plantlets leaves of *Hippophae neurocarpa*. The results showed that the three enzymes could be affected easily under low temperature. In the early stage of stress, activities of PAL and C4H fluctuated greatly. The activity of PAL reached the highest value at 12 hours and got the lowest value by 24 hours, which was 63.514% lower than that of control. Its activity recovered gradually afterwards. The activity of C4H got the lowest value at 12 hours and began to increase after that. Its activity was 447.2% of the control by 72 hours. The activity of 4CL reached the highest after 6 hours and was 36.285% higher than that of control. The activity of 4CL decreased after that and was lower than that of control at last. The activities of PAL, C4H and 4CL in test-tube plantlets leaves of *Hippophae neurocarpa* changed in different ways under low temperature. Phenylalanine metabolism was activated and synthesis of secondary metabolites such as flavonoids could be regulated.

Keywords: *Hippophae neurocarpa*; test-tube plantlets; low-temperature stress; PAL; C4H; 4CL; enzyme activity

沙棘系列食品加工工艺

知识窗

沙棘营养成分全面,而且整个植株都可以利用。沙棘的维生素 C、E、K、A、B₁、B₂ 等含量较高,还含有 20 多种微量元素和 20 多种氨基酸。沙棘叶可制茶或作饲料,种子可加工油脂,花不仅可以做蜜源,而且可浸提香精。所以沙棘是饮料、食品、医药等工业的重要原料。目前,已开发的沙棘产品如下。

一、沙棘汁

工艺流程:原料→称重→分洗→破碎→榨汁→二次榨汁→混合→调配→预热→过滤→杀菌→装瓶→产品。

操作方法:果实用清水洗净,沥干后装入破碎机。将破碎后的果肉放入榨汁机内榨汁。第 1 次榨汁的果渣加入 15% 的清水,搅拌均匀后进行第 2 次榨汁。将第 1、2 次榨出的果汁混合,测得总酸量至 1.5%,若原液中酸度过高,也可用饮料水冲洗。然后加入白糖加热,待糖溶解后,用手持糖量计测定,使可溶性固形物达 33.5%。继续加热煮沸,以凝固果汁中的蛋白质,然后用纱布过滤,再用热交换器加热到 90℃ 杀菌。趁热装瓶,装瓶后瓶内温度一般在 85℃ 左右。

二、沙棘果酒和汽酒

工艺流程:选果→清洗→破碎→加酵母液→初发酵→压榨分离→后发酵→分离→调整酒度→贮藏。

操作方法:将果实洗净,在破碎机内破碎成浆状,加入 1% 的酵母糖液(含糖 8.5%)搅拌均匀,进行前发酵,每日搅拌 2 次,温度维持在 22~25℃,经 5~6 d,当残糖降到 6% 时,进行压榨分离,

将汁转入后发酵,按发酵到 12° 酒为指标,在汁中加入砂糖,保持温度 15~20℃,经 30~35 d 后分离,转入贮藏。此酒浑浊,不易沉淀,用 90% 以上酒精调至酒度达 16° 以上,贮藏很长时间,即为成品。出酒率达 25%。

沙棘汽酒的制法:将果实榨出的果汁加入果胶分解酶制剂,将果胶分解后,迅速过滤使得清汁,在清汁中加入糖 8%,酒 4%,充入 1 kg/cm³ 二氧化碳气体即成。

三、沙棘醋

工艺流程:选料→一次发酵→二次发酵→装缸→淋醋。

操作方法:将果实 15 kg 倒入缸内,加入 22.5 kg 大曲,搅匀,在室温 20℃ 下发酵 15 d。发酵后的果实掺入 175 kg 麸皮,用粉碎机打碎,放入缸内搅匀,二次发酵,温度不超过 40℃。每天倒缸 1 次,约经 10 d,2 次发酵完毕。装入淋醋缸内淋醋,将头醋淋过后的醋渣再浸泡 10 h,进行第 2 次淋醋。

四、沙棘浓缩汁

先将果实制成果汁,然后再制浓缩汁。加工工艺包括:①原料处理。将果汁经离心机过滤一次,除去残渣。②真空浓缩。真空度 2.98~3.21 kPa,浓缩温度以 50~60℃ 为宜。③配料。在浓缩汁中加入 80% 葡萄糖(或在 10 kg 浓缩汁中加入白砂糖 8 kg),配料时应在双重锅中加温到 50℃ 左右,充分混合均匀,即得沙棘浓缩汁。④包装。将成品分装在棕色瓶中即为成品。

(来源:黑龙江农业信息网)