

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201407036

章英才,曹金霞,景红霞. 灵武长枣果实质膜和液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性与果实糖分积累[J]. 广西植物, 2015, 35(5): 641—647
Zhang YC, Cao JX, Jing HX. H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities of plasmalemma and tonoplast and sugar accumulation in fruit of *Ziziphus jujuba* cv. Lingwuchangzao[J]. *Guihaia*, 2015, 35(5): 641—647

灵武长枣果实质膜和液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性与果实糖分积累

章英才*, 曹金霞, 景红霞

(宁夏大学 生命科学学院, 银川 750021)

摘要: 以不同发育时期灵武长枣(*Ziziphus jujuba* cv. Lingwuchangzao)的果实为材料,通过测定与分析果肉组织中细胞质膜、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性、果实糖分含量变化,研究了灵武长枣果实质膜、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性与糖积累特性的关系。结果表明:(1)果实第二次快速生长期之前主要积累葡萄糖和果糖,之后果实迅速积累蔗糖,葡萄糖和果糖含量则逐渐下降,成熟期果实主要积累蔗糖。(2)在果实发育的缓慢生长期 S1,质膜 H^+ -ATPase 活性最低;第一次快速生长期,质膜 H^+ -ATPase 活性最高;缓慢生长期 S2,其活性降低;第二次快速生长期,质膜 H^+ -ATPase 活性升至次高;完熟期,质膜 H^+ -ATPase 活性下降幅度较大。(3)在果实发育过程中,液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性的变化趋势相似。缓慢生长期 S1,液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性较低;从缓慢生长期 S1 至第一次快速生长期缓慢下降至最低;从第一次快速生长期开始,液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性呈现为逐渐增高的变化趋势;除第二次快速生长期以外,液泡膜 H^+ -PPase 活性始终高于 H^+ -ATPase。由此推测,质膜 H^+ -ATPase 和液泡膜 H^+ -ATPase、 H^+ -PPase 对灵武长枣果实糖分的跨膜次级转运起到重要的调控作用。

关键词: 灵武长枣; 质膜; 液泡膜; H^+ -ATPase; H^+ -PPase; 糖积累

中图分类号: Q945.18 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0641-07

H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities of plasmalemma and tonoplast and sugar accumulation in fruit of *Ziziphus jujuba* cv. Lingwuchangzao

ZHANG Ying-Cai*, CAO Jin-Xia, JING Hong-Xia

(School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In order to study the relation between the H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities of plasmalemma and tonoplast and the sugar accumulation in fruit of *Ziziphus jujuba* cv. Lingwuchangzao, the H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities of plasmalemma and tonoplast and the sugar content in fruit were determined with different developmental periods fruit as materials. The results were as follows: (1) The fruit mainly accumulated glucose and fructose before the second rapid growth period, sucrose accumulated rapidly after the second rapid growth period, at the same time, the content of glucose and fructose decreased gradually, the mature period fruit mainly accumulated sucrose. (2) The plasmalemma H^+ -ATPase activity was the lowest in the slower growth period S1 and the highest in the first rapid

收稿日期: 2014-09-23 修回日期: 2014-11-17

基金项目: 国家自然科学基金(31160057)

作者简介: 章英才(1967-),男,宁夏中卫人,教授,硕士生导师,主要从事植物学研究,(E-mail)yingcaizh@163.com。

*通讯作者

growth period, but it dropped in the slower growth period S2 and rose to higher in the second rapid growth period and dropped substantially in the mature period. (3) The variation trend of tonoplast H^+ -ATPase activity was similar to tonoplast H^+ -PPase activity during fruit development. Tonoplast H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities were lower in the slower growth period S1, they dropped slowly to the lowest from the slower growth period S1 to the first rapid growth period and increased gradually from the first rapid growth period, tonoplast H^+ -PPase activity was higher throughout than tonoplast H^+ -ATPase activity except the second rapid growth period. Hence, the plasmalemma H^+ -ATPase and the tonoplast H^+ -ATPase and H^+ -PPase played an important regulative role in secondary active transport sugar across membrane in fruit of *Z. jujuba* cv. Lingwuchangzao.

Key words: *Ziziphus jujuba* cv. Lingwuchangzao; plasmalemma; tonoplast; H^+ -ATPase; H^+ -PPase; sugar accumulation

植物质膜 H^+ -ATPase(P-ATPase)以及液泡膜上的 2 类质子泵 H^+ -ATPase(V-ATPase)和 H^+ -PPase(V-PPase)是膜束缚的功能性蛋白质,参与跨膜物质运输和植物生长发育等诸多生理生化过程(姚秋菊等,2008)。质膜 H^+ -ATPase 作为植物生命活动的“主宰酶”,能水解 ATP 产生能量,并把细胞质内的 H^+ 逆向跨质膜泵出膜外,产生跨膜 pH 梯度和电势梯度,形成质子电化学势 ΔpH ,驱动氨基酸、小分子糖和游离糖等的次级主动运输(Mor-somme *et al.*,2000;Sondergaard *et al.*,2004)。木质部和韧皮部中无机营养物和有机营养物的装载都由该酶控制。液泡膜 H^+ -ATPase 和质膜 H^+ -ATPase 结构不同但功能相同(陈亚华等,2000)。液泡膜 H^+ -PPase 是一种区别于 H^+ -ATPase 的质子泵, H^+ -PPase 将焦磷酸(PPi)水解为 2 个 Pi,不仅减弱了高浓度 PPi 对胞质生物大分子合成的影响,而且为此过程中 H^+ 从细胞质跨膜转运到液泡提供了自由能(包爱科等,2006)。液泡膜 H^+ -PPase 与 H^+ -ATPase 共同作用形成 H^+ 跨液泡膜电化学梯度,为离子、氨基酸和糖类等各种溶质分子跨液泡膜的次级主动运输提供驱动力,促进多种离子和代谢产物在液泡中的积累(包爱科等,2006)。以往研究较多关注质膜、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 在植物抵御盐胁迫(Muramatsu,*et al.*,2002;Yang,*et al.*,2007)、温度胁迫(Lindberg,*et al.*,2005;Zhang,*et al.*,2006;潘秋红等,2007)、养分胁迫(Yan,*et al.*,2002)等逆境中的作用,但对发育过程中果实质膜、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 在果实有机物积累过程中的作用未见有研究,以及果实中糖的跨膜运输能力及其与糖积累之间的关系尚未见有报道。

果实中积累的糖分主要为果糖、葡萄糖和蔗糖,果实品质在很大程度上取决于果实内所含糖的种类

和数量(陈俊伟等,2004),因此,糖分的积累是果实品质的关键。果实积累糖分的过程受诸多因素调控。控制糖分积累的关键步骤是位于正在发育的果实内部,而不是源叶输出光合产物的能力或是韧皮部路径的运输效率。库细胞中韧皮部后运输效率,糖代谢酶的成分与活力和糖的跨膜运输能力等因素决定了果实糖的积累。

灵武红枣(*Ziziphus jujuba* cv. Lingwuchangzao)是宁夏具有地方特色的优良鲜食枣品种,具有食用和药用价值(章英才等,2014)。目前,对灵武红枣的研究主要集中于产业化生产和鲜果保鲜、生物学特性、种质资源调查和品种选优等方面,但对果实品质形成的原因仍缺少深入而系统地研究,尤其在果实发育过程中糖的积累规律及其与质膜和液泡膜酶活性方面的研究还未见报道(章英才等,2014)。本研究以灵武红枣果实为试材,对发育过程中果实细胞质膜和液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 的活性以及糖的运输积累进行了研究,阐明 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性变化及其在灵武红枣果实糖积累中的作用,研究结果对于进一步明确灵武红枣果实中的糖分积累机理具有重要意义,为科学调控果实糖分积累奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

以宁夏红枣工程技术研究中心试验基地的 6 年生灵武红枣为供试材料,采用随机区组设计,3 次重复,每次重复选择树势适中、栽培管理一致的植株 5~10 株,用 3 种不同颜色的毛线于 6 月 10 日标记同一天开放的花朵,每个重复标记 3 000 朵。果实的生长发育曲线为“双 S”型(章英才等,2014),呈现慢—快—慢—快—慢的生长节奏,分别在果实缓慢

生长期 S1、第一次快速生长期 R1、缓慢生长期 S2、第二次快速生长期 R2、缓慢生长期 S3 共 5 个阶段的中间典型时期,即分别于 6 月 20 日(花后 10 d)、7 月 10 日(花后 30 d)、8 月 9 日(花后 60 d)、9 月 8 日(花后 90 d)、9 月 28 日(花后 110 d)采集果实。采样于上午 9:00—11:00 进行,分别从标记植株树冠的东、西、南、北四个方向及上、中、下、里、外各方向选取大小一致无病虫害的果实。用于测定酶活性的样品保存于液氮中,后放入-80 °C 冰箱备用;部分样品烘干后用于测定果实发育过程中糖的含量。

1.2 测定项目和方法

1.2.1 果实质膜微囊和液泡膜微囊的制备

参考 Milner *et al.*(1995)的方法,所有操作过程均在 0~4 °C 下进行。分别称取各时期等质量的果实,用去离子水清洗后,剪碎。

取果肉组织 10 g 加入 30 mL 冷冻研磨缓冲液(250 mmol · L⁻¹ 甘露醇,0.3% (w/v) BSA,1.5% PVPP,4 mmol · L⁻¹ DTT,3 mmol · L⁻¹ EDTA,10% 甘油,0.4% 酪蛋白,10 mmol · L⁻¹ Vc,1 mmol · L⁻¹ PMSF,70 mmol · L⁻¹ Tris-Cl,5 mmol · L⁻¹ BTP-Mes,pH8.5)中研磨后真空渗透 10 min,匀浆,经四层纱布过滤后,13 000 × g 离心 15 min,上清液经 80 000 × g 离心 45 min,沉淀在 2 mL 冷冻悬浮液 1(250 mmol · L⁻¹甘露醇,2 mmol · L⁻¹ DTT,10%甘油,5 mmol · L⁻¹ Tris,用 MES 调 pH 至 7.0)中悬浮。在 10 mL 的 47%、38% 和 24% 蔗糖(含 1 mmol · L⁻¹ DTT,5 mmol · L⁻¹ Tris/MES (pH7.0))不连续梯度中 74 000 × g 超速离心 3 h,分别提取 47%~38% 梯度间和 38%~24% 梯度间的两层界面处离心沉淀物,再加入 10 倍体积 10 mmol tris-Mes(pH7.0)稀释,经 100 000 × g 离心 30 min,弃上清,沉淀重新悬浮于悬浮液 2(250 mmol · L⁻¹甘露醇,1 mmol · L⁻¹ DTT,10%甘油,5 mmol · L⁻¹ Tris,用 MES 调 pH 至 7.0)后液氮速冻,-70 °C 保存,即得质膜微囊和液泡微囊。

1.2.2 蛋白浓度测定

蛋白浓度的测定用 Bradford (1976)的方法,以 BSA 为标准蛋白。

1.2.3 质膜和液泡膜酶活性测定

1.2.3.1 质膜 H⁺-ATPase 活性测定

参考 Milner *et al.*(1995)的方法,略有改动。0.5 mL 反应体系中含膜蛋白 10~20 μg、MgSO₄ 2 mmol · L⁻¹、KCl 50 mmol · L⁻¹、Tris/MES(pH6.5) 40 mmol · L⁻¹、NaN₃ 2.0 mmol · L⁻¹、NaNO₃ 50 mmol · L⁻¹、钼酸

铵 0.1 mmol · L⁻¹ 和 0.1% (v/v) TritonX-100、用 ATP-Na₂ 3 mmol · L⁻¹ 启动反应,37 °C 下反应 30 min,加入 1 mL 酶反应终止液(钼酸铵-硫酸溶液)终止反应。2 min 后加入 0.2 mL 显色剂 10% 抗坏血酸显色,10 min 后在 660 nm 波长下测定其吸光值,得出释放的无机磷量,即可得 H⁺-ATPase 活性。酶活性以 μg Pi · mg⁻¹ Protein · min⁻¹ 表示。

1.2.3.2 液泡膜 H⁺-ATPase 活性测定

参考 Milner *et al.*(1995)的方法,略有改动。0.5 mL 反应体系中含膜蛋白 10~20 μg、MgSO₄ 2 mmol · L⁻¹、KCl 50 mmol · L⁻¹、Tris/MES (pH7.0) 40 mmol · L⁻¹、NaN₃ 2.0 mmol、Na₃VO₄ 0.05 mmol · L⁻¹、钼酸铵 0.1 mmol · L⁻¹ 和 0.1% (v/v) TritonX-100、用 ATP-Na₂ 3 mmol · L⁻¹ 启动反应,37 °C 下反应 30 min,加入 1 mL 酶反应终止液(钼酸铵-硫酸溶液)终止反应。2 min 后加入 0.2 mL 显色剂 10% 抗坏血酸显色,10 min 后在 660 nm 波长下测定其吸光值,得出释放的无机磷量,即可得 H⁺-ATPase 活性。酶活性以 μg Pi · mg⁻¹ Protein · min⁻¹ 表示。

1.2.3.3 液泡膜 H⁺-PPase 活性的测定

参照何龙飞等(1999)的方法,略有改动。0.5 mL 反应体系中含膜蛋白 10~20 μg、MgSO₄ 2 mmol · L⁻¹、KCl 50 mmol · L⁻¹、Tris/MES (pH7.0) 40 mmol · L⁻¹、NaN₃ 2.0 mmol · L⁻¹、NaNO₃ 50 mmol · L⁻¹、Na₃VO₄ 0.05 mmol · L⁻¹、钼酸铵 0.1 mmol · L⁻¹ 和 0.1% (v/v) TritonX-100、用焦磷酸钠 3 mmol · L⁻¹ 启动反应,37 °C 下反应 30 min,然后加入 1 mL 酶反应终止液(钼酸铵-硫酸溶液)终止反应。2 min 后加入 0.2 mL 显色剂 10% 抗坏血酸显色,10 min 后在 660 nm 波长下测定其吸光值,得出释放的无机磷量,即可得到焦磷酸酶活性。酶活性以 μg Pi · mg⁻¹ Protein · min⁻¹ 表示。

1.2.4 可溶性糖的提取和含量测定

参考章英才等(2014)和赵智中等(2001)的方法。用日本岛津 LC-20 AT 型高效液相色谱仪测定糖含量,色谱条件:流动相(乙腈:重蒸水=85:15),流速 1.0 mL · min⁻¹,Shim-pack CLC-NH₂ 氨基柱,柱温为室温,RID-10A 示差检测器,LC solution 数据处理系统。

1.3 数据处理

采用 SPSS19.0 软件和 Excel 2007 软件进行数据处理与统计分析。

2 结果与分析

2.1 果实发育过程中可溶性糖含量的变化

测定果实发育过程中葡萄糖、果糖和蔗糖 3 种主要可溶性糖含量的结果(图 1)表明,在缓慢生长期 S1 时,果实中 3 种糖的含量差别不明显;第一次快速生长期 R1 开始 3 种糖的含量均呈逐渐增加趋势,其中果糖和葡萄糖含量增加较快,而蔗糖含量增加较慢;自缓慢生长期 S2 开始蔗糖的含量迅速增加,葡萄糖和果糖含量仍延续快速增加的趋势;到果实发育至第二次快速生长期 R2 时,葡萄糖和果糖含量均呈快速下降趋势,而蔗糖的含量仍表现为快速增加,至果实发育成熟,含量高达 $139.80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,远高于果糖的 $65.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和葡萄糖的 $51.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,蔗糖和还原糖比值为 1.2 : 1,说明灵武长枣果实成熟时主要以积累蔗糖为主。缓慢生长期 S1 果实总糖含量较低,从第一次快速生长期 R1 至缓慢生长期 S2 总糖含量较快增长,主要原因是葡萄糖和果糖含量的快速增加;缓慢生长期 S2 至第二次快速生长期 R2,由于葡萄糖、果糖和蔗糖 3 种可溶性糖含量均迅速增加,因而总糖含量也迅速增加;第二次快速生长期 R2 至缓慢生长期 S3,由于蔗糖含量仍快速增加,而葡萄糖和果糖含量快速下降,导致果实总糖含量增加缓慢,果实发育中后期是总糖快速积累的关键时期。

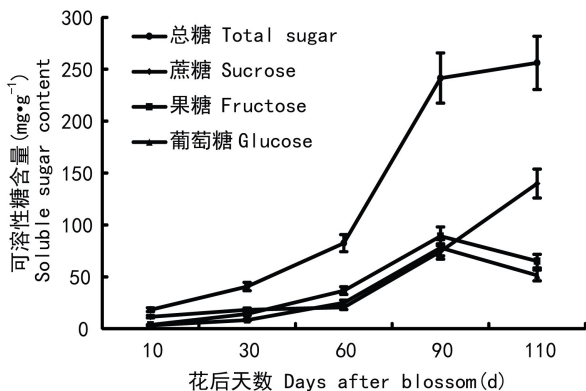


图 1 果实发育过程中可溶性糖含量的变化

Fig. 1 Changes of soluble sugar content in the developing fruits

2.2 果实发育过程中质膜 H^+ -ATPase 活性变化

细胞质膜 H^+ -ATPase 活性的变化规律(图 2)表明,其活性变化趋势呈现低—高一低—高一低的

“M”型变化趋势,与果实慢—快—慢—快—慢的生长趋势变化相对应。缓慢生长期 S1, H^+ -ATPase 活性最低;第一次快速生长期 R1, 质膜 H^+ -ATPase 活性升至最高峰值;缓慢生长期 S2, H^+ -ATPase 活性有所下降;第二次快速生长期 R2, 质膜 H^+ -ATPase 活性升至第二峰值;缓慢生长期 S3 即成熟期质膜 H^+ -ATPase 活性下降幅度较大。细胞质膜 H^+ -ATPase 为糖分运进细胞提供了能量,但随着果实成熟,其活性降低,说明由韧皮部卸载的糖分在进入细胞时,除存在以 ATP 为能量载体的主动运输过程外,还可能存在被动运输的过程。

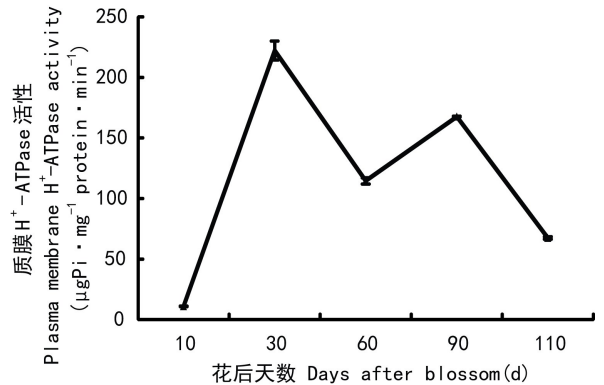


图 2 果实发育过程中质膜 H^+ -ATPase 活性的变化

Fig. 2 Changes of plasma membrane H^+ -ATPase activity in the developing fruits

2.3 果实发育过程中液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性变化

由图 3 可知,缓慢生长期 S1, 液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性较低,为果实整个发育过程中的次低值;从缓慢生长期 S1 至第一次快速生长期 R1, 液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性缓慢下降至最低,细胞积累糖分的能力较弱。从第一次快速生长期 R1 开始,液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性呈现为逐渐增高的变化趋势,其中,第一次快速生长期 R1 至缓慢生长期 S2, H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性增加较快;缓慢生长期 S2 至第二次快速生长期 R2, H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性增加较慢;第二次快速生长期 R2 至缓慢生长期 S3, H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性迅速增至果实发育过程的最高值。在果实发育的过程中,除第二次快速生长期 R2 外,液泡膜 H^+ -PPase 活性始终高于 H^+ -ATPase。植物细胞的液泡是果实糖分贮藏的主要细胞器,糖分跨液泡膜同时存在主动运输和被

动运输,而主动运输所需能量主要来自液泡膜 H^+ -PPase 和 H^+ -ATPase 产生的跨液泡膜 H^+ 梯度,果实发育进程中液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性的持续增高,为液泡内糖分的运输提供原动力。

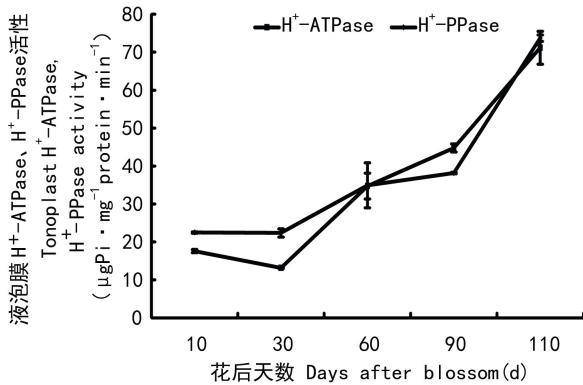


图3 果实发育过程中液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性的变化

Fig. 3 Changes of tonoplast H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities in the developing fruits

2.4 质膜 H^+ -ATPase、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性与可溶性糖的相关性

表1结果表明,质膜 H^+ -ATPase 活性与3种可溶性糖及总糖的积累相关性不显著,而液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性与蔗糖的积累具有显著的相关性,并且液泡膜 H^+ -ATPase 活性与总糖积累也存在显著的相关性。因此,质膜 H^+ -ATPase 主要影响糖分的跨质膜主动运输,对果实细胞糖分的跨质膜次级转运发挥重要的调控作用,而液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 则与果实糖分跨液泡膜的积累具有密切关系。

表1 质膜 H^+ -ATPase、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性与可溶性糖的相关性分析

Table 1 Relational analysis between plasma membrane H^+ -ATPase, tonoplast H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities and soluble sugar content

可溶性糖 Soluble sugar	质膜 H^+ -ATPase 活性 Plasma membrane H^+ -ATPase activity	液泡膜 H^+ -ATPase 活性 Tonoplast H^+ -ATPase activity	液泡膜 H^+ -PPase 活性 Tonoplast H^+ -PPase activity
蔗糖 Sucrose	-0.133	0.948*	0.954*
果糖 Fructose	0.204	0.778	0.630
葡萄糖 Glucose	0.190	0.740	0.583
总糖 Total sugar	0.052	0.909*	0.821

注: * 表示相关性达 0.05 显著水平。

Note: * stands for significance of correlation coefficient at 0.05 level.

3 讨论与结论

叶片产生的光合同化产物以蔗糖的形式,经韧皮部长途运输后卸载到果实内,在有关酶的作用下进行代谢及跨膜运输,最终以蔗糖、果糖和葡萄糖等形式积累在果实中。果实糖分含量和组成是决定品质的重要指标,糖积累是果实品质形成的关键(章英才等,2014)。灵武长枣果实内主要含葡萄糖、果糖和蔗糖3种可溶性糖,发育成熟的果实中蔗糖与还原糖之比为1.2:1,说明果实的糖积累方式是以可溶性糖的形式贮藏积累的糖直接积累型,发育成熟的果实主要积累蔗糖,是蔗糖积累型果实。细胞的液泡是果实积累糖分的主要细胞器,光合产物从韧皮部卸出后,进入薄壁细胞储藏必须穿过质膜和液泡膜进入液泡储藏利用(陈俊伟等,2004)。糖在果肉细胞质膜和液泡膜上的运输是需要能量的主动过程, H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 分别水解 ATP 和 PPI 为光合产物的跨膜运输提供能量,质膜 H^+ -ATPase、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 是产生跨膜 H^+ 梯度,形成 H^+ 动力势的主要酶类(姚秋菊等,2008)。

质膜上糖的运输同时存在主动和被动过程。被动运输不需要能量,而糖分逆浓度梯度的跨细胞膜的主动运输是消耗能量的过程,物质转运量多质膜 H^+ -ATPase 则丰富,活性较高(Alves *et al.*, 2004)。灵武长枣果实的生长发育曲线为“双S”型(章英才等,2014),呈现出慢—快—慢—快—慢的生长节奏,果实生长发育过程中有两个快速生长阶段,花后30d和花后90d分别处于果实第一次快速生长期和第二次快速生长期,此时质膜 H^+ -ATPase 活性均较高,糖分跨质膜运输能力较强,尤其是第一次快速生长期果实的增长速度快于第二次快速生长期,对糖分等物质的需求较多,质膜 H^+ -ATPase 活性最高;而液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性在第一次快速生长期最低,第二次快速生长期 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性无明显增加,跨质膜进入细胞的糖分积累较少,运输至果实的糖分主要用于果实生长。由于 ATP 水解产生的能量不能被植物细胞直接利用,实现逆浓度梯度跨质膜转运糖分,而质膜 H^+ -ATPase 利用水解 ATP 产生能量,将质膜内侧的 H^+ 泵至质膜外侧,产生跨质膜 pH 梯度和电势梯度,为糖分跨质膜转运提供驱动力(Son-

dergaard *et al.*, 2004; 刘昂等, 2014)。通过质膜运输到果实细胞中的蔗糖被分解为果糖和葡萄糖, 为构建果实的形态奠定了物质基础, 促进了果实的快速生长, 是果实第一次快速生长期之后至第二次快速生长期果糖和葡萄糖比例较高的主要原因。乔永旭等(2004)认为, 果实中蔗糖的积累数量严重影响成熟期果实的糖总量。本研究表明, 花后 90 d 即第二次快速生长期是果实第二次快速增长即将结束进入较缓慢生长的时期, 果实对还原糖的需求减少, 与之相伴的是蔗糖含量的迅速增高, 花后 90 d 是蔗糖含量迅速增高、果糖和葡萄糖含量下降的转折点。细胞质膜 H^+ -ATPase 为糖分运进细胞跨质膜运输提供了能量, 但随着果实成熟, 其活性降低, 成熟期质膜 H^+ -ATPase 活性下降幅度较大, 胞质内蔗糖和总糖含量的迅速增高某种程度上也抑制了质膜 H^+ -ATPase 活性, 而促进了液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性的迅速增长, 保证了糖分向液泡中的迅速转运。因此, 蔗糖积累转折点也是液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性迅速增高、质膜 H^+ -ATPase 活性进一步下降的时期。所以, 质膜 H^+ -ATPase 活性的变化导致跨质膜电化学势的改变, 从而直接影响糖分的跨质膜主动运输, 对果实细胞糖分的跨质膜次级转运发挥重要的调控作用。

中央液泡是果实细胞中糖分的主要贮存场所, 糖分跨液泡膜运输也是主动和被动运输同时存在(刘慧英等, 2006)。光合产物进入液泡有简单扩散、协助扩散和主动运输 3 种方式, 由液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 分别水解 ATP 和 PPi 形成跨液泡膜 pH 梯度和电势梯度, 为糖分主动运输提供能量(吕英民等, 2000)。本研究结果表明, 在灵武长枣果实发育的第一次快速生长期和第二次快速生长期之后, 液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性均迅速增强, 与蔗糖含量变化趋势相似, 且液泡膜 H^+ -PPase 活性除第二次快速生长期外始终高于 H^+ -ATPase, 这与刘慧英等(2006)的研究结果相似。因此, 灵武长枣果实内光合产物的跨液泡膜运输所需能量主要由 H^+ -PPase 利用 PPi 水解产生的能量提供。从果实发育的第一次快速生长期和第二次快速生长期, 果实贮藏细胞依靠将糖积累区隔到液泡中保持其较高的膨压而使自身膨大, 而第二次快速生长期到成熟期由于在自由空间和胞质中大量积累糖分, 致使卸载到果实中的糖减少, 贮藏细胞停止膨大。 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 是结合在液泡膜上

的 2 种不同的酶, 平行泵运 H^+ 进入液泡, 两者作用的地位并不固定(姚秋菊等, 2008)。在维持跨液泡膜 pH 梯度方面, 液泡膜 H^+ -ATPase 通常是起主要作用的质子泵, 而 H^+ -PPase 只是泵运 H^+ 的辅助系统(赵雅丽等, 2006), 但在特定的发育时期和 ATP 供应减少、 H^+ -ATPase 活性下降的特定条件下, 液泡膜 H^+ -PPase 质子泵的作用加强(姚秋菊等, 2008)。在建立跨液泡膜的电化学势梯度上, H^+ -PPase 与 H^+ -ATPase 作用相当或更大, 并且液泡占成熟细胞的体积较大, H^+ -PPase 的作用不可忽视, H^+ -PPase 活性的升高会使 H^+ 跨液泡膜电化学势升高, 这有利于增强糖进入液泡。因此, H^+ -ATPase 或 H^+ -PPase 质子泵的过量表达, 都将提高 H^+ 的利用率, 增大跨液泡膜 H^+ 梯度(Gaxiola *et al.*, 2001), 从而使进入液泡膜的糖分增加, 进而增加果实糖的含量。

较低铝浓度时, 两品种小麦质膜 H^+ -ATPase 活力上升, H^+ -ATPase 活性增加有利于加强胞内 H^+ 外排的能力, 在液泡膜 H^+ -ATPase 活性下降导致胞质 H^+ 增加的条件下, 维持胞质 pH 的稳定(何龙飞等, 2001); 植物应对细胞质内高 Na^+ 浓度的一条重要途径是将 Na^+ 转运到质外体或液泡内(Kader *et al.*, 2006), 这种转运作用分别由质膜 H^+ -ATPase、液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 所产生的跨膜 H^+ 梯度来完成(Zhu, 2001; Ohta *et al.*, 2002)。因此, 质膜 H^+ -ATPase 和液泡膜 H^+ -ATPase 及 H^+ -PPase 不论是在光合产物糖分积累方面还是在抵御外界环境的各种胁迫方面都相互协调、互相补充, 反映在本实验中表现为当质膜 H^+ -ATPase 活性高时, 液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性较低, 反之亦然。

质膜 H^+ -ATPase 和液泡膜 H^+ -ATPase、 H^+ -PPase 的调节机制, 及其在感受环境因子刺激的信号传导中的作用一直以来是生命科学领域研究的热点之一。利用分子生物学技术使 H^+ -ATPase 或者 H^+ -PPase 在灵武长枣内过量表达, 可以增大细胞内 H^+ 电化学梯度和跨膜梯度, 进而影响果实糖的积累, 在灵武长枣果实品质调控方面极具应用前景。

参考文献:

- Alves G, Ameglio T, Guillot A, *et al.* 2004. Winter variation in xylem sap pH of walnut trees; involvement of plasma membrane H^+ -ATPase of vessel-associated cells[J]. *Tree Physiol*, **24**(1): 99-105

- Bao AK(包爱科), Zhang JL(张金林), Guo ZG(郭正刚), *et al.* 2006. Tonoplast H^+ -pyrophosphatase involved in plant salt tolerance(液泡膜 H^+ -PPase 与植物耐盐性)[J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), **42**(4):777-784
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**:248-254
- Chen JW(陈俊伟), Zhang SL(张上隆), Zhang LC(张良诚). 2004. Sugar transport, metabolism, accumulation and their regulation in fruits(果实中糖的运输、代谢与积累及其调控)[J]. *J Plant Physiol & Mol Biol*(植物生理与分子生物学学报), **30**(1):1-10
- Chen YH(陈亚华), Shen ZG(沈振国), Liu YL(刘友良). 2000. Effects of chilling and high pH stresses on the ATPase activities of plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from rice(*Oryza sativa* L.) roots(低温、高 pH 胁迫对水稻幼苗根系质膜、液泡膜 ATP 酶活性的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **26**(5):407-412
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, *et al.* 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H^+ -pump [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**:11 444-11 449
- He LF(何龙飞), Shen ZG(沈振国), Liu YL(刘友良). 1999. The responses of ATPase and PPase activities and lipid composition of tonoplast in roots of two wheat cultivars to aluminium stress (铝胁迫对小麦根系液泡膜 ATP 酶、焦磷酸酶活性和膜脂组成的效应)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **25**(4):350-356
- He LF(何龙飞), Liu YL(刘友良), Shen ZG(沈振国), *et al.* 2001. Effects of aluminum on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes of wheat roots(铝对小麦根细胞质膜 ATP 酶活性和膜脂组成的影响)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **34**(5):465-468
- Kader MA, Seidel T, Golldack D, *et al.* 2006. Expressions of OsHKT1, OsHKT2, and OsVHA are differentially regulated under NaCl stress in salt-sensitive and salt-tolerant rice(*Oryza sativa* L.) cultivars[J]. *J Exp Bot*, **57**(15):4 257-4 268
- Lindberg S, Banas A, Stymne S. 2005. Effects of different cultivation temperatures on plasma membrane ATPase activity and lipid composition of sugar beet roots[J]. *Plant Physiol & Biochem*, **43**:261-268
- Liu A(刘昂), Wu WW(吴文卫), Zhao L(赵磊), *et al.* 2014. Effects of magnesium chloride pretreatment on the plasma membrane H^+ -ATPase activity and nitrate absorption efficiency of *Canna generalis* in farmland wastewater(氯化镁预处理对美人蕉根部质膜 H^+ -ATPase 活性与农田废水硝态氮吸收效率的影响)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **34**(1):128-134
- Liu HY(刘慧英), Zhu ZJ(朱祝军), Diao M(刁明), *et al.* 2006. Characteristics of the sugar metabolism in leaves and fruits of grafted watermelon during fruit development(嫁接的西瓜果实发育过程中叶和果实蔗糖代谢的一些特性)[J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), **42**(5):835-840
- Lü YM(吕英民), Zhang DP(张大鹏). 2000. Accumulation of sugars in developing fruits(果实发育过程中糖的积累)[J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), **36**(3):258-265
- Milner ID, Ho LC, Hall JL. 1995. Properties of proton and sugar transport at the tonoplast of tomato(*Lycopersicon esculentum*) fruit[J]. *Physiol Plant*, **94**:399-410
- Morsomme P, Boutry M. 2000. The plant plasma membrane H^+ -ATPase: structure, function and regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, **1465**:1-16
- Muramatsu Y, Harada A, Ohwaki Y, *et al.* 2002. Salt-tolerant ATPase activity in the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L.[J]. *Plant & Cell Physiol*, **43**(10): 1 137-1 145
- Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, *et al.* 2002. Introduction of a Na^+/H^+ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice[J]. *Febs Lett*, **532**(3):279-282
- Pan QH(潘秋红), Zheng YJ(郑艳军), Liu YY(刘艳艳), *et al.* 2007. Changes in H_2O_2 and salicylic acid contents as well as plasma membrane H^+ -ATPase activity and their relations in pea leaves during thermotolerance induction(在耐热性诱导中豌豆叶片过氧化氢和水杨酸含量与质膜 ATP 酶活性的变化及相互关系)[J]. *J Plant Physiol & Mol Biol*(植物生理与分子生物学学报), **33**(5):425-434
- Qiao YX(乔永旭), Liu ST(刘栓桃), Zhao ZZ(赵智中), *et al.* 2004. Study on the correlation of sugar accumulation and sucrose-metabolizing enzymes during the developing period of Muskmelon(*Cucumis melon*)(甜瓜果实发育过程中糖积累与蔗糖代谢相关酶的关系)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), **21**(5): 447-450
- Sondergaard TE, Schulz A, Palmgren MG. 2004. Energization of transport processes in plants roles of the plasma membrane H^+ -ATPase[J]. *Plant Physiol*, **136**(1):2 475-2 482
- Yan F, Zhu Y, Müller C, *et al.* 2002. Adaptation of H^+ pumping and plasma membrane H^+ -ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency[J]. *Plant Physiol*, **129**: 50-63
- Yang Y, Zhang F, Zhao M, *et al.* 2007. Properties of plasma membrane H^+ -ATPase in salt-treated *Populus euphratica* callus [J]. *Plant Cell Rep*, **26**:229-235
- Yao QJ(姚秋菊), Zhang XW(张晓伟), Lü ZW(吕中伟), *et al.* 2008. Effects of silicon on the activities of plasmalemma H^+ -ATPase, tonoplast H^+ -ATPase and H^+ -PPase in cucumber seedlings under salt stress(硅对盐胁迫下黄瓜幼苗根系质膜、液泡膜酶活性的影响)[J]. *Acta Agric Boreal-Sin*(华北农学报), **23**(6):125-129
- Zhang JH, Liu YP, Pan QH, *et al.* 2006. Changes in membrane-associated H^+ -ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses [J]. *Plant Sci*, **170**(4):768-777
- Zhang YC(章英才), Chen YP(陈亚萍), Jing HX(景红霞), *et al.* 2014. Relation between sugar accumulation and sucrose-metabolizing enzymes in fruit of 'Lingwuchangzao' (*Ziziphus jujuba* Mill.)('灵武长枣'果实糖积累与蔗糖代谢相关酶的关系)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), **31**(2):250-257
- Zhao YL(赵雅丽), Han B(韩冰), Li SF(李淑芬), *et al.* 2006. The role in the response of vacuolar H^+ -ATPase to the abiotic stress and the signal transduction in plants(液泡膜 H^+ -ATPase 在植物的非生物胁迫响应和信号转导中的作用)[J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), **42**(5):812-816
- Zhao ZZ(赵智中), Zhang SL(张上隆), Xu CJ(徐昌杰), *et al.* 2001. Roles of sucrose-metabolizing enzymes in accumulation of sugars in satsuma mandarin fruit(蔗糖代谢相关酶在温州蜜柑果实糖积累中的作用)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), **28**(2):112-118
- Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, **6**(2):66-71