

网络出版时间:2013-05-02 10:54

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130502.1054.011.html>

3 个脐橙品种果实内糖代谢相关酶的活性分析

刘 训¹, 龚荣高¹, 张 旭², 冉茂升³

(1 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014; 2 四川省甘孜州林业科学研究所,
四川 甘孜 626001; 3 四川省汶川县农委, 四川 汶川 623000)

【摘 要】 【目的】研究 3 个脐橙品种果实发育过程中糖含量及相关代谢酶活性的变化, 探讨影响脐橙品种间糖含量差异的关键酶及其作用时期, 为脐橙果实品质的改进提供理论依据。**【方法】**以罗伯逊脐橙(以下简称罗脐)、纽荷尔脐橙和丰脐为试材, 从花后 60 d 开始, 每隔 15 d 取 1 次果实样品, 共取样 11 次, 测定其发育过程中糖含量变化及中性转化酶(Neutral invertase, NI)、酸性转化酶(Acid invertase, AI)、蔗糖合成酶(Sucrose synthase, SS)、蔗糖磷酸合成酶(Sucrose phosphate synthase, SPS)活性的变化, 比较品种间各指标的差异。**【结果】**不同脐橙品种果实糖含量存在显著差异, 纽荷尔脐橙和丰脐果实糖含量分别极显著和显著高于罗脐, 主要是由于花后 90 d 后, 纽荷尔脐橙和丰脐果实中糖积累的速度比罗脐要快。3 个脐橙品种间 AI、NI、SS(分解方向)酶活性在果实整个发育过程中差异不显著; 花后 90 d 后, 纽荷尔脐橙和丰脐果实内 SPS 和 SS(合成方向)的活性分别极显著和显著高于罗脐。**【结论】**SPS 和 SS(合成方向)是引起不同脐橙品种果实糖含量差异的关键酶, 它们分别在果实发育的中、后期促进糖合成, 使脐橙品种间糖含量产生差异。

【关键词】 脐橙; 糖代谢; 酶活性

【中图分类号】 S666.4-33

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)05-0136-05

The activity analysis for sugar-metabolizing related enzymes in 3 kinds of navel orange fruits

LIU Xun¹, GONG Rong-gao¹, ZHANG Xu², RAN Mao-sheng³

(1 Horticultural College, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014, China; 2 Forest Research Institute of Ganzi
Prefecture, Ganzi, Sichuan 626001, China; 3 Wenchuan Agriculture Departments, Wenchuan, Sichuan 623000, China)

Abstract: 【Objective】 This research studied the sugar concentrations and changes in enzyme activities during the development of 3 kinds of navel orange fruits. The key enzyme which influences the diversity of sugar content and the period when it effects were discussed in order to provide the oretical basis for quality improvement of havel orange fruit. **【Method】** Using fruits of Robertson Navel orange, Newhall Navel orange and Harvest Navel orange as experimental materials, samples were taken every 15 days from 60 days after bloom for 11 times in total. Sugar concentrations and the enzyme activities of NI(Neutral invertase), AI(Acid invertase), SS(Sucrose synthase) and SPS(Sucrose phosphate synthase) were investigated before being compared with other kinds. **【Result】** From 90 days after bloom, the significant diversity of sugar contents in different kinds of naval orange fruit was mainly caused by the fact that the velocities of sugar accumulation in Newhall Navel orange and Harvest Navel orange fruits were faster than Robertson Navel orange. So the sugar content in the Newhall Naval orange and Harvest Navel orange fruits respectively a-

【收稿日期】 2012-06-15

【基金项目】 四川省教育厅重点资助项目(2009ZA071)

【作者简介】 刘 训(1990—), 女, 四川成都人, 在读本科, 主要从事园艺植物逆境生理研究。E-mail: liuxun0123song@163.com

【通信作者】 龚荣高(1975—), 男, 重庆人, 副教授, 博士, 主要从事园艺植物生理生态研究。E-mail: gongronggao@tom.com

achieve very significant difference and significant difference. There was no relation between the catabolic activities of sucrose enzymes and between sucrose concentrations of different citrus fruits. But since 90 days after bloom, the activities of SPS and SS(Synthesis direction) in the Newhall Navel orange and Harvest Navel orange fruits were very significant different and significant different than Robertson Navel orange, respectively. 【Conclusion】 It is suggested that the difference of sugar contents in different varieties is mainly determined by SPS and SS(synthetic direction). They influence sugar contents in different varieties by promoting sugar synthesis in the mid- and late- stage of fruit development.

Key words: navel orange; sugar metabolism; enzyme activity

脐橙在世界园艺产业中具有重要地位,其独特的风味深受人们的喜爱。但在四川不同地区,脐橙果实含糖量低含酸量高是常见问题,这影响着当地柑橘产业的发展。脐橙果实的甜味主要来自于果实中的糖,而果实中积累的可溶性糖大部分是蔗糖、果糖和葡萄糖。蔗糖代谢是糖积累的重要环节,研究蔗糖代谢相关酶活性则是探讨果实糖分积累的重要手段^[1]。蔗糖代谢相关酶主要包括酸性转化酶(AI)、中性转化酶(NI)、蔗糖合成酶(SS)和蔗糖磷酸合成酶(SPS)^[2]。脐橙果实内能催化蔗糖合成的酶主要为SPS和合成方向SS这2种酶,而催化蔗糖分解的酶有AI、NI及分解方向SS这3种酶^[3]。目前研究表明,脐橙果实糖积累与合成方向SS和SPS活性密切相关^[1]。脐橙作为国际第一大鲜果贸易品种,近年来有人建立模型对其糖酸比进行了快速预测^[4],但有关其不同品种糖含量随发育进程的变化及相关酶活性的对比分析还鲜见报道。为此,本研究以3种不同品种的脐橙为试材,对果实发育过程中糖积累与蔗糖代谢相关酶活性的关系进行了分析,以期为提升脐橙果实品质的相关栽培技术的改进提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地选择在四川省乐山市井研县,属四川盆地中亚热带湿润气候区,四季分明,干湿两季分明,年平均气温约17.2℃,年平均日照约1 134.6 h,年平均降雨量约1 025.8 mm,全年无霜期334 d。

1.2 样品采集

在井研县代表果园中选取9~12年生、树势健壮、常规栽培管理相对一致的以红桔作为砧木的罗伯逊脐橙(简称罗脐)、纽荷尔脐橙和丰脐植株各5株,作为代表性植株,从花后60 d开始,每隔15 d取样1次,每次从树冠外围中部的东、南、西、北、顶部各个方位随机采取中等大小的果实各1个,共取样

11次,置于一20℃冷冻保存,备用。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 酶液的制备 所有酶的提取均在0~4℃条件下进行。AI和NI的提取参照Kubo等^[5]和赵智中等^[6]的方法,并略加以改进。以果实中心柱为对称轴,将样果纵切为4份,任取对称的2份称取1~2 g混合样品放于研钵中,加少许石英沙和10 mL pH 7.5的提取缓冲液(包含200 mmol/L磷酸钾缓冲液、体积分数0.1%β-巯基乙醇、5 mmol/L MgCl₂、体积分数0.05% Triton-X 100、质量浓度20 g/L PVPP,质量浓度0.5 g/L BSA),研磨成匀浆,3~5 min之后,20 000 g冷冻离心30 min,取上清液,逐渐加入(NH₄)₂SO₄至质量浓度为516 g/L。放置30 min后,20 000 g冷冻离心30 min。弃上清液,加入pH 7.5的脱盐缓冲液(20 mmol/L磷酸钾缓冲液,体积分数0.01%β-巯基乙醇,0.25 mmol/L MgCl₂,质量浓度0.5 g/L BSA)重新溶解沉淀,装入透析袋,在脱盐缓冲液中透析16 h,脱盐后的酶提取液用于AI和NI活性测定。SPS和SS酶液的提取参照龚荣高等^[1]的方法进行。

1.3.2 糖含量和酶活性的测定 果实中糖的提取参照文献^[1]的方法进行,糖含量测定参照文献^[7]的方法进行。

转化酶活性测定参照赵智中等^[6]的方法进行,SS、SPS活性测定参照龚荣高等^[1]的方法进行。

1.4 数据分析

试验数据采用Excel 2007制图,用SPSS 17.0软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同脐橙品种果实糖含量的变化

从图1可见,3个脐橙品种果实糖含量的变化趋势基本一致,在幼果期均很低,但随着果实的发育其糖含量逐渐升高,特别是在花后90 d后,纽荷尔脐橙和丰脐果实中糖积累的速度比罗脐快。主效应

方差分析结果表明,纽荷尔脐橙、丰脐糖含量分别极显著和显著高于罗脐,而纽荷尔脐橙与丰脐之间糖含量差异未达显著水平。这表明不同脐橙品种糖含量最终存在差异,这可能主要是由于果实发育中后期糖的积累速度不同所致。

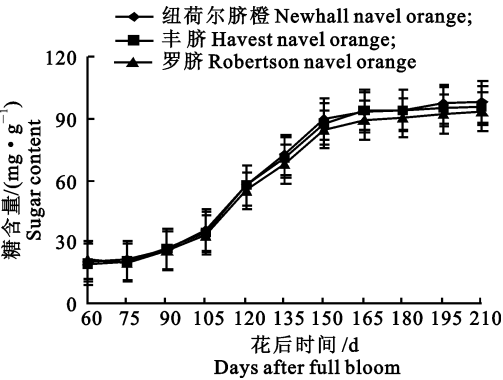


图 1 不同脐橙品种果实发育过程中糖含量的变化
Fig. 1 Changes of sugar contents in different navel orange varieties during the development of fruits

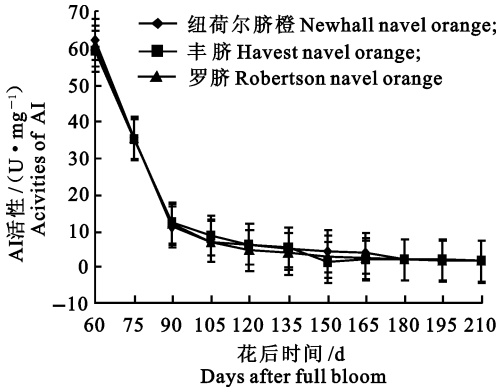


图 2 不同脐橙品种果实发育过程中 AI 活性的变化
Fig. 2 Changes of AI activities in different navel orange varieties during the development of fruits

由图 4 可以看出,SS(分解方向)活性在花后 60~90 d 较高,到 90~135 d 有所下降。对 3 个脐橙品种果实内酶活性进行主效应方差分析,结果表明。纽荷尔脐橙、丰脐和罗脐 3 个品种间的 SS(分解方向)活性差异不显著,说明 SS(分解方向)虽然是果实蔗糖代谢中很重要的酶,但本试验未发现其与不同脐橙品种果实糖含量差异间有明显联系。

2.2.2 催化蔗糖合成的酶 由图 5 可知,在脐橙果实发育前中期(花后 150 d 之前),SPS 活性在不同品种间差异明显。主效应方差分析表明,纽荷尔脐橙果实内 SPS 活性极显著高于罗脐($P<0.01$),而丰脐与罗脐之间的差异也达到显著水平($P<0.05$),但丰脐与纽荷尔果实内 SPS 活性差异不显著($P>0.05$),说明 SPS 与不同脐橙品种果实内糖含量差异有密切关系。

2.2 不同脐橙品种果实发育过程中糖代谢相关酶活性的比较

2.2.1 催化蔗糖分解的酶 不同脐橙品种果实发育过程中 AI 活性的变化结果如图 2 所示。由图 2 可知,AI 活性在脐橙花后 60~80 d 很高,但随着果实的发育而迅速降低,直到 180 d 之后,AI 活性基本消失。主效应方差分析结果表明,3 个脐橙品种间 AI 活性的差异未达显著水平,这表明 AI 不是引起不同品种脐橙果实糖含量差异的主要酶类。

不同脐橙品种果实发育过程中 NI 活性的变化结果如图 3 所示。图 3 显示,NI 活性在脐橙幼果期也比较高,但随着果实的发育而迅速降低,在花后 165 d 后活性基本消失。主效应方差分析得出,3 个脐橙品种间 NI 活性差异未达显著水平,这说明 NI 也不是引起不同品种脐橙果实糖含量差异的主要酶类。

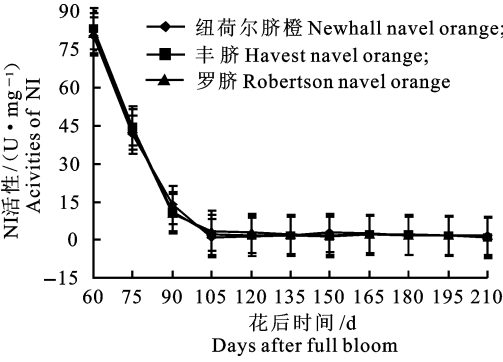


图 3 不同脐橙品种果实发育过程中 NI 活性的变化
Fig. 3 Changes of NI activities in different navel orange varieties during the development of fruits

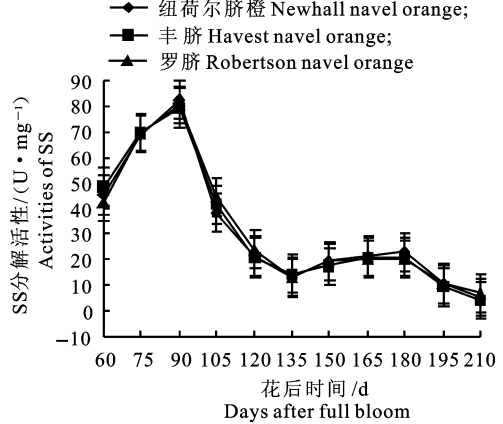


图 4 不同脐橙品种果实发育过程中 SS(分解方向)活性的变化
Fig. 4 Changes of SS (resolve direction) activities in different navel orange varieties during the development of fruits

由图 6 可知,3 个脐橙品种果实 SS(合成方向)活性变化趋势比较一致,特别是在 60~105 d,而在花后 165~195 d 纽荷尔脐橙和丰脐果实的 SS(合成方向)活性则高于罗脐。主效应方差分析结果表

明,纽荷尔脐橙和丰脐果实 SS(合成方向)活性分别极显著和显著高于罗脐,而丰脐与纽荷尔脐橙间的差异未达到显著水平,表明 SS(合成方向)是影响不同脐橙品种果实糖含量差异的关键酶。

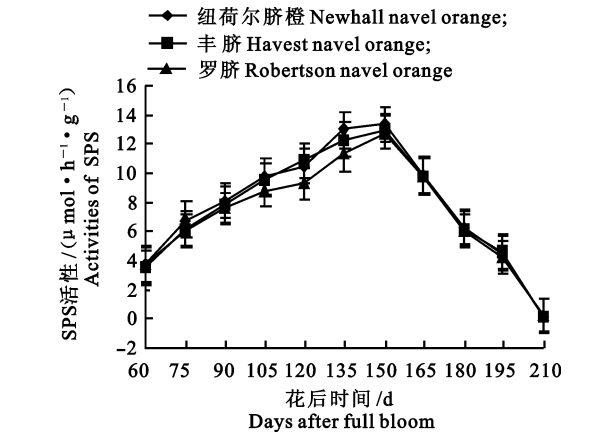


图 5 不同脐橙品种果实发育过程中 SPS 活性的变化
Fig. 5 Changes of SPS activities in different navel orange varieties during the development of fruits

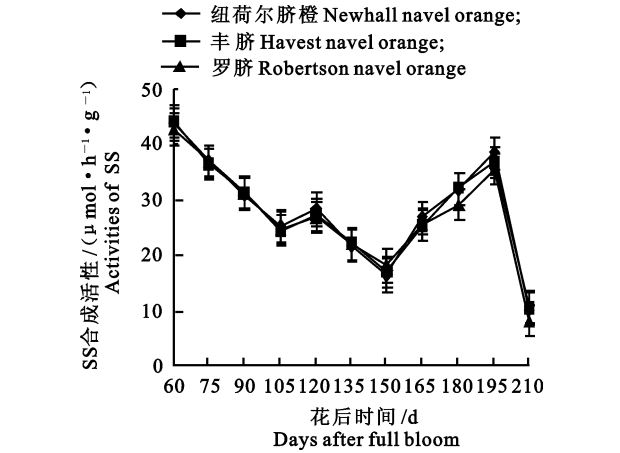


图 6 不同脐橙品种果实发育过程中 SS(合成方向)活性的变化
Fig. 6 Changes of SS (synthetic direction) activities in different navel orange varieties during the development of fruits

3 讨论与结论

本试验结果表明,不同脐橙品种糖含量差异可能主要取决于糖的合成量,而不是分解量。不同脐橙品种间 AI 和 NI 活性差异不显著,表明 AI 和 NI 不是引起不同脐橙品种果实糖含量差异的主要酶。本试验结果与于年文等^[8]对梨果实内 AI 和 NI 活性的研究结果相似。

SS(合成方向)活性在花后 150~195 d 明显上升,且不同品种间差异明显,纽荷尔脐橙和丰脐果实 SS(合成方向)活性分别极显著和显著高于罗脐,说明 SS(合成方向)是引起不同脐橙品种果实糖含量差异的关键酶。

本试验发现,SS(分解方向)活性在果实发育早期较高,中后期下降;而 SS(合成方向)活性在果实发育后期升高,这一结果与 Akio 等^[9]对日本梨的研究结果一致。本试验结果表明,SS(分解方向)与糖积累可能无关,而 SS(合成方向)与糖积累有密切关系。Wen 等^[10]通过对 SS 基因的克隆,指出在甜瓜果实发育过程中,SS 对糖的积累可能只起到微小作用,这与本试验结果有差异,可能是因为试材种类差异太大造成的。罗霄等^[11]指出,不同脐橙品种中蔗糖代谢酶在糖积累中的作用也有差异,但本试验未发现 SS(分解方向)与不同脐橙品种果实糖含量差异有明显联系,这可能与 SS 分解方向主要起调节果实库强^[1]、未直接参与果实糖积累有关。

Choudhury 等^[14]通过 SPS 基因的导入控制香蕉成熟过程中蔗糖的含量,结果表明,SPS 确实能影响香蕉果实糖含量。柴叶茂等^[15]在对草莓的研究中也指出,SPS 基因表达在草莓果实糖代谢过程中发挥着重要的作用。本研究结果表明,在花后 90~150 d,3 个脐橙品种的 SPS 活性差异明显,且纽荷尔脐橙、丰脐果实中的 SPS 活性分别极显著和显著高于罗脐,说明 SPS 与不同脐橙品种果实糖含量关系密切。

本试验结果表明,SPS 和 SS(合成方向)是引起 3 个脐橙品种果实糖含量差异的关键酶,SPS 主要作用于果实发育中期,SS(合成方向)则主要作用于果实发育后期。故可以认为,不同脐橙品种间糖含量差异是这 2 种酶共同作用的结果,但对于其综合作用的方式以及机理,还有待于进一步研究。

王永章等^[12]对“红富士”苹果的研究表明,在苹果果实发育后期,SS(合成方向)与蔗糖的积累水平呈显著正相关;Beruter 等^[13]对苹果果实的研究也得到了相同的结果。本研究发现,不同脐橙品种的

[参考文献]
[1] 龚荣高,张光伦,吕秀兰,等. 脐橙果实糖积累与蔗糖代谢相关酶的研究 [J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(1): 34-36.
Gong R G, Zhang G L, Lü X L, et al. Study on the relationship between the sugar accumulation and its metabolizing enzymes

in navel orange fruit [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2004, 22(1): 34-36. (in Chinese)

[2] 柯凡君,张虎平,陶书田,等. 套袋对梨果实发育过程中糖组分及其相关酶活性的影响 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(7): 1422-1427.

Ke F J, Zhang H P, Tao S T, et al. Sugar component contents and metabolism-related enzyme activities in developing pear fruits after bagging [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(7): 1422-1427. (in Chinese)

[3] 龚荣高,张光伦. 柑橘果实糖代谢的研究进展 [J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(4): 343-345 .

Gong R G, Zhang G L. Advances in research on sugar metabolism in citrus fruit [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2003, 21(4): 343-345. (in Chinese)

[4] 胡润文,高海洲,夏俊芳. 脐橙糖酸比的近红外光谱检测 [J]. 湖北农业科学, 2011, 13(50): 2753-2756.

Hu R W, Gao H Z, Xia J F. Nondestructive determination of sugar-acid ratio of navel orange by near infrared spectroscopy [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 13(50): 2753-2756. (in Chinese)

[5] Kubo T, Hohjo I, Hiratsuka S. Sucrose accumulation and its related enzyme activities in the juice sacs of *Satsuma mandarin* Fruit from trees with different crop loads [J]. Scientia Horticulture, 2001, 91(2): 215-225.

[6] 赵智中,张仁隆,徐昌杰,等. 蔗糖代谢相关酶在温州蜜柑果实糖积累中的作用 [J]. 园艺学报, 2001, 28(2): 112-118.

Zhao Z Z, Zhang R L, Xu C J, et al. Roles of sucrose- metabolizing enzymes in accumulation of sugars in satsuma mandarin fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28(2): 112-118. (in Chinese)

[7] 龚荣高,吕秀兰,张光伦. 脐橙果实糖酸比及代谢相关酶活性变化研究 [J]. 北方园艺, 2008(9): 22-24.

Gong R G, Lü X L, Zhang G L, et al. Study on the ratio of sugar and acid content and its related metabolizing enzymes in robertson navel orange during development of fruit [J]. Northern Horticulture, 2008(9): 22-24. (in Chinese)

[8] 于年文,李俊才,王家珍,等. 南果梨果实糖积累过程中相关酶的作用 [J]. 西南农业学报, 2011, 24(3): 919-923.

Yu N W, Li J C, Wang J Z, et al. Roles of related enzymes in accumulation of sugars in nanguoli pear fruit [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2011, 24(3): 919-923. (in Chinese)

[9] Akio S, Kazuyuki A. Occurrence of two sucrose synthase isozymes during maturation of Japanese pear fruit [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1996, 121(5): 943-947.

[10] Wen X X, Zhang W Q, Yanqing Feng Y Q , et al. Cloning and characterization of a sucrose synthase-encoding gene from muskmelon [J]. Mol Biol Rep , 2010, 37(2): 695-702.

[11] 罗 霄,郑国琦,郑紫燕,等. 宁夏枸杞果实遮光处理对果实糖积累和相关酶活性的影响 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(5): 984-989.

Luo X, Zheng G Q, Zheng Z Y, et al. Sugar accumulation and related enzyme activity in fruit of *Lycium barbarum* L. with shielding light [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008, 28(5): 984-989. (in Chinese)

[12] 王永章,张大鹏. “红富士”苹果果实蔗糖代谢与酸性转化酶和蔗糖合酶的关系的研究 [J]. 园艺学报, 2001, 28(3): 259-261.

Wang Y Z, Zhang D P. A study on the relationships between acid invertase, sucrose synthase and sucrose metabolism in Red Fuji apple fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28(3): 259-261. (in Chinese)

[13] Beruter J, Studer Feusi M E. The effects of gridling on carbon hydrate partitioning in the growing applefruit [J]. Plant Physiol, 1997, 151(1): 227-285.

[14] Choudhury S R, Roy S, Sengupta D N. A comparative study of cultivar differences in sucrose phosphate synthase gene expression and sucrose formation during banana fruit ripening [J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 54(1): 15-24.

[15] 柴叶茂,贾海锋,李春丽,等. 草莓果实发育过程中糖代谢相关基因的表达分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(4): 637-643.

Chai Y M, Jia H F, Li C L, et al. Transcriptional analysis of sugar metabolism-related genes during strawberry fruit development [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(4): 637-643. (in Chinese)