



文章编号: 1000-4025(2013)10-2024-07

不同梨品种果实有机酸含量变化 与相关酶活性的研究

李甲明¹, 杨志军¹, 张绍铃¹, 黄小三¹, 曹玉芬², 吴俊^{1*}

(1 南京农业大学 梨工程技术研究中心, 南京 210095; 2 农业部果树种质资源利用重点开放实验室, 辽宁兴城 125100)

摘要:以梨品种‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’为试材, 对不同品种果实有机酸积累及相关酶活性随发育的动态变化特征进行分析比较, 探讨果实有机酸含量与相关酶活性的关系。结果表明: (1) 梨果实发育过程中有机酸含量呈逐渐下降趋势, 果实成熟时的总有机酸含量以‘茌梨’最高, ‘鸭梨’次之, ‘八里香’最低, 且 3 品种间总酸含量差异显著。 (2) 果实发育后期, ‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’的柠檬酸含量几乎相同, 而苹果酸的含量差异显著, 说明苹果酸是引起品种间总酸含量差异的主要因素。 (3) 在苹果酸代谢中, 不同品种间 NADP-ME 酶活性在果实发育后期差异显著, 而 NAD-MDH 和 PEPC 酶活性无显著差异, 表明 NADP-ME 酶是引起‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’成熟果实苹果酸含量差异的主要原因。 (4) 不同品种的柠檬酸代谢酶 CS、Cyt-ACO、Mit-ACO 和 NAD-IDH 的活性变化趋势一致, 且成熟时无显著差异, 表明它们不是引起梨果实酸含量差异的主要原因。 (5) 梨果实发育过程中有机酸含量与相关代谢酶活性的相关性分析表明, 苹果酸和柠檬酸代谢酶共同影响梨果实的酸含量水平。

关键词: 梨; 果实; 有机酸; 酶活性

中图分类号: Q945.6⁺4

文献标志码: A

Change of Organic Acid Contents and Related Enzyme Activities in Different Pear Cultivars

LI Jiaming¹, YNAG Zhijun¹, ZHANG Shaoling¹, HUANG Xiaosan¹, CAO Yufen², WU Jun^{1*}

(1 Pear Engineering and Technology Research Centre, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Key Laboratory of Fruit Germplasm Resources Utilization, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

Abstract: In this study, the pear cultivar ‘Yali’, ‘Chili’ and ‘Balixiang’ were used to determine the dynamic change of fruit organic acids accumulation and related enzyme activities during fruit development, the correlation of organic acids contents and the activities of related enzyme were also explored. The results demonstrated that: (1) The contents of organic acids decreased gradually during fruit development. The total organic acid content of ‘Chili’ was the highest, followed by ‘Yali’, and the ‘Balixiang’ is the least at the period of fruit ripening. Furthermore, the total organic acid content showed significant difference among three cultivars. (2) At the later stage of fruit development, the content of citric acid of ‘Yali’, ‘Chili’ and ‘Balixiang’ was almost the same, but the content of malic acid showed significant difference among three cultivars, which indicated that malic acid played an important role in the difference of organic acid content of different cultivars. (3) NADP-ME activity showed significant difference during late stage of fruit development, however, NAD-MDH and PEPC activities showed no significant difference in synthesis of malic acid, so the NADP-ME was an important enzyme involved in the difference of malic acid content among ‘Yali’, ‘Chili’ and ‘Balixiang’. (4) The related enzymes of CS, Cyt-ACO, Mit-ACO and NAD-IDH in synthesis

收稿日期: 2013-05-27; 修改稿收到日期: 2013-08-05

基金项目: 国家自然科学基金(31171928); 国家梨产业技术体系(CARS-29)

作者简介: 李甲明(1989—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事果树生理及分子生物学研究。E-mail: 894442300@qq.com

* 通信作者: 吴俊, 教授, 博士生导师, 主要从事果树生理及分子育种研究。E-mail: wujun@njau.edu.cn

pathway of citric acid showed same trends in different cultivars, but no significant difference at late stage of fruit development, which suggested that they were not main factors leading to the difference of citric acid content. (5) The correlation analysis between organic acid content and activities of related enzymes during the fruit development revealed that both of enzyme activities in malic acid and citric acid synthesis pathway affected the total level of the organic acid content together.

Key words: pear; fruit; organic acid; enzymes activities

果实有机酸和可溶性糖含量是影响品质风味的重要因素,糖酸比是衡量果实品质风味的重要指标之一,果实中糖酸比主要受有机酸含量影响^[1-2]。目前,国内外学者对果实有机酸的研究主要集中在不同品种资源的有机酸组分和含量测定,以及有机酸的积累特征等方面。例如,高海燕等^[3]对不同梨品种的研究发现,梨果汁中有机酸包括苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、莽草酸、酒石酸、奎尼酸、乳酸和富马酸,其中苹果酸的含量最高。姚改芳等^[4]对 98 个梨品种的研究表明,梨果实中的有机酸主要由苹果酸、柠檬酸、莽草酸和奎尼酸组成。霍月青等^[1]对 70 个砂梨品种进行了有机酸组分特点及发育动态研究。此外,有机酸代谢相关酶的研究也是探讨果实有机酸积累的重要方面,龚荣高等^[5]对脐橙的研究发现,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和柠檬酸合成酶(CS)是影响有机酸合成的重要酶,而柠檬酸脱氢酶(IDH)是影响有机酸分解的重要酶。李雪梅^[6]对砂梨的研究表明,柠檬酸脱氢酶(IDH)活性变化与苹果酸的含量变化趋势基本一致,CS 酶活性与柠檬酸含量的变化趋势一致。以上研究表明,对不同物种及品种间果实有机酸积累的差异及其产生的生理机制目前尚不清楚,有关研究报道较少。因此,本试验拟通过对不同梨品种果实有机酸组分变化动态及相关酶活性的比较研究,探讨梨果实有机酸品质形成的差异及其产生的主要原因,从而为今后梨果实酸品质性状的改良和调控提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以本试验室前期对不同梨品种资源的评价分析为基础^[4],选择不同酸含量水平的‘鸭梨’(2011 年盛花期 4 月 28 日)、“荏梨”(2011 年盛花期 4 月 28 日)和“八里香”(2011 年盛花期 4 月 22 日)为研究材料。试验样品来自中国农业科学院兴城国家梨种质资源圃,选取生长势一致的 3 株梨树进行样品采集和分析。

根据各品种的盛花期,从花后 30 d 开始,每隔

15 d 采果 1 次,采样时按树冠外围的中、东、南、西、北各个方向随机选取果形中等且无病虫害的果实(幼果期采集果实 30 个,随着果实增大采样个数逐渐减少为 10 个),将果实清洗干净后去皮、去核,将果肉混匀,采用四分法取样,取一部分用于酸组分的测定,其余样品液氮速冻后,置于一 70 ℃ 冰箱中,用于酶活性测定。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 有机酸组分和含量 果实有机酸的提取参照 Jia 等^[7]的方法。每个样品重复提取 3 次,定容至 25 mL,然后取 2 mL 样品风干,用超纯水定容 1 mL,再经过 C₁₈ SPE 柱和 0.45 μm Sep-Pak 微孔滤膜过滤后,作为高效液相色谱法(HPLC)分析的样品测定有机酸的组分和含量。色谱条件为:色谱柱 Zorbar SB-Aq 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:2%的甲醇和 98%的 20 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二钠缓冲液(pH 2.6,用磷酸调配),流速 0.7 mL·min⁻¹;柱温:35 ℃,检测器类型 Waters 2487 紫外检测器,波长 210 nm;进样量:5 μL,根据样品峰面积和各有机酸的标准曲线计算其含量。标准样品苹果酸、柠檬酸均购自 Sigma 公司。

1.2.2 苹果酸和柠檬酸代谢酶活性 果实酶液的提取参照 Hirai 等^[8]和罗安才等^[9]的方法,并有所修改。具体做法:称取 2 g 果肉于预冷得研钵中,加 2 mL 研磨缓冲液(0.2 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2),0.6 mol·L⁻¹ 蔗糖,10 mol·L⁻¹ 异抗坏血酸)冰浴下研磨,4 ℃ 4 000×g 离心 20 min,取上清液定容至 5 mL。取其中 2 mL 定溶液 15 000×g,4 ℃ 离心 15 min,取上清液用提取缓冲液(0.2 mol·L⁻¹ Tris-HCl,pH 8.2,10 mmol·L⁻¹ 异抗坏血酸,0.1% Triton X-100)定容至 4 mL 即得细胞质乌头酸酶液(Cyt-Aconitase,Cyt-ACO),沉淀用提取缓冲液定容至 2 mL 即得线粒体乌头酸酶(Mit-Aconitase,Mit-ACO)和 NAD-异柠檬酸脱氢酶(NAD-Isocitrate dehydrogenase,NAD-IDH)酶液。取另外 3 mL 定溶液加 3 mL 提取缓冲液,即可用于测定 NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-Malate dehydrogenase,NAD-

MDH)和 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)的活性;取其中 4 mL,在大量透析液(即提取缓冲液)中 4 ℃透析过夜,即得磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和柠檬酸合成酶(CS)酶液。

酶活性的测定利用分光光度计法,反应体系为 3 mL,采用 UV-2450 型紫外分光光度计测定吸光度,0.02 秒为单位扫描 3 min,以每分钟吸光度变化 0.01 为一个酶单位(U),酶的活性单位表示为 $U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

1.3 数据处理

所有实验数据的差异显著性运用 SPSS 17.0 系统分析软件进行相关分析,平均值、标准差以及图形生成运用 Excel 相关软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 梨果实发育过程中有机酸组分及含量动态变化特征

2.1.1 总酸含量 在梨果实发育过程中,‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’的总酸含量均呈逐渐下降趋势(图 1,A)。其中,‘八里香’的总酸含量在花后 30 d 最高,而在成熟时(花后 135 d)、含量($2.84 mg \cdot g^{-1}$)显著低于‘鸭梨’和‘茌梨’;‘茌梨’却相反,其总酸含量在花后 30 d 最低,花后 75 d 至花后 120 d 高于‘鸭梨’和‘八里香’,接近成熟时有所上升,且‘鸭梨’和‘八里香’中的总酸含量一直呈下降趋势。成熟期(花后 135 d)3 个梨品种的总酸含量差异显著,并以‘茌梨’的总酸含量最高($14.38 mg \cdot g^{-1}$)。

2.1.2 苹果酸含量 在梨果实发育过程中,3 个品种的苹果酸含量表现出基本一致的波动下降的趋势,且大部分时间为‘茌梨’>‘鸭梨’>‘八里香’(图 1,B)。其中,在花后 30 d,苹果酸的含量迅速下降;花后 45 d,苹果酸的含量开始有所上升;至花后 60 d,出现一个相对高峰,三者的含量分别为 15.31、23.21 和 $16.67 mg \cdot g^{-1}$ 。随后,3 个梨品种的苹果酸含量逐渐下降,‘八里香’在花后 105 d 时达到最低值($0.94 mg \cdot g^{-1}$),果实成熟时含量相对稳定;而‘鸭梨’和‘茌梨’在花后 120 d 时达到最低值,其含量分别为 3.08 和 $5.51 mg \cdot g^{-1}$,接近果实成熟时两者中苹果酸的含量有所上升。3 个梨品种的苹果酸含量在成熟时差异显著($P < 0.05$),并以‘茌梨’最高,‘八里香’最低。

2.1.3 柠檬酸含量 ‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’中的柠檬酸含量在整个发育过程中均呈先上升后下降的趋势,且三者间含量比较接近,其间始终无显著差

异(图 1,C)。其中,在花后 30 d 时,三者的柠檬酸含量均有所上升;花后 45 d 时达到最高值,‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’含量分别为 44.12、42.44 和 $42.83 mg \cdot g^{-1}$ 。随着果实进一步发育,‘鸭梨’和‘茌梨’的柠檬酸含量逐渐下降,于花后 135 d 时均达到最低值,含量分别为 2.78 和 $2.65 mg \cdot g^{-1}$;而‘八里香’中柠檬酸含量从花后 45 d 开始迅速下降,花后 75 d 后下降缓慢,成熟时柠檬酸的含量仅为 $0.62 mg \cdot g^{-1}$ 。

2.2 梨果实发育过程中有机酸代谢酶活性的变化特征

2.2.1 苹果酸相关酶活性 梨果实发育过程中,‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’中 NAD-MDH 酶活性的变化趋势基本一致,且‘八里香’一直都低于其他 2

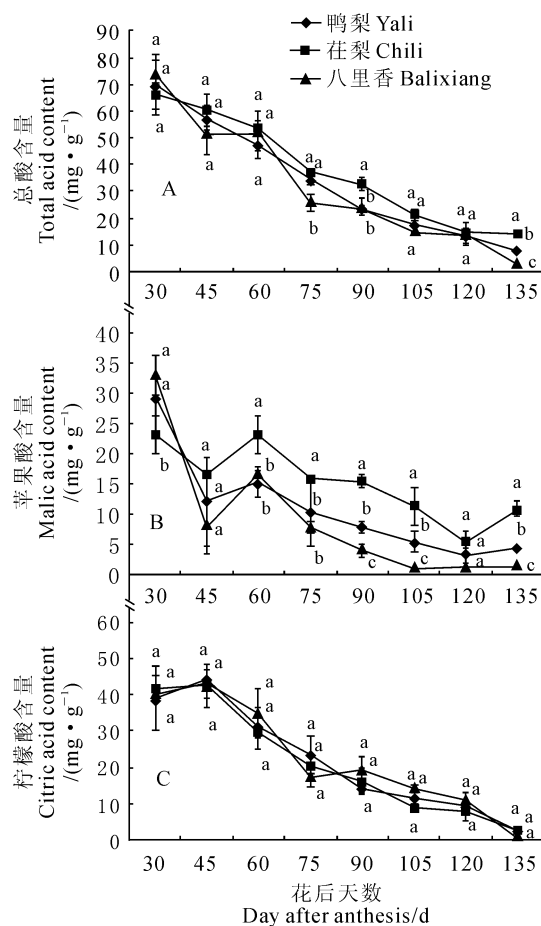


图 1 ‘鸭梨’、‘茌梨’和‘八里香’果实发育过程中有机酸含量的动态变化

同期不同字母表示品种间在 0.05 水平存在显著性差异;下同

Fig. 1 Changes of acid content in fruits of ‘Yali’, ‘Chili’ and ‘Balixiang’ during development

The different normal letters within the same day indicate significant difference between cultivars

at 0.05 level; The same as below

个品种(图 2, A)。在果实发育初期,三者的 NAD-MDH 酶活性都略有下降;从花后 45 d 开始,各品种 NAD-MDH 酶活性均有所上升,‘荏梨’和‘八里香’在花后 60 d 时出现一个相对高峰,而‘鸭梨’NAD-MDH 酶活性变化相对滞后,在花后 75 d 时出现峰值;随着果实进一步发育,3 个品种的 NAD-MDH 酶活性均逐渐下降,至花后 120 d 时达到最低值;成熟时,三者的 NAD-MDH 酶活性都略有上升,但此时 3 个品种间差异不显著。

同时,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中的 PEPC 酶活性随果实发育进程均呈现先上升后下降的变化趋势,且除花后 30~40 d 外始终以‘荏梨’最高(图 2, B)。其中,在花后 30 d 时,三者的 PEPC 酶活性均逐渐上升,‘八里香’至花后 60 d 时达到最高峰,而‘鸭梨’和‘荏梨’均在花后 75 d 时达到最大值;随着果实进一步发育,三者中 PEPC 酶活性逐渐降低,至花后 105 d 趋于稳定;果实成熟时,‘八里香’的 PEPC 酶活性最低,但其与其他 2 个品种间差异不显著。

另外,随着果实的发育,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中 NADP-ME 酶活性均呈现逐渐上升的趋势,且‘八里香’NADP-ME 酶活性在果实发育初期低于‘鸭梨’和‘荏梨’,但在发育的中后期却高于‘鸭梨’和‘荏梨’(图 2, C)。其中,果实发育前期,3 个梨品种的 NADP-ME 酶活性表现微量的上升和下降变化;随着果实发育,三者的 NADP-ME 酶活性开始缓慢上升,于花后 90 d 时几乎相等,之后该酶活性迅速上升,品种间的差异显著;果实成熟时,3 个品种的 NADP-ME 酶活性均达到最大值且差异显著 ($P < 0.05$),此时‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’该酶活性分别为 44.44、36.11 和 55.56 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.2.2 柠檬酸相关酶活性 在果实发育过程中,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中 CS 酶活性变化趋势基本一致,且除花后 75 d 外品种间均无显著性差异(图 3, A)。其中,花后 30 d 时,3 个品种的 CS 酶活性均逐渐上升,并于花后 60 d 时均达到最大值;随着果实进一步发育,各品种 CS 酶活性均逐渐下降;接近成熟时,CS 酶活性在 3 个品种间几乎相等。

同时,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’果实中的 Cyt-ACO 酶活性随生育期均呈现先上升后下降的趋势,果实发育后期又有微量的上升,但除花后 90 d 外品种间均无显著性差异(图 3, B)。在花后 30 d 时,3 个品种的 Cyt-ACO 酶活性均逐渐上升,‘鸭梨’于花后 60 d 达到最大值,而‘荏梨’和‘八里香’

在花后 75 d 达到最大值;从花后 75 d 开始,三者的酶活性均逐渐下降,均在花后 120 d 时达到最低值;果实成熟时,3 个品种的 Cyt-ACO 酶活性都略有上升,但品种间差异不显著。

另外, Mit-ACO 酶活性在‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’果实发育过程中均呈现先上升后下降的趋势,且均在花后 75 d 时达到最高峰,但同期品种间始终无显著性差异(图 3, C)。在果实发育初期, Mit-ACO 酶活性在 3 个品种中均逐渐上升,其中的‘八里香’略高于‘鸭梨’和‘荏梨’;随着果实继续发育,各品种 Mit-ACO 酶活性均开始逐渐下降;果实成熟时,‘荏梨’ Mit-ACO 酶活性略有上升,而‘八里香’和‘鸭梨’继续下降,此时的 Mit-ACO 酶活性表现为“鸭梨” > “荏梨” > “八里香”,但其间差异不显著。

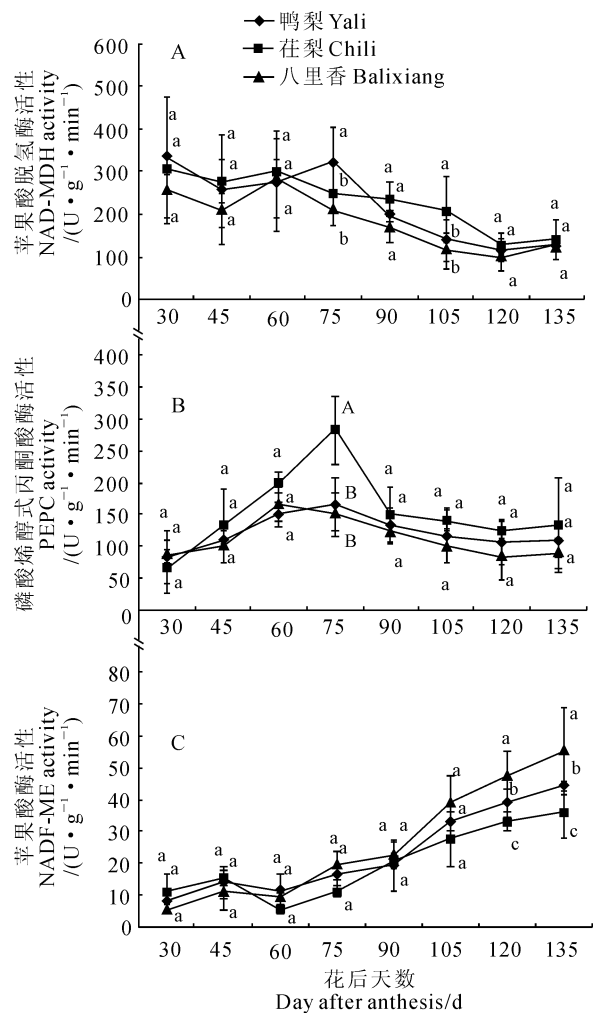


图 2 ‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’果实

苹果酸代谢相关酶活性变化

Fig. 2 Changes of malic metabolism related enzyme activities in fruits of ‘Yali’, ‘Chili’ and ‘Balixiang’ during their development

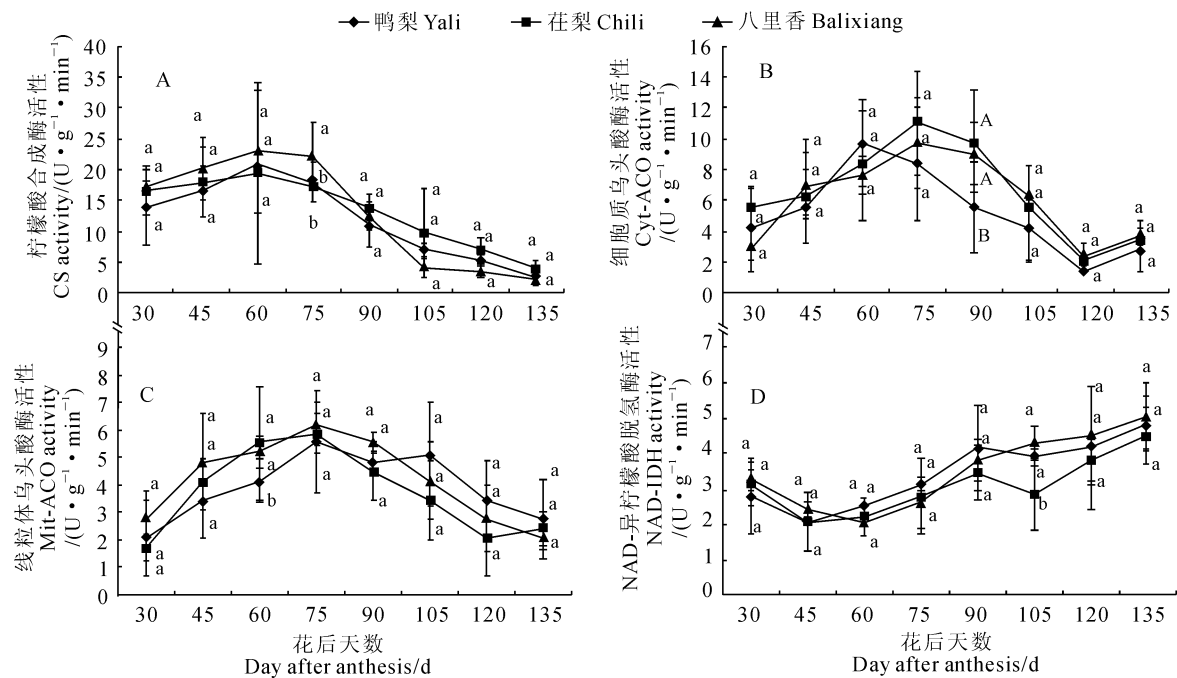


图3 ‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’果实发育过程中柠檬酸代谢相关酶活性变化

Fig. 3 Changes of citric metabolism related enzyme activities in fruits of ‘Yali’, ‘Chili’ and ‘Balixiang’ during their development

表1 果实中总酸及各酸组含量与相关代谢酶活性的相关系数

有机酸 Organic acid	品种 Cultivar	代谢酶 Related enzyme						
		NAD-IDH	NAD-MDH	NADP-ME	Cyt-ACO	Mit-ACO	PEPC	CS
苹果酸 Malic	鸭梨 Yali	-0.163	0.367	-0.513 *	0.23	-0.001	0.02	0.349
	荏梨 Chili	-0.339	0.650 * *	-0.681 * *	0.165	0.102	0.011	0.389
	八里香 Balixiang	-0.337	0.555 * *	-0.601 * *	-0.124	0.022	-0.014	0.437 *
柠檬酸 Citric	鸭梨 Yali	-0.501 *	0.410 *	-0.717 * *	0.18	-0.239	-0.205	0.491 *
	荏梨 Chili	-0.453 *	0.533 * *	-0.654 * *	0.108	0.163	-0.149	0.462 *
	八里香 Balixiang	-0.439 *	0.430 *	-0.695 * *	0.132	0.232	0.085	0.549 * *
总酸 Total acid	鸭梨 Yali	-0.421 *	0.445 *	-0.723 * *	0.225	-0.168	-0.135	0.494 *
	荏梨 Chili	-0.452 *	0.614 * *	-0.716 * *	0.136	0.156	-0.109	0.476 *
	八里香 Balixiang	-0.428 *	0.521 * *	-0.709 * *	0.028	0.156	0.047	0.543 * *

注：* * 和 * 分别表示在 0.01 和 0.05 水平上显著相关。
Note: * * and * mean significant at 0.01 and 0.05 level, respectively.

最后,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中的 NAD-IDH 酶活性随着果实发育呈逐渐上升趋势,但除花后 105 d 外品种间均无显著差异(图 3, D)。其中,在果实发育初期,‘鸭梨’和‘荏梨’中的 NAD-IDH 酶活性有所下降,于花后 45 d 时均达到最低值,而花后 60 d 时 NAD-IDH 酶活性在‘八里香’中出现相对低值;随着果实的继续发育,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中 NAD-IDH 酶活性快速上升,其中‘鸭梨’和‘荏梨’中 NAD-IDH 酶活性在花后 90 d 时均略有下降,成熟时又有所上升,而‘八里香’中 NAD-IDH 酶活性从花后 90 d 开始持续上升;果实成熟

时,NAD-IDH 酶活性在 3 个品种间差异不显著。

以上结果表明,果实发育过程中,不同梨品种的柠檬酸代谢相关酶活性变化趋势基本一致,且酶活性无品种间的差异显著,因此推断柠檬酸代谢相关酶不是决定品种间酸含量差异的主要因素。

2.3 梨果实发育过程中有机酸组分和代谢酶活性的关系

通过对‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’果实的苹果酸、柠檬酸以及总酸含量与代谢酶活性的相关性分析(表 1)发现,三者的苹果酸含量都与 NADP-ME 酶活性呈显著或极显著负相关性;柠檬酸含量与

NAD-MDH 和 CS 酶活性均表现为显著或极显著正相关,而与 NAD-IDH 和 NADP-ME 酶活性呈显著或极显著负相关;总酸含量也是与 NAD-MDH 和 CS 酶活性表现为显著或极显著正相关,而与 NAD-IDH 和 NADP-ME 酶活性呈显著或极显著负相关。可见,梨果实发育过程中苹果酸和柠檬酸代谢酶活性共同影响了梨果实的酸含量水平。

3 讨 论

3.1 不同品种梨果实中有机酸组分含量的动态变化特征

不同果实在不同时期积累的有机酸种类有所不同。Lamikanra 等^[10]对葡萄的研究发现,苹果酸含量随着果实的生长发育逐渐上升,发育中期苹果酸的含量达到最大值,而柠檬酸含量在果实生长至成熟过程中呈现下降的趋势。Shaw 等^[11]报道,3 个枇杷品种果实发育前期苹果酸和柠檬酸含量迅速上升,而在发育后期两者含量都有所下降,且柠檬酸下降速度高于苹果酸。陈美霞等^[12]发现,杏品种‘新世纪’的总酸和苹果酸含量变化趋势完全一致,在较高的水平上缓慢增加,而柠檬酸的含量始终很低;而凯特杏的柠檬酸在果实发育前期含量很低,之后急剧上升,成熟前稍有下降,苹果酸的变化正好与柠檬酸相反。本研究结果表明,果实发育中前期,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’3 个品种中柠檬酸含量一直高于苹果酸,而发育后期柠檬酸含量持续下降,且在 3 个品种中几乎相等,苹果酸含量却有所上升,从而成为不同品种间酸含量差异的主要原因。这与霍月青^[1]的研究结果有所不同,其对梨品种‘大理火把’、‘二宫白’、‘黄蜜’以及‘雁荡雪梨’的研究表明,果实中苹果酸含量先上升后下降,柠檬酸呈持续上升趋势,只有部分品种后期含量略有下降,柠檬酸在果实成熟时占主导地位。这可能与梨的不同栽培种酸积累类型差异有关^[4],由于本研究中没有包括砂梨品种,不同研究结果产生差异的原因仍需要进一步探讨。

3.2 梨果实苹果酸积累差异与其代谢酶的关系

NAD-MDH 酶^[13]是果实细胞中苹果酸合成的关键酶,在细胞质中通过 PEPC 酶产生草酰乙酸(OAA),在 NAD-MDH 酶的作用下转化成苹果酸。本研究发现,在果实发育前期,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中苹果酸的变化趋势与 NAD-MDH 酶活性相一致,这与赵永红等^[14]在设施油桃上的研究相一致。但是发育前期‘鸭梨’和‘荏梨’中的苹果酸含量差异不显著,且相关性分析表明,‘鸭梨’中苹果酸含

量变化与 NAD-MDH 酶活性相关性不显著。因此,梨果实中苹果酸的积累还受到其他因素的影响。赵森等^[15]认为,果实中有机酸的来源主要有 2 种途径:一种是叶片暗固定 CO₂ 形成的有机酸转运至果实中,另一种是果实自身通过 CO₂ 的暗固定形成有机酸。因此,我们推测梨果实中的苹果酸除了通过 NAD-MDH 将 OAA 转化,还有可能通过线粒体中的三羧酸循环形成苹果酸。

众多研究表明,细胞质中 NADP-ME 对苹果酸主要起降解作用。Frenkel 等^[16]发现,该酶活性变化与苹果酸的脱羧、果实呼吸商的提高及在果实衰老期苹果酸的逐渐降低相一致。本研究发现,在梨果实发育后期,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中的苹果酸含量变化和 NADP-ME 酶活性相关性达到显著或极显著负相关水平($r = -0.513^*$; $r = -0.681^{**}$; $r = -0.601^{**}$),且果实发育前期, NADP-ME 对苹果酸含量影响较小,后期 NADP-ME 酶活性上升导致苹果酸降解,由于合成速率小于降解速率,因此果实中苹果酸总量减少,此结果与前人在菠萝上研究结果相似^[17]。这表明 NADP-ME 是影响梨果实中苹果酸代谢的关键酶。另外,梨果实成熟期 NADP-ME 活性在 3 个品种间的差异也达到显著的水平($P < 0.05$)。因此,我们推测在梨果实发育后期, NADP-ME 活性差异是造成不同品种中苹果酸含量差异的主要原因之一。这与李雪梅^[6]在砂梨上的研究结论相一致,而与 Masashi 等^[18]在柑橘上的研究结论不同,可能是由于梨与柑橘果实酸代谢方式不同所致^[14]。

3.3 梨果实柠檬酸积累差异与其代谢酶的关系

Haffaker 和 Wallace^[19]在伏令夏橙中的研究表明,果实中的柠檬酸合成途径由 CO₂ 在 PEPC 的催化下固定形成 OAA, OAA 与乙酰辅酶 A 通过 CS 的作用生成柠檬酸。本试验发现,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中的柠檬酸含量变化与 CS 活性相关性显著或极显著($r = 0.491^*$; $r = 0.462^*$; $r = 0.549^{**}$),即 CS 是梨果实合成柠檬酸的关键酶,这与前人在柑桔^[9,20]、菠萝^[16]、脐橙^[5]上的研究结果相一致。但是, Bruemer 等^[21]、Canel 等^[22]及 Sadka 等^[23]的研究发现,果实中 CS 酶活性变化与果实中酸水平无相关性,在有机酸含量差异明显的柑橘种、品种之间, CS 酶活性变化与有机酸含量差异没有明显的关系。在本试验的果实发育过程中,‘鸭梨’、‘荏梨’和‘八里香’中柠檬酸的含量差异不显著, CS 酶活性差异也不显著。因此, CS 酶活性不是引起品种间柠檬

酸含量差异的主要因素。

罗安才等^[24]研究认为,影响柠檬酸积累、造成种和品种间柠檬酸含量差异的原因不仅与合成有关,还可能与其跨膜运输和分解有关。Sadka 等^[25]研究表明,Mit-ACO 酶活性受抑制可阻止柠檬酸转化为乌头酸,最终导致柠檬酸积累增加。本试验发现,在梨果实发育前期,Mit-ACO 酶活性逐渐上升,

这与柠檬酸含量的下降相一致,但两者并没有表现显著的相关性,说明 Mit-ACO 酶并不是影响柠檬酸积累差异的关键酶;在梨果实发育后期,柠檬酸含量下降,除与 CS 酶活性下降、NAD-IDH 酶活性升高有关外,还受 Cyt-ACO、Mit-ACO 酶的影响,这些酶可通过三羧酸循环,降低果实中柠檬酸的含量。

参考文献:

- [1] 霍月青. 砂梨品种资源糖酸及石细胞含量特点研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [2] YAO G F(姚改芳),ZHANG SH L(张绍铃),WU J(吴俊),*et al.* Analysis of components and contents of soluble sugars and organic acids in ten cultivars of pear by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报),2011,**34**(5):25—31(in Chinese).
- [3] GAO H Y(高海燕),WANG SH G(王善广),LIAO X J(廖小军),*et al.* Study on determination and correlation of soluble sugars and organic acids in pear juice from different cultivars[J]. *Acta Agric. Boreal.-Sin.*(华北农学报),2004,**19**(2):104—107(in Chinese).
- [4] 姚改芳. 不同栽培种梨果实糖酸含量特征及形成规律的研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [5] GONG R G(龚荣高),LÜ X F(吕秀芳),*et al.* Study on the organic acid-metabolizing enzymes in robertson navel orange during the fruit development[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报),2006,**24**(4):402—404(in Chinese).
- [6] 李雪梅. 砂梨果实有机酸含量及代谢相关酶活性动态变化研究[D]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [7] JIA H J,HIRANO K,OKANMOTO G. Effect of fertilizer levels on tree growth and fruit quality of “Hakuho” peaches (*Prunus persica*) [J]. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*,1999,**68**(3):487—493.
- [8] HIRAI M,UENO I. Development of citrus fruits:fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue[J]. *Plant Cell Physiol.*,1977,**18**:791—799.
- [9] LUO A C(罗安才),YANG X H(杨晓红),DENG Y Y(邓英毅),*et al.* Organic acid concentrations and the relative enzymatic changes during the development of citrus fruits[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学),2003,**36**(8):941—944(in Chinese).
- [10] LAMIKANRA O,INYANG I D,LEONG S. Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red muscading grapes[J]. *J. Agriculture Food Chemistry*,1995,**43**:3 026—3 028.
- [11] SHAW P E,WILSON C W. Determination of organic acids and sugars in loquat by high-pressure liquid chromatography[J]. *J. Sci. Food Agric.*,1981,**32**:1 242—1 246.
- [12] CHEN M X(陈美霞),CHEN X S(陈学森),CI ZH J(慈志娟),*et al.* Changes of sugar and acid constituents in apricot during fruit development[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报),2006,**33**(4):805—808(in Chinese).
- [13] MILLER S S,DRISCOLL B T,GREGERSON R G,*et al.* Alfamalde dehydrogenase(MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodulenehance MDH[J]. *Plant J.*,1998,**15**:173—184.
- [14] ZHAO Y H(赵永红),LI X L(李宪利),JIANG Z SH(姜泽盛),*et al.* Organic acid metabolism in nectarine fruit development under protected cultivation[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*(中国生态农业学报),2007,**15**(5):87—89(in Chinese).
- [15] ZHAO M(赵森),WU Y J(吴严军),JIANG G H(蒋桂华),*et al.* Advances in research on the metabolism of organic acids in citrus fruits[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报) 2008,**25**(2):225—230(in Chinese).
- [16] FREKEL C,KLEIN I,DOLLY D R. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruit[J]. *Plant Physiol.*,1968,**43**:1 146—1 153.
- [17] SARADHULDHAT P,PAULL R E. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development[J]. *Scientia Horticulturae*,2007,**112**(3):297—303.
- [18] MASASHI HIRAI M,UENO I. Development of citrus fruits:Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue[J]. *Plant & Cell Physiol.*,1977,**18**(4):791—799.
- [19] HAFFAKER RC,WALLACE A. Dark fixation of CO₂ in homogenates from citrus leaves,fruits, and roots[J]. *Pro. Amer. Soc. Hort Sci.*,1959,**74**:348—357.
- [20] WEN T(文涛),XIONG Q E(熊庆娥),*et al.* Study on the change of organic acid synthetase activity during fruit development of navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck)[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报),2001,**19**(1):27—30(in Chinese).
- [21] BRUEMMER J H,BUSLIG B S,ROE R. Citrus enzyme system:Opportunities for control of fruit quality[J]. *Pro. Int. Soc. Citricult.*,1997,**3**:712—716.
- [22] CANE L C,BAILAY-SERRES J N,ROOSE M L. *In vitro* [¹⁴C]citrate uptake by tonoplast vesicles of acidless citrus juice cells[J]. *J. Amer. Hort. Sci.*,1995,**120**(3):510—514.
- [23] SADKA A,DAHAN E,COHEN L,*et al.* Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit[J]. *Physiologia Plantarum*,2000,**108**:255—262.
- [24] LUO A C(罗安才),LI D G(李道高),YANG X H(杨晓红). Advances in research on the metabolism of organic acids in citrus fruits[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报),2001,**28**:597—602(in Chinese).
- [25] SADKA A,DAHAN E,OR E. NADP-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development[J]. *Plant Sci.*,2000,**158**:173—181.