



# ‘鸭梨’×‘京白梨’杂交后代果实有机酸积累差异及相关酶活性的研究

李甲明<sup>1</sup>,杨志军<sup>1</sup>,乐文全<sup>2</sup>,姚改芳<sup>1</sup>,黄小三<sup>1</sup>,张绍铃<sup>1</sup>,吴俊<sup>1\*</sup>

(1 南京农业大学 梨工程技术研究中心,南京 210095;2 河北省农林科学院昌黎果树研究所,河北昌黎 066600)

**摘要:**该研究以‘鸭梨’×‘京白梨’杂交后代高酸个体(GS-Y14)和低酸个体(DS-Y182)为试材,系统分析了果实发育过程中有机酸积累动态及相关酶活性的变化特征。结果表明:(1)GS-Y14 属于苹果酸优势型果实,DS-Y182 属于柠檬酸优势型果实,且成熟时两者在总酸含量上表现出的差异主要是由于苹果酸含量的差异所致。(2)苹果酸酶(NADP-ME)是苹果酸形成的关键酶,在梨果实发育过程中 NADP-ME 起分解作用,且该酶活性在两类个体果实发育后期差异显著,即 NADP-ME 是引起 GS-Y14 和 DS-Y182 中苹果酸含量不同的主要原因,进而导致成熟时两类个体果实酸积累的差异。(3)梨果实磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)活性的升高有利于其柠檬酸的合成,而柠檬酸合酶(CS)是影响其柠檬酸含量变化的关键酶;细胞质鸟头酸酶(Cyt-ACO)和线粒体鸟头酸酶(Mit-ACO)早期对果实柠檬酸的含量变化影响较小,后期异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)活性对柠檬酸在后代个体中的积累有一定影响。

**关键词:**梨;杂交后代;有机酸;酶活性

中图分类号:Q945.6<sup>+</sup>5

文献标志码:A

## Difference of Acidity Accumulation and Related Enzyme Activities of Pear from Hybrid Offspring of ‘Yali’×‘Jingbaili’

LI Jiaming<sup>1</sup>, YANG Zhijun<sup>1</sup>, YUE Wenquan<sup>2</sup>, YAO Gaifang<sup>1</sup>,  
HUANG Xiaosan<sup>1</sup>, ZHANG Shaoling<sup>1</sup>, WU Jun<sup>1\*</sup>

(1 Pear Engineering Research Centre, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Research Institute of Changli Fruit Tree, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China)

**Abstract:** In this study, two individuals, GS-Y14 with high acid content and DS-Y182 with low acid content, from hybrid offspring of ‘Yali’×‘Jingbaili’ were used to analyze the dynamic changes of organic acid and enzyme activities in pear fruit. The results showed that GS-Y14 belongs to malic acid dominant type, DS-Y182 belongs to the citric acid dominant type. The difference in total acid contents between DS-Y182 and GS-Y14 individual was mainly attributed to the content of malic acid during ripening. NADP-ME as key enzyme plays a decomposition role in malic acid pathway, and showed significant difference near ripening in two species, so the NADP-ME was the main reason leading to the difference of malic acid between GS-Y14 and DS-Y182, and effect the final acid accumulation in fruit during ripening. The increasing activity of PEPC favored the synthesis of citric acid. CS is the key enzyme in the change of malic acid content. In the early period, Cyt-ACO and Mit-ACO showed little effects on the change of citric acid content. In the later

收稿日期:2013-10-18;修改稿收到日期:2013-11-30

基金项目:国家自然科学基金(31171928);农业产业技术体系建设专项(CARS-29-2)

作者简介:李甲明(1989—),男,在读硕士研究生,主要从事果树生物学研究。E-mail:2012104034@njau.edu.cn

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

period, the activity of NAD-IDH enzyme has a certain effect on the citric acid accumulation in different progeny.

**Key words:** pear; hybrids progeny; organic acid; enzyme activity

果实中糖、酸含量和糖酸比是影响梨果实风味品质的重要因素,也是品种选择的重要衡量指标。在梨的杂交育种实践中,多数个体因表现出低糖高酸的特征而被淘汰。由于梨杂交后代果实中糖含量变化范围较小,而酸变化幅度较大,因此果实糖酸比大小主要由酸含量决定<sup>[1]</sup>。因此,梨果实有机酸含量的高低是杂交后代筛选时的重要指标,有机酸积累特性及机制的研究也成为梨果实品质研究的重点。目前,国内外有关果实有机酸形成机理的研究较多的是在柑桔树种上<sup>[2-4]</sup>。如赵森<sup>[5]</sup>通过对不同品种的柑橘研究,明确了柑橘果实有机酸的主要成分是柠檬酸;陈发兴等<sup>[3]</sup>研究认为不同类型的柑橘类果实有机酸的变化规律有所不同;罗安才<sup>[6]</sup>、文涛等<sup>[7]</sup>通过对柑橘以及脐橙的研究结果表明:柠檬酸合酶(CS)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)是柠檬酸积累过程中的重要酶。近几年有关梨果实有机酸性状的发育特征研究也有一些进展,如高海燕等<sup>[8]</sup>研究发现,梨汁中有机酸的主要成分是苹果酸、柠檬酸、琥珀酸等,且苹果酸的含量最高。霍月青<sup>[9]</sup>对70个砂梨品种对有机酸组分特点及发育动态研究,将梨品种划分为柠檬酸优势型以及苹果酸优势型两类。在酸的遗传特性方面,王宇霖等<sup>[10]</sup>通过对49个杂交组合2542株梨杂种实生苗亲本性状遗传倾向的研究表明,糖和酸是独立数量遗传。李秀珍等<sup>[11]</sup>的研究认为选用西洋梨风味甜酸的品种作为母本与砂梨系统中甜的品种杂交时,后代果实的风味多数为酸甜,只有少数出现酸或甜;同样其与秋子梨系统的品种杂交时,后代果实酸味遗传性状较强。

综上所述,国内外对梨果实有机酸的研究主要集中在部分品种资源的有机酸组分和含量测定、有机酸积累特征以及酸性状的遗传规律等方面,但对于不同酸积累水平的个体间差异产生的生理基础以及影响机制研究却鲜有报道。因此,本研究以杂交群体中表现高酸和低酸的个体为试材<sup>[12]</sup>,拟通过对遗传背景相对一致的杂交后代间有机酸含量及相关酶活性的动态变化差异,以及不同代谢酶对有机酸积累的影响,探讨果实有机酸含量差异产生的主要原因,从而为鉴定杂交后代酸含量水平提供有效的生理检测指标,对于进一步开展梨果实有机酸积累代谢的生理机制研究具有重要意义,同时也将为今

后指导梨杂交育种中酸性状的果品质改良提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验以本实验室前期研究工作结果为基础,以‘鸭梨’×‘京白梨’杂交后代中筛选出的长势良好且成熟期一致的高酸型后代GS-Y14和低酸型后代DS-Y182<sup>[12]</sup>为研究材料。试验材料采自河北省农林科学院昌黎果树研究所,栽培条件:2002年进行杂交并得到种子,2003年播种,2007年开始结果,2009年进行调查。果园土质为沙壤土。杂交后代的株行距为0.6 m×3.0 m<sup>[12]</sup>。自盛花后40 d开始采样,每隔15 d采样1次,每次取5个果实,共6次。采样时按树冠外围的中、东、南、西、北各个方向随机采取中等大小且无病虫害的果实,将果实清洗干净后削去果皮,去核,取果肉并混匀,取一部分用于酸组分的测定,其余样品液氮速冻后,置于-70℃冰箱中,用于测定相关酶活性。

### 1.2 测定方法

**1.2.1 有机酸提取与含量测定** 有机酸提取参照Jia等<sup>[13]</sup>的方法。采用高效液相色谱法(HPLC法)测定有机酸含量。由于梨果实中苹果酸和柠檬酸为主要的有机酸组分,其他组分含量很低,因此本研究中果实总酸含量为苹果酸含量与柠檬酸含量之和。

**1.2.2 酶液的提取与活性测定** 酶液的提取和活性的测定均参照Hirai<sup>[14]</sup>和罗安才等<sup>[4]</sup>方法。最终得到细胞质乌头酸酶液(Cyt-Aconitase, Cyt-ACO)、线粒体乌头酸酶液(Mit-Aconitase, ACO)和NAD-异柠檬酸脱氢酶液(NAD-Isocitrate dehydrogenase, NAD-IDH)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶液(phospho-enolpyruvatecarboxylase, PEPC)和柠檬酸合成酶液(citrate synthase, CS)。酶活性的测定反应体系为3 mL,UV-2450型紫外分光光度计测定吸光度,以0.02 s为单位扫描3 min,以每分钟吸光度变化0.01为一个酶单位,酶的活性单位用鲜重表示U·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>。

### 1.3 数据处理

所有实验数据的差异显著性分析均采用SPSS 17.0系统分析软件进行,平均值、标准差以及图形

生成采用 Excel 相关软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂交后代高酸/低酸个体果实酸含量的变化

**2.1.1 总酸含量** 从图 1,A 可以看出, 高酸/低酸个体果实中总酸含量的变化均呈现先上升后下降的趋势。在果实发育初期, DS-Y182 中总酸含量上升较快, 而 GS-Y14 中总酸含量反而上升较慢, 两者在花后 55 d 都达到最高值且差异极显著, 分别为 69.73 和 38.89 mg·g<sup>-1</sup>; 随着果实的生长发育, 两者均开始下降, 自花后 85 d 开始, GS-Y14 中总酸的含量要高于 DS-Y182; 至果实成熟时, DS-Y182 和 GS-Y14 果实的总酸含量分别为 7.89 和 11.44 mg·g<sup>-1</sup>, 且其间差异达到显著水平。

**2.1.2 苹果酸含量** 由图 1,B 可知, 高酸/低酸个体果实发育早期, 苹果酸的含量逐渐上升, 且 GS-Y14 显著高于 DS-Y182。在花后 55 d 时, GS-Y14 果实中的苹果酸含量达到最大值 (14.02 mg·g<sup>-1</sup>), 随后含量下降, 至花后 70 d, 呈缓慢下降趋势, 并保持相对稳定的水平; 而 DS-Y182 苹果酸含量在花后 70 d 达到最大值 (7.82 mg·g<sup>-1</sup>), 随后迅速下降, 至花后 100 d 达到最低值 (2.35 mg·g<sup>-1</sup>), 其后含量略有上升。在果实整个发育期内, GS-Y14 果实中苹果酸含量始终高于 DS-Y182; 两者成熟时的苹果酸含量分别为 8.35 和 3.88 mg·g<sup>-1</sup>, 且差异达到显著水平。

**2.1.3 柠檬酸含量** 高酸/低酸个体 GS-Y14 与 DS-Y182 果实中柠檬酸含量变化趋势基本一致, 表现出先升后降的动态变化(图 1,C)。其中, 在花后 90 d 之前, GS-Y14 中的柠檬酸含量均低于 DS-Y182; 花后 40 d, DS-Y182 中的柠檬酸含量开始迅速上升, 并于花后 55 d 达到最大值 (62.40 mg·g<sup>-1</sup>), 而 GS-Y14 上升趋势较为平缓, 但也于花后 55 d 达到最大值 (24.87 mg·g<sup>-1</sup>); 随着果实的生长发育, 两者中的柠檬酸含量开始逐渐下降, 花后 70 d 时两者含量基本维持相对稳定状态。至果实成熟时, DS-Y182 柠檬酸含量反而高于 GS-Y14, 两者含量分别为 3.996 和 3.095 mg·g<sup>-1</sup>, 但差异并不显著。

以上分析结果表明, 果实发育中前期总酸含量变化与柠檬酸含量变化趋势相似。待果实进入成熟期, GS-Y14 中的总酸含量要高于 DS-Y182, 此时苹果酸含量 GS-Y14 高于 DS-Y182, 且两个体总酸和柠檬酸含量差异均显著, 柠檬酸的含量差异不显著。

这说明杂交后代个体表现高酸和低酸主要是因为苹果酸含量的差异, 果实发育后期, 苹果酸的合成与积累对决定果实总酸的含量十分关键。

### 2.2 杂交后代低酸/高酸型个体果实有机酸代谢相关酶活性的变化

**2.2.1 苹果酸代谢相关酶活性** 梨果实发育过程中苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)活性变化在 GS-Y14 中表现为先下降后上升趋势, 而在 DS-Y182 为下降-上升-下降的趋势(图 2,A)。在花后 110 d 之前, GS-Y14 中 NAD-MDH 活性要显著低于 DS-Y182。花后 40 d, 两者 NAD-MDH 活性均逐渐下降, DS-

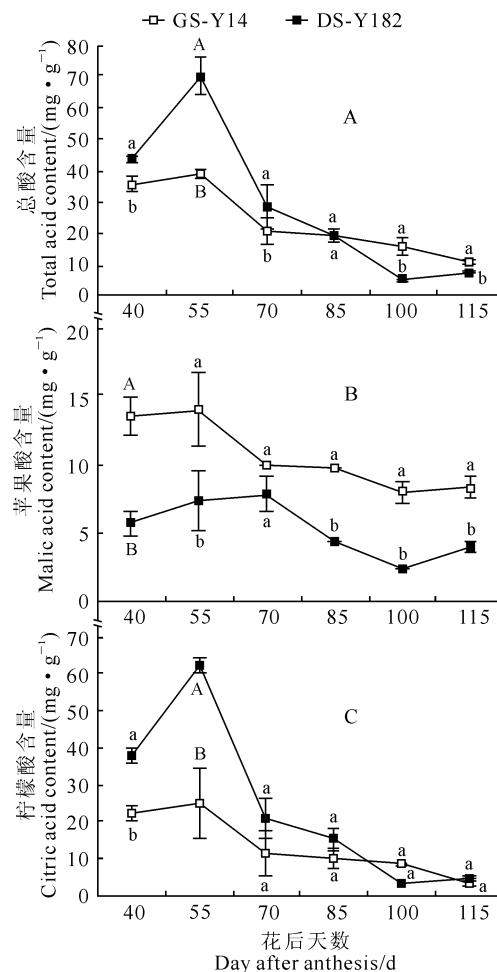


图 1 GS-Y14 和 DS-Y182 果实不同发育阶段酸含量变化  
GS-Y14 和 DS-Y182 分别为杂交后代的高酸和低酸个体; 同期不同大小写字母分别表示材料在 0.01 和 0.05 水平显著性差异; 下同

Fig. 1 Changes of acid content in GS-Y14 and

DS-Y182 fruits at various developmental stages

The GS-Y14 and DS-182 are individuals from hybrid offspring of 'Yali' × 'Jingbaili' with high and low acid content, respectively; The different capital and normal letters within same time indicate significant difference between materials at 0.01 and 0.05 level, respectively; The same as below

Y182 在花后 55 d 达到最低值( $328.75 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ),而 GS-Y14 在花后 70 d 达到最低值( $115.45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ );之后,随着果实生长发育,两者 NAD-MDH 活性逐渐上升,DS-Y182 中的酶活性花后 100 d 达到最大值( $671.79 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ),随后略有下降,而 GS-Y14 花后 70 d 一直呈上升趋势,于花后 115 d 达到最大值( $641.99 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )。果实成熟时,GS-Y14 的 NAD-MDH 活性稍高,但两者间差异不显著。

由图 2,B 可见,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)活性在两个品种中变化趋势基本一致。其中,在花后 40 d,GS-Y14 和 DS-Y182 中该酶活性均呈上升趋势,至花后 70 d 活性均达到最高值,分别为  $40.76$  和  $56.93 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;随着果实继续生长发育,两者中 PEPC 的活性开始下降,但与 DS-Y182 相比,该酶活性在 GS-Y14 中下降的趋势较为平缓;在果实发育后期,两者的 PEPC 活性均略有上升。在整个梨果实发育过程中,两者间 PEPC 活性差异一直不显著。

另外,两类个体果实中苹果酸酶(NADP-ME)活性的变化也表现出相似的趋势,即前中期先在低水平波动,而后期快速升高(图 2,C)。其中,在果实发育整个时期内,GS-Y14 中 NADP-ME 活性始终低于 DS-Y182,且两者的变化趋势基本一致。在果实发育前期至中期,两者中酶活性变化不大,花后 85 d 开始两者中 NADP-ME 活性迅速上升,于花后 115 d 达到最大值,分别为  $46.07$  和  $23.16 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;在果实发育后期两类个体间 NADP-ME 活性差异均显著。

### 2.2.2 柠檬酸相关酶活性

GS-Y14 和 DS-Y182 中柠檬酸合酶(CS)活性的变化趋势基本一致,两者均呈现先上升后下降的趋势,且 GS-Y14 中 CS 活性始终高于 DS-Y182(图 3,A)。其中,花后 40 d,两者 CS 活性均呈现上升趋势;花后 55 d,两者中 CS 活性均达到最高峰且差异显著,分别为  $8.18$  和  $10.82 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;随后,两者的 CS 活性均逐渐下降。方差分析表明,除了花后 55 d 外,其余发育时期两者酶活性差异均不显著。

同时,在果实发育初期,细胞质乌头酸酶(Cyt-ACO)活性在 GS-Y14 中低于 DS-Y182,而中后期相反(图 3,B)。其中,在花后 40 d,两者中 Cyt-ACO 活性均呈上升趋势,DS-Y182 在花后 55 d 出现最高峰( $5.41 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ),而 GS-Y14 的最高峰相对滞后并偏低一些,花后 70 d 达到最大值( $4.76 \text{ U}$

$\cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ );随着果实生长发育,两者的酶活性开始逐渐下降,均于花后 100 d 时达最低值,分别为  $1.37$  和  $1.36 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,之后两者又略有上升,但最终两者酶活性差异不显著。

另外,在果实发育的整个时期内,GS-Y14 和 DS-Y182 中线粒体乌头酸酶(Mit-ACO)活性变化趋势始终一致,且 DS-Y182 中的酶活性始终高于 GS-Y14(图 3,C)。在花后 40 d,两材料果实中 Mit-ACO 活性均呈上升的趋势,并均至花后 70 d 达到最高值,分别为  $2.38$  和  $1.70 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;随着果实的进一步生长发育,Mit-ACO 活性在两者中均呈逐渐下降趋势,花后 115 d 时两类个体中的酶活性几乎相同。

由图 3,D 可见,GS-Y14 和 DS-Y182 中异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)活性呈波动变化趋势。在花后 40 d,GS-Y14 和 DS-Y182 中 NAD-IDH 活性均呈现上升趋势,并于花后 55 d 达到第一个最高峰,分

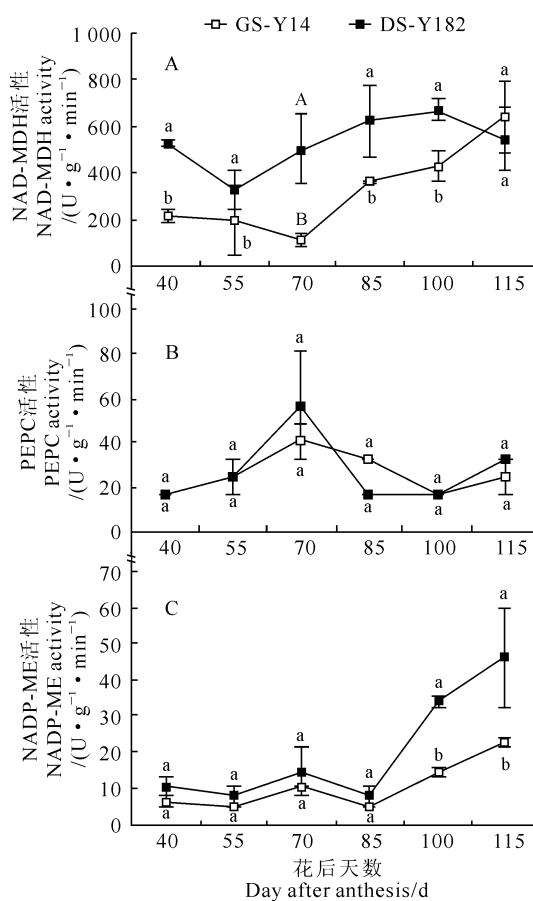


图 2 GS-Y14 和 DS-Y182 果实不同发育阶段苹果酸相关酶活性变化

Fig. 2 Changes of related enzyme activities of malic acid metabolism in GS-Y14 and DS-Y182 fruits at various developmental stages

别为 $3.41$ 和 $3.04\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,随后两者NAD-IDH均开始下降,在花后70 d时GS-Y14活性低于DS-Y182。随着果实的继续生长发育,GS-Y14和DS-Y182中NAD-IDH活性再次呈上升趋势,并于花后85 d达到第二个高峰,酶活性值分别为 $3.07$ 和 $4.07\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ;在果实发育后期,NAD-IDH活性在两材料中变化趋势相反,且差异极显著。

以上结果说明,果实发育过程中苹果酸形成相关酶仅NADP-ME活性在果实成熟时两品种间差异显著,而柠檬酸形成相关酶仅NAD-IDH活性在果实成熟时两类个体差异显著,然而梨果实中主要

酸成分为柠檬酸及苹果酸,因此,推测NADP-ME活性与NAD-IDH活性对成熟时两类个体总酸含量的差异具有重要作用。

### 2.3 梨果实柠檬酸和苹果酸含量变化与其相关代谢酶活性的相关性

同一杂交群体的高酸/低酸个体(GS-Y14/DS-Y182)果实发育过程中苹果酸和柠檬酸含量与其相关代谢酶活性的相关性分析(表1)表明,两种个体的苹果酸含量均与其NADP-ME活性呈极显著负相关性,而两者柠檬酸含量与CS活性呈极显著的正相关性。同时,对于低酸个体DS-Y182而言,柠檬酸含量与其NAD-MDH和NADP-ME活性呈显

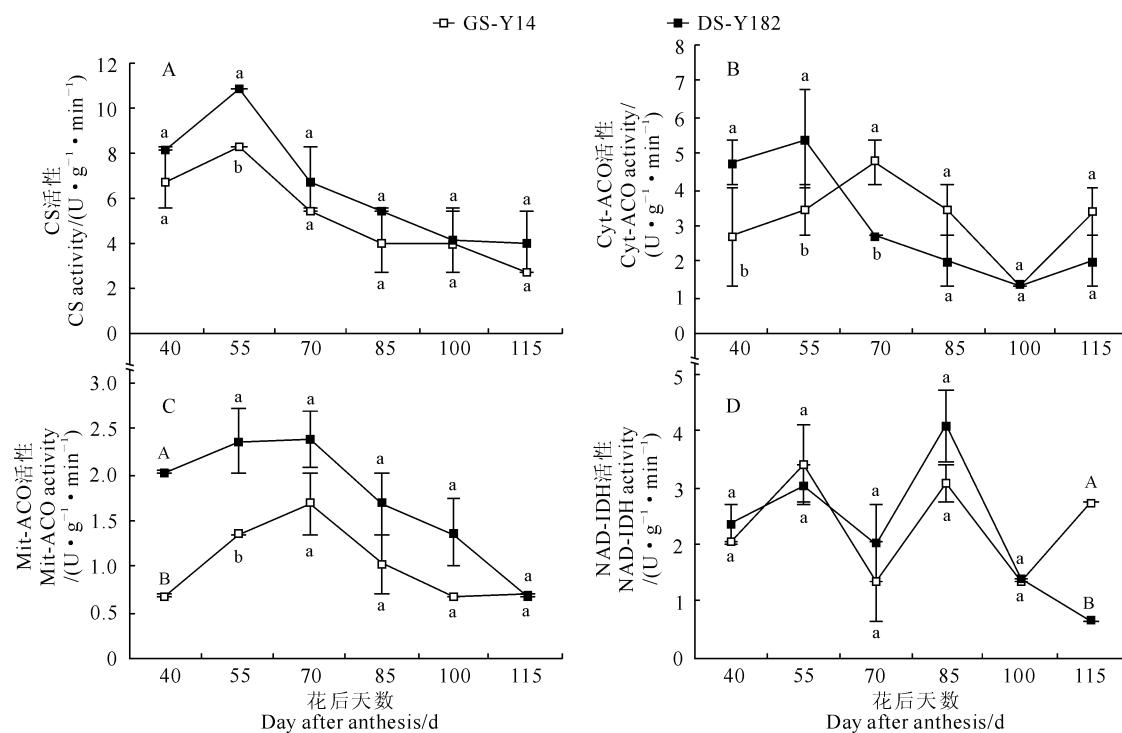


图3 GS-Y14 和 DS-Y182 果实不同发育阶段柠檬酸相关酶活性变化

Fig. 3 Changes of related enzyme activities of citric acid metabolism in GS-Y14 and DS-Y182 fruits at various developmental stages

表1 GS-Y14 和 DS-Y182 果实中柠檬酸和苹果酸含量变化与其代谢酶的相关性

Table 1 Correlation coefficients among the citric and malic acid contents and related enzyme activities in GS-Y14 and DS-Y182 pear fruits

有机酸 Organic acid	类型 Type	NAD-IDH	NAD-MDH	NADP-ME	Cyt-ACO	Mit-ACO	PEPC	CS
柠檬酸 Citric	GS-Y14	0.083	-0.416	-0.656	0.161	0.201	-0.623	0.925 **
	DS-Y182	0.510	-0.606 *	-0.593 *	0.932 **	0.383	-0.068	0.860 **
苹果酸 Malic	GS-Y14	0.349	-0.442	-0.828 **	-0.19	-0.009	-0.322	0.159
	DS-Y182	-0.121	-0.386	-0.732 **	0.513	0.514	-0.386	-0.122

注: \*\* 和 \* 分别表示相关性在 0.01 和 0.05 水平显著。

Note: \*\* and \* mean significant correlation at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

著的负相关性,而与其 Cyt-ACO 活性呈极显著正相关性。这说明果实发育过程中 NADP-ME 活性对苹果酸的形成有一定的抑制作用,而 CS 活性对柠檬酸的形成具有促进作用,此外,NAD-MDH、NADP-ME 以及 Cyt-ACO 活性可能对个别品种柠檬酸的形成也具有一定的影响。

### 3 讨 论

#### 3.1 梨果实发育过程中有机酸含量变化特征

在梨果中,一向认为苹果酸含量最高且占主要地位,而柠檬酸含量很少,并以苹果酸为标准测定总酸含量<sup>[3,8]</sup>。陈发兴等<sup>[3]</sup>研究表明,根据果实成熟时所含主要有机酸,将果实分为 3 种类型:苹果酸型、柠檬酸型、酒石酸型,而梨属于苹果酸型。霍月青<sup>[9]</sup>通过苹果酸和柠檬酸含量的比值又将梨划分为柠檬酸优势型和苹果酸优势型,其测定的地方品种中有 35% 是柠檬酸优势型,而 65.22% 的选育品种是苹果酸优势型。崔艳波等<sup>[12]</sup>研究表明,‘京白梨’×‘鸭梨’正反交后代果实可滴定酸平均值都大于中亲值,正交后代甚至高于高亲值,遗传传递力比较强。而本试验研究其杂交后代群体中 GS-Y14 和 DS-Y18 的总酸含量分别为 7.89 和 11.44 mg·g<sup>-1</sup>,均大于高亲值,这与崔艳波等<sup>[12]</sup>研究结果基本一致。本试验研究结果还表明,在低酸杂交后代 DS-Y182 中柠檬酸的含量要高于苹果酸,属于柠檬酸优势型,而高酸个体 GS-Y14 有机酸的主要成分是苹果酸,其占总酸含量的 72.99%,属于苹果酸优势型。在总酸含量上,果实发育初期,GS-Y14 中总酸含量要低于 DS-Y182,这主要是由于在发育初期 DS-Y182 中的柠檬酸含量要显著高于 GS-Y14;待果实进入成熟期,GS-Y14 中的总酸含量要高于 DS-Y182,此时苹果酸含量 GS-Y14 高于 DS-Y182,且两者差异显著,而柠檬酸的含量在两者间没有显著差异。这说明杂交后代果实呈现出高酸和低酸的主要原因是由于苹果酸含量的差异所致,果实发育后期,苹果酸的合成与积累对决定果实总酸的含量十分关键。

#### 3.2 梨果实苹果酸代谢酶活性与酸积累差异的关系

Law 等<sup>[15]</sup>、Miller 等<sup>[16]</sup>研究结果表明,PEPC 活性受果实中苹果酸、丙酮酸等含量的影响,它能将细胞质中的 PEP 转化成 OAA,OAA 通过 NAD-MDH 的作用转化成苹果酸,而生成的苹果酸又通过 NADP-ME 降解形成 PEP。本研究表明,在梨果实发育前期,果实中的苹果酸呈上升的趋势,GS-

Y14 和 DS-Y182 苹果酸含量分别在花后 55 d、70 d 达到最高峰,此时对苹果酸具有合成作用的 PEPC 活性虽然呈上升趋势,但是在花后 55 d NAD-MDH 活性均有所下降,因此我们推测 GS-Y14 和 DS-Y182 中的苹果酸含量上升可能是由于 PEPC 将 PEP 转化成的 OAA 进入到线粒体中参与三羧酸循环形成苹果酸,也有可能是叶片通过 CO<sub>2</sub> 的暗固定形成有机酸转运到果实中。在梨果实发育后期,苹果酸的含量低于早期,此时高酸与低酸个体果实中 NADP-ME 活性都有大幅度的提高,并且 GS-Y14 中的 NADP-ME 活性要低于 DS-Y182;相关性分析表明,两类个体果实中苹果酸的含量与 NADP-ME 活性呈极显著负相关性。Bogin 等<sup>[17]</sup>和 Ruffner 等<sup>[18]</sup>分别在甜柠檬和葡萄中的研究认为,NADP-ME 能够催化丙酮酸固定 CO<sub>2</sub> 形成苹果酸。在梨果实中 NADP-ME 显然起分解作用,并且由于在发育后期 GS-Y14 和 DS-Y182 的酶活性不同,导致了成熟时两者苹果酸含量的差异。

#### 3.3 梨果实柠檬酸代谢酶活性与酸积累差异的关系

Haffaker 等<sup>[19]</sup>根据在‘伏令夏橙’果实中的研究结果,提出果实中柠檬酸的合成途径是:在 PEPC 催化下,固定 CO<sub>2</sub> 生成草酰乙酸(OAA),OAA 与乙酰辅酶 A 通过 CS 的作用生成柠檬酸。本试验结果表明,在果实发育早期柠檬酸的含量呈现上升的趋势,花后 55 d 达到最高峰,此时参与柠檬酸合成的 CS 和 PEPC 活性都逐渐升高,所不同的是花后 55 d 之后 CS 活性开始下降,PEPC 活性继续升高,而柠檬酸的含量开始下降。相关性分析表明,GS-Y14 和 DS-Y182 中 CS 活性的变化与柠檬酸含量变化的相关性达到极显著水平,相关系数分别为 0.925 和 0.860,说明 CS 是梨果实柠檬酸代谢的关键酶。这与龚荣高等<sup>[20]</sup>对脐橙和罗安才<sup>[6]</sup>对柑桔的研究结论类似。但是,赵永红等<sup>[21]</sup>对油桃的研究发现,CS 活性与柠檬酸含量变化相关性不大,这可能与物种间的特异性有关。

李雪梅<sup>[22]</sup>在砂梨中研究表明,具有分解作用的 Cyt-ACO 和 Mit-ACO 对柠檬酸代谢有一定影响,但是这种作用不显著。本研究相关性分析表明,除 Cyt-ACO 活性在 DS-Y182 中与柠檬酸含量变化呈现极显著正相关性外,其他均呈现非显著相关性,说明 Cyt-ACO 和 Mit-ACO 活性不是梨果实酸含量决定的关键因素。张秀梅等<sup>[23]</sup>在菠萝上研究表明,果实进入青熟期时 PEPC 和 CS 与柠檬酸的含量变化

无明显联系，并认为此期间的柠檬酸含量变化除了与酶的水平有关外，还与其他因素有关。Sripaoraya 等<sup>[24]</sup>认为这些其他因素可能包括温度、养分、种间和种内的遗传等。Cercos 等<sup>[25]</sup>认为果实发育后期柠檬酸还可以通过  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)途径形成氨

基酸。本研究还发现，在果实发育后期，NAD-IDH 活性与柠檬酸含量变化趋势一致，相关性分析也表明两者之间有一定相关性。表明梨的 NAD-IDH 活性对杂交后代个体柠檬酸的积累水平有一定影响，这与李雪梅<sup>[22]</sup>在砂梨中的研究结论相一致。

## 参考文献：

- [1] LI J C(李俊才), YI K(伊 凯), LIU CH(刘 成), et al. The study of pear fruit parts genetic tendency[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2002, **19**(2): 87—93(in Chinese).
- [2] ZHAO M(赵 森), WU Y J(吴延军), 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).
- [3] CHEN F X(陈发兴), LIU X H(刘星辉), CHEN L X(陈立松). Advances in research on organic acid metabolism in fruits[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2005, **22**(5): 526—531(in Chinese).
- [4] LUO A C(罗安才), YANG X H(杨晓红). 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**(80): 941—944(in Chinese).
- [5] 赵 森. 柑橘果实有机酸代谢及调控研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [6] 罗安才. 柑橘果实有机酸代谢生理和奉节脐橙芽变株系的 AFLP 分析研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003.
- [7] WEN T(文 涛), XIONG Q E(曾伟光), ZZENG W H(熊庆娥), et al. Study on the regulation of organic acid synthesize during fruit development of navel orange[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报), 2001, **19**(2): 144—146(in Chinese).
- [8] 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. Boreali-Sin.*(华北农学报), 2004, **19**(2): 104—107(in Chinese).
- [9] 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.
- [10] WANG Y L(王宇霖), WEI W D(魏闻东), LI X G(李秀根). Studies on the trends of inheritance of commercial characteristics of crossed Chinese pear parents in their progenies[J]. *Journal of Fruit Science*(果树科学), 1991, **8**(2): 75—82(in Chinese).
- [11] LI X ZH(李秀珍), MA H L(马慧丽), LIU B G(刘保国), et al. Advances in research on the genetics of pear fruit characters[J]. *Journal of Henan University of Science and Technology*(Agricultural Science)(河南科技大学学报·农学报), 2004, **24**(2): 59—62(in Chinese).
- [12] CUI Y B(崔艳波), CHEN H(陈 慧), YUE W Q(乐文全), et al. Studies on genetic tendency of fruit characters in reciprocal crosses generation berween ‘Jingbaili’ and ‘Yali’ pear cultivars[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2011, **38**(2): 215—224(in Chinese).
- [13] 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.
- [14] HIRAI M, UENO I. Development of citrus fruits; fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue[J]. *Plant and Cell Physiol.*, 1977, **18**(3): 791—799.
- [15] LAW R D, PLAXTON W C. Purification and characterization of a novel phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit[J]. *Biochem.*, 1995, **307**: 807—816.
- [16] MILLER S S, DRISCOLL B T, GREGERSON R G, et al. Alfalfa malate dehydrogenase(MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH[J]. *Plant Journal*, 1998, **15**(2): 173—184.
- [17] BOGIN E, WALLACE A. Citrate synthase from lemon fruit[J]. *Mothods in Enzymology*, 1969, **13**: 19—22.
- [18] RUFFNER H P, POSSNER D, BREM S, et al. The physiological role of malic enzyme in grape ripening[J]. *Planta*, 1984, **160**(5): 444—448.
- [19] HAFFAKER R C, WALLACE A. Dark fixation of CO<sub>2</sub> in homogenates from citrus leaves, fruits, and roots[J]. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 1959, **74**: 348—357.
- [20] GONG R G(龚荣高), LÜ X L(吕秀兰), ZHANG G L(张光伦), et al. Study on the organic acid-metabolizing enzymes in tobertson 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).
- [21] ZHAO Y H(赵永红), LI X L(李宪利), JIANG Z SH(姜泽盛), et al. Organic acid metabolism is 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).
- [22] 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.
- [23] ZHANG X M(张秀梅), DU L Q(杜丽清), SUN G M(孙光明), et al. Changes in organic acid concentrations and the relative enzyme activities during the development of cayenne pineapple fruit[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2007, **24**(3): 381—384(in Chinese).
- [24] SRIPAORAYA S, BLACKHALL N W, MARCHANT R, et al. Relationships in pineapple by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis[J]. *Plant Breed.*, 2001, **120**(3): 265—267.
- [25] CERCOS M, SOLER G, LGLESIAS D J, et al. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh A proposed mechanism for citric acid utilization[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, **62**(4—5): 513—527.