

‘金冠’苹果及其优系(SGP-1)果实发育期间 有机酸代谢特征比较

杨文渊^{1,2,3}, 谢红江², 陶 炼², 宦云敏¹, 陈善波⁴, 林立金¹, 廖明安^{1*}

(1 四川农业大学 园艺学院, 成都 611130; 2 四川省农业科学院园艺研究所, 成都 610066; 3 农业部西南区域园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 成都 610066; 4 四川省林业科学研究院, 成都 610081)

摘 要:以‘金冠’苹果及其优系‘SGP-1’为试材, 测定果实发育期间有机酸组分、含量和苹果酸代谢相关酶活性, 分析它们的变化规律及相关关系, 以探索苹果有机酸积累的关键时期和关键酶, 揭示果实低酸成因。结果表明: (1) 苹果果实发育期间, ‘SGP-1’的有机酸含量显著低于‘金冠’, 成熟时仅为‘金冠’的二分之一, 且主要由苹果酸、奎宁酸、酒石酸和柠檬酸组成, 幼果期以奎宁酸为主, 成熟期以苹果酸为主。(2) ‘SGP-1’的苹果酸含量显著低于‘金冠’, 其在幼果期和膨大期变化规律与‘金冠’相反, 且积累关键时期和快速下降期早于‘金冠’; ‘SGP-1’果实其余酸组分含量变化趋势与‘金冠’基本一致, 但在幼果期显著高于‘金冠’, 在成熟期与‘金冠’差异不显著。(3) ‘SGP-1’的苹果酸代谢相关酶活性在幼果期均显著高于‘金冠’, 成熟期持平或显著低于‘金冠’; 幼果期 MDH 活性和成熟期 ME 活性在两材料间变化规律相反。(4) ‘SGP-1’的幼果期苹果酸积累与 PEPC 和 VHA 活性呈极显著正相关关系, 而同期‘金冠’则与 MDH、PEPC 和 VHA 活性呈极显著负相关关系; ‘SGP-1’膨大期苹果酸积累与 MDH、PEPC 活性呈极显著负相关关系, 与 PEPC 和 VHA 活性呈显著正相关关系, 而同期‘金冠’则与 PEPC、ME 和 VHP 活性呈极显著或显著负相关关系; 二者成熟期苹果酸积累均与 MDH、PEPC、ME 和 VHP 活性呈极显著或显著负相关关系。研究发现, ‘SGP-1’是以苹果酸为主的低酸型‘金冠’苹果变异优系, 对苹果酸积累起主要调控作用的酶种类和活性与‘金冠’不同, 导致了‘SGP-1’的低酸品质, 该研究结果为深入探索果实低酸形成机理和培育高糖低酸新品种奠定了基础。

关键词: ‘金冠’苹果优系(SGP-1); 有机酸积累; 苹果酸代谢酶

中图分类号: Q945.6⁺5; S661.1 **文献标志码:** A

Comparison of Organic Acid Metabolism Characteristics between ‘Golden Delicious’ Apple and Its Excellent Variation Material ‘SGP-1’ during Fruit Development

YANG Wenyuan^{1,2,3}, XIE Hongjiang², TAO Lian², HUAN Yunmin¹,
CHEN Shanbo⁴, LIN Lijin¹, LIAO Ming'an^{1*}

(1 College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 Horticulture Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; 3 Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops [Southwest Region], Ministry of Agriculture, Chengdu 610066, China; 4 Sichuan Academy of Forestry Science, Chengdu 610081, China)

Abstract: To explore the critical period and key enzymes of organic acid accumulation, and reveal the cause

收稿日期: 2021-11-18; 修改稿收到日期: 2022-03-22

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFD1000201); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助(CARS-27); 四川省区域创新合作(2021YFQ0025); 农业部西南区域园艺作物生物学与种质创制重点实验室(MYZS201904)

作者简介: 杨文渊(1982—), 女, 副研究员, 主要从事果树栽培与育种研究。E-mail: wenyang@163.com

* 通信作者: 廖明安, 教授, 博士生导师, 主要从事果树栽培与育种研究。E-mail: lman@sicau.edu.cn

of low acid in fruit, we used the ‘Golden Delicious’ apple and its excellent strain (SGP-1) as materials to determine the components and contents of organic acids and the activities of metabolism-related enzymes during fruit development, then analyzed their variation law and correlation. The results showed that: (1) during the fruit development, the content of organic acids in ‘SGP-1’ was significantly lower than that of ‘Golden Delicious’, which was only half of that of ‘Golden Delicious’ at maturation stage. The organic acids of ‘SGP-1’ were mainly composed of malic acid, quinic acid, tartaric acid and citric acid, with quinic acid as the main component at young fruit stage and malic acid as the main component at maturation stage. (2) The malic acid content of ‘SGP-1’ was significantly lower than that of ‘Golden Delicious’, whose variation law was opposite to that of ‘Golden Delicious’ at young fruit stage and fruit enlargement stage, and the critical accumulation stage and rapid decline stage were earlier than that of ‘Golden Delicious’. The change trend of other acid components in ‘SGP-1’ and ‘Golden Delicious’ was basically the same, and the acid content at young fruit stage of ‘SGP-1’ was significantly higher than that of ‘Golden Delicious’, while there was no significant difference at maturation stage. (3) The activities of malic acid metabolism-related enzymes in ‘SGP-1’ were significantly higher than those in ‘Golden Delicious’ at young fruit stage, and were equal to or significantly lower than those in ‘Golden Delicious’ at maturation stage; The changes of MDH activity in young fruit stage and ME activity in maturation stage of ‘SGP-1’ and ‘Golden Delicious’ were opposite. (4) Correlation analysis showed that the malic acid accumulation of ‘SGP-1’ in young fruit stage was extremely significantly positively correlated with PEPC and VHA, while there was an extremely significantly negative correlation between the malic acid accumulation and activities of MDH, PEPC and VHA in ‘Golden Delicious’. At fruit enlargement stage, malic acid accumulation of ‘SGP-1’ was extremely significantly negatively correlated with MDH and PEPC activities, and significantly positively correlated with PEPCK and VHA activities, while there was a extremely significantly or significantly negative correlation between the malic acid accumulation and activities of PEPC, ME and VHP in ‘Golden Delicious’. The malic acid accumulation in ‘SGP-1’ and ‘Golden Delicious’ at maturation stage was extremely significantly or significantly negatively correlated with MDH, PEPC, ME and VHP activities. It was found that ‘SGP-1’ was a excellent variation strain of ‘Golden Delicious’ apple with low acid content, which was dominated by malic acid. The types and activities of enzymes that mainly regulate malic acid accumulation were different from those of ‘Golden Delicious’, resulting in the low acid quality of ‘SGP-1’. This study laid a foundation for further exploring the formation mechanism of low acid in fruits and cultivating new varieties with high sugar and low acid.

Key words: variant materials of ‘Golden Delicious’ apple; organic acids accumulation; enzymes of malate metabolism

果实中有机酸的代谢是一个复杂的生理过程, 包括酸的合成、降解、利用及区域化的平衡, 且有机酸含量及组分比例是决定果实酸度及风味的重要组成因子^[1]。因此, 揭示果实中有机酸的调控机制对果实品质调控及良种培育具有重要的意义。苹果成熟果实中有机酸以苹果酸为主, 占 60% 以上, 高的可占 97%^[2-4], 奎宁酸、柠檬酸、酒石酸、莽草酸、琥珀酸等含量低^[5-6]。通常有机酸在果实生长过程中积累, 在成熟过程中作为糖酵解、三羧酸循环(TAC 环)等呼吸基质, 以及糖原异生作用基质而被消耗, 其合成和降解过程是在酶促反应下进行的。苹果果实中苹果酸的积累受代谢关键酶调控, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和苹果酸脱氢酶(MDH)负责苹果酸合成, 苹果酸酶(ME) 和磷酸烯醇式丙酮酸

羧化激酶(PEPCK)负责苹果酸的降解, 液泡膜上的 2 个质子泵 H^{+} -ATPase (VHA) 和 H^{+} -焦磷酸酶 (VHP) 为苹果酸的跨膜运输提供能量, 目前已在苹果^[1,7-9]、欧李^[10]、杏^[11]、桃^[12-13]等多种果实中证实以上 6 种代谢相关酶活性是影响苹果酸积累速率的决定因素, 但它们具体的作用机制还不太清楚。

经过多年生产实践, 发现‘金冠’苹果自然变异材料 1 份(暂定名‘SGP-1’), 具有低酸、少锈、耐贮藏等优良性状, 弥补了‘金冠’苹果易感锈、果酸味浓、易发绵等不足。本研究拟通过测定‘金冠’苹果及其优系‘SGP-1’果实发育期间有机酸组分和含量以及苹果酸代谢相关酶活性, 分析有机酸含量变化规律及其与苹果酸代谢相关酶的关系, 明确有机酸积累的关键时期和关键酶, 探讨‘金冠’和‘SGP-1’

果实全发育期有机酸积累的生理差异,为调控苹果果实酸度提供理论依据,也为深入研究‘SGP-1’果实有机酸代谢的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 参试材料及样品采集

供试材料为四川省阿坝州苹果园‘金冠’苹果及其优系‘SGP-1’的果实。在 2019 年 4~9 月,选取生长势基本一致的 3 株苹果树进行样品采集,在花后 7 d 开始采集样品,以后每 20 d 取 1 次样,直至果实达到生理成熟(花后 160 d 左右),1 共取 9 次样。幼果期至成熟期果实大小差异较大,因此每次取果量应根据果实大小而定。样品采集后,果实带皮去心切碎,迅速用液氮冷冻(−196 ℃)后混匀,分两份置于超低温冰箱(−80 ℃)备用,一份用于检测有机酸组分及含量,另一份用于分析苹果酸代谢酶活性。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 果实中酸组分及含量 果实中酸组分提取和测定参照刘雅兰^[14]、张丽丽等^[15]的方法并略加改进。称取液氮研磨成粉的果肉 2 g 左右(计重),加入 4 mL 0.2% 偏磷酸,摇匀,常温超声提取 20 min,8 500 r/min 离心 10 min,残渣中再加入 4 mL 偏磷酸再次提取,合并上清液并定容到 10 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤,获得样品提取液待测。色谱条件:Agilent 高效液相色谱仪(Agilent1260 II),色谱柱为 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为纯甲醇:0.02 mol/L K₂HPO₄ (pH 2.6) = 3 : 97,流速 0.8 mL/min,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。色谱纯级的标准样品苹果酸、奎宁酸、柠檬酸和酒石酸由 Sigma 公司提供,用超纯水分别制备成系列混合标准溶液。将系列混合标准溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤到 2 mL 进样瓶中,进样后以峰面积(X)对浓度(Y)求回归方程和相关系数。将处理后的样品提取液进行液相色谱分析,进样量为 10 μL,采用外标法定量。有机酸含量为各酸组分相加之和。

1.2.2 果实中苹果酸代谢相关酶活性 样品酶提取液制备参照 Hirai 等^[16]和 Sadka 等^[17]的方法。将 0.5 g 果肉用 3 mL 的提取缓冲液[0.2 mol · L^{−1} Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2)、0.6 mol · L^{−1} 蔗糖、10 mmol · L^{−1} 异抗坏血酸]在冰上匀浆,8 000 g,4 ℃离心 10 min,取上清液置冰上,用于酶活性的测定。按照酶试剂盒说明书分别测定 MDH、PEPC、ME、PEPCK、VHA 和 VHP 活性,采用酶标仪分光

光度法测定吸光度(OD)值变化,每 30 s 记录 1 次 OD 值,重复 3 次(1 min 为 1 次重复),共记录 3 min,以每分钟 OD 值变化 0.01 为 1 个酶活单位(U),酶的活性以单位每克鲜果肉每分钟表示(U · g^{−1} · min^{−1})。

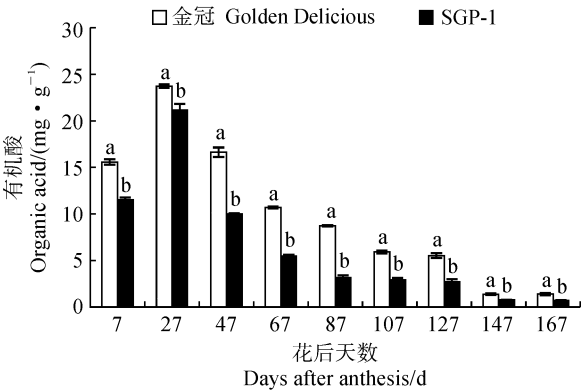
1.3 数据统计分析

用 Excel 2010 软件进行数据整理和绘图,测定结果以平均值±相对标准偏差表示,应用 SPSS20 进行差异显著性分析(Duncan’s 新复极差法,0.05 水平上测试)和相关性分析(Pearson 法)。

2 结果与分析

2.1 ‘金冠’及‘SGP-1’果实发育过程中主要有机酸含量比较

2.1.1 有机酸含量 在整个果实发育期,‘SGP-1’果实有机酸含量始终显著低于‘金冠’果实;二者果实有机酸含量随发育期的变化趋势基本一致,均先升后降,并在花后 27 d 达到最高值,分别达到 21.17 mg · g^{−1} 和 23.74 mg · g^{−1}(图 1)。其中,‘SGP-1’有机酸含量在花后 47~67 d 快速下降,降幅在 50% 左右,在花后 87~127 d 有机酸含量趋于稳定;在成熟期(花后 127~167 d),‘SGP-1’和‘金冠’果实有机酸含量分别急剧下降至 0.70 mg · g^{−1} 和 1.40 mg · g^{−1},分别仅为峰值的 3.31% 和 5.90%。总之,两材料果实有机酸含量随发育期的变化趋势相似,但‘SGP-1’下降较早且快,自花后 67 d 开始,‘SGP-1’有机酸含量仅为‘金冠’的一半,并持续到果实成熟。



同期不同小写字母表示品种间在 0.05 水平存在显著性差异,下同
图 1 ‘金冠’和‘SGP-1’苹果果实发育期有机酸含量变化
The different normal letters within same stage indicate significant difference between materials at 0.05 level, the same as below
Fig. 1 Changes of organic acid content in ‘Golden Delicious’ and ‘SGP-1’ apple fruits during development

2.1.2 苹果酸、奎宁酸、酒石酸和柠檬酸含量

‘SGP-1’和‘金冠’果实有机酸主要由苹果酸、奎宁酸、酒石酸和柠檬酸组成,幼果期均以奎宁酸为主,分别占比 87.40%和 64.00%,成熟期均以苹果酸为主,分别占比 50.10%和 74.20%。

首先,在整个苹果果实发育期,‘SGP-1’果实苹果酸含量始终显著低于‘金冠’,仅为‘金冠’的 8.4%~67.4%(图 2,A)。在幼果期(花后 7~47 d)和膨大期(花后 67~107 d),二者果实苹果酸含量变化趋势不同,‘SGP-1’在花后 7 d 达到峰值(4.15 mg·g⁻¹),而后急剧下降至 0.83~1.01 mg·g⁻¹之间;而‘金冠’苹果酸含量幼果期快速上升,于花后 47 d 达到最高值(9.88 mg·g⁻¹),随后缓慢递减,在花后 107~127 d 趋于稳定。在成熟期(花后 127~167 d),两材料苹果酸含量均急剧下降,仅为峰值的 10%左右,此时‘SGP-1’苹果酸含量是‘金冠’的 1/3。可见,‘SGP-1’苹果酸积累的关键时期为果实发育初期,而‘金冠’苹果酸积累关键期是幼果期和膨大期。

同时,‘SGP-1’和‘金冠’果实中奎宁酸和酒石酸含量变化趋势一致,总体呈现先升后降的特征(图 2,B,C)。在幼果期,‘SGP-1’果实两种酸含量大多显著高于‘金冠’,且峰值均出现在花后 27 d;‘SGP-

1’和‘金冠’果实奎宁酸含量峰值分别为 18.49 mg·g⁻¹和 15.19 mg·g⁻¹;‘SGP-1’奎宁酸含量在幼果期比‘金冠’高出 21.81%~37.41%(图 2,B),弥补了其苹果酸含量的不足(图 2,A),使得两材料有机酸整体含量变化趋于一致(图 1)。在以后发育期,两材料果实奎宁酸和酒石酸含量均快速减少,至成熟期两材料间差异不显著。

另外,在整个果实发育期,‘SGP-1’和‘金冠’果实中柠檬酸含量变化趋势一致(图 2,D)。在果实发育初期,‘SGP-1’柠檬酸含量显著高于‘金冠’,并在花后 7 d 就达到峰值(0.67 mg·g⁻¹),而后大幅下降;在花后 67~87 d,‘SGP-1’柠檬酸含量显著低于‘金冠’;在成熟期,二者柠檬酸含量趋于一致,差异不显著。

2.2 ‘金冠’及‘SGP-1’果实发育过程中酸代谢相关酶活性比较

2.2.1 MDH 和 PEPC 活性 ‘SGP-1’和‘金冠’果实中 MDH 活性在果实发育过程中整体呈‘U’型变化,幼果期和成熟期 MDH 活性较高,膨大期活性较低(图 3,A)。其中,两材料 MDH 活性峰值出现时间不同,分别在花后 47 d(52.42 U·g⁻¹·min⁻¹)和 167 d(36.68 U·g⁻¹·min⁻¹);除花后 87 d 和 167 d 外,其余时段两材料 MDH 活性差异达到显著

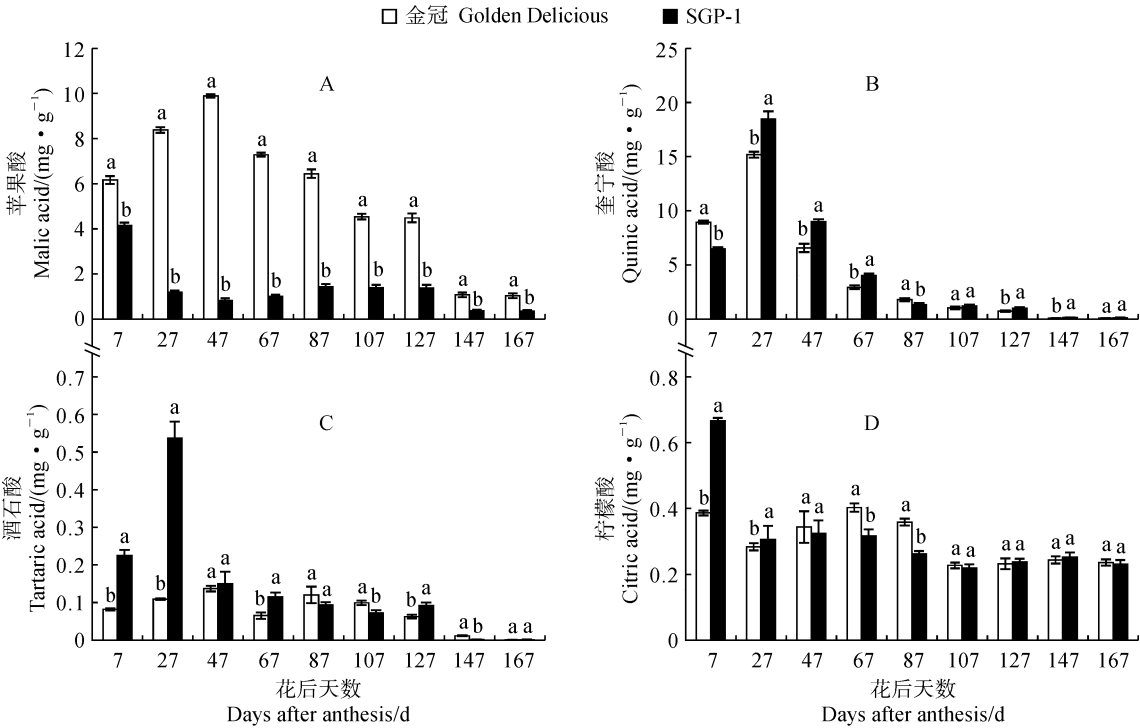


图2 ‘金冠’和‘SGP-1’苹果果实苹果酸、奎宁酸、酒石酸和柠檬酸含量变化
Fig. 2 Changes of malic acid, quinic acid, tartaric acid and citric acid contents in ‘Golden Delicious’ and ‘SGP-1’ apple fruits during development

水平。在幼果期,两材料 MDH 活性变化趋势相反,且‘SGP-1’中的 MDH 活性是‘金冠’的 2 倍左右,说明在幼果期‘SGP-1’苹果酸的合成途径更活跃。

同时,‘SGP-1’和‘金冠’果实中 PEPC 活性变化趋势一致,均整体上先降后升,峰值均出现在花后 7 d,分别为 21.13 和 17.10 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (图 3, B)。在幼果期,‘SGP-1’中 PEPC 活性显著高于‘金冠’,最大差距为 4 倍,且降幅远小于‘金冠’;‘金冠’PEPC 活性仅在花后 107 d 快速回升并显著高于‘SGP-1’,而后再快速下降,至成熟期,两材料 PEPC 活性均快速增加,并趋于一致,差异不显著。

2.2.2 ME 和 PEPCK 活性 由图 4, A 可知,‘SGP-1’和‘金冠’果实中 ME 活性随着生育期的变化趋势基本一致,在幼果期最高,后随着果实发育快速下降,而在膨大期和成熟期又有所回升;整个发育期出现 3 个小高峰,最大值在花后 27 d,‘SGP-1’和‘金冠’分别为 42.36 和 27.04 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。‘SGP-1’的 ME 活性在花后 7~87 d 显著高于‘金冠’,差距在 2~3 倍;在花后 107 d,‘金冠’的 ME 活

性快速上升,显著超过‘SGP-1’;在果实成熟时,两材料的 ME 活性差异达到显著水平。

同时,两材料果实中 PEPCK 活性随发育期的变化趋势也基本一致,在幼果期最高,并在花后 27 d 达到峰值,‘SGP-1’和‘金冠’分别为 56.65 和 38.50 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,而后快速下降,成熟期略有所回升(图 4, B)。**‘SGP-1’的 PEPCK 活性在幼果期显著高于‘金冠’,而在成熟期显著低于‘金冠’。**

2.2.3 VHA 和 VHP 活性 ‘SGP-1’和‘金冠’果实中质子泵 VHA 活性随生育期的变化趋势基本一致,整体呈“W”型,在发育初期、膨大期和成熟期出现 3 个小高峰(图 5, A)。其中,‘SGP-1’果实的 VHA 活性在花后 7~87 d 显著高于‘金冠’;之后,随着果实发育,‘SGP-1’的 VHA 活性先下降后上升,在花后 87 d 达到最大值而后持续下降;到成熟时显著低于‘金冠’,仅为‘金冠’的三分之一。

同时,由图 5, B 可知,两种材料果实的质子泵 VHP 活性变化趋势也一致,随着果实发育先上升后下降再上升,并在幼果期和成熟期表现出较高活性。

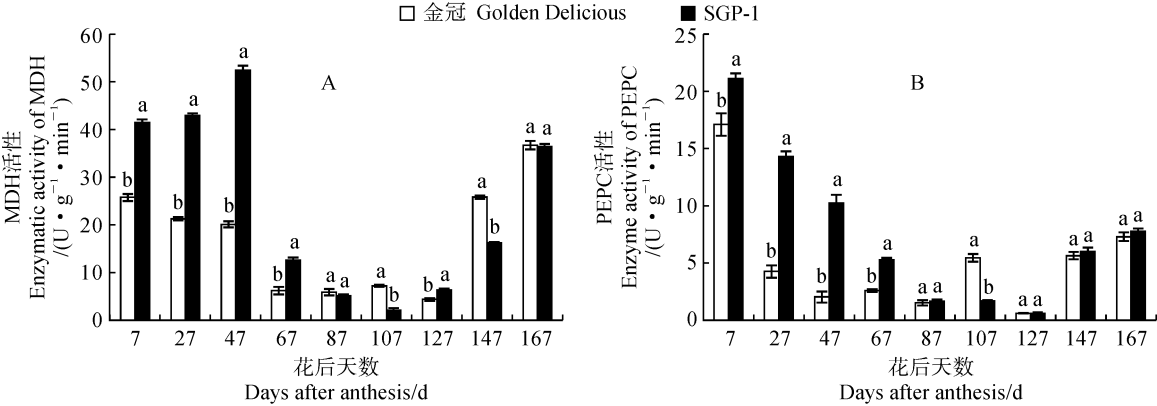


图 3 ‘金冠’和‘SGP-1’苹果果实 MDH、PEPC 活性变化
Fig. 3 Changes of MDH and PEPC activities in ‘Golden Delicious’ and ‘SGP-1’ apple fruits

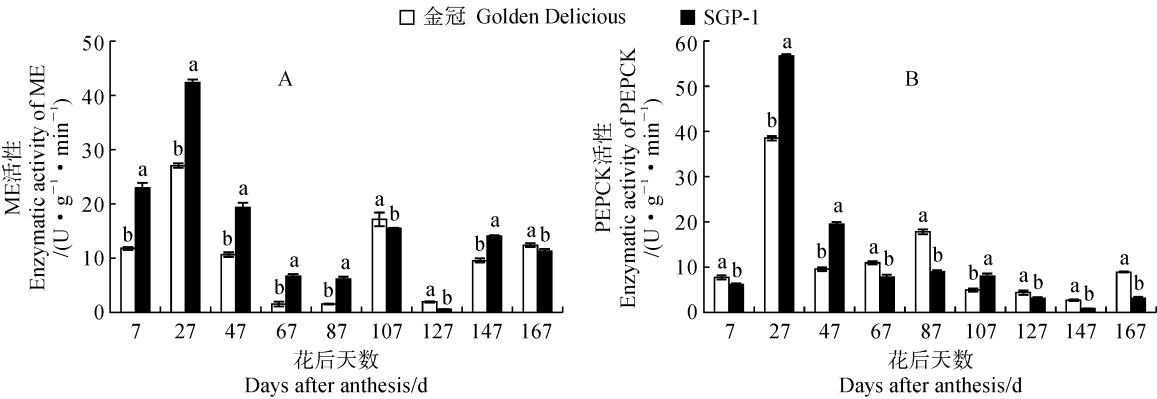


图 4 ‘金冠’和‘SGP-1’苹果果实 ME、PEPCK 活性变化
Fig. 4 Changes of ME and PEPCK activities in ‘Golden Delicious’ and ‘SGP-1’ apple fruits

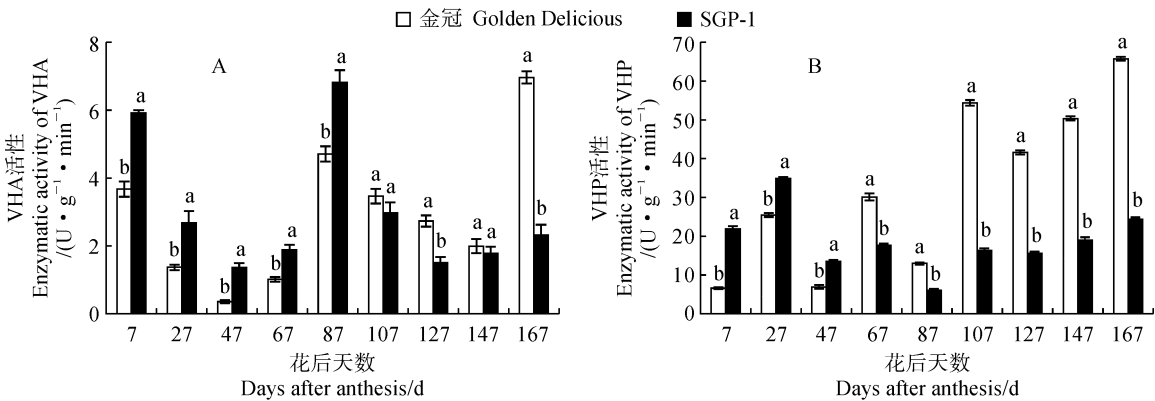


图5 ‘金冠’和‘SGP-1’苹果果实 VHA 和 VHP 活性变化

Fig. 5 Changes of VHA and VHP activities in ‘Golden Delicious’ and ‘SGP-1’ apple fruits

表 1 ‘金冠’和‘SGP-1’果实苹果酸与其代谢相关酶活性的相关系数

Table 1 Correlation coefficient between malic acid and its metabolism related enzyme activities in ‘SGP-1’ and ‘Golden Delicious’ fruits

品种 Variety	花后天数 Days after flowering	苹果酸脱氢酶 MDH	磷酸烯醇式 丙酮羧化酶 PEPC	苹果酸酶 ME	磷酸烯醇式 丙酮羧化酶 PEPCK	H ⁺ -ATP 酶 VHA	H ⁺ -焦磷酸酶 VHP
SGP-1	7~47 d	-0.677 *	0.953 **	-0.269	-0.628	0.973 **	-0.021
	67~107 d	-0.845 **	-0.918 **	0.372	0.706 *	0.672 *	-0.617
	127~167 d	-0.755 *	-0.961 **	-0.967 **	0.454	-0.797 *	-0.978 **
金冠 Golden Delicious	7~47 d	-0.977 **	-0.962 **	-0.120	0.163	-0.979 **	0.125
	67~107 d	-0.634	-0.826 **	-0.951 **	0.641	-0.467	-0.744 *
	127~167 d	-0.936 **	-0.961 **	-0.963 **	-0.247	-0.640	-0.768 *

注: **. 在 0.01 水平(双侧)上显著相关。*, 在 0.05 水平(双侧)上显著相关

Note: **. Significant correlation at the 0.01 level (bilateral). *. Significant correlation at 0.05 level (bilateral)

‘SGP-1’果实 VHP 活性在幼果期显著高于‘金冠’,从花后 67 d 开始则显著低于‘金冠’;特别在花后 107 d 至成熟期,‘金冠’果实中 VHP 活性快速增加,一直保持较高水平,显著高于‘SGP-1’,约是‘SGP-1’的 2~3 倍。

2.3 ‘金冠’及‘SGP-1’果实苹果酸含量与其代谢酶活性的相关性

相关性分析表明(表 1),在幼果期(花后 7~47 d),‘SGP-1’苹果酸含量与 PEPC 和 VHA 活性呈极显著正相关,与 MDH 活性呈显著负相关,而‘金冠’苹果酸含量与 MDH、PEPC 和 VHA 活性均呈极显著负相关;在果实膨大期(花后 67~107 d),‘SGP-1’苹果酸含量与 MDH、PEPC 活性呈极显著负相关,与 PEPCK、VHA 活性呈显著正相关,而‘金冠’苹果酸含量则与 PEPC、ME、VHP 活性呈极显著或显著负相关;在成熟期(花后 127~167 d),‘SGP-1’苹果酸含量与 MDH、PEPC、ME、VHA 和 VHP 活性均呈极显著或显著负相关,而‘金冠’苹果

酸含量则与 MDH、PEPC、ME 和 VHP 均呈极显著或显著负相关。由此可知,对‘SGP-1’和‘金冠’苹果酸积累起主要调控作用的关键酶在幼果期和膨大期存在较大差异,幼果期负责苹果酸合成的关键酶不同,而膨大期负责苹果酸降解和运输的关键酶不同,成熟期基本一致。

3 讨 论

本研究对‘SGP-1’和‘金冠’苹果果实发育过程中有机酸及各组分含量变化进行了分析,二者差异达到显著水平。特别是‘SGP-1’苹果酸含量变化规律与‘金冠’相反,至成熟时只有‘金冠’的三分之一;加之,‘SGP-1’来源于‘金冠’变异优系,二者遗传背景相似,从果实发育期间各酸组分含量、苹果酸代谢关键酶活性及相关关系,探讨果实发育过程中降酸途径及‘SGP-1’果实低酸成因,对高糖低酸新品种培育具有重要意义。

本研究发现‘SGP-1’果实中主要影响苹果酸合

成(MDH、PEPC)、降解(ME、PEPCK)和转运(VHA和VHP)的关键酶活性,在幼果期均显著高于‘金冠’,并没有带来‘SGP-1’果实苹果酸的高积累,反而显著低于‘金冠’;而且苹果酸含量与两个主要合成酶活性呈负相关关系,表明合成只是苹果酸积累的前提但不是唯一的因素,高的合成不能直接导致高的积累。这与姚玉新^[7]在苹果中的研究结论一致。Beruter^[18]研究也发现在高酸和低酸的“Us-terapfel”苹果成熟过程中两种合成酶活性没有差异。可见,苹果酸合成不是果实酸度差异形成的关键因素,而参与降解的ME、PEPCK和为运输提供能量的VHA和VHP的协同调控对苹果酸含量变化及果实酸度差异形成起关键作用。

本研究结果表明负责苹果酸降解的ME和PEPCK活性,在‘SGP-1’幼果期快速升高,且显著高于‘金冠’,导致幼果期‘SGP-1’苹果酸快速下降,积累偏少;而成熟期两种材料苹果酸含量急剧下降也伴随有上述酶活性的回升,说明ME和PEPCK对两种材料苹果酸含量的下降起到重要作用,与前人在苹果^[7,19-20]、李^[21]、樱桃^[22]上的研究结果一致。但它们是否受控制苹果果实低酸性状基因的调控,以及这些关键酶的作用都需进一步研究。

质子泵VHA和VHP为有机酸跨膜运输提供能量^[23],对果实液泡有机酸的贮藏起到了关键作用,为代谢产物和离子的次级运输提供能量^[24]。本研究结果表明VHA和VHP的活性在果实发育过程中出现了3个小高峰,相关性分析也说明质子泵活性直接影响着苹果酸的积累,幼果期和膨大期

VHA发挥主要作用,而成熟期VHP作用更显著。相似的研究在苹果^[7]、柑橘^[25]、葡萄^[26]和梨^[27]上也被发现。特别是在‘金冠’苹果果实成熟过程中两质子泵活性显著升高,增量大于‘SGP-1’,说明在酸度高的‘金冠’苹果成熟过程中,需要提供更多能量来实现对苹果酸的调节。但关于两个质子泵是如何调节果实酸度、果实有机酸的跨膜运输及调控机理等,还有待深入研究。

果实有机酸代谢是一个极为复杂的过程,不同果实中控制果实有机酸含量的分子机制至今还不完全清楚。前人从分子水平研究了控制李^[28]、苹果^[29]果实酸度候选基因,为调控果实酸度奠定了基础,针对‘SGP-1’与‘金冠’果实酸度的显著差异和不同发育期起主要调控作用的关键酶不同,下一步可深入挖掘了‘SGP-1’果实酸度调控的关键基因,并分析它们的功能,对改善果实品质具有重要意义。

4 结 论

本研究证实了‘SGP-1’是以苹果酸为主的低酸型‘金冠’苹果变异优系,该发现为深入研究果实低酸形成机理和培育高糖低酸新品种奠定了基础。本研究还发现‘SGP-1’苹果酸积累的关键时期为果实发育初期,并在幼果期就快速下降;而‘金冠’苹果酸积累关键期是幼果期和膨大期,至成熟期才快速下降。‘SGP-1’苹果酸代谢相关酶活性在幼果期均显著高于‘金冠’,成熟期持平或显著低于‘金冠’;二者幼果期负责苹果酸合成的关键酶不同,膨大期负责苹果酸降解和运输的关键酶不同,成熟期基本一致。

参考文献:

[1] PRIECINA L, KARKLINA D. Composition of major organic acids in vegetables and spices[J]. *CBU International Conference Proceedings*, 2015, **3**: 447-454. (doi: <http://dx.doi.org/10.12955/cbup.v3.637>)

[2] 梁俊,郭燕,刘玉莲,等. 不同品种苹果果实中糖酸组成与含量分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, **39**(10): 163-170.

LIANG J, GUO Y, LIU Y L, *et al.* Analysis of contents and constituents of sugar and organic acid in different apple cultivars[J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2011, **39**(10): 163-170.

[3] 王海波, 李林光, 陈学森, 等. 中早熟苹果品种果实的风味物质和风味品质[J]. 中国农业科学, 2010, **43**(11): 2 300-2 306.

WANG H B, LI L G, CHEN X S, *et al.* Flavor compounds and flavor quality of fruits of mid-season apple cultivars[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, **43**(11): 2 300-2 306.

[4] RÓTH E, BERNA A, BEULLENS K, *et al.* Postharvest quality of integrated and organically produced apple fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, **45**(1): 11-19.

[5] YANG S B, MENG Z P, LI Y N, *et al.* Evaluation of physiological characteristics, soluble sugars, organic acids and volatile compounds in ‘Orin’ apples (*Malus domestica*) at different ripening stages [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2021, **26**(4): 807-817.

[6] WU J H, GAO H Y, ZHAO L, *et al.* Chemical composition-al characterization of some apple cultivars[J]. *Food Chemistry*, 2007, **103**(1): 88-93.

[7] 姚玉新, 李明, 由春香, 等. 苹果果实中苹果酸代谢关键酶与苹果酸和可溶性糖积累的关系[J]. 园艺学报, 2010, **37**(1): 1-8.

YAO Y X, LI M, YOU C X, *et al.* Relationship between malic acid metabolism-related key enzymes and accumulation of malic acid as well as the soluble sugars in apple fruit[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, **37**(1): 1-8.

[8] NOUR V, TRANDAFIR I, IONICA M E. Compositional characteristics of fruits of several apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars [J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2010, 38: 228-233.

[9] ZHANG Y Z, LI P M, CHENG L L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh[J]. *Food Chemistry*, 2010, **123**(4): 1 013-1 018.

[10] 王鹏飞, 薛晓芳, 穆晓鹏, 等. 不同酸度欧李果实有机酸积累特性与相关代谢酶活性分析[J]. 中国农业科学, 2013, **46**(19): 4 101-4 109.

WANG P F, XUE X F, MU X P, *et al.* Analysis of organic acid accumulation characteristics and organic acid-metabolizing enzyme activities of Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis* Bunge.) fruit[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, **46**(19): 4 101-4 109.

[11] 陈美霞, 赵从凯, 陈学森, 等. 杏果实发育过程中有机酸积累与相关代谢酶的关系[J]. 果树学报, 2009, **26**(4): 471-474.

CHEN M X, ZHAO C K, CHEN X S, *et al.* Relationship between accumulation of organic acid and organic acid-metabolizing enzymes during apricot fruit development[J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, **26**(4): 471-474.

[12] 赵永红, 李宪利, 姜泽盛, 等. 设施油桃果实发育过程中有机酸代谢的研究[J]. 中国生态农业学报, 2007, **15**(5): 87-89.

ZHAO Y H, LI X L, JIANG Z S, *et al.* Organic acid metabolism in nectarine fruit development under protected cultivation [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2007, **15**(5): 87-89.

[13] ETIENNE C, MOING A, DIRLEWANGER E, *et al.* Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation; Involvement in regulating peach fruit acidity[J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, **114**(2): 259-270.

[14] 刘雅兰, 靳志飞, 陈 红. 果梅果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化特征[J]. 西北植物学报, 2017, **37**(1): 130-137.

LIU Y L, JIN Z F, CHEN H. Changes of the organic acid concentrations and the relative metabolic enzyme activities during the development of *Prunus mume* fruit[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(1): 130-137.

[15] 张丽丽, 刘威生, 刘有春, 等. 高效液相色谱法测定 5 个杏品种的糖和酸[J]. 果树学报, 2010, **27**(1): 119-123.

ZHANG L L, LIU W S, LIU Y C, *et al.* Measurement of sugars, organic acids in 5 apricot cultivars by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Fruit Science*, 2010, **27**(1): 119-123.

[16] HIRAI M, UENO I. Development of *Citrus* fruits: Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1977, **18**(4): 791-799.

[17] SADKA A, DAHAN E, COHEN L, *et al.* Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit[J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, **108**(3): 255-262.

[18] BERÜTER J. Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, **161**(9): 1 011-1 029.

[19] 王立霞. 几个功能型苹果优株果实风味品质评价及苹果酸代谢相关酶的研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2014.

[20] 徐爱红, 徐臣善, 刘丽霞, 等. 授粉品种对‘红富士’苹果果实有机酸积累和代谢关键酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 2020, **56**(9): 1 955-1 962.

XU A H, XU C S, LIU L X, *et al.* Effects of pollination varieties on characteristics of organic acid accumulation and activities of organic acid-metabolizing enzymes in ‘Red Fuji’ apple fruit[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, **56**(9): 1 955-1 962.

[21] 王小红, 陈 红, 董晓庆. ‘蜂糖李’果实发育过程中有机酸含量变化及其与苹果酸代谢相关酶的关系[J]. 果树学报, 2018, **35**(3): 293-300.

WANG X H, CHEN H, DONG X Q. Changes in organic acids content during ‘Fengtang’ plum (*Prunus salicina*) fruit development in relation to malic acid metabolism related enzymes[J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, **35**(3): 293-300.

[22] 李 航, 陶海青, 陈益香, 等. 2 种中国樱桃果实有机酸积累及代谢相关酶活性的研究[J]. 西北农业学报, 2019, **28**(12): 2 019-2 026.

LI H, TAO H Q, CHEN Y X, *et al.* Evaluation of organic acid accumulation and metabolism related enzymes activities in two Chinese cherry fruits[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, **28**(12): 2 019-2 026.

[23] SUZUKI Y, MAESHIMA M, YAMAKI S. Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its expression during the development of pear fruit[J]. *Plant & Cell Physiology*, 1999, **40**(8): 900-904.

[24] LUTTGE U, FISCHER-SCHLIEBS E, RATAJCZAK R. The H⁺ pumping V-ATPase of higher plants: Aversatile “eco-enzyme” in response to environmental stress[J]. *Cell Biol Mol Lett*, 2001, 6: 356-361.

[25] BRUNE A, MÜLLER M, TAIZ L, *et al.* Vacuolar acidification in *Citrus* fruit: Comparison between acid lime (*Citrus aurantifolia*) and sweet lime (*Citrus limmetioides*) juice cells[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2002, **127**(2): 171-177. [LinkOut]

[26] TERRIER N, SAUVAGE F X, AGEORGES A, *et al.* Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development[J]. *Planta*, 2001, **213**(1): 20-28.

[27] SUZUKI Y, SHIRATAKE K, YAMAKI S. Seasonal changes in the activities of vacuolar H⁺-pumps and their gene expression in the developing Japanese pear fruit[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2000, **69**(1): 15-21.

[28] 巫伟峰, 陈明杰, 祁芳斌, 等. 李果实有机酸组成特征及其与苹果酸转运体基因 *PsALMT9* 和 *PstDT* 的相关性[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(8): 1 356-1 363.

WU W F, CHEN M J, QI F B, *et al.* Organic acid composition characteristics and its correlation with malate transporter genes *PsALMT9* and *PstDT* in plum fruit[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2020, **40**(8): 1 356-1 363.

[29] 高 萌. 苹果种质资源有机酸含量评价及酸含量调控候选基因 *Mt PEPP* 功能分析[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2020.