

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

刘雅兰^{1,2}, 靳志飞^{1,2}, 陈 红^{1,2*}

(1 贵州大学 农学院, 贵阳 550025; 2 贵州省果树工程技术研究中心, 贵阳 550025)

摘 要:以优选荔波野生梅单株‘荔波-3’和‘荔波-11’为试验材料,采用高效液相色谱法(HPLC)测定了果梅果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性变化特征。结果表明:(1)‘荔波-3’和‘荔波-11’果梅果实中柠檬酸和苹果酸主要在果实发育后期积累,花后 140 d 两品种的柠檬酸积累量达到最大,且果实中总酸的积累量也相应的达到最大值。(2)柠檬酸积累量与柠檬酸合成酶(CS)活性呈极显著正相关关系,‘荔波-11’因 CS 活性高于‘荔波-3’,使得其果实成熟时的柠檬酸含量高于后者。(3)苹果酸积累量与磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和 NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)活性呈极显著正相关关系,但与 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)活性呈负相关关系;在花后 45~100 d 内,果梅果实中 PEPC 和 NAD-MDH 活性迅速升高,而 NADP-ME 活性相对较低,使苹果酸积累量迅速增加;在花后 120~140 d,‘荔波-3’果实中 PEPC、NADP-MDH 活性显著高于‘荔波-11’,而其 NADP-ME 活性低于‘荔波-11’,导致成熟时‘荔波-11’的苹果酸含量高于‘荔波-3’。可见,果梅果实的有机酸主要在果实发育后期积累,有机酸积累差异受多个酶协同调控;苹果酸的积累差异主要由 NAD-MDH、PEPC 和 NADP-ME 活性协同变化引起,柠檬酸积累差异主要受 CS 活性变化影响。

关键词:果梅;果实;柠檬酸代谢;酶活性

中图分类号: Q945.6⁺5

文献标志码: A

Changes of the Organic Acid Concentrations and the Relative Metabolic Enzyme Activities during the Development of *Prunus mume* Fruit

LIU Yalan^{1,2}, JIN Zhifei^{1,2}, CHEN Hong^{1,2*}

(1 College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2 Guizhou Center for Fruit Engineering Technology, Guiyang 550025, China)

Abstract: Taking the optimizing plant ‘Libo-3’ and ‘Libo-11’ *Prunus mume* which was native to Guizhou Province as materials, using the method of ultra performance liquid chromatograph (UPLC), we measured the changes of organic acid contents and relative metabolic enzyme activities during the development of *Prunus mume* fruit. The results showed that: (1) citric acid and malic acid of ‘Libo-3’ and ‘Libo-11’ mainly accumulated in the late period of fruit development, after anthesis the accumulation of citric acid reached the maximum at 140 d, the amount of total acid in the fruit also accordingly reached the maximum value. (2) The accumulation of citric acid was related to the activity of citrate synthase (CS), the content of citric acid of ‘Libo-11’ was higher than that of ‘Libo-3’ since for its CS activity was higher at the ripening

收稿日期: 2016-08-01; 修改稿收到日期: 2016-12-23

基金项目: 贵州省工程技术研究中心专项“[黔科合农 G 字(2009)4003]”; 贵州省特色农业产业人才基地计划(黔人颁发 2013-16)

作者简介: 刘雅兰(1992—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究。E-mail: 867396562@qq.com

* 通信作者: 陈 红, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物技术与果树遗传育种研究。E-mail: chen96@aliyun.com

stage. (3) The content of malic acid exhibited positive correlation with the activities of PEPC and NAD-MDH, while the NADP-ME activity exhibited negative correlation. The difference in malic acid accumulation is mainly caused by the coordination change of PEPC, NAD-MDH and NADP-ME activities. After anthesis 45 to 100 d, the activities of PEPC and NAD-MDH increased rapidly, while the NADP-ME activity was relatively low, promoting the massive accumulation of malic acid. After anthesis 120 to 140 d, PEPC and NAD-MDH activities of ‘Libo-3’ was significantly higher than the activities of ‘Libo-11’, while NADP-ME activity of ‘Libo-11’ was lower. As a result, the content of malic acid of ‘Libo-11’ is higher when mature. The late period of fruit development is a critical period for the accumulation of malic acid and citric acid. The accumulation of total organic acids was regulated by multiple enzymes. The difference in malic acid accumulation is mainly caused by the coordination change of PEPC, NAD-MDH and NADP-ME activities, while the difference in the accumulation of citric acid is mainly affected by the change of CS activity.

Key words: *Prunus mume*; fruit; citric acid metabolism; enzyme activities

果梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc)果实富含多种有机酸组分,其中主要为柠檬酸,含量为总酸的90%左右;除此之外,还含有少量的苹果酸、儿茶酸、酒石酸、琥珀酸、丙酮酸、乳酸、马来酸和富马酸等^[1]。在果实发育过程中,有机酸含量的变化与相应的酶活性是密不可分的,如柠檬酸合成酶(CS)、顺乌头酸酶(ACO)、NAD-异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)、NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)都影响着有机酸的积累。其中,CS、ACO、IDH 是影响果实柠檬酸代谢的关键酶;PEPC、MDH 和 ME 是影响果实苹果酸代谢的重要酶^[2]。李甲明等^[3]研究表明 NADP-ME 是引起不同梨品种成熟果实苹果酸含量差异的主要原因。柠檬酸型水果 CS 活性影响柠檬酸含量的变化^[4];而有报道称 CS 活性变化与果实中的柠檬酸含量没有相关性^[5-8]。龚荣高等^[9]认为 IDH 是引起不同脐橙品种果实有机酸含量差异的关键酶,而 PEPC 则是重要酶。Moing 等^[10]的研究表明,PEPC 有效地调控了梨发育过程中有机酸的合成和积累,而且对于低酸品种和高酸品种的作用机制是不一样的,这与王立霞^[11]在不同酸度株系金冠苹果果实中的研究发现相似。也有研究指出,PEPC 变化与有机酸含量相关性较小,在果实有机酸积累中的作用不显著^[12]。文涛等^[13]认为 CS 和 PEPC 是影响脐橙有机酸积累的重要酶。而 CS、MDH 和 ACO 是影响杏果实有机酸积累的主要酶^[12]。这些研究表明果实中有机酸的积累是受代谢相关酶调控的,不同类型果实中有机酸代谢相关酶的调控机制存在差异。鉴于目前果梅果实有机酸积累的差异及其产生的生理机制的研究报道较少,本试验通过对贵州省荔波

县国家级茂兰喀斯特野生梅单株‘荔波-3’和‘荔波-11’果梅果实发育过程中有机酸组分含量及相关代谢酶活性的测定,明确果实中有机酸积累的关键时期及其关键酶,为今后果梅果实品质的改良及调控提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料果梅采自贵州省荔波县国家级茂兰喀斯特野生梅自然保护区,选择树势健壮、树龄(20~22 年)、立地条件基本一致的,课题组前期筛选的高酸和低酸单株‘荔波-3’、‘荔波-11’,分别于 2014 年花后 45、60、70、80、90、100、110、120、130 和 140 d 采集果实,采后放入冰盒,立即带回实验室,经液氮处理后保存于-80 ℃冰箱中待用。

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 Nisperos- Carriedo 等^[14]的方法,略作改进。准确称取果梅果肉样品 1 g 放入研钵中,加入 5 mL 超纯水研磨混匀;常温超声波处理 20 min,4 ℃、10 000 r/min 离心 15 min 后,将上清液转至 10 mL 容量瓶中;残渣加入 5 mL 超纯水再次提取并离心,合并 2 次的上清液并定容至 10 mL;再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,将滤液置于 1.5 mL 进样瓶中备用。有机酸测定的色谱条件:色谱柱为 Shim-pack VP-ODS C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 25 ℃,流动相 A 为 0.1% 偏磷酸,流动相 B 为 3% 甲醇,总流速为 0.5 mL/min,检测波长为 210 nm,检测器为岛津 SPD-10A 紫外检测器,进样量为 20 μL。根据样品出峰面积和各有机酸的标准曲线计算其含量。做标准品所使用的药品均为分析纯,购

置于上海生工生物工程股份有限公司。测定的有机酸主要包括柠檬酸和苹果酸。

1.2.2 柠檬酸和苹果酸相关代谢酶活性 酶液制备和酶活性的测定参照 Hirai 等^[7]和罗安才等^[15]的方法,并稍作修改。具体方法:称取 2 g 果实放入预冷的研钵中,加 2 mL 缓冲液[(0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2),0.6 mol/L 蔗糖,10 mmol/L 异抗坏血酸)]冰浴下研磨,4 ℃、4 000 r/min 离心 20 min,取上清液定容至 5 mL,取其中 2 mL 4 ℃、15 000 r/min 离心 15 min,取上清液用提取缓冲液(0.2 mol/L Tris-HCl(pH8.2),10 mmol/L 异抗坏血酸,0.1% TritonX-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 NAD-异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)酶液;另外 3 mL 加 3 mL 提取缓冲液,即可用于测 NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)和 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)的测定,取其中 4 mL 分为 2 份,在大量透析液(即提取缓冲液)中 4 ℃透析过夜,用新鲜透析液定容即得磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC),柠檬酸合成酶(CS)酶液。利用紫外分光光度计法测定,反应体系为 1 mL。采用 UV-2550 型紫外分光光度计测定吸光度,以每分钟吸光度变化 0.01 为一个酶单位(U),重复 3 次。测定的果实有机酸代谢关键酶主要包括柠檬酸合成酶(CS)、顺乌头酸酶(ACO)、NAD-异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)、NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)。

1.3 数据处理

数据处理与作图用 Excel 软件,方差分析用 DPS v7.05 分析软件进行。

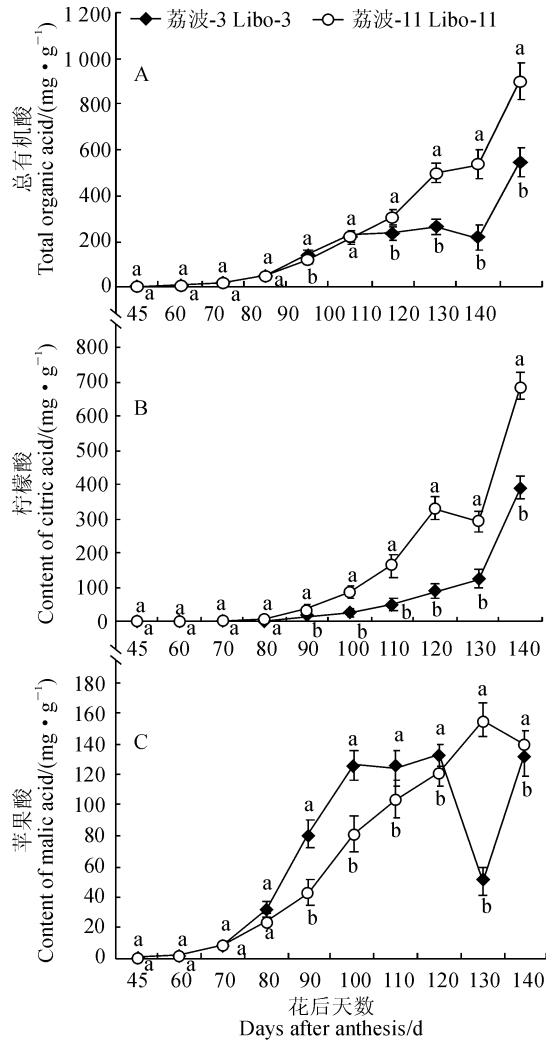
2 结果与分析

2.1 果梅果实发育过程中有机酸含量的变化特征

2.1.1 总酸含量 在果梅果实发育过程中,‘荔波-3’和‘荔波-11’的总酸含量均呈逐渐上升趋势,其在果实发育初期积累量较低,之后不断增加,并分别在花后 100~130 d 和 120~130 d 保持相对平稳,随后积累量急剧增加,且总酸含量都在花后 140 d 时达到最高值;同时,‘荔波-11’的总酸含量在花后 110~140 d 期间显著高于‘荔波-3’,其余时间两品种间差异不显著(图 1,A)。

2.1.2 柠檬酸含量 在果梅果实发育过程中,‘荔波-3’和‘荔波-11’的柠檬酸含量均表现出与总酸含

量相似的逐渐上升的趋势(图 1,B)。在花后 80 d 内,柠檬酸含量保持平稳、较低的水平,两单株含量变化差异较小;而在花后 80~140 d,两者的柠檬酸含量差异变化较大,并有差异逐渐加大的趋势。其中,‘荔波-11’果实中的柠檬酸含量从花后 80 d 开始缓慢上升,到花后 120 d 时达到一个小峰值,之后有一个小低谷(293.38 mg·g⁻¹),随后在花后 130~140 d 期间急速上升达到最高值(685.02 mg·g⁻¹),此时占总酸的 76.98%;‘荔波-3’果实中柠檬酸含量在花后 80~130 d 期间呈缓慢增加的趋势,从花后 130 d 至成熟间又急剧增加,于成熟时达到最大值(390.12 mg·g⁻¹)。另外,‘荔波-11’果实中



同期不同小写字母表示品种单株间差异达 0.05 显著水平;下同
图 1 果梅果实中总有机酸(A)、柠檬酸(B)、苹果酸(C)的含量随生育期的变化
Different lowercase letters at the same stage indicate significant difference between two varieties at 0.05 level. The same as below
Fig. 1 Changes in contents of total organic acid(A)and citric acid(B)and malic acid(C)during *Prunus mume* fruit development

的柠檬酸含量在花后 100~140 d 期间显著高于‘荔波-3’,其余时间两品种间差异不显著。

2.1.3 苹果酸含量 图 1,C 显示,在果梅果实发育过程中,‘荔波-11’果实中苹果酸含量几乎呈直线上升趋势,于花后 130 d 时达到最大值($155.85\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),之后有所降低;‘荔波-3’果实中苹果酸含量从花后 70 d 开始急剧上升,至花后 100 d 达到顶峰,之后变化较为平稳,在花后 120 d 时开始下降,花后 130 d 时大幅下降到低谷($50.26\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),至成熟时苹果酸含量又快速回升到之前峰值水平($133.31\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。另外,‘荔波-11’果实中的苹果酸含量在花后 90~130 d 期间显著高于‘荔波-3’,其余时间两单株间差异不显著。以上结果说明果梅果实有机酸主要在果实发育后期积累;柠檬酸是引起果梅果实总酸含量差异的主要因素。

2.2 果梅果实发育过程中柠檬酸相关代谢酶活性的变化特征

柠檬酸合酶(CS)是一类存在于果实细胞线粒体中能催化草酰乙酸(OAA)与乙酰辅酶 A(Ac-CoA)结合生成柠檬酸的酶。2 个单株果梅果实发育过程中 CS 活性均呈较为相似的‘升-降-升’的变化趋势(图 2,A)。其中,在果实发育初期,CS 活性处于较低水平,且增速缓慢;后随着果实的继续发育(花后 70 d),CS 活性急剧上升并于花后 120 d 达到第一个峰值;此后开始下降,但在果实成熟前 CS 活性又急速增加。‘荔波-3’果实中 CS 活性变化较为平缓,其在整个生长发育期始终低于同期‘荔波-11’,并在花后 80~140 d 两者差异达到显著水平,这可能是‘荔波-3’果实柠檬酸含量低于‘荔波-11’的主要原因。

乌头酸酶(ACO)参与柠檬酸的降解过程,而异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)主要存在于线粒体中,是三羧酸循环的第二个控制点,催化异柠檬酸与 α -酮戊二酸的互变,是柠檬酸降解的控制因子之一。‘荔波-3’和‘荔波-11’果实中的 Cyt-ACO 活性在生长过程中呈现出相似的‘升-降-升-降’变化趋势,但‘荔波-3’的 ACO 活性始终高于同期的‘荔波-11’,并在花后 80~110 d 和 130~140 d 期间达到显著水平(图 2,B)。其中,两单株果实的 ACO 活性均分别在花后 70 d 和花后 110 d 或 120 d 依次出现两个峰值,前一次峰值明显低于后一次的峰值;两品种的 ACO 活性在第一次峰值时差异较小,到第二次高峰时差异较大(分别为 76.58 和 $52.85\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$)。相比之下,‘荔波-3’和‘荔波-11’2 个单株果实的

NAD-IDH 活性变化趋势较为平稳,但‘荔波-3’的 NAD-IDH 活性始终高于同期‘荔波-11’,且大部分时间内达到显著水平(图 2,C)。其中,两品种的 NAD-IDH 活性在果实发育初期均处于相对较低水平,随着果实的发育酶活性稍有上升后保持相对稳定,到果实成熟前活性有所下降,且‘荔波-11’中 NAD-IDH 活性下降速度快于‘荔波-3’。

2.3 果梅果实发育过程中苹果酸相关代谢酶活性的变化特征

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)生成草酰乙酸(OAA),OAA 可进一步生成苹果酸。两个果梅单株果实 PEPC 活性随果实发育均呈现出先升后降的相似变化趋势,且均在花后 110 d 时达到最大值,但不同发育时期变

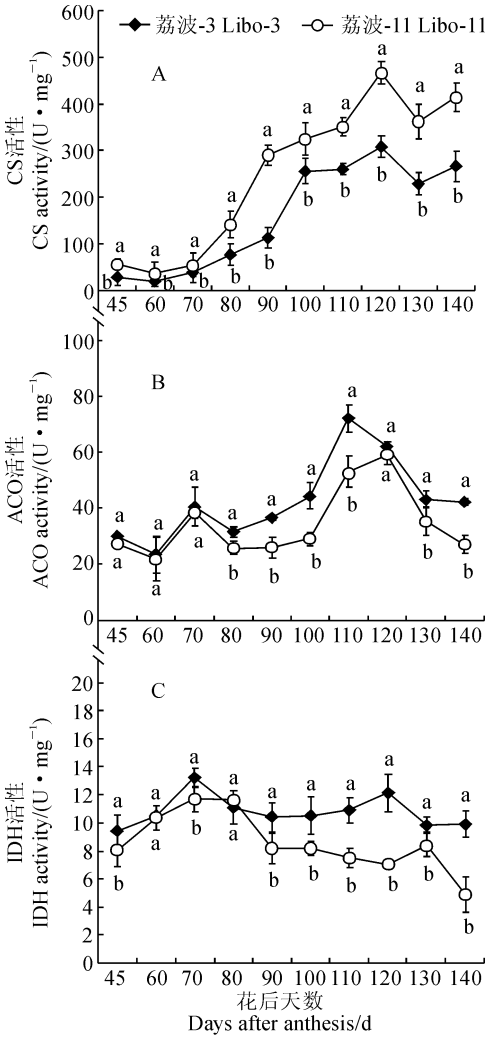


图 2 果梅果实发育过程中 CS(A)、ACO(B)和 IDH(C)活性的变化

Fig. 2 Changes of CS(A), ACO(B) and IDH(C) activities in fruit during development of *P. mume*

化幅度存在较大差异(图 3,A)。其中,‘荔波-3’ PEPC 活性在果实发育初期较低,随着果实的发育不断增加,至花后 90 d 时达到最高值($118.80\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$),在至花后 100 d 时保持相对稳定,后又随着果实的继续生长发育开始下降,到果实成熟前活性降至最低;‘荔波-11’果实 PEPC 活性从花后 45~

100 d 缓慢增加,在花后 100~110 d 急速下降,之后保持相对平稳的下降趋势。另外,在整个果实发育过程中,‘荔波-3’的 PEPC 活性大部分时期(花后 60~90 d 和 130~140 d)显著高于‘荔波-11’,这可能是‘荔波-3’苹果酸含量高于‘荔波-11’的主要原因。

同时,果梅果实发育过程中,‘荔波-3’和‘荔波-11’中 NAD-MDH 活性均呈现出先升后降基本一致的变化趋势,并均在花后 100 d 时达到最大值,且‘荔波-3’的 NAD-MDH 活性一直都高于同期的‘荔波-11’,并在大部分时期差异达到显著水平(图 3, B)。其中,2 个单株果实中 NAD-MDH 活性从花后 45 d 开始呈现逐步增加的趋势,在果实发育中期增加较快,成熟时 NAD-MDH 活性开始降低;‘荔波-3’和‘荔波-11’果实 NAD-MDH 活性最大值分别为 460.0 和 $342.0\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$,并以‘荔波-11’的 NAD-MDH 活性整体变化相对平稳。

另外,2 个单株果实 NADP-苹果酸酶(NADP-ME)活性在发育过程中相对较低,在果实发育中期呈波动性增加,然后快速升高,‘荔波-11’和‘荔波-3’分别在花后 120 和 130 d 先后达到最大值,果实成熟时酶活性有所降低(图 3,C)。其中,从花后 70~130 d,2 个单株间 NADP-ME 活性表现出较为明显的差别,期间‘荔波-11’的 NADP-ME 活性上升较快并显著高于同期的‘荔波-3’,其余时间‘荔波-3’酶活性反高于‘荔波-11’。

2.4 果梅果实发育过程中柠檬酸、苹果酸含量与相关代谢酶活性的关系

表 1 的相关性分析结果表明,‘荔波-3’和‘荔波-11’两个单株果实发育过程中柠檬酸含量与 CS 活性均呈极显著正相关关系,相关系数分别为 0.75 和 0.85 ,与 NAD-IDH 活性呈显著负相关关系,相关系数分别为 -0.27 和 -0.84 ,与 Cyt-ACO 活性呈负相关但未达到显著水平。同时,‘荔波-3’和‘荔波-11’果实苹果酸含量变化均与其 PEPC 活性呈极显著正相关关系,相关系数分别为 0.90 和 0.86 ,同

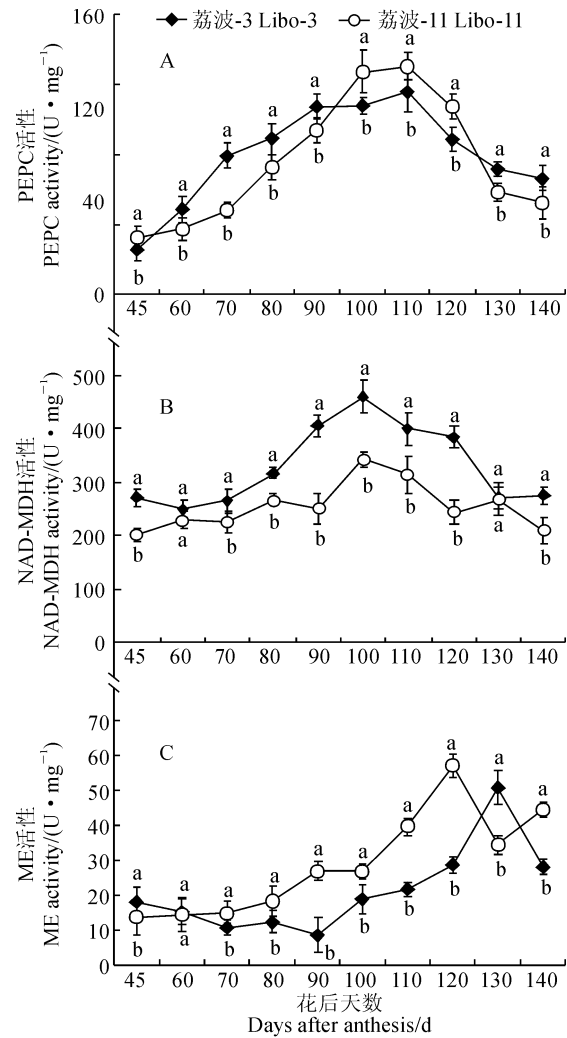


图 3 果梅果实发育过程中 PEPC(A)、NAD-MDH(B)和 ME(C)活性的变化

Fig. 3 Changes of PEPC(A), NAD-MDH(B) and ME(C)activities during the development of *P. mume*

表 1 果梅果实柠檬酸、苹果酸与其代谢酶活性的相关系数

Table 1 Correlation coefficient between citric acid, malic acid contents and their metabolizing enzyme activities of *P. mume*

单株 Variety	柠檬酸代谢酶 Citric acid metabolizing enzyme			苹果酸代谢酶 Malic acid metabolizing enzyme		
	CS	Cyt-ACO	IDH	PEPC	MDH	ME
荔波-3Libo-3	0.75**	0.34	−0.27	0.90**	0.97**	−0.86*
荔波-11Libo-11	0.85**	0.33	−0.84**	0.86**	0.96**	−0.80

注: * 和 ** 分别表示相关性在 0.05 和 0.01 水平显著
Note: * and ** represent correlation is significant at 0.05 and 0.01 level, respectively

时也与果实中 NAD-MDH 活性均呈极显著正相关关系,相关系数分别为 0.97 和 0.96,但与果实 NADP-ME 活性呈负相关关系,相关系数分别为 -0.86 和 -0.80。可见,果梅发育过程中果实柠檬酸、苹果酸与其 CS、IDH、PEPC、MDH、ME 等相关代谢酶活性密切相关。

3 讨 论

两个果梅品种单株果实中有机酸(主要为柠檬酸和苹果酸)含量高,其中以柠檬酸含量最高。果梅有机酸含量在果实的整个发育过程中表现出缓慢增加或直线上升的趋势,这与酸来檬和柠檬中有机酸含量变化趋势相似^[16],而与杏^[12]果实中有机酸含量呈现‘低-高-低’的变化趋势不同,这可能是由于杏果实属于苹果酸积累型所致。本实验中果梅果实中柠檬酸含量的变化趋势与总有机酸含量的变化趋势恰好相似。‘荔波-11’果实中苹果酸含量先增加直到成熟时稍有降低,与欧李^[24]中苹果酸含量变化趋势一致;而‘荔波-3’果实中苹果酸含量也先增加,而在花后 120 d 时突然下降,至成熟时回升,这可能与相关代谢酶活性变化有关。在柑橘^[25]、桃果实生长发育过程中苹果酸和柠檬酸含量都逐渐增高,生长停止转入成熟阶段时含量下降;在苹果^[20]、梨^[29]中柠檬酸含量总体呈下降趋势;而苹果^[20]、杜果^[22]苹果酸含量在发育过程中呈增加后下降趋势,菠萝^[20]中苹果酸含量总逐渐下降。但果梅有机酸含量变化与其他水果差异较大,其积累关键时期主要在果实发育后期。

柠檬酸由 CS 催化 OAA 与 Ac-CoA 缩合而成。本试验中,果实膨大期 CS 活性迅速增加,促进了柠檬酸的合成;果实接近成熟时 CS 活性没有降低反而升高,且两个单株果梅果实柠檬酸含量随其活性增加而增加,‘荔波-11’CS 活性大于‘荔波-3’而使其柠檬酸含量也高于后者,这与梨^[3]、脐橙^[13]、欧李^[24]果实中的 CS 活性变化结果不一致,而与酸柠檬^[4]、菠萝^[23]后期 CS 活性的变化相似,这有可能是果梅柠檬酸积累量高于其它果树的原因。经相关性分析发现果梅果实中 CS 活性变化与其柠檬酸含量极显著正相关,因此,CS 为柠檬酸合成的关键酶。但 Kubo 等^[7]证实日本夏橙果实发育过程中 CS 活性与柠檬酸积累并不相关,且在不同酸度柑橘中柠檬酸的积累差异与 CS 活性和表达亦无关^[15],说明 CS 对果实柠檬酸合成调控作用因树种而异,仍需要进一步研究。甜来檬和酸柠檬果实发育过程中

ACO 活性的表达和变化研究发现,ACO 存在两种同工酶 Cyt-ACO 和 Mit-ACO,参与柠檬酸的降解^[25],而欧李膨大期 Mit-ACO 活性一直在降低,有利于果实中柠檬酸积累^[24]。本研究中,果梅果实膨大期 Cyt-ACO 活性增加时,果梅柠檬酸含量增长缓慢,而在其活性降低时,‘荔波-3’柠檬酸含量还在增加,而‘荔波-11’柠檬酸含量稍有降低后再迅速上升;在整个果实发育过程‘荔波-3’Cyt-ACO 活性高于‘荔波-11’,其 CS 活性远低于后者,而其柠檬酸含量低于后者,这可能是 CS 在果梅柠檬酸积累中的作用远大于 Cyt-ACO 引起的。不同果梅单株 NAD-IDH 活性前期相差不大,后期 NAD-IDH 活性的升高都与柠檬酸的变化存在一定的负相关性,由此可知 NAD-IDH 可能参与柠檬酸的降解。

果实有机酸代谢由多个相关酶综合调控^[26],果实细胞中 PEPC、NAD-MDH、NADP-ME 是参与苹果酸代谢的关键酶^[2,27],其活性变化直接影响苹果酸的积累速率。本试验中,果梅果实 PEPC、NAD-MDH 活性均与其苹果酸含量变化呈极显著正相关,在苹果酸含量达到最大值前,PEPC 活性也明显升高,说明 PEPC 活性可能促进了苹果酸的积累;同时,无论是‘荔波-3’还是‘荔波-11’,在生长发育过程中,果实中 NAD-MDH 活性都处于较高的水平并逐渐升高,苹果酸开始下降时,NAD-MDH 活性也开始下降。这与前人在油桃^[8]、砂梨^[28]果实中观察到的 NAD-MDH 活性变化相似。‘荔波-3’中苹果酸含量在花后 100 d 时缓慢下降,此时 NAD-MDH 活性也下降较快;‘荔波-11’中 NAD-MDH 活性此时变化较缓慢,而其苹果酸含量也下降较少。并且在花后 100 d 时,在两者中处于最高值者,其 NAD-MDH 活性和苹果酸含量都是最高的;果实成熟时,‘荔波-3’苹果酸含量高,NAD-MDH 活性也高。由此可见,NAD-MDH 是影响果梅果实苹果酸含量变化的关键酶。

ME 活性变化与苹果酸的脱羧、果实呼吸商的提高与果实衰老期苹果酸的逐渐降低相一致^[29]。本研究表明果实发育前期 NADP-ME 活性变化不大,后期升高较快,而苹果酸含量前期升高,后期降低,且在果实发育过程中‘荔波-3’NADP-ME 活性低于‘荔波-11’,前者出现峰值时的果实苹果酸含量高于后者且出现低谷,说明在果梅果实中,NADP-ME 对苹果酸起了降解作用,这与前人在桃^[8]、苹果^[11]中所得的研究结果一致。果梅成熟时,苹果酸含量不同的单株中,NADP-ME 活性越高,苹果酸含

量就越少,这与菠萝^[23]、梨^[3]中的研究结论相同。可见,NADP-ME也是果梅果实中苹果酸代谢的关键酶,后期NADP-ME活性高低是造成不同果梅单株果实苹果酸含量差异一个重要的原因。

综上所述,果梅果实有机酸主要在果实发育后

期积累,有机酸积累差异受多个酶协同调控;苹果酸的积累差异主要由NAD-MDH、PEPC和NADP-ME活性协同变化引起,柠檬酸积累差异主要受CS活性变化影响。

参考文献:

- [1] 翟焕趁,史怀,宋亚娜,等.反相HPLC法同时测定青梅中的7种有机酸[J].福建农业学报,2007,22(4):414-417.
ZHAI H C,SHI H,SONG Y N,*et al.* Reversed-phase HPLC simultaneous determination of plum in the seven kinds of organic acid[J].*Fujian Journal of Agricultural Sciences*,2007,22(4):414-417.
- [2] SHA S F,LI J C,WU J,*et al.* Changes in the organic acid content and related metabolic enzyme activities in developing 'Dangshansuli' pear fruit[J].*African Journal of Agricultural Research*,2011,6(15):3 560-3 567.
- [3] 李甲明,杨志军,张绍铃,等.不同梨品种果实有机酸含量变化与相关酶活性的研究[J].西北植物学报,2013,33(10):2 024-2 030.
LI J M,YANG Z J,ZHANG S L,*et al.* Study on the change of organic acid content and related enzyme activities in different pear cultivars [J].*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2013,33(10):2 024-2 030.
- [4] BRUEMMER J H,BUSLIG B S,ROE R. Citrus enzyme system:Opportunities for control of fruit quality[J].*Proc. Intl. Soc. Citricult*,1977,3:712-716.
- [5] CANEL C,BAILEY SERRES J N,ROOSE M L. Molecular characterization of the mitochondrial citrate synthase gene of an acidless pummelo (*Citrus maxima*) [J].*Plant Molecular Biology*,1996,31:143-147.
- [6] HIRARI M,UENO I. Development of citrus fruits: fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue[J].*Plant and Cell Physiology*,1977,18:791-799.
- [7] KUBO T,KIHARA T,HIRABAYASHI T. The effects of spraying lead arsenate on citrate accumulation and the related enzyme activities in the juice sacs of citrus natsudaikai[J].*Engei Gakkai Zasshi*,2002,71(3):305-310.
- [8] 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.
- [9] 龚荣高,吕秀兰,张光伦,等.不同脐橙品种果实有机酸代谢相关酶的研究[J].四川农业大学学报.2011,(4):499-502.
GONG R G,LÜ X L,ZHANG G L,*et al.* Study of different navel orange varieties fruit organic acid metabolizing enzymes [J].*Journal of Sichuan Agricultural University*,2011,(4):499-502.
- [10] MOING A,ROTHAN C,SVANELLA I,*et al.* Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development[J].*Physiologia Plantarum*,2000,108(1):1-10.
- [11] 王立霞.几个功能型苹果优良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.
- [12] 陈美霞,陈学森,慈志娟,等.杏果实糖酸组成及其不同发育阶段的变化[J].园艺学报,2006,33(4):805-808.
CHEN M X,CHEN X S,CI Z J,*et al.* Changes of sugar and acid constituents in apricot during fruit development[J].*Acta Horticultura Sinica*,2006,33(4):805-808.
- [13] 文涛,熊庆娥,曾伟光,等.脐橙果实发育过程中有机酸合成代谢酶活性的变化[J].园艺学报,2001,28(2):161-163.
WEN T,XIONG Q E,ZENG W G,*et al.* Changes of organic acid synthetase activity during fruit development of navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck)[J].*Acta Horticulturae Sinica*,2001,28(2):161-163.
- [14] NISPEROS-CARRIEDO M O,BUSLIG B S,SHAW P E. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC[J].*Journal of Agricultural & Food Chemistry*,1992,40:1 127-1 130.
- [15] 罗安才,杨晓红,邓英毅,等.柑橘果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化[J].中国农业科学,2003,36(8):941-944.
LUO A C,YANG X H,DENG Y Y,*et al.* Organic acid concentrations and the relative enzymatic changes during the development of Citrus fruits[J].*Scientia Agricultura Sinica*,2003,36(8):941-944.
- [16] 汤谧.‘风味甜瓜’系列果实高糖高酸品质形成的机理研究[D],武汉:华中农业大学,2010.
- [17] 陈美霞,陈学森,慈志娟,等.杏果实糖酸组成及其不同发育阶段的变化[J].园艺学报,2006,33(4):805-808.

CHEN M X, CHEN X S, CI Z J, *et al.* Changes of sugar and acid constituents in apricot during fruit development[J]. *Acta Horticulturac Sinica*, 2006, **33**(4): 805-808.

[18] 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.

[19] WU B H, QUILOT B, GENARD M, *et al.* Changes in sugar and organic acid concentrations during fruit maturation in peaches, *P. davidi* and hybrids as analyzed by principal component analysis[J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 103: 429-439.

[20] 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.

[21] XU X J, LI Q Y, SONG X H, *et al.* Dynamic regulation of nitrogen and organic acid metabolism of cherry tomato fruit as affected by different nitrogen forms[J]. *Pedosphere*, 2012, **22**(1): 67-78.

[22] LECHAUDEL M, GENARD M, LESCOURRET F, *et al.* Leaf-to-fruit ratio affects water and dry-matter content of mango fruit[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2002, **77**(6): 773-777.

[23] 张秀梅, 杜丽清, 孙光明, 等. 菠萝果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化[J]. 果树学报, 2007, **24**(3): 381-384.

ZHANG X M, DU L Q, SUN G M, *et al.* Changes in organic acid concentrations and the relative enzyme activities during the development of Cayenne pineapple fruit[J]. *Journal of Fruit Science*, 2007, **24**(3): 381-384.

[24] 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(19). 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.

[25] SADKA A, DAHAN E, COHEN L, *et al.* Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit [J]. *Plant Physiology*, 2000, 108: 255-262.

[26] 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.

[27] SWEETMAN C, DELUC L G, CRAMER G. R, *et al.* Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1 329-1 344.

[28] 霍月青, 胡红菊, 彭抒昂, 等. 砂梨品种资源有机酸含量及发育过程中变化[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 216-223. HUO Y Q, HU H J, PENG S A, *et al.* Development process and content of organic acids in sand pear cultivars [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, **42**(1): 216-223.

[29] FRENKEL C, KLEIN I, DILEY DR. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruit [J]. *Plant Physiology*, 1968, 43: 1 146-1 153.

(编辑: 裴阿卫)