

葡萄早熟芽变与其亲本果实发育特征比较分析

郭大龙*, 郭明晓, 张国海

河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003

摘要: ‘峰早’和‘洛浦早生’葡萄分别是‘巨峰’和‘京亚’的早熟芽变, 本研究对比分析了早熟芽变与其亲本间在果实发育过程中与成熟有关的生理指标动态变化的差异。结果表明, 与亲本相比, 两个早熟芽变品种在果实横径、纵径、单粒重的增长速率, 叶绿素、类黄酮和总酚含量变化趋势, 以及 β -半乳糖苷酶活性等方面的变化趋势差别不大。可溶性固形物和可溶性糖的变化趋势、类胡萝卜素的含量及脂氧合酶(LOX)活性的变化趋势在两对芽变与亲本间无明显一致的趋势, 表现出的情形比较复杂。但两芽变品种花色苷的增长速率在花后50 d均显著快于亲本, 且在成熟时的绝对含量均大于对应时期亲本, 这可能是早熟芽变品种果实先着色的原因之一。两芽变与亲本间果胶甲酯酶(PE)活性和多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性变化模式相一致, 且两芽变的PG酶活性增长速率均明显大于其亲本, 这种变化幅度也与早熟芽变性状变化的幅度相关, 所以PG酶活性增加加快了芽变品种的成熟软化, 这可能是芽变比亲本早熟的原因之一。

关键词: 葡萄; 早熟芽变; 果实发育; PG酶

Comparisons of Berry Development Characteristics between the Early Ripening Bud Mutants of Grape and Their Parents

GUO Da-Long*, GUO Ming-Xiao, ZHANG Guo-Hai

College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

Abstract: ‘Fengzao’ and ‘Luopuzaosheng’ are the early ripening bud mutants of ‘Kyoho’ and ‘Jingya’, respectively. The berries of grape cultivars, ‘Fengzao’, ‘Kyoho’, ‘Jingya’ and ‘Luopuzaosheng’ were used in this study. The dynamic changes of berry development, pigment content and related enzyme activities were compared between the mutants and their parents. The results showed that there were no differences in the increasing tendency of the horizontal and vertical diameters, and weight of per berry, in the content of chlorophyll, flavonoid and total phenols, and in the activity of β -gal between the bud mutation and parents, which indicated that the development rate of grape berry was not the reason for the early ripening of bud mutant. The changes in the content of soluble solid, soluble sugars, carotenoid and the activity of LOX showed different tendency between the bud mutants and their parents. The increasing in the content of anthocyanin was obviously faster in 50 days after blooming and the absolute content was also higher in the sports. The tendency of changes in the activity of PE and PG enzymes were similar in both of the mutants and the parents. However, the increase of PG activity in the mutant was faster and in accordance with the early ripening. This indicated that increasing of PG enzyme activity accelerated the berry softening of the bud mutant which might be one of the reasons that the mutant ripen early than the parents.

Key words: grape; early bud mutant; fruit development; PG enzyme

葡萄是世界范围内种植的果树, 在我国果业中也有着重要的地位(张广科等2014)。现有的鲜食葡萄品种以中晚熟品种为主, 优质、早熟、大粒、适宜栽培的早熟鲜食葡萄品种并不是特别多。因此, 早熟品种对葡萄种植结构的优化有重要作用, 但目前对早熟葡萄早熟性状的生理基础了解还不多。‘巨峰’和‘京亚’是目前生产中的主栽葡萄品种之一, 而‘峰早’(李学强等2008)和‘洛浦早生’(张国海等2005)分别是‘巨峰’和‘京亚’的早熟芽

变。‘峰早’成熟期比‘巨峰’早30 d左右, ‘洛浦早生’成熟期比‘京亚’早20 d左右。对比分析葡萄早熟芽变材料与亲本间在果实发育过程中一些重要生理

收稿 2014-10-08 修定 2014-10-30

资助 国家自然科学基金(31372026)、河南省高校科技创新人才支持计划(13HASTIT004)和河南省重点科技攻关项目(132102110029)。

* 通讯作者(E-mail: guodalong@haust.edu.cn; Tel/Fax: 0379-6428345)。

指标动态变化的差异,有可能获得一些葡萄早熟性状生理基础的重要信息。

葡萄果实开始成熟的主要标志是果实开始着色和变软(Coombe 1995)。果实着色的物质基础是花青苷,其积累的数量和时间决定着果实着色的程度和时期,并最终影响着果实的外观品质。果实的成熟软化与细胞壁酶活性有密切关系。多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)是一种水解酶,参与果胶降解,促进果实软化,在细胞壁结构的改变中有着重要的作用。 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -Gal)能从细胞壁多糖中水解半乳糖苷酶残基,目前已经从包括葡萄在内的多种果实中检测到它的活性。果胶甲酯酶(pectinesterase, PE)可将高甲氧基果胶转化为低甲氧基果胶并为PG提供底物,对果胶的降解起调节作用。对苹果‘乔纳金’与其脆果芽变的研究表明,果实发育后期硬度和脆度的差异是多种基因协同作用的结果,但PG、 β -Gal酶在其中起重要作用(陈学森等2014)。脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)作为植物脂肪酸氧化途径的关键酶(曹嵩晓等2014),其代谢产物具有很多功能,苹果中的研究发现,LOX酶不仅参与了果实的软化,而且可能在果实发育初期的细胞分化和果实膨大中起重要作用(魏建梅和马锋旺2009)。

本研究拟对2个葡萄早熟芽变与其亲本在果实发育过程中果实生长动态、可溶性糖和可溶性固形物含量、果皮中色素含量和果实软化相关酶活性的变化进行对比分析,获得早熟芽变与亲本间果实发育的差异,了解葡萄早熟性状的一些可能的生理基础。

材料与方 法

1 试验材料

试验于2012年5月~2013年9月在河南科技大学园艺实验室进行。试验所用材料为葡萄(*Vitis vinifera* L.)品种:‘巨峰’、‘峰早’、‘京亚’和‘洛浦早生’。取样地点为河南科技大学果树实习基地。连续2年取样(2012和2013年),每个品种的果实在开花后10 d开始采样,然后每隔10 d取一次样,直至果实完全成熟。每次从选定的3株上取100粒果实,取样后迅速放入冰盒,带回实验室。在超低温冰箱中保存用于酶活性测定。

2 试验方法

2.1 果实大小、重量、可溶性糖及可溶性固形物含量的测定

用游标卡尺测量果实的纵径和横径并称量单粒重。将采集的果实样品清洗干净,用手持折光仪测定可溶性固形物。可溶性糖含量用蒽酮法(张志良和瞿伟菁2003)。

2.2 叶绿素、类胡萝卜素的提取与测定

采用比色法,参照王福民等(2009)的方法。

2.3 花色素、类黄酮、总酚的提取与测定

采用比色法,参照林植芳等(1988)的方法。

2.4 LOX酶活性测定

参照冯尚坤和徐海菊(2008)的方法。取1 g果肉组织于预冷的研钵中加入5 mL预冷的磷酸缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0)匀浆。将匀浆液在 $9\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$)离心20 min,取上清液作为LOX粗酶液,用于活性测定。反应体系为:2.7 mL磷酸缓冲液,200 μL 底物,500 μL LOX粗酶液(对照加入500 μL 蒸馏水)。加入酶液后开始计时,在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中反应1 h,在234 nm波长下比色。酶活性以每克鲜重每小时增加的OD值表示。实验重复3次。

2.5 PG酶活性测定

参照李春燕等(2006)的方法并略有改动:酶提取液为6% NaCl,内含0.6% EDTA和1% PVP。取1 g果肉于预冷的研钵内冰浴匀浆20 min提取粗酶液,3 500 \times g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心,15 min,上清液为待测酶液。

PG测定:取0.5 mL酶液,加2 mL 0.5%果胶(pH 4.0),对照为pH 4.0的醋酸缓冲液。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温反应30 min,加2 mL DNS(二硝基水杨酸),沸水浴5 min,双蒸水定容至25 mL,540 nm比色。以D-(+)-半乳糖醛酸作标准曲线。以每分钟每克鲜样 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 时分解果胶产生1 mg的游离半乳糖醛酸为一个果胶酶活性单位(U)。

2.6 PE酶活性测定

参照李建国等(2003)的方法进行测定。酶活性以每分钟每克鲜样 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 时分解果胶产生1 μg 的游离半乳糖醛酸为一个酶活性单位(U)。

2.7 β -Gal酶活性测定

参照魏建梅和马锋旺(2009)的方法进行测定。以每15 min催化生成1 μmol ONPG(邻硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷)所需要的酶量定义为一个

酶活性单位(U)。

3 统计分析

所有测定均重复3次, 试验数据的统计分析采用SPSS 17.0软件, 使用新复极差法进行检验。

实验结果

1 果实生长动态变化

在整个果实发育过程中, 四个品种的纵、横

径和单粒重的变化如图1所示。基本上都呈现不断增加, 最后趋于平稳状态。如图上折线的斜率变化所示, 两个芽变品种与亲本的果实横径、纵径和单粒重在果实发育期增长的速率差异不显著。在花后20~40 d, ‘巨峰’和‘京亚’的纵径大于芽变品种‘峰早’和‘洛浦早生’纵径, 并在花后30 d达极显著水平(图1-C和D)。至成熟期, 芽变与亲本的纵、横径和单粒重的差异都不显著。

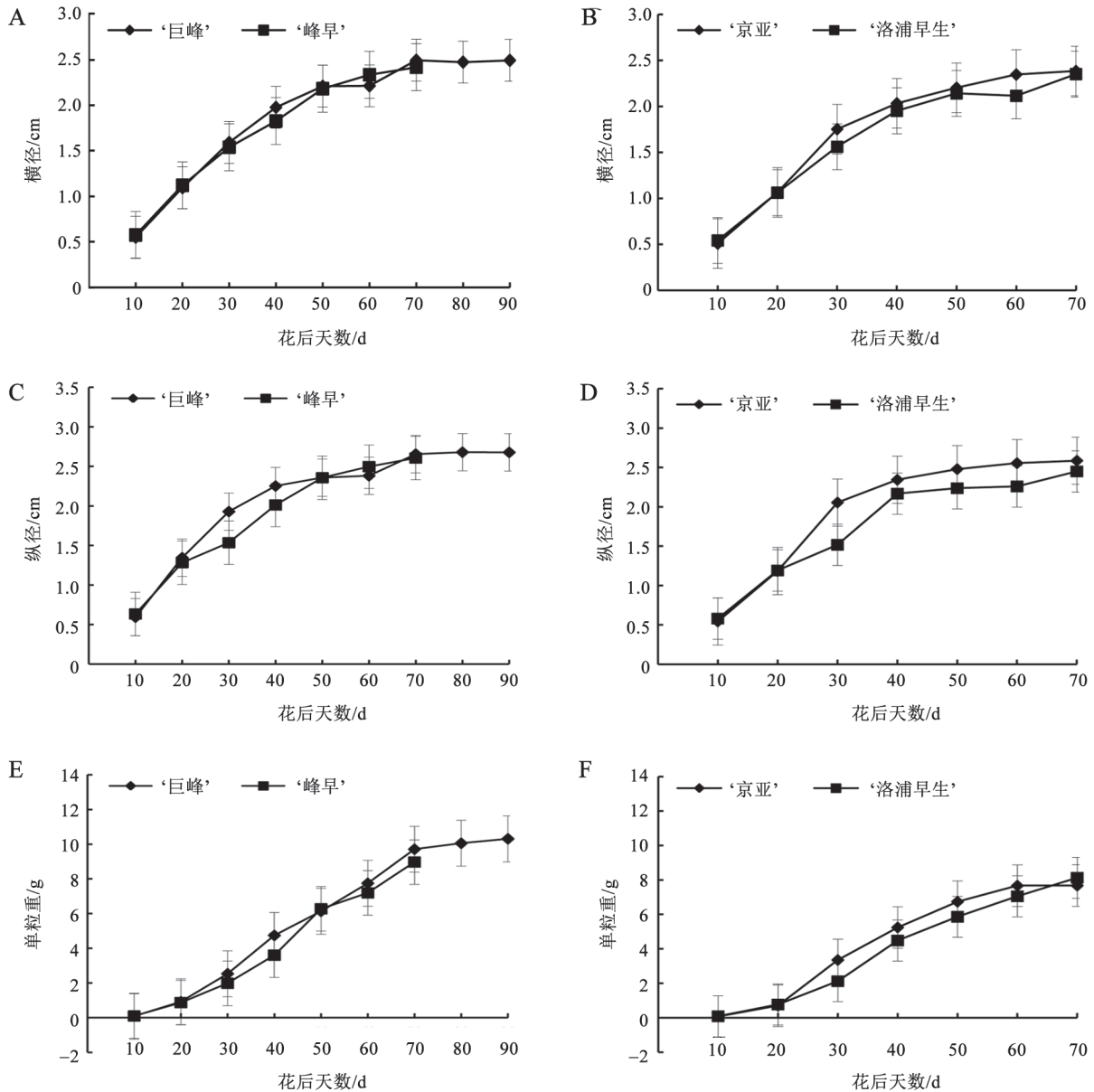


图1 葡萄果实发育的动态变化

Fig.1 The dynamic changes in grape berry development

A、C和E分别为‘巨峰’和‘峰早’果实发育横径、纵径和单粒重发育动态对比; B、D和F分别为‘京亚’和‘洛浦早生’果实发育横径、纵径和单粒重发育动态对比。

‘巨峰’在花后40 d为果实第一次生长高峰,而‘峰早’则为花后30 d。‘巨峰’在花后40~60 d为果实缓慢生长期,而‘峰早’则为花后30~40 d,‘巨峰’在花后60 d后为果实第二次生长高峰,而‘峰早’则为花后40 d(图1-A、C和E)。‘京亚’和‘洛浦早生’果实在花后30 d为果实第一次生长高峰。‘京亚’在花后40~50 d进入果实缓慢生长期(图1-B、D和F),‘洛浦早生’此期则不明显。

2 果实中可溶性固形物和可溶性糖含量变化

四个品种可溶性固形物的变化趋势大致相似,均呈现一直上升趋势,见图2-A和B。在花后10~50 d,‘巨峰’果实的可溶性固形物增长缓慢。而‘峰早’自花后20 d开始,可溶性固形物含量增加很快(图2-A)。“京亚”的可溶性固形物含量的快速增加阶段在花后30~50 d,呈直线上升趋势,而‘洛浦早生’的可溶性固形物含量在花后20 d至果实完全成

熟,增长速率较‘京亚’平缓,有两个快速增加时期(图2-B)。

随着果实的成熟,四份材料的可溶性糖含量均逐渐增加(图2-C和D),在成熟期都达到最大。花后30~60 d,‘峰早’和‘京亚’,‘巨峰’和‘洛浦早生’的可溶性糖含量增长趋势分别相似,芽变与相应亲本间的变化在两组间趋势恰好相反。

综上,可溶性固形物和可溶性糖的变化速率在两对芽变与亲本间无明显一致的趋势,表现出的情形比较复杂。

3 果皮中色素含量变化

3.1 果皮中叶绿素类和类胡萝卜素含量变化

四个品种中叶绿素(图3-A和B)和类胡萝卜素含量(图3-C和D)的变化相似,随着果实的发育逐渐减低,并在成熟期达到最低,但降低的速率和最终含量略有不同。在整个果实发育期,‘巨峰’果皮中

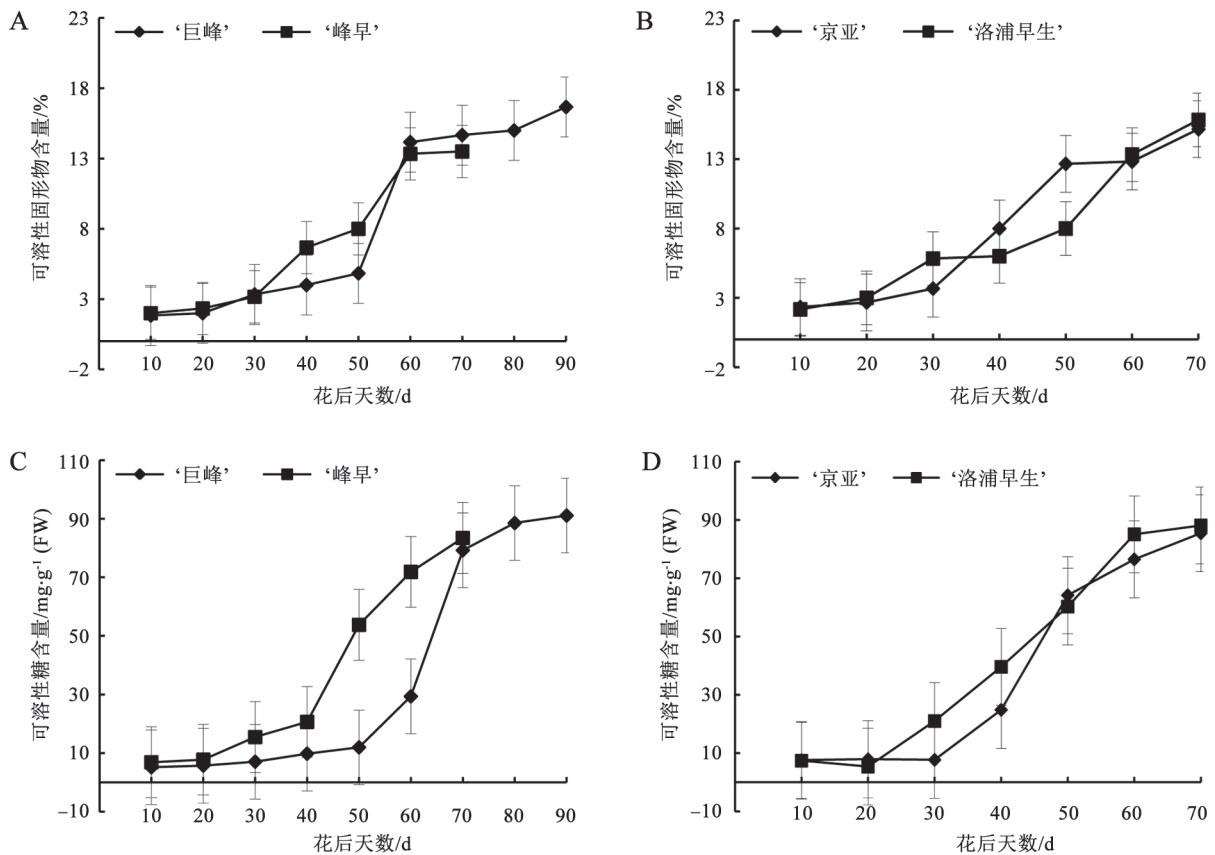


图2 葡萄果皮中可溶性固形物和可溶性糖含量变化

Fig.2 The content changes of soluble solids and soluble sugar in grape berry skins

A和C分别为‘巨峰’和‘峰早’果皮中可溶性固形物和可溶性糖含量变化对比; B和D分别为‘京亚’和‘洛浦早生’果皮中可溶性固形物和可溶性糖含量变化对比。

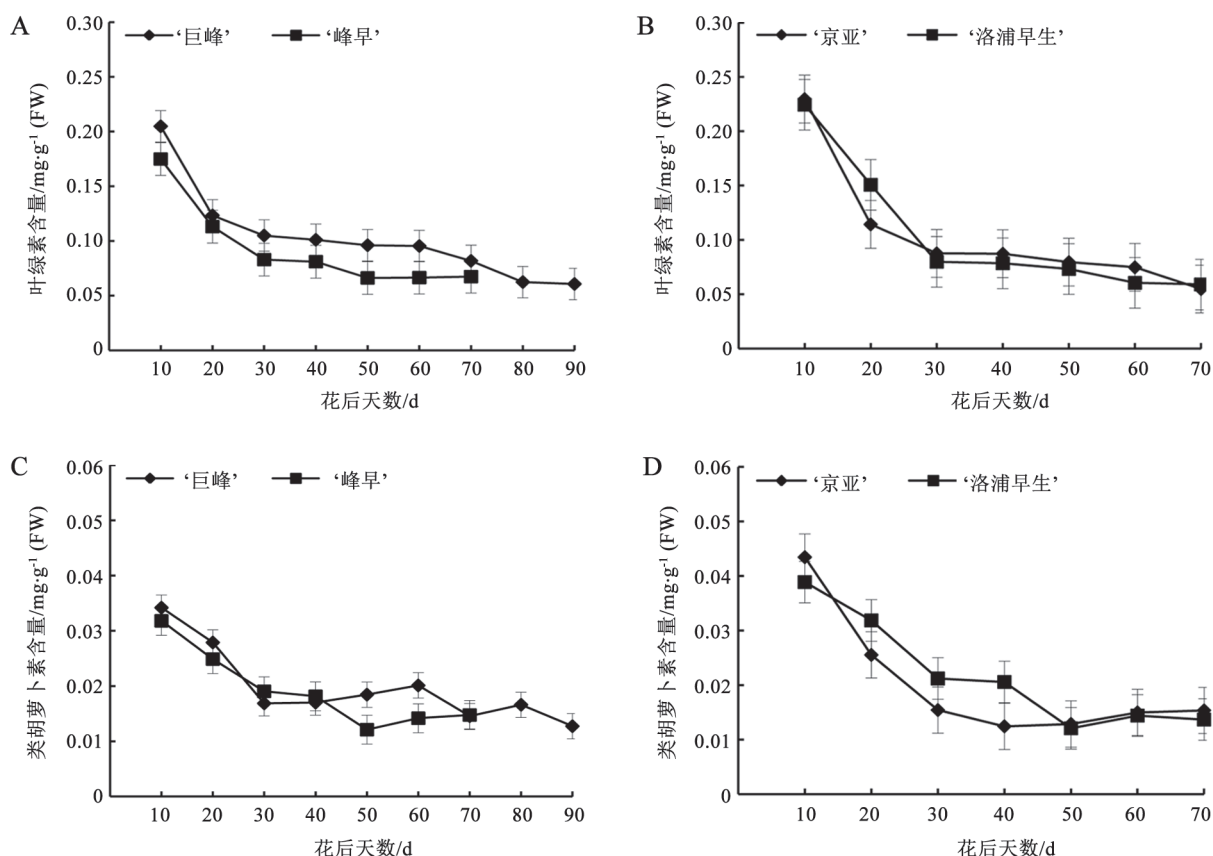


图3 葡萄果皮中叶绿素和类胡萝卜素含量变化

Fig.3 The content changes of chlorophyll and carotenoid in grape berry skins

A和C分别为‘巨峰’和‘峰早’果皮中叶绿素和类胡萝卜素含量变化对比; B和D分别为‘京亚’和‘洛浦早生’果皮中叶绿素和类胡萝卜素含量变化对比。

的叶绿素含量始终大于‘峰早’, 达到显著差异。‘京亚’果皮中叶绿素和‘洛浦早生’中的变化趋势相似, 仅在花后20 d时两者的变化速率略有差异。

‘峰早’和‘巨峰’果皮中类胡萝卜素含量前期的变化趋势基本一致, 只是到了花后40 d, ‘峰早’的类胡萝卜素含量有一个快速下降, 而‘巨峰’的相对平缓。整体上看, ‘京亚’果皮中类胡萝卜素含量和‘洛浦早生’中的变化趋势相同, 仅果实发育初始阶段, ‘京亚’中的下降速率高于‘洛浦早生’。

3.2 果皮中花色素苷、类黄酮、总酚含量的变化

四个品种果皮中花色素苷含量(图4-A和B)在花后50 d都开始增加, 但‘洛浦早生’和‘峰早’的增长速率均显著快于亲本的, 且在成熟期时绝对含量均大于对应时期亲本的。这其中, 又以‘巨峰’花色素苷含量增长较慢, 最终含量也较低。

四个品种果皮中类黄酮(图4-C和D)和总酚含

量(图4-E和F)变化趋势一致, 均是先缓慢降低, 再升高, 芽变和亲本间没有大的差异。

4 果肉中成熟软化相关酶活性变化

4.1 果肉中LOX酶活性变化

在整个果实发育过程中脂氧合酶活性的变化如图5-A和B所示。四个品种的变化趋势相似, 都呈现出逐渐降低的趋势。其活性变化在前期迅速降低, 后期趋于平缓。芽变品种果肉中LOX酶的活性与其亲本相差不大。仅在花后20~30 d, ‘洛浦早生’果肉中LOX酶活性高于亲本, 差异达到了显著水平。而另一对芽变品种的结果正好相反。

4.2 果肉中PG酶活性变化

由图5-C和D可以看出, 在花后10~40 d, 四个品种的PG酶活性变化都较平稳。花后40 d开始, ‘峰早’和‘洛浦早生’的PG酶活性迅速升高, 芽变品种PG酶活性增长速率(折线斜率)均明显大于其亲

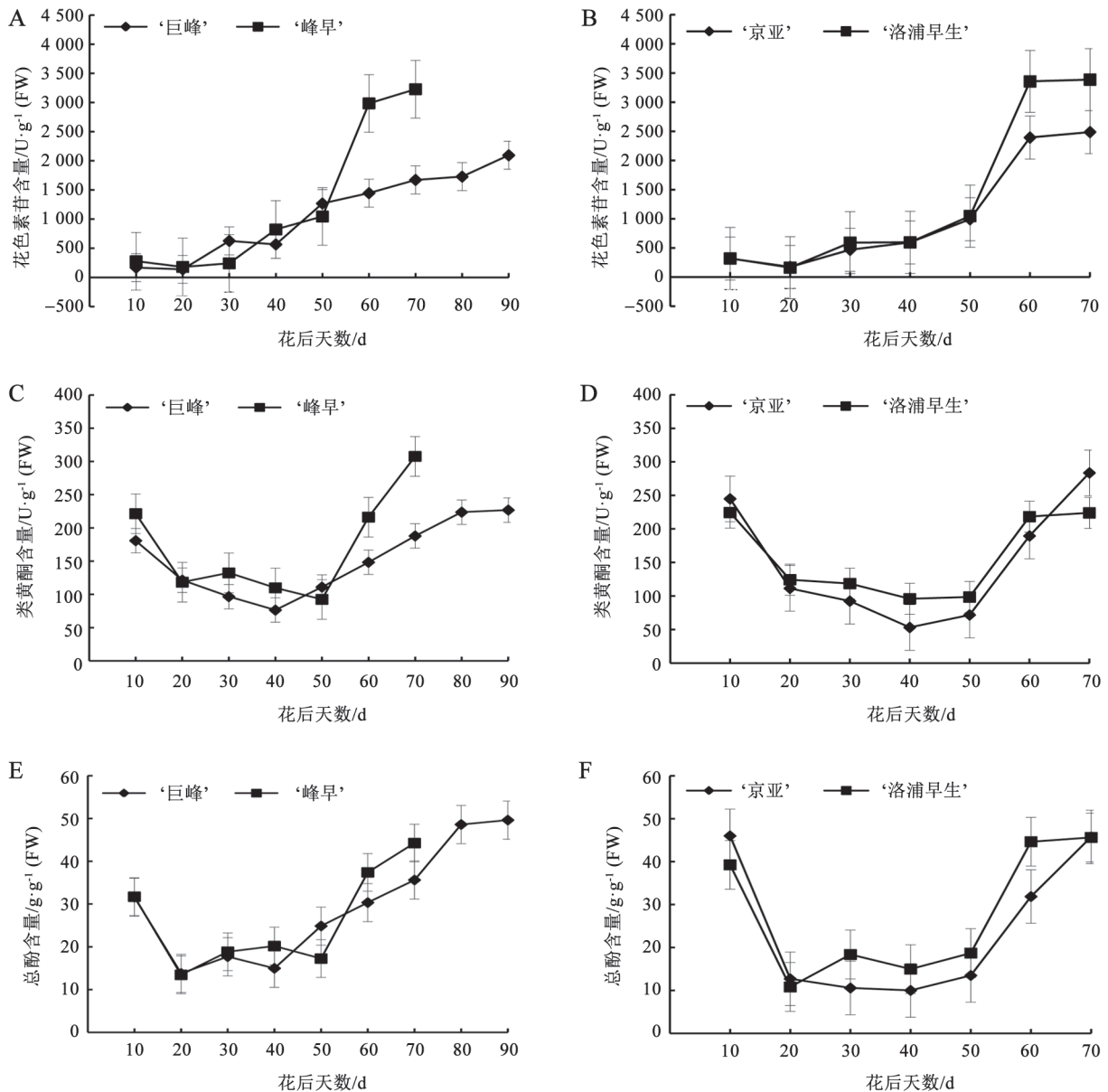


图4 葡萄果皮中花色苷、类黄酮、总酚含量的变化

Fig.4 The content changes of anthocyanin, flavonoids and total phenols in grape berry skins

A、C和E分别为‘巨峰’和‘峰早’果皮中花色苷、类黄酮、总酚含量变化对比；B、D和F分别为‘京亚’和‘洛浦早生’果皮中花色苷、类黄酮、总酚含量变化对比。

本, 尤以‘峰早’和‘巨峰’间的差异更为明显。芽变品种PG酶活性花后60 d时达到最高, 但接下来活性开始降低。而亲本品种的PG酶活性上升后一直保持平稳状态。

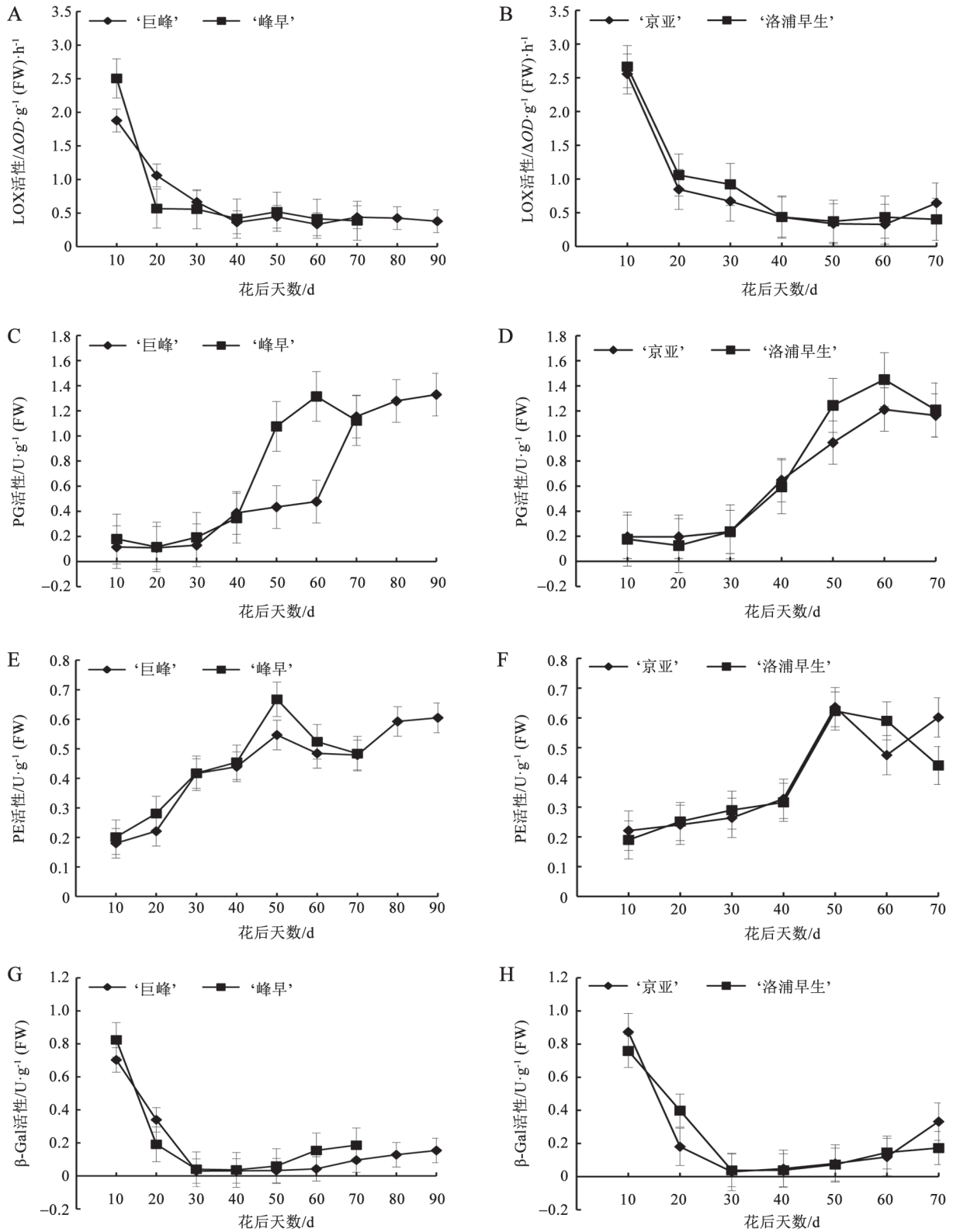
4.3 果肉中PE酶活性变化

在果实发育过程中, 果肉中PE酶活性的如图5-E和F所示。四个品种中PE酶活性开始都是缓慢增长, 到花后50 d都达到最大峰值, 然后芽变品种

都是一直降低, 而亲本中还有一个再次缓慢升高的过程。

4.4 果肉中 β -Gal酶活性变化

由图5-G和H可以看出在整个果实发育过程中 β -Gal酶活性的变化。四个葡萄品种果肉中 β -Gal酶活性都表现为先下降, 芽变品种在花后30 d内活性表现为直线下降, 而后四个品种中活性一直保持在比较平缓的状态。

图5 葡萄果肉中LOX、PG、PE、 β -Gal酶活性的变化Fig.5 The activity changes of LOX, PG, PE and β -Gal in grape berry pulps

A、C、E和G分别为‘巨峰’和‘峰早’果肉中LOX酶、PG酶、PE酶和 β -Gal酶活性变化对比; B、D、F和H分别为‘京亚’和‘洛浦早生’果肉中LOX酶、PG酶、PE酶和 β -Gal酶活性变化对比。

讨 论

果实的成熟过程牵扯到一系列复杂的生理生化变化,但果实成熟最直接的外观表现是果实开始着色和果实开始软化,所以本研究从果实发育的速率变化(纵横径、单粒重的变化),色素类与果实成熟软化有关的酶类入手,以期了解葡萄早熟芽变与亲本相比,果实发育过程中相关生理过程的变化。但因为早熟芽变与亲本的发育进程不同,直接对比同一时间点生理指标的差异没有任何意义;对比相应发育时期的指标,一是相应发育时期点不能准确确认,二是理论上芽变和亲本的发育过程是类似的,直接对比相应指标的高低,也不能说明任何问题,所以本研究中选择比较果实整个发育过程中各指标的动态变化过程,即变化趋势的差异,确实发现了一些有价值的结果。

果实发育速率指标,即纵横径、单粒重的对比表明在芽变与亲本间,这些指标的增长速率没有显著的差异。‘峰早’和‘巨峰’相比,‘洛浦早生’和‘京亚’相比,它们的花期相同,但如图1-A~F所示,果实第一次和第二次生长高峰均是早熟芽变品种开始的早,果实缓慢生长期也是芽变进入的早,但该期在2个芽变中持续时期短或者表现不明显。说明早熟芽变的果实发育进程要较亲本的快。可溶性固形物和可溶性糖的变化速率在两对芽变与亲本间无明显一致的趋势,表现出的情形比较复杂,说明这也与芽变的早熟性无关。

果皮的颜色是叶绿素、类胡萝卜素、类黄酮和花色苷等综合作用的结果(Lancaster等1994)。叶绿素的变化在两个芽变与亲本间无差异,变化趋势相似。但果实前期类胡萝卜素在两对芽变中的变化趋势表现的情况相反。从四个葡萄品种的花色素苷可以看出,在花后50 d花色苷开始在果皮中大量积累,但芽变品种的增长速率均显著快于亲本,且在成熟期时绝对含量均大于对应时期亲本。四个品种果皮中类黄酮和总酚含量变化趋势一致,均是先缓慢降低,再升高,芽变和亲本间没有大的差异。所以,早熟芽变品种果实先着色的原因之一可能与芽变品种中花色苷的含量在花后50 d迅速快速增加有关。

LOX酶的代谢产物具有很多功能,主要有参与种子萌发及幼苗发育,调节植物生长发育、参

与生物和非生物胁迫反应以及果实的成熟衰老(张波等2007)。本研究中LOX酶在葡萄果实发育过程中都有一定的活性,随着果实的成熟,LOX酶活性逐渐降低。在花后20~30 d,‘洛浦早生’果肉中LOX酶活性高于其亲本,差异达到了显著水平。而另一对芽变品种的结果正好相反。其他研究也发现,不同果实种类,LOX酶活性与果实成熟进程存在明显差异(张波等2007),LOX具体功能有待进一步的研究。

随着葡萄果实的成熟,芽变和亲本果实发育前期PE酶活性均是缓慢升高,但达到峰值后,两个芽变品种中PE酶活性均是持续降低,而两个对应亲本中PE酶活性还有一个缓慢增长的过程,这是否与芽变的早熟性有关还有待进一步研究。

4个葡萄品种中PG酶活性整体都呈现出不断上升的趋势。对‘黄冠’梨采后生理的研究表明,PG与果实硬度呈极显著负相关(王玲利等2014)。花后40 d开始,‘峰早’和‘洛浦早生’的PG酶活性迅速升高,且活性和增长速率均大于其亲本,并且差异达到显著水平,尤以‘峰早’和‘巨峰’的差异更大。这也是预料之中的,因为‘峰早’要比‘巨峰’早熟近30 d,而‘洛浦早生’仅比‘京亚’早熟8~10 d,说明PG酶活性的变化幅度与早熟芽变早熟性状变化的幅度相关。说明在果实发育过程中,与亲本品种相比,PG酶加快了早熟品种的成熟软化。这可能是葡萄早熟芽变早熟的原因之一。芽变品种PG酶活性花后60 d时达到最高,但接下来活性开始降低。而亲本品种的PG酶活性上升后一直保持平稳状态。

β -Gal可通过降解有支链的多聚醛酸而使果胶降解或者溶解来改变某些细胞壁组分的稳定性。在桃、枇杷等果实的成熟软化中已经证明 β -半乳糖苷酶参与了果实的成熟软化(阚娟等2012)。本试验中 β -半乳糖苷酶在果实发育早期活性高,随着果实的成熟酶活性降低。该酶变化趋势与PG酶和PE酶明显不同,这一结果与桃(阚娟等2012)果实发育过程中该酶变化趋势相似。

参考文献

- 曹嵩晓,张冲,汤雨凡,齐红岩(2014).植物脂氧合酶蛋白特性及其在果实成熟衰老和逆境胁迫中的作用.植物生理学报,50(8):1096~1108

- 陈学森, 宋君, 高利平, 冀晓昊, 张宗营, 毛志泉, 张艳敏, 刘大亮, 张芮, 李敏(2014). ‘乔纳金’苹果及其脆肉芽变果实质地发育机理. 中国农业科学, 47 (4): 727~735
- 冯尚坤, 徐海菊(2008). 不同pH值反应体系对果蔬中脂氧合酶活性测定的影响. 食品研究与开发, 29 (3): 60~62
- 阚娟, 刘俊, 金昌海(2012). 桃果实成熟软化与细胞壁降解相关糖苷酶及乙烯生物合成的关系. 中国农业科学, 45 (14): 2931~2938
- 李春燕, 张光伦, 曾秀丽, 罗楠, 胡强(2006). 细胞壁酶活性与甜橙果实质地的相关性研究. 四川农业大学学报, 24 (1): 73~76
- 李建国, 黄旭明, 黄辉白(2003). 裂果易发性不同的荔枝品种果皮中细胞壁代谢酶活性的比较. 植物生理与分子生物学学报, 29 (2): 141~146
- 李学强, 李秀珍, 张国海(2008). 巨峰葡萄早熟性芽变98-2的孢粉学及同工酶研究. 果树学报, 25 (6): 937~940
- 林植芳, 李双顺, 张东林, 林桂珠, 李月标, 刘淑娴, 陈绵达(1988). 采后荔枝果皮色素、总酚及有关酶活性的变化. 植物学报, 30 (1): 40~45
- 王福民, 黄敬峰, 王秀珍(2009). 水稻叶片叶绿素、类胡萝卜素含量估算的归一化色素指数研究. 光谱学与光谱分析, 29 (4): 1064~1068
- 王玲利, 刘超, 黄艳花, 李兴发, 曾明(2014). ‘黄冠’梨采后热处理和钙处理对其钙形态及细胞壁物质代谢的影响. 园艺学报, 41 (2): 249~258
- 魏建梅, 马锋旺(2009). 苹果果实 β -Gal和LOX活性变化特性及其与果实软化的关系. 园艺学报, 36 (5): 631~638
- 张波, 李鲜, 陈昆松(2007). 脂氧合酶基因家族成员与果实成熟衰老研究进展. 园艺学报, 34 (1): 245~250
- 张广科, 肖培连, 侯丽霞, 王文杰, 马倩, 刘新(2014). 葡萄*VvBAP1*基因的克隆及表达特性分析. 植物生理学报, 50 (6): 829~934
- 张国海, 郭香凤, 李秀珍, 李学强, 史国安, 林芳立, 夏仁学(2005). 极早熟葡萄新品种‘洛浦早生’. 园艺学报, 32 (3): 558
- 张志良, 瞿伟菁(2003). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 127~128
- Coombe BG (1995). Growth stages of the grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Austra J Grape Wine Res*, 1: 104~110
- Lancaster JE, Grant JE, Lister CE, Taylor MC (1994). Skin color in apples – Influence of copigmentation and plastid pigments on shade and darkness of red color in five genotypes. *J Amer Soc Hortic Sci*, 119 (1): 63~69