

柑橘品种间糖积累差异的生理基础

赵智中,张上隆,陈俊伟,陶俊,吴延军

(浙江大学园艺系,杭州 310029)

摘要:测定了本地早、椪柑、香柠檬和宫川汁囊中蔗糖、葡萄糖、果糖、可滴定酸以及 ABA 的含量,分析了酸性转化酶(AI)的活性,并模拟汁囊条件对蔗糖的酸水解进行了研究。结果表明,不同品种的糖含量和构成比例、酸含量、ABA 含量以及 AI 活性都存在明显差异。在果实发育后期,汁囊中的 ABA 与糖含量都明显升高,呈极显著相关,表明 ABA 对糖的积累具有重要影响。本地早和宫川以积累蔗糖为主,香柠檬以积累己糖为主,椪柑介于二者之间。在酸度较高的香柠檬中,蔗糖的酸水解是影响汁囊中糖分构成的主要因素。在酸度较低的本地早、宫川和椪柑中,果实发育后期汁囊中的 AI 活性对糖分构成具有重要影响。

关键词:柑橘;糖积累;生理学

The Physiological Mechanism on the Difference of Sugar Accumulation in Citrus Varieties

ZHAO Zhi-zhong, ZHANG Shang-long, CHEN Jun-wei, TAO Jun, WU Yan-jun

(Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: The content of sucrose, glucose, fructose, titratable acid, ABA, and the activity of acid invertase (AI) were measured in juice sacs of Bendizao mandarin (*C. succosa* Hort), ponkan (*C. reticulata* Blanco), Miyagawa wase (*C. unshiu* Marc) and Meyer lemon (*C. meyeri* Y). Acid hydrolysis of sucrose *in vitro* was also studied. The evident differences in sugar content, the ratio of different sugars, titratable acidity, ABA content, and the activity of AI were observed in four citrus varieties. Sugar content in juice sacs of citrus fruit was significantly related to that of ABA at the late stage of fruit development. The result suggested that ABA played an important role in sugar accumulation in juice sacs of citrus fruit. Bendizao mandarin and Miyagawa wase mainly accumulated sucrose in juice sacs of citrus fruit, the main sugars in Meyer lemon was hexose, and Ponkan citrus was the sucrose-hexose accumulating type variety. For Meyer lemon with high acid degree, acid hydrolysis of sucrose determined the composition of sugars in juice sacs. In addition, for Bendizao mandarin, Ponkan citrus and Miyagawa wase with low acid degree, the AI activity obviously affected the composition of sugars at the late stage of fruit development.

Key words: Citrus; Sugar accumulation; Physiology

糖含量和构成对柑橘果实的风味、色泽和其它营养成分有重要影响。因此,研究不同品种间糖含量和构成差异的生理基础对全面了解柑橘品质的形成具有重要意义。

柑橘果实的可溶性糖主要包括蔗糖、葡萄糖和

果糖,品种间糖的构成差异较大。温州蜜柑以积累蔗糖为主^[1,2],而甜来檬则以积累己糖为主^[3]。其它果实,如番茄也有蔗糖积累型和己糖积累型之分^[4]。在不同果实中影响糖分构成比例的因素也不同,Klann等^[4]发现,蔗糖积累型和己糖积累型

收稿日期:2001-07-17

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39730340)

作者简介:赵智中(1968-),男,山东曹县人,博士,主要从事果实发育生理和果树育种研究。张上隆为通讯作者, Tel: 0571-86971009; E-mail: shlzhang@zju.edu.cn

番茄果实间唯一明显的区别就是前者缺少酸性转化酶(AI)活性;而在成熟的酸来檬“Pesian”果实中,蔗糖因被酸水解而含量降低^[5]。ABA是影响果实糖含量的重要因素之一,它可以强化库活力,促进光合产物在库组织中积累^[6,7],外源ABA处理可以提高果实糖含量^[8,9]。目前,对柑橘品种间糖构成差异的生理基础以及果实糖含量与内源ABA关系的研究还比较少。本试验旨在探索柑橘果实糖积累差异的生理基础,为提高柑橘品质和品种改良提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验于2000年在浙江省柑橘研究所(台州市黄岩区)生产果园内进行。供试的本地早(*C. succosa* Hort cv. Bendizao mandarin)、椪柑(*C. reticulata* Blanco cv. Ponkan)和宫川(*C. unshiu* Marc cv. Miyagawa wase)的果实取自枳砧成年树。盛花期为4月27~29日。分别于7月31日、9月21日、10月12日、11月5日和11月26日(不包括宫川)选择有代表性的果实取样。香柠檬(*C. meyeri* Y cv. Meyer lemon)的供试果实取自浙江省台州市黄岩区院桥镇所属生产果园内成年枳砧树。盛花期为4月29日~5月1日。分别于7月31日、9月21日和11月26日选择有代表性的果实取样。两地的土质、气候以及果园管理水平相似。果实采后立即放入-20℃冰箱储存。试验重复3次。

1.2 糖含量测定

糖含量测定参照赵智中等^[2]的方法。称取6个果的混合样,液氮中研磨3~5 min,加提取液(乙醇:氯仿:水=12:5:3)再匀浆3~5 min,5 000×g离心15 min,取上清液,重复3次。合并提取液,转入分液漏斗,加水使之分层,5000×g离心10 min去除氯仿层,用0.1·mol·L⁻¹ NaOH调pH值至7.0,40℃减压蒸干,蒸馏水定容。高压液相色谱(BECKMAN)测定糖的含量,色谱条件为:流动相(乙腈/重蒸水=70/30, V/V),流速1 ml·min⁻¹,碳水化合物柱,156示差检测器,System Gold Software控制及数据处理系统。

1.3 ABA的提取和测定

ABA的测定参照张上隆等^[10]的方法并加以改进。取样品5 g,液氮研磨,4℃条件下80%甲醇30 ml浸提过夜,抽滤,滤渣用80%甲醇再浸提2次,合并滤液,38℃减压蒸至水相,加石油醚1:1萃取3次

去除色素,合并水相,调pH值至8.0,加0.5g不溶性PVPP,搅拌吸附酚类物质15 min,抽滤,滤液再加PVPP去酚类物质2次,调滤液pH值至3.0,加乙酸乙酯1:1萃取3次,合并酯相,38℃减压蒸干,用0.5 ml甲醇+3.5 ml的醋酸缓冲液(pH 3.5,浓度0.2 mol·L⁻¹)溶解后过C₁₈预处理柱(预先用5 ml甲醇和15 ml上述醋酸缓冲液平衡好),30 ml上述醋酸缓冲液洗柱去杂,15 ml 80%甲醇洗脱,收集洗脱液,38℃减压蒸干,用色谱甲醇定容至1 ml。高效液相色谱测定ABA含量,色谱条件:流动相为乙腈:醋酸缓冲液(pH 3.5, 0.02 mol·L⁻¹)=25:75,流速1 ml·min⁻¹, ODS(C₁₈)柱,紫外检测器,检测波长为254 nm, System Gold Software控制及数据处理系统。

1.4 汁囊中可滴定酸含量及pH值测定

果汁中的可滴定酸采用酸碱滴定法测定,以柠檬酸计算可滴定酸百分比含量^[11]。

汁囊中pH值的测定:取一定量的汁囊,充分磨碎后,4 500×g离心15 min,取上清液,用pHS-3C型精密pH计直接测定果汁的pH值。

1.5 蔗糖酸水解测定

根据果汁可滴定酸和pH值的测定结果,配相同百分含量、相同pH值的柠檬酸钠缓冲液。根据糖的分析结果确定反应体系中的蔗糖浓度,30℃保温1.5 h、3.0 h和4.5 h,反应结束后立即加入0.2 mol·L⁻¹的NaOH调pH值为7.0,再用DNS显色法测定还原糖含量。对照的pH为7.0。

1.6 AI活性分析

AI活性测定参照赵智中等^[2]的方法。

酶的提取:称取样品,液N₂中研磨5~10 min,加提取缓冲液(200 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液,5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.1% β-巯基乙醇, 0.05% Triton X100, 0.05% BSA, 2% PVPP, pH 7.5)再匀浆3~5 min, 20 000×g离心30 min,取上清液逐渐加(NH₄)₂SO₄至80%饱和度,放置30 min, 20 000×g离心20 min,去除上清液,加脱盐缓冲液(20 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液, 0.25 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.01% β-巯基乙醇, 0.05% BSA, pH 7.5)重新溶解沉淀, Sephadex G25柱离心脱盐,脱盐后的酶提取液用于酶活性分析。

酶活性分析:在490 μl反应体系中含80 mmol·L⁻¹醋酸-磷酸钾(pH 4.5), 100 mmol·L⁻¹蔗糖,粗酶提取液;37℃反应30 min,加入490 μl DNS试剂终止反应,沸水浴5 min,冷却后测定A₅₄₀。对照用

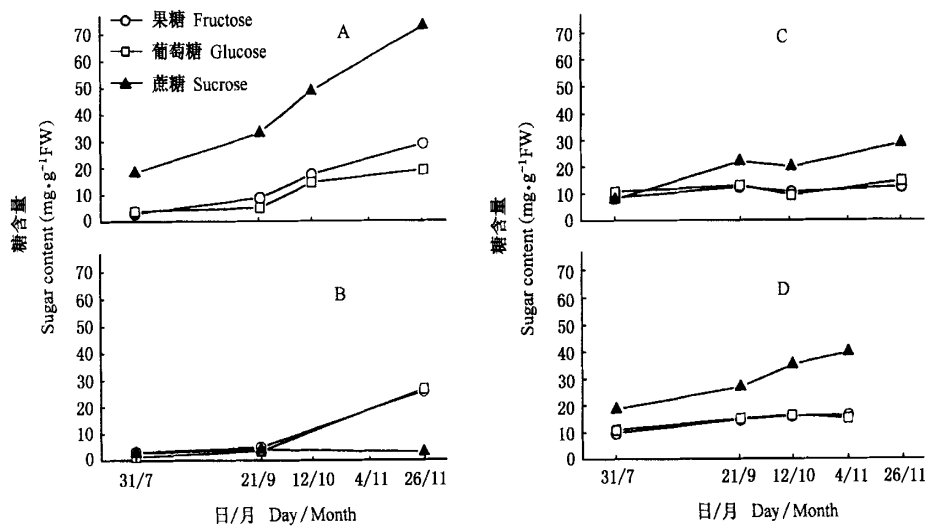
杀死的酶液替代粗酶提取液。

2 结果与分析

2.1 汁囊糖积累的特点

由图1可见,9月21日以前在本地早汁囊中糖的积累速度较慢,随后蔗糖含量急速升高,己糖含量也明显上升,至11月26日糖的含量高达12.15%。从糖分的构成来看,最后本地早汁囊中的蔗糖占总糖(蔗糖+葡萄糖+果糖)的60.04%,为己糖的1.5倍多(图1A)。香柠檬汁囊中糖的积累前期也较慢,9月21日之后糖的含量迅速上升;但这种上升

是由己糖含量增加而引起的,蔗糖含量不升反降。最后香柠檬的糖含量达到5.63%,其中己糖占总糖的96.47%,为蔗糖的27倍多(图1B)。柑汁囊中糖的积累一直比较缓慢,特别是9至10月份果实进入膨大期后,糖的含量还有所下降。到11月26日椪柑的糖含量仅为5.58%,其中蔗糖和己糖的含量基本相当(图1C)。宫川汁囊中糖的积累情况与本地早较为相似,只是后期己糖积累不如本地早明显。11月5日宫川汁囊中糖的含量可以达到7.24%,蔗糖占55.26%,明显高于己糖(图1D)。



A:本地早 Bendizao mandarin; B:香柠檬 Meyer lemon; C:椪柑 Ponkan; D:宫川 Miyagawa wase

图1 柑橘果实发育过程汁囊中糖的积累

Fig.1 Sugar accumulation in juice sacs of developing citrus fruits

2.2 汁囊中的 ABA 含量与糖积累

对汁囊中 ABA 的测定结果表明,(1)在果实发育前期(9月21日之前),各品种的 ABA 含量普遍较低,而且变化不大;在9月21日之后均相继表现出不同程度的升高;特别是在果实接近成熟时 ABA 含量的上升更为明显。例如,本地早汁囊中的 ABA 含量在9月21日仅为613.2 ng·g⁻¹ FW,之后迅速增加,至11月26日已达1527.1 ng·g⁻¹ FW,为前者的2.5倍,(2)本地早汁囊中的 ABA 含量始终高于同时期的其他品种;宫川各组织的 ABA 含量略低于本地早,但也明显高于其他两个品种;椪柑和香柠檬的 ABA 含量整体水平较低(图2)。

对9月21日之后汁囊中的 ABA 与糖含量的相关分析结果表明,汁囊中的 ABA 与糖含量的相关系

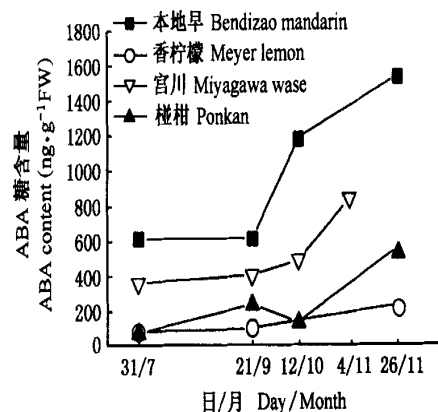


图2 柑橘果实发育过程中汁囊中 ABA 的含量变化

Fig.2 Changes of ABA content in juice sacs of developing citrus fruits

数为 0.899, 达极显著水平。可见汁囊中的 ABA 含量与其自身的糖分积累密切相关(图 3)。

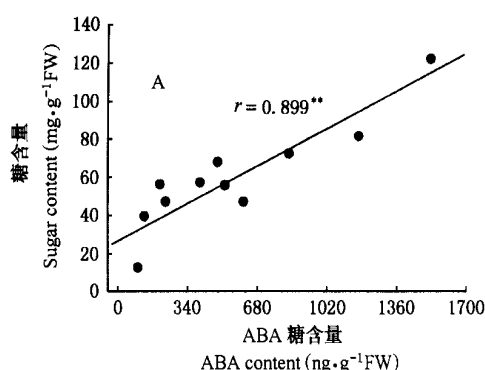


图 3 柑橘汁囊中 ABA 与糖含量的相关关系

Fig. 3 The relationships between ABA and sugar content in juice sacs of citrus fruits

2.3 汁囊中的酸含量及其对糖构成的影响

对汁囊中可滴定酸含量的测定结果见表。由表

表 柑橘汁囊中可滴定酸含量的变化

Table The change in content of titre acid in juice sacs

日期 Date (d/ m)	汁囊中的可滴定酸含量 Content of titre acid in juice sacs (%)			
	本地早 Bendizao mandarin	椪柑 Ponkan	香柠檬 Meyer lemon	宫川 Miyagawa wase
31/7	3.58(±0.03)	2.75(±0.04)	2.38(±0.16)	2.14(±0.03)
21/9	1.85(±0.03)	2.71(±0.52)	3.45(±0.25)	1.17(±0.02)
12/10	0.99(±0.20)	1.76(±0.51)	-	0.82(±0.06)
4/11	-	-	-	0.51(±0.05)
26/11	0.48(±0.06)	0.84(±0.13)	3.65(±0.46)	-

模拟汁囊中的 pH 值和糖含量在体外对蔗糖酸的水解进行了测定。从图 4 中的变化可以看出,在 pH 值 2.6 的条件下蔗糖可被酸所水解;而在 pH 值为 3.75 或 3.75 以上时,蔗糖被酸水解的程度接近于 0。由此可知,在果实的发育后期,只有香柠檬汁囊中的酸性环境可以使蔗糖发生明显水解。

2.4 汁囊中 AI 活性与糖的构成

液泡是成熟细胞中糖(蔗糖和己糖)的主要储存部位,而可溶性 AI 存在于液泡之中。因此柑橘果实发育后期,液泡中的 AI 活性对汁囊中糖的构成具有重要影响。由图 5 可见,虽然 3 种宽皮橘汁囊中的 AI 活性都随果实的发育而下降,但在果实发育后期,宫川和本地早汁囊中的 AI 活性随果实的发育先后降至检测限之下;而椪柑的 AI 却始终保持着一定的活性。在香柠檬果实发育后期,汁囊中的 AI 活性很低,且并未随着己糖的迅速积累而上

中数据可知,根据汁囊中含酸量的变化 4 个品种可以清晰地划分为两类:(1) 汁囊中的含酸量前期较高,但随着果实的发育而持续下降;3 种宽皮橘都属于此类。结合汁囊中的含糖量计算得出,最终本地早、宫川和椪柑的糖酸比分别为 25.59、14.25 和 6.67;(2) 汁囊中的可滴定酸含量前期并不特别高,但随着果实的发育呈持续上升;香柠檬即属于此类。采收期香柠檬汁囊中的含酸量高达 3.65%,糖酸比仅为 1.54。这说明香柠檬是酸积累型果实,与糖积累较多的宽皮橘具有本质上的区别。

汁囊榨出液 pH 值的测定结果表明,到最后采收时,本地早(11 月 26 日)、香柠檬(11 月 26 日)、椪柑(11 月 26 日)和宫川(11 月 4 日)汁囊榨出液的 pH 值分别为 4.20(±0.05)、2.60(±0.05)、3.75(±0.19) 和 3.98(±0.05)。可见成熟香柠檬汁囊中的酸度远高于其它品种。

升,反而有所降低。这说明 AI 与香柠檬汁囊中糖分构成的变化关系不大。

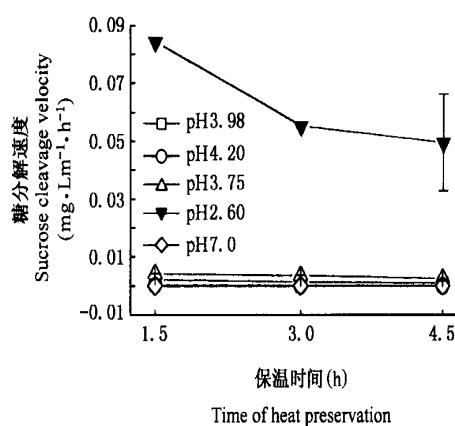


图 4 蔗糖的体外酸水解

Fig. 4 Acid hydrolysis of sucrose in *vitro*

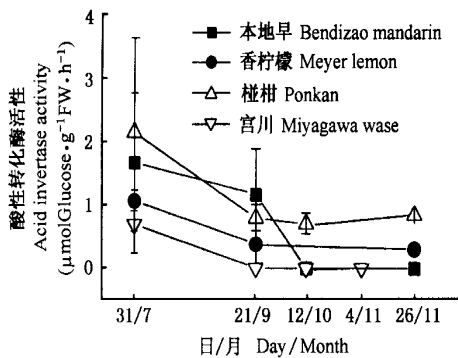


图 5 柑橘果实发育过程中汁囊中酸性转化酶的活性变化

Fig. 5 Changes of acid invertase activity in juice sacs of developing citrus fruits

3 讨论

在成熟柑橘汁囊的薄壁细胞中,液泡占总体积的 90%;而且细胞中的有机酸和糖分主要是存在于液泡之中^[12]。因此,汁囊榨出液的 pH 值与液泡中的真实值应较为接近;而且液泡内糖分的转变对果实中糖的构成具有较大影响。Echeverria 等^[5]曾通过模拟酸来檬液泡环境来研究蔗糖的酸水解情况。本试验的结果表明,在酸度较高的香柠檬中,成熟期汁囊中的 pH 值仅为 2.6,在此酸性条件下蔗糖被不断水解;同时 AI 的活性较低,接近于零。这说明香柠檬汁囊中已糖大量积累而蔗糖积累较少主要是由于酸的作用。这与 Echeverria 等^[5]对酸来檬的研究结论基本一致。在酸度较低的本地早、宫川和椪柑中,成熟期汁囊中的含酸量都不足以造成蔗糖的大量水解;因此,它们的汁囊中蔗糖所占的比例远高于香柠檬。进一步的对比发现,宫川和本地早的 AI 活性先后降至检测水平之下,但是椪柑汁囊中始终保持一定的 AI 活性。这说明椪柑汁囊中蔗糖所占比例偏低可能与 AI 的作用有关。可见液泡中的酸度和 AI 活性对柑橘汁囊中糖的构成具有重要影响。

非呼吸跃变型果实(如柑橘、草莓、葡萄和樱桃等)的成熟伴随着 ABA 含量的增加^[13]。外源 ABA 可以提高柑橘汁囊中的含糖量^[3]。有报道认为,ABA 可以激活细胞膜上的 ATP 酶活性^[14]、提高膜的通透性^[15],从而有利于同化产物的跨膜运输。本试验的结果显示,4 个品种汁囊中的 ABA 和糖含量都在果实发育后期明显上升;在糖含量较高的本地早和宫川的汁囊中 ABA 的含量显著高于糖含量较低的香柠檬和椪柑;汁囊中 ABA 和糖含量的相关性达到极显著水平(图 3)。可见柑橘果实发育后期,

汁囊中的 ABA 含量不仅对果实的成熟具有重要作用,而且对糖的积累也具有显著影响,伴随着 ABA 含量的提高汁囊中糖的积累速度明显加快。

References

- [1] Komatsu A, et al. Differential expression of three sucrose-phosphate synthase isoforms during accumulation in citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc). *Plant Sci.* 1999, 140: 169 - 178.
- [2] Zhao Z Z, et al. Roles of activities of sucrose-metabolizing enzymes in accumulation of sugars in satsuma mandarin fruit. *Acta Horticulture Sinica*, 2001, 28: 112 - 118. (in Chinese) 赵智中,等.蔗糖代谢相关酶在温州蜜柑果实糖积累中的作用.园艺学报,2001,28:112-118.
- [3] Echeverria E, et al. Characterization of proton and sugar transport at the tonoplast of sweet lime (*Citrus limmetoides*) juice cells. *Physiol. Plant*, 1997, 101: 291 - 300.
- [4] Klann E W, et al. Expression of acid invertase gene control sugar composition in tomato (*Lycopersicon*) fruit. *Plant Physiol.* 1993, 103: 863 - 870.
- [5] Echeverria E, et al. Vacuolar acid hydrolysis as a physiological mechanism for sucrose breakdown. *Plant Physiol.* 1989, 90: 530 - 533.
- [6] Talon, et al. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Plant Physiol.* 1990, 79: 400 - 406.
- [7] Weaver R J, et al. Relation of hormones to nutrient mobilization and the internal environment of the plant: the supply of mineral nutrients and photosynthate. *Encyclopedia of Plant physiology, New series Vol. 11, Hormonal Regulation of Development III, Role of Environmental Factors.* Springer Verlag Berlin: Heidelberg, 1985: 3 - 36.
- [8] Kojima K, et al. Effects of abscisic acid on sugar and organic acid contents of citrus fruit. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 1995, 64: 17 - 21.
- [9] Ackerson R C. Invertase activity and abscisic acid in relation to carbohydrate status in developing soybean reproductive structure. *Crop Sci.* 1985, 25: 615 - 618.
- [10] Zhang S L, et al. Changes of endogenous IAA, ABA, and ZT in pollinated, non-pollinated and parthenocarpic ovary (fruitlet) of citrus. *Acta Horticulture Sinica*, 1994, 21: 117 - 123. (in Chinese) 张上隆,等.柑橘授粉处理和单性结实子房(幼果)内源 IAA、ABA 和 ZT 含量的变化.园艺学报,1994,21:117-123.
- [11] Wuhan University. *Experiment of Analytical Chemistry.* Beijing: High Education Press, 1987: 246 - 249. (in Chinese) 武汉大学主编.分析化学实验.北京:高等教育出版社,1987:246-249.
- [12] Echeverria E, et al. Carbohydrate and enzyme distribution in protoplasts from valencia orange juice sacs. *Phytochem*, 1988, 27: 73 - 76.
- [13] Leshem Y Y, et al. *Processes and Control of Plant Senescence.* Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1990: 206. 莱谢姆 Y Y,等.植物衰老过程和调控.沈阳:辽宁科学技术出版社,1990:206.
- [14] Peng Y B. *Research on cell biology of developing apple fruit: concentrated on the cytological mechanism of sugar unloading within the fruit.* Beijing: China Agriculture University, 2000: 34. (in Chinese) 彭宜本.苹果果实发育的细胞生物学研究:着重于果实内糖卸载的细胞学机制.北京:中国农业大学,2000:34.
- [15] Leshem Y Y, et al. A biophysical study of abscisic acid interaction with membrane phospholipid components. *New Phytol.* 1990, 116: 487.