

京白梨果实采后 PG、糖苷酶和 LOX 活性变化及其基因表达特性

魏建梅^{1,*}, 齐秀东^{2,*}, 张海娥¹, 冉辛拓¹, 乐文全^{1,**}

(¹ 河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北昌黎 066600; ² 河北科技师范学院, 河北秦皇岛 066000)

摘 要: 以京白梨为试材, 测定贮藏期间果实多聚半乳糖醛酸酶 (PG)、糖苷酶 (β -Gal、 α -L-Af) 及脂氧合酶 (LOX) 活性及其基因表达变化及对 1-MCP 和低温的响应。结果表明, 果实软化呈慢 (3 d 内)、快 (3~9 d)、慢 (9 d 后) 的变化趋势; PG、 β -Gal、 α -L-Af 和 LOX 活性及其基因表达量均随果实软化呈不同程度增加, 且 β -Gal 和 LOX 的活性均在果实采收后 3 d 内上升快, 其基因的表达量亦迅速增加, 由此认为 β -Gal 和 LOX 可能在果实软化早期起着更为重要的作用。经 1-MCP 处理和冷藏后, β -Gal、 α -L-Af、LOX 和 PG 的活性及基因表达显著受抑, 延缓了果实软化进程, 且 1-MCP 对 β -Gal 和 LOX 的抑制作用最强烈, 尤其在处理前期。在果实冷藏过程中 PG 和 β -Gal 活性基本维持原有水平, 其基因表达在贮藏前期受到抑制, LOX 活性和基因表达均维持在极低水平, 说明 LOX 对低温较其它酶敏感。因此认为, PG、 β -Gal、 α -L-Af 和 LOX 均不同程度地参与了京白梨果实的后熟软化, 在早期软化阶段 β -Gal 和 LOX 可能起着更为重要的作用, 1-MCP 对 β -Gal 和 LOX 活性和基因表达具有更显著的调控作用, 而低温可能主要是通过抑制 LOX 活性和基因表达来抑制果实软化。

关键词: 梨; 果实; 采后; 多聚半乳糖醛酸酶; 糖苷酶; 脂氧合酶; 基因表达

中图分类号: S 661.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 01-0031-09

The Activity and Gene Expression of Polygalacturonase, Glycosidase and Lipoxigenase in Postharvest ‘Jingbaili’ Pear Fruit

WEI Jian-mei^{1,*}, QI Xiu-dong^{2,*}, ZHANG Hai-e¹, RAN Xin-tuo¹, and YUE Wen-quan^{1,**}

(¹ Changli Fruit Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China; ² Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei 066000, China)

Abstract: In this paper, the fruit of ‘Jingbaili’ pear was used to measure the changes in activity and gene expression of polygalacturonase (PG), glycosidase (β -Gal, α -L-Af) and lipoxigenase (LOX) after being respectively treated by 1-MCP and cold storage, in order to explore their roles and inter-relationship during fruit softening. The results showed that there was a softening trend with slow (within 3 d of harvest) – fast (3–9 d of harvest) – slow (after 9 d of harvest) in ‘Jingbaili’ pear fruit, and the activity and gene expression of PG, β -Gal, α -L-Af and LOX increased in varying degrees with fruit softening. β -Gal and LOX activity showed a rapid rising within 3 days after harvest, and accompanied by

收稿日期: 2011–09–01; **修回日期:** 2011–11–24

基金项目: 河北省博士专项基金项目 (2010055006); 国家现代梨产业技术体系项目 (CARS-29-23)

* 并列第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lewenquan@163.com)

the rapidly increasing in both gene expression, which indicating that both β -Gal and LOX may play a very important role at early softening stage in 'Jingbaili' pear fruit. Both 1-MCP treatment and cold storage could significantly inhibit the activity and gene expression of β -Gal, α -L-Af, LOX and PG, and thus delayed the fruit softening. What's more, 1-MCP treatment may play stronger inhibition in the activity and gene expression of β -Gal and LOX, particularly at early time of 1-MCP treatment. Cold storage could maintain the initial activity in both PG and β -Gal during storage, while mainly inhibit their gene expressions at early stage. The activity and gene expression of LOX maintained very low level under cold storage, indicating LOX was more sensitive to low temperature than other three enzymes. Therefore, it was concluded that PG, β -Gal, α -L-Af and LOX were all involved in fruit softening to varying degrees, among which both β -Gal and LOX maybe take more contribution to early softening stage. We think that 1-MCP treatment play a more important role in fruit softening by inhibiting the activity and gene expression of both β -Gal and LOX, and cold storage delay fruit softening mainly due to inhibiting the LOX activity and gene expression in 'Jingbaili' pear fruit.

Key words: *Pyrus*; polygalacturonase; fruit; postharvest; glycosidase; lipoxygenase; gene expression

京白梨 (*Pyrus ussuriensis* Maxin. 'Jingbaili') 属秋子梨系统, 原产于北京附近, 主要分布在北北京、河北昌黎一带, 其果肉细腻多汁, 酸甜适口, 香气浓郁, 品质极佳, 但其成熟期早, 采后硬度迅速下降, 后熟期仅 7 ~ 10 d, 供应期短, 极不耐贮运, 限制了其发展。虽然京白梨已有数百年的栽培历史, 但其果实贮藏生理和软化机理的相关研究报道很少。

多年来, 人们认为果胶—纤维素—半纤维素总体结构的破坏是果实软化的开端, 多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 是果实成熟软化的主要因素 (Tucker et al., 1980; Wu et al., 1993; 姜妮娜 等, 2010; 刘超超 等, 2011)。然而, 随着研究的不断深入, 转反义 PG RNA 基因番茄果实的获得, 发现 PG 不是果实软化的惟一决定因素 (Smith et al., 1988; Gioyannoni et al., 1989), 果实软化是多种酶共同参与、协同作用的结果, 单纯从一种酶的变化来阐明果实软化的现象是不够的。近年来人们发现细胞壁中性多糖的解离对多种果实软化有重要作用, 其相关的糖苷酶类, 如 β -Gal 和 α -L-Af 在果实软化中的作用引起众多学者的关注。研究发现, β -Gal 和 α -L-Af 可通过改变细胞壁一些组分的稳定性使其疏松, 破坏细胞壁的完整性, 使细胞壁松弛降解, 促进果胶的增溶和降解, 可能作用于果实软化的初始阶段 (Ross et al., 1993; Zhuang et al., 2006; Mercy et al., 2007; Gustavo & Pedro, 2008)。此外, 许多研究发现参与细胞膜膜脂过氧化作用的 LOX 活性升高优先于乙烯峰出现, 可能是导致果实前期软化的原因 (陈昆松 等, 1999; 张波 等, 2007)。因此, LOX 在果实软化中的作用也是近几年来研究的热点之一。本研究中以京白梨果实为试材, 研究其后熟软化过程中 PG、糖苷酶和 LOX 的活性变化和基因表达特性, 以及 1-MCP 和低温处理对酶活性及基因表达的影响, 探讨这几种酶在京白梨果实后熟软化中的作用及其相互关系, 以期找到影响京白梨后熟软化的关键因子, 为改善果实品质和完善贮藏保鲜技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

京白梨果实选自河北昌黎两山乡果园。2009 年 9 月 11 日采收, 采后当天选取八、九成熟, 大小均匀一致和无病、虫、伤的果实, 运回河北省农林科学院昌黎果树研究所中心实验室, 散掉田间

热后进行如下处理。(1) 对照: 不做任何处理, 贮于 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 常温下; (2) 1-MCP 处理: 将果实在含有 $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-MCP 的密闭容器中 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 常温下熏蒸 24 h, 然后通风, 果实置于常温下贮藏; (3) 低温处理: 将经预冷的果实置于 0°C 下贮藏。每个处理 50 kg 果实, 重复 3 次, 每 3 d 采样 1 次, 测定相关指标。用 Excel 和 SPSS 软件进行数据作图、统计和分析。

1.2 测定方法

1.2.1 果实硬度、呼吸速率和相对电导率测定

随机取 10 个果实, 在果实胴部对称两边去皮, 用 GY-B 型手持硬度计 ($\Phi 3.5 \text{ mm}$) 测定果肉硬度, 取平均值; 呼吸速率用气流法测定, 重复 3 次; 采用 DJS-11 型电导仪测定相对电导率。

1.2.2 多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 和糖苷酶活性的测定

酶液提取参照 Andrews 和 Li (1995) 及 Zhou 等 (1999) 的方法略加改进。取果肉 3.0 g, 液氮研磨, 加 6 mL 0.2% 亚硫酸钠溶液摇匀, 4°C 离心, 取沉淀加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸钠缓冲液 [NaCl $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1% (体积比) 巯基乙醇, 1.5% PVP (K-30)] 15 mL, pH 5.2, 置冰槽中摇匀, 4°C 离心, 上清液用于酶活测定。

PG 活性的测定参照 Gross (1982) 的方法, 底物为多聚半乳糖醛酸 (Sigma 公司), 以 D - (+) 半乳糖醛酸为标样, 以 37°C 下每克鲜样每分钟分解产生 $1 \mu\text{g}$ 游离半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位 (U)。β - 半乳糖苷酶 (β-Gal) 和 α - L - 阿拉伯呋喃糖苷酶 (α-L-Af) 活性测定按 Brummell 等 (2004) 的方法, 分别以对硝基酚半乳糖苷和对硝基酚阿拉伯糖苷 (Sigma 公司) 为底物, 37°C 反应 30 min, 于 400 nm 下分析酶水解生成的对硝基酚含量, 以对硝基酚做标准曲线, 酶活以 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示。重复 3 次。

1.2.3 脂氧合酶 (LOX) 活性的测定

参照陈昆松等 (1999) 的方法略加改进。粗酶液提取: 取 2.0 g 果肉, 液氮研磨, 加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0), 4°C 离心, 得上清液备用。在 3 mL 反应体系中含反应底物 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚油酸钠) 25 μL , $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸—磷酸缓冲液 (pH 6.0) 2.775 mL, 酶液 0.2 mL, 30°C 温育, 加酶液后 15 s 开始计时, 记录 1 min 内 OD_{234} 变化, 酶活以 $\Delta\text{OD}_{234} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示。重复 3 次。

1.2.4 酶基因表达的实时荧光定量 PCR 检测

参照 Gasic 等 (2004) 的方法, 采用改良 CTAB 法提取总 RNA。所提取的总 RNA 于 UV-1700 紫外分光光度计测定 A_{260} 、 A_{280} 、 A_{230} , 同时进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 质量和完整性。

采用 primer 5.0 软件进行 qRT-PCR 引物设计, 引物序列如表 1。

表 1 多聚半乳糖醛酸酶、糖苷酶及脂氧合酶基因的 real-time 荧光定量 PCR 扩增引物
Table 1 Primers for the real-time qRT-PCR amplification of PG, β-Gal, α-L-Af and LOX gene

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	
PG	F5'-GTAAGTGCACAGAGGACA-3'	R5'-TTCTTCACCACCAAGTTATT-3'
β-Gal	F5'-AAGAACGGAAGTCCCCAC-3'	R5'-TCCAATGACCCATACACGG-3'
α-L-Af	F5'-AGAAACGCCTATCCTGAC-3'	R5'-CACGGCATACTCGCTCAC-3'
LOX	F5'-AGCGACAAGAAAGAAGAAC-3'	R5'-TACTGACCGTAGTTGATTGC-3'
18S	F5'-CCATTGGAGGGCAAGTCT-3'	R5'-GGTTCTCACGCTACACGA-3'

使用 TaKaRa 逆转录试剂盒进行 cDNA 第一链的合成, RNA 模板量为 500 ng。采用 iQ™ 5 多重实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 进行 qRT-PCR 检测。反应总体积 20.0 μL , 其中包括 1.0 μL 模板 (cDNA), 0.5 μL 特异引物, 10.0 μL SYBR® Premix Ex Taq™ (2 ×), 8.5 μL ddH₂O 补齐。所用程序均采用三步法, 94°C 5 min, 94°C 3 ~ 5 s, $55 \sim 60^\circ\text{C}$ 10 ~ 20 s, 72°C 10 s, 40 个循环。每次 PCR

设阴性对照, 18S 的引物序列如表 1。qRT-PCR 的数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法。每个样品设置 3 次 qRT-PCR 平行管重复。

2 结果与分析

2.1 京白梨果实采后硬度、呼吸速率和电导率的变化

常温下, 京白梨果实从采收至采后 3 d, 硬度缓慢下降, 3~9 d 快速软化, 9 d 后达完熟状态, 硬度下降趋缓; 1-MCP 处理极显著地抑制了京白梨果实的软化进程, 常温下贮藏 15 d 后硬度才开始下降, 果实逐渐后熟, 与对照相比货架期延长至 27 d 以上; 而 0 °C 冷藏很好地保持了京白梨果实的原有硬度 (图 1, A)。

相应地, 常温下京白梨果实呼吸速率迅速升高, 3 d 和 9 d 时出现两个较明显的跃变峰; 1-MCP 处理显著抑制了其贮藏前期的呼吸速率, 推迟跃变峰的出现, 但没有降低其峰值; 而 0 °C 下果实呼吸速率一直处于较低水平, 无明显跃变峰出现 (图 1, B)。

图 1, C 显示, 采后随京白梨果实软化, 其相对电导率不断增加, 15 d 时即增加 2 倍多; 1-MCP 处理显著抑制了贮藏初期果实相对电导率的增加, 15 d 后其相对电导率值逐渐升高, 完全后熟时与对照相近; 冷藏下京白梨果实的相对电导率基本维持在较低水平。

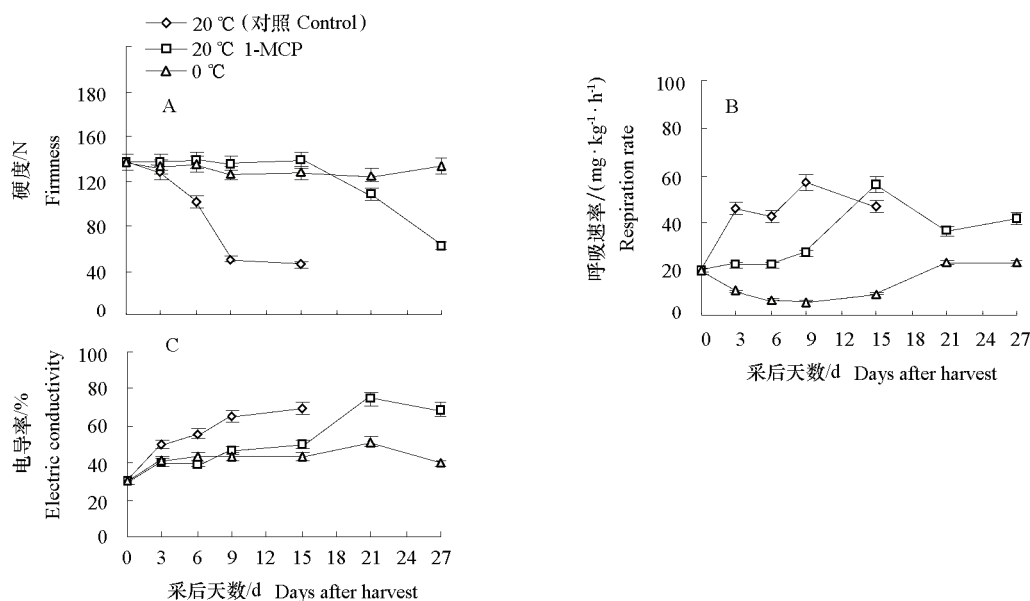


图 1 京白梨果实硬度、呼吸速率和相对电导率变化

Fig. 1 Changes of firmness, respiration rate and electric conductivity in 'Jingbaili' pear fruit

2.2 京白梨果实采后多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 活性变化及其基因表达

常温下, 京白梨果实在采收 3 d 后 PG 活性开始迅速升高, 9 d 达高峰后下降; 1-MCP 处理显著降低 PG 活性, 但未改变其变化趋势, 处理 9 d 出现活性高峰 (低于对照) 后下降; 0 °C 下贮藏, PG 活性极显著受抑, 在贮藏过程中一直未升高 (图 2, A)。果实 PG 活性与硬度变化的相关性均未达显著水平 (表 2)。

PG 基因在采后 3 d 的表达水平是采收时的 1.82 倍, 但之后增加量较少, 1-MCP 处理和冷藏显

著抑制了 *PG* 基因表达, 1-MCP 的抑制程度强于冷藏处理, 表明 *PG* 基因较其酶活性对 1-MCP 的响应更为强烈, 也说明 1-MCP 对延缓京白梨后熟软化具有显著效果 (图 2, B)。

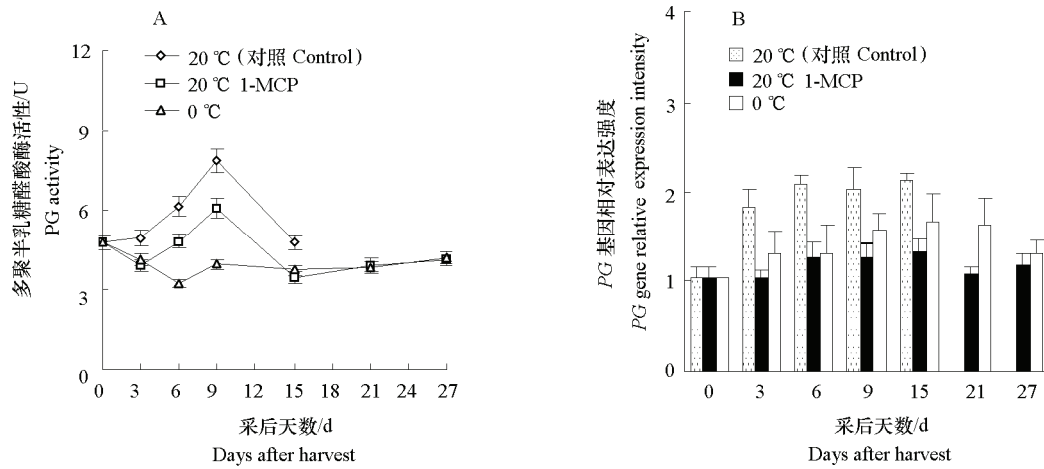


图 2 京白梨果实多聚半乳糖醛酸酶活性及其基因相对表达强度变化

Fig. 2 Changes of PG activity and the gene quantitative expression in 'Jingbaili' pear fruit

表 2 不同处理对京白梨果实硬度与 PG、糖苷酶及 LOX 活性间相关关系的影响

Table 2 Effects of treatments on the correlation between firmness and the activity of PG, glycosidase and LOX in 'Jingbaili' pear fruit

处理 Treatment	LOX	β -Gal	α -L-Af	PG
20 °C (对照 Control)	- 0.938**	- 0.819*	- 0.984**	- 0.581
20 °C 1-MCP	- 0.583	- 0.766*	- 0.729*	0.218
0 °C	- 0.584	- 0.115	- 0.548	0.224

*表示显著线性相关, **表示极显著线性相关。

* and ** indicate significant linear correlation of 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.3 京白梨果实采后 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 活性变化及其基因表达

从图 3, A 看出, 京白梨果实 β -Gal 活性在采收后一直呈明显的上升趋势, 与果实硬度的降低呈显著的负相关关系 ($r = -0.819^*$); 1-MCP 处理的果实在贮藏前期显著受抑, 处理 15 d 后才不断

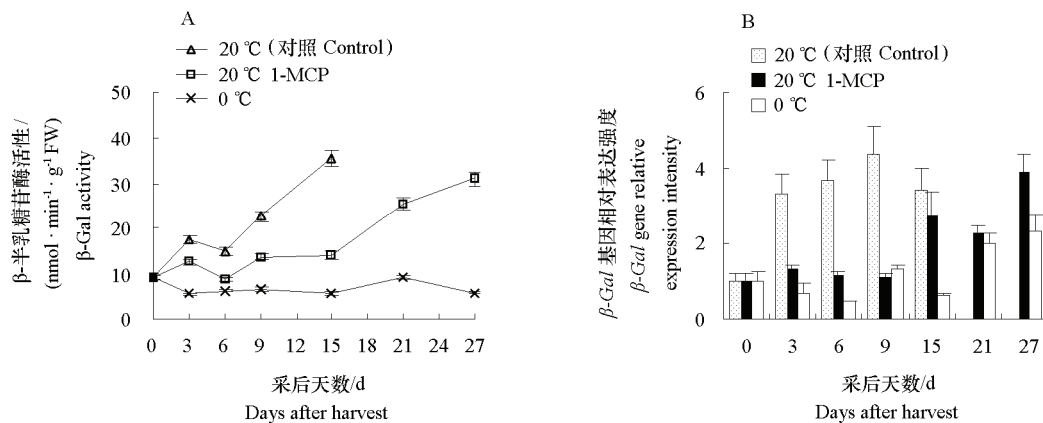


图 3 京白梨果实 β -半乳糖苷酶活性及其基因相对表达强度变化

Fig. 3 Changes of β -Gal activity and the gene quantitative expression in 'Jingbaili' pear fruit

升高,酶活性与硬度变化呈负相关 ($r = -0.766^*$);而 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温极显著抑制了 $\beta\text{-Gal}$ 活性上升,在整个贮藏过程一直稳定在较低水平,酶活性与硬度间的相关系数为 -0.115 (表 2)。

相应地,采后果实 $\beta\text{-Gal}$ 基因表达迅速提高,采后 3 d 即增加到采收时的 3.33 倍,并随后熟时间延长不断增加,9 d 达最高后下降;1-MCP 和 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温处理均极显著抑制了 $\beta\text{-Gal}$ 基因的表达,尤其在果实贮藏初期几乎完全抑制了表达水平的增加,只有在 1-MCP 处理 15 d 后, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 21 d 后,表达水平才显著增加 (图 3, B),表明 $\beta\text{-Gal}$ 在京白梨果实后熟软化中起着较为重要的作用。

2.4 京白梨果实采后 $\alpha\text{-L}$ -阿拉伯呋喃糖苷酶 ($\alpha\text{-L-Af}$) 活性变化及其基因表达

图 4, A 表明, $\alpha\text{-L-Af}$ 与 $\beta\text{-Gal}$ 活性呈相似的变化规律,在果实采收后开始升高,并随果实软化逐渐增强,酶活性与果实硬度变化呈极显著负相关关系 ($r = -0.984^{**}$);1-MCP 处理抑制了 $\alpha\text{-L-Af}$ 活性的升高,但在处理初期与对照差异较小,9 d 后差异显著,与硬度变化呈负相关 ($r = -0.729^*$); $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温贮藏则显著抑制了 $\alpha\text{-L-Af}$ 活性,贮藏 6 d 后略有升高,9 d 后基本维持稳定,其与硬度的相关性不显著 (表 2)。

从图 4, B 可知,随着果实后熟软化 $\alpha\text{-L-Af}$ 基因的表达量不断增加,但增加幅度低于 $\beta\text{-Gal}$ 基因;1-MCP 处理和 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温贮藏也极显著抑制了 $\alpha\text{-L-Af}$ 基因的表达,整个贮藏过程中基本维持在刚采收时的水平,贮藏后期有所增加。这一结果说明, $\alpha\text{-L-Af}$ 在京白梨果实后熟软化过程中也起着重要的调控作用,但在贮藏初期受 1-MCP 和低温的影响效应弱于 $\beta\text{-Gal}$ 。

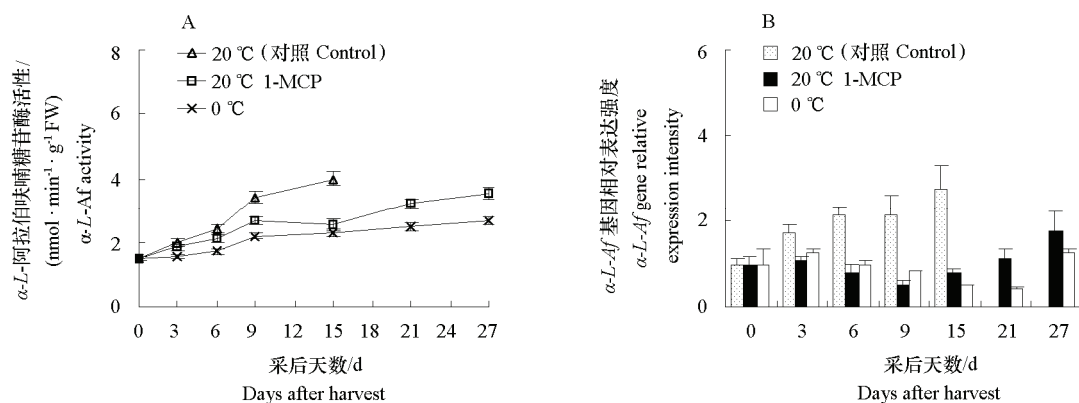


图 4 京白梨果实 $\alpha\text{-L}$ -阿拉伯呋喃糖苷酶活性及其基因相对表达强度变化
Fig. 4 Changes of $\alpha\text{-L-Af}$ activity and the gene quantitative expression in 'Jingbaili' pear fruit

2.5 京白梨果实采后脂氧合酶 (LOX) 活性变化及其基因表达

常温下京白梨果实 LOX 活性呈逐渐增加趋势,与果实硬度变化呈极显著负相关 ($r = -0.938^{**}$)。1-MCP 处理抑制了贮藏初期 LOX 活性增加,并显著降低了与硬度之间的相关度 ($r = -0.583$),6 d 后其活性开始升高,15 d 后与对照差异不显著;而 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏则强烈抑制了 LOX 活性,在整个贮藏过程中未见明显增加,与硬度间的相关不显著 ($r = -0.584$) (图 5, A; 表 2)。

图 5, B 显示,采收初期 LOX 基因表达量迅速增加,采收 3 d 即为采收时的 15 倍多,之后一直处于较高水平,与其酶活性变化趋势相一致。而 1-MCP 处理则强烈抑制了贮藏前期 LOX 基因的表达,15 d 时才开始增加,而 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温下的表达量始终维持在较低水平。

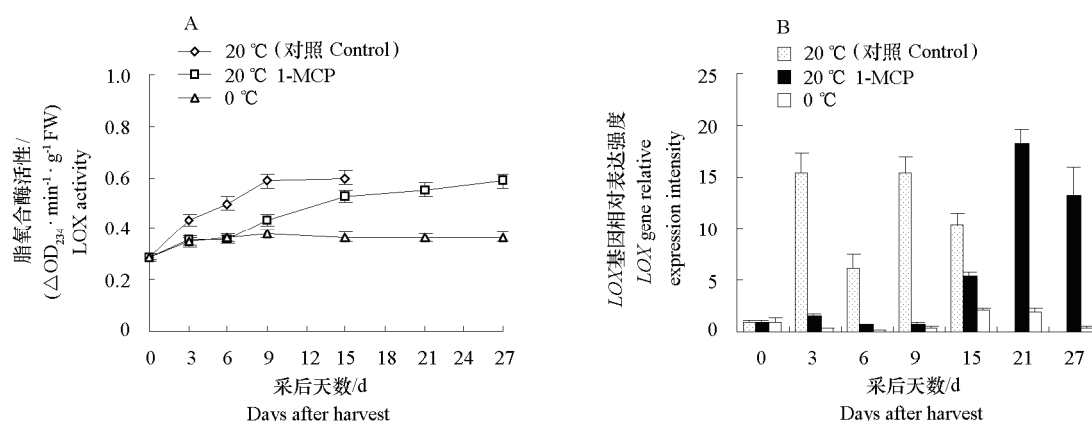


图 5 京白梨果实脂氧合酶活性及其基因相对表达强度变化

Fig. 5 Changes of LOX activity and the quantitative expression of LOX gene in 'Jingbaili' pear fruit

3 讨论

果实软化主要由细胞胞间层结构改变, 细胞壁总体结构破坏及其物质降解等引起 (Anddrews & Li, 1995; Zhou et al., 2000; Brummell et al., 2004), 果胶酶引起的果胶成分的变化是细胞间粘合力下降的主要原因 (Fischer & Bennet, 1991; Brummell, 2006)。林河通等 (2003) 认为黄花梨果实软化过程中 PG 是降解果胶的关键酶。 β -Gal 和 α -L-Af 在许多果实软化中的作用得到证实。 β -Gal 主要是通过降解果胶多聚醛酸侧链的半乳糖残基, 改变果胶分子相互作用及其聚体作用, 导致细胞壁的完整性下降 (Ross et al., 1993; Zhuang et al., 2006), β -Gal mRNA 在果实采后初期组织中的积累, 为果实后熟所需的水解酶的合成做好准备, 可能对果实早期阶段的软化启动影响很大 (Zhou et al., 2000)。Gross 和 Wallner (1979) 报道, 细胞壁半乳聚糖的下降先于或伴随着可溶性多聚醛酸的增加, 而且在果实成熟的早期 β -Gal 活性先于 PG 出现; 也有研究认为 β -Gal 可能对许多反应起引发剂的作用 (Brummell et al., 2004; Mercy et al., 2007)。 α -L-Af 能够降解细胞壁多糖支链上的阿拉伯糖苷残基, 使细胞壁阿拉伯半乳聚糖、阿拉伯甘露聚糖等中性糖不断解离, 促进果胶的增溶和降解 (Mercy et al., 2007; Gustavo & Pedro, 2008)。该酶对鳄梨 (Tateishi et al., 2001)、番茄 (Sozzi et al., 2002)、柿 (Xu et al., 2003) 和桃 (Brummell et al., 2004) 等果实成熟软化有重要作用。LOX 代谢途径产生活性氧、氧自由基和氢过氧化物等对细胞膜、蛋白质及 DNA 产生毒害, 加剧细胞膜降解, 导致细胞功能丧失, 促进组织衰老 (陈昆松和张上隆, 1998; 许文平等, 2000; 张波等, 2007)。越来越多的研究显示, LOX 活性变化与果实采后硬度下降显著相关 (陈昆松等, 1999; 吴敏等, 1999; 寇晓红等, 2002)。在跃变型果实中 LOX 参与成熟衰老进程中的乙烯生物合成, 其活性增加先于乙烯跃变, 调节 LOX 活性可以有效控制果实的软化进程 (许文平等, 2000; Zhang et al., 2003)。陈昆松和张上隆 (1998) 的研究表明, LOX 催化的膜脂过氧化是启动猕猴桃果实软化的重要因子。李富军等 (2005) 认为 LOX 在桃和苹果果实软化启动阶段起明显促进作用。前人研究均认为 β -Gal、 α -L-Af 和 LOX 在果实软化初期起重要作用, 但它们之间的作用比较研究报道很少。

本研究中发现, 随着京白梨果实后熟软化, PG、 β -Gal、 α -L-Af 和 LOX 活性均不同程度地提高, 其基因表达亦表现出不同的增加趋势。然而, 在果实慢 (采后 3 d)、快 (3~9 d)、慢 (9 d 后) 的软化进程中, PG 活性在采后 3 d 内增加很少, 3~9 d 上升加快, 之后下降, 但 β -Gal、 α -L-Af 和 LOX

的活性则始终呈上升趋势,在采收 3 d 内(果实硬度降低很少)即快速上升,尤其是 β -Gal 和 LOX 更为显著,此两种酶基因的表达量亦迅速增加,由此认为 β -Gal 和 LOX 可能在京白梨果实软化早期起着更为重要的作用。1-MCP 处理和低温贮藏极显著地延缓了京白梨果实的软化进程,相应地,PG、 β -Gal、 α -L-Af 和 LOX 活性和基因表达均受到抑制,且 1-MCP 对 β -Gal 和 LOX 活性和基因表达的抑制作用最强烈,尤其在处理前期,这也佐证了上一推论。冷藏过程中,京白梨果实 PG 和 β -Gal 基本维持原有活性水平,而在贮藏前期二者基因表达受到抑制,后期二者均有所增加;LOX 活性和基因表达均维持在极低水平,说明 LOX 对低温最为敏感。综上所述,PG、 β -Gal、 α -L-Af 和 LOX 均是京白梨果实软化的重要酶,在其果实早期软化阶段 β -Gal 和 LOX 可能起着更为重要的作用;1-MCP 对 β -Gal 和 LOX 活性和基因表达具有更显著的调控作用,而低温对京白梨果实软化的抑制可能主要是抑制了 LOX 催化的膜脂过氧化作用的结果。

References

- Andrews P K, Li S. 1995. Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimacteric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Hort Sci*, 70 (4): 561 - 567.
- Brummell D A, Cin V D, Crisosto C H. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2029 - 2039.
- Chen Kun-song, Xu Chang-jie, Lou Jian, Gavin S Ross. 1999. Lipoxxygenase in relation to the ripening and softening of *Actinidia* fruit. *Acta Phytophysiol Sin*, 25 (2): 138 - 144. (in Chinese)
- 陈昆松, 徐昌杰, 楼 健, Gavin S Ross. 1999. 脂氧合酶与猕猴桃果实熟软化的关系. *植物生理学报*, 25 (2): 138 - 144.
- Chen Kun-song, Zhang Shang-long. 1998. The role of lipoxxygenase in ripening and senescencing fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 25 (4): 338 - 344. (in Chinese)
- 陈昆松, 张上隆. 1998. 脂氧合酶与果实的成熟衰老. *园艺学报*, 25 (4): 338 - 344.
- Fischer R L, Bennet A B. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecule Biology*, 42: 675 - 703.
- Gasic K, Hernandez A, Schuyler S, Korban S S. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol Biol Rep*, 22: 437 - 437.
- Gioyannoni J J, Della Penna D, Bennett A B, Fischer R L. 1989. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell*, 1: 53 - 63.
- Gross K C. 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *Hort Sci*, 17 (6): 933 - 934.
- Gross K C, Wallner S J. 1979. Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol*, 63: 117 - 120.
- Gustavo A M, Pedro M C. 2008. Effect of heat treatments on gene expression and enzyme activities associated to cell wall degradation in strawberry fruit. *Postharvest Biol Technol*, 49 (1): 38 - 45.
- Jiang Ni-na, Rao Jing-ping, Fu Run-shan, Suo Jiang-tao. 2010. Effects of propylene and 1-methylcyclopropene on PG activities and expression of *DkPGI* gene during persimmon softening process. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (9): 1507 - 1512. (in Chinese)
- 姜妮娜, 饶景萍, 付润山, 索江涛. 2010. 柿果实采后软化中 PG 酶活性及其基因 *DkPGI* 的表达. *园艺学报*, 37 (9): 1507 - 1512.
- Kou Xiao-hong, Yan Shi-jie, Wu Cai-e, Wang Ru-fu, Liang Li-ya, Guo Chun-rong, Li Chen, Zhang Ai-lin. 2002. Effects of lipoxxygenase on ripening and softening of jujube fruit. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 18 (2): 127 - 130. (in Chinese)
- 寇晓虹, 闫师杰, 吴彩娥, 王如福, 梁丽雅, 郭春绒, 李 臣, 张爱琳. 2002. 脂氧合酶与枣果成熟软化的关系. *农业工程学报*, 18 (2): 127 - 130.
- Li Fu-jun, Zhang Xin-hua, Zhai Heng. 2005. Enzyme mechanism of fruit softening of apple cultivar Starking and peach cultivar Feicheng. *Journal of Fruit Science*, 22 (5): 450 - 453. (in Chinese)
- 李富军, 张新华, 翟 衡. 2005. 红星苹果和肥城桃果实软化的酶学基础. *果树学报*, 22 (5): 450 - 453.
- Lin He-tong, Xi Yu-fang, Chen shao-jun. 2003. Postharvest softening physiological mechanism of Huanghua pear fruit. *Scientia Agricultura Sinica*, 36 (3): 349 - 352. (in Chinese)

- 林河通, 席玛芳, 陈绍军. 2003. 黄花梨果实采后软化生理基础. 中国农业科学, 36 (3): 349 - 352.
- Liu Chao-chao, Wei Jing-li, Xu Yu-ting, Jiao Qi-qing, Sun Hai-bing, Wang Chuan-zeng, Chen Xue-sen. 2011. Preliminary study on firmness and related physiological indices of three early-ripening apple cultivar during late development of the fruit. Acta Horticulturae Sinica, 38 (1): 133 - 138. (in Chinese)
- 刘超超, 魏景利, 徐玉亭, 焦其庆, 孙海兵, 王传增, 陈学森. 2011. 苹果 3 个早熟品种果实发育后期硬度及其相关生理指标的初步研究. 园艺学报, 38 (1): 133 - 138.
- Mercy W M, Francis M M, Kyoko H. 2007. β -Gal and α -L-Af activities and gene expression in European and Chinese pear fruit during ripening. J Japan Soc Hort Sci, 76 (1): 85 - 90.
- Ross G S, Redgwell R J, MacRae E A. 1993. Kiwifruit β -galactosidase: Isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharides. Planta, 189: 499 - 506.
- Smith C J S, Watson C G, Ray J. 1988. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression on transgenic tomatoes. Nature, 334: 724 - 726.
- Sozzi G O, Frascina A A, Navarro A A. 2002. α -L-arabinofuranosidase activity during development and ripening of normal and ACC synthase antisense tomato fruit. HortScience, 37: 564 - 566.
- Tateishi A, Inoue H, Yamaki S. 2001. Fluctuation of the activities of three β -galactosidase isoforms from avocado (*Persea americana*) fruit with fruit ripening and different activities against its cell wall polysaccharides. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 70: 586 - 592.
- Tucker G A, Robertson N G, Grierson D. 1980. Changes in polygalacturonase isoenzymes during the 'ripening' of normal and mutant tomato fruit. Eur J Biochem, 112: 119 - 124.
- Wu Min, Chen Kun-song, Zhang Shang-long. 1999. Involvement of lipoxygenase in the postharvest ripening of peach fruit. Acta Horticulturae Sinica, 26 (4): 227 - 231. (in Chinese)
- 吴敏, 陈昆松, 张上隆. 1999. 桃果实采后成熟过程中脂氧合酶活性变化. 园艺学报, 26 (4): 227 - 231.
- Wu Q, Szakacs Dobozi M, Hemmat M. 1993. Endo-polygalacturonases in apple (*Malus domestica*) and its expression during fruit ripening. Plant Physiol, 102: 219 - 225.
- Xu C G, Nakatsuka A, Kano H. 2003. Changes in ethylene production and activities of cell wall degrading enzymes during rapid fruit softening of Japanese persimmon 'Saijo'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 72: 460 - 462.
- Xu Wen-ping, Chen Kun-song, Li Fang, Zhang Shang-long. 2000. Regulations of lipoxygenase, jasmonic acid and salicylic acid on ethylene biosynthesis in ripening kiwifruit. Acta Phytobiologica Sinica, 26 (6): 507 - 514. (in Chinese)
- 许文平, 陈昆松, 李方, 张上隆. 2000. 脂氧合酶、茉莉酸和水杨酸对猕猴桃果实成熟软化进程中乙烯生物合成的调控. 植物生理学报, 26 (6): 507 - 514.
- Zhang Bo, Li Xian, Chen Kun-song. 2007. Physiological and molecular features of lipoxygenase gene family members in ripening fruit. Acta Horticulturae Sinica, 34 (1): 245 - 250. (in Chinese)
- 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.
- Zhang Y, Chen K S, Chen Q J. 2003. Effects of acetylsalicylic acid and ethylene treatments on ripening and softening of postharvest kiwifruit. Acta Botanica Sinica, 45 (12): 1447 - 1452.
- Zhou H W, Sonogoi L, Ben A R. 1999. Analysis of cell wall components in juice of flavortop nectarines during normal ripening and woolliness. J Amer Soc Hort Sci, 124 (4): 424 - 429.
- Zhou H W, Sonogoi L, Khalchitski A. 2000. Cell wall enzymes and cell wall changes in 'Flavortop' nectarines: mRNA abundance, enzyme activity, and changes in pectic and neutral polymers during ripening and in woolly fruit. J Amer Soc Hort Sci, 125: 630 - 637.
- Zhuang J P, Su J, Li X P, Chen W X. 2006. Cloning and expression analysis of β -galactosidase gene related to softening of banana (*Musa* sp.) fruit. J Plant Physiol Mol Biol, 32 (4): 411 - 419.