

砧木对脐橙果实品质及糖酸代谢相关基因表达的影响

苏 媚, 伊华林

(华中农业大学园艺林学学院, 武汉, 430070)

摘 要 在同一果园不同砧木的8年生嫁接树上采样,对香橙、红桔和枳砧鲍威尔脐橙成熟果实的生理生化指标及糖酸代谢相关基因的表达进行了分析。结果表明:砧木对脐橙果实的单果质量、果皮厚度、可溶性固形物含量、维生素C含量、可溶性糖含量和有机酸含量存在较大影响,对可食率、可滴定酸含量及果皮色泽均无明显影响。香橙砧脐橙的单果质量和果皮厚度显著大于枳砧脐橙。红桔砧脐橙果肉中糖、酸的含量均显著低于香橙砧和枳砧脐橙。其分子机理为,红桔砧脐橙果肉中蔗糖转运蛋白基因 *CsSUC1* 和 *CsSUC4* 表达量低,糖酵解途径关键酶之一的丙酮酸激酶基因 *CsPKP3* 表达量高;柠檬酸合成酶 *CsCS2* 表达量低,柠檬酸降解酶谷氨酸脱羧酶基因 *CsG-DHI* 和谷氨酰胺合成酶基因 *CsGS1* 表达量高。

关键词 柑桔砧木;果实品质;可溶性糖;有机酸;基因表达

鲍威尔脐橙是华盛顿脐橙的晚熟芽变,目前在重庆三峡库区已有大面积种植^[1]。鲍威尔脐橙常用香橙、红桔或枳做砧木,均具有较好的亲和性,但不同砧木的树体和果实存在差异。前人研究表明,砧木对柑桔果实有巨大的影响,包括果实大小^[2]、果皮色泽^[3]以及内在品质^[4]等。脐橙果实内在品质主要取决于可溶性糖^[5]和有机酸^[6]含量。淳长品等^[7]研究发现,枳砧锦橙果实可溶性固形物含量较高,而桔砧和橙砧锦橙果实较低。刘翔宇等^[8]研究发现,枳砧沙糖桔果实可溶性固形物高于红柠檬砧。本研究比较了香橙砧、红桔砧和枳砧脐橙果实的品质差异,测定了果肉及果皮中可溶性糖和有机酸的含量,并通过分析糖酸相关基因的表达初步探究砧木影响果实糖酸含量的分子机制,为深入研究砧木对柑桔果实品质的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 香橙砧、红桔砧和枳砧鲍

威尔脐橙成熟果实均于2015年3月采自重庆奉节县康乐镇铁佛果园,3种砧木嫁接树均为8年生。每种砧木各选择3株树势一致的树,作为生物学重复。每株树每次随机采6个果,其中3个带回实验室进行品质分析,另外3个将果皮和果肉分离,分别切碎,液氮速冻,带回实验室保存于-80℃冰箱。

1.2 试验方法 用电子天平测量单果质量。用日本产MINOLTA CR-400色差计(CIELAB色彩系统)测定果皮色泽。用手持折光仪测定果实可溶性固形物含量。用酸碱滴定法测定果汁可滴定酸含量。用2,6-二氯酚法测定果汁维生素C含量。果皮及果肉中可溶性糖(蔗糖、葡萄糖和果糖)和有机酸(柠檬酸、苹果酸和奎宁酸)含量采用Agilent 6890N气相质谱仪进行测定。参照刘永忠^[9]的方法提取果肉中总RNA,采用TaKaRa PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit进行RNA反转录,参考吴巨勋^[10]的脐橙果实糖酸相关基因引物,以Ac-

收稿日期:2016-05-15;修回日期:2016-08-17

基金项目:国家科技支撑计划项目(2013BAD92B02);国家现代农业产业技术体系专项资金(CARS-27)资助。

作者简介:苏媚(1990—),女,硕士生。E-mail:434607980@qq.com

通信作者:伊华林,男,博士,教授,博士生导师,从事柑桔遗传育种研究。E-mail:yihualin@mail.hzau.edu.cn

DOI:10.13938/j.issn.1007-1431.20160225

tin 为内参基因。实时定量 PCR 反应采用 ABI 公司的 Power SYBR Green PCR Master Mix 在 ViiA™ 7 Real-time PCR System 上进行。反应体系 (10 μ L): 稀释的 cDNA 0.5 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, Mix 5 μ L,

灭菌双蒸水 3.5 μ L。脐橙果实糖酸代谢相关基因及内参基因 *Actin* 实时定量 PCR 的引物序列见表 1。

1.3 数据分析 用 Microsoft Excel 2007 整理数据, 用 SAS Release 8.1 分析差异显著性。

表 1 脐橙果实糖酸代谢相关基因及其实时定量 PCR 引物

基因名称	甜橙数据库 ID	正向引物序列(5'至3')	反向引物序列(5'至3')
CsH XK1	Cs4g15520	TCTTTGTCTGATTATCTTCTCTCATG	TTGGAGGGCAAAGGCATTTA
CsPKP3	Cs7g22750	GCTGTCTAGCAACTGTATATTTTTCCA	AGCTTTATCAGTTCACCAATCCTTTC
CsCS4	Cs7g01170	TAGAATTGAAAAGGGTGGGTGTA	ACACAAACTCTCCATCCACTACTAAT
CsCS2	orange1.1t01588	GCGCCAAGCGTAGAATCATC	TGAGCCTGCCTTGATTTGACT
CsACOI	Cs1g26040	TGATTCCGCAAGAACCAACTG	ACGTCGGCTGAATCTGCTAAA
CsGDH1	Cs5g26650	CCAGCGGCATGGAAGTG	CAGGACAAGATAATGACCAAAGCA
CsGSI	Cs6g17430	TTCACGAGTTTACGACAGAATTG	GGGCAGAGATTGAAACAAGACAA
CsSS	Cs6g15930	CAAAGACAGACCCGGACAGTATG	CATCGATGCCTTTGACAACCTCTA
CsSPS	Cs5g19060	TCAACATGGCAAGGGCAAT	CTCCGGCATCCGCATAGT
CsSUC1	Cs3g22560	TCTTCATGGCCGTCGGTAAAC	CGGAAGCATGTGGTACAAGTGA
CsSUC4	Cs3g16640	GCCGTCGACACCGTTTAT	GCGGAAAGACCAATTAGCAAAA
<i>Actin</i>		CATCCCTCAGCACCTTCC	CCAACCTTAGCACTTCTCC

2 结果与分析

2.1 砧木对果实品质的影响 香橙砧和红桔砧脐橙果实的单果质量和果皮厚度显著高于枳砧脐橙。各砧木脐橙之间果实的可食

率、可滴定酸含量及果皮色泽参数 *H* 值均无显著差异。枳砧和香橙砧脐橙果实可溶性固形物含量显著高于红桔砧脐橙。红桔砧脐橙果实维生素 C 含量显著高于香橙砧与枳砧脐橙(见表 2)。

表 2 重庆奉节铁佛果园 8 年生不同砧木鲍威尔脐橙成熟果实的品质

砧木	单果质量/ g	果皮厚 /cm	可食率/ %	可溶性固 形物/%	可滴定酸/ %	维生素 C/ mg · kg ⁻¹	果皮色泽 参数 <i>H</i> 值
香橙	222.50±32.94 a	0.57±0.08 a	66.77 a	11.83±0.29 a	0.83±0.06 a	0.59±0.01 b	0.92±0.02 a
红桔	201.43±15.20 a	0.53±0.04 a	67.01 a	10.67±0.76 b	0.86±0.03 a	0.69±0.01 a	0.94±0.08 a
枳	152.53±28.42 b	0.44±0.05 b	69.80 a	12.67±0.29 a	0.92±0.06 a	0.61±0.01 b	0.93±0.05 a

注:不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。图 1 和图 2 同。

2.2 砧木对果实糖酸含量的影响 各砧木脐橙果肉均是蔗糖含量高而还原糖低,果皮则是还原糖含量高而蔗糖含量低。果肉和果皮中果糖、葡萄糖的含量均是枳砧脐橙>香橙砧脐橙>红桔砧脐橙。果肉中蔗糖含量是红桔砧脐橙显著低于枳砧和香橙砧脐橙,果皮中蔗糖含量则是香橙砧脐橙显著低于另外两种砧木脐橙(见图 1)。各砧木脐橙果肉均是柠檬酸含量>苹果酸含量>奎宁酸含量,果皮中各有机酸含量关系与果肉相反。果肉中柠檬酸和苹果酸含量是红桔砧脐橙显著低于香橙砧和枳砧脐橙,果皮则与此相反;果肉奎宁酸含量在各砧木脐橙之间无显著性差异,果皮奎宁酸含量则是香橙砧脐橙显著高

于枳砧脐橙(见图 1)。果肉可溶性糖总量是枳砧和香橙砧脐橙显著高于红桔砧脐橙,果皮可溶性糖总量则是枳砧脐橙显著高于红桔砧和香橙砧脐橙。果肉有机酸总量是枳砧和香橙砧脐橙显著高于红桔砧脐橙,果皮则与此相反(见图 1)。

2.3 砧木对果肉糖酸代谢相关基因表达的影响 蔗糖合成酶基因 *CsSS* 表达量是枳砧和红桔砧脐橙显著高于香橙砧脐橙。蔗糖磷酸合成酶基因 *CsSPS* 表达量为枳砧脐橙>红桔砧脐橙>香橙砧脐橙。蔗糖转运蛋白基因 *CsSUC1* 和 *CsSUC4* 的表达量是红桔砧脐橙显著低于香橙砧和枳砧脐橙,与果肉的可溶性糖含量比较结果一致。己糖激酶基因

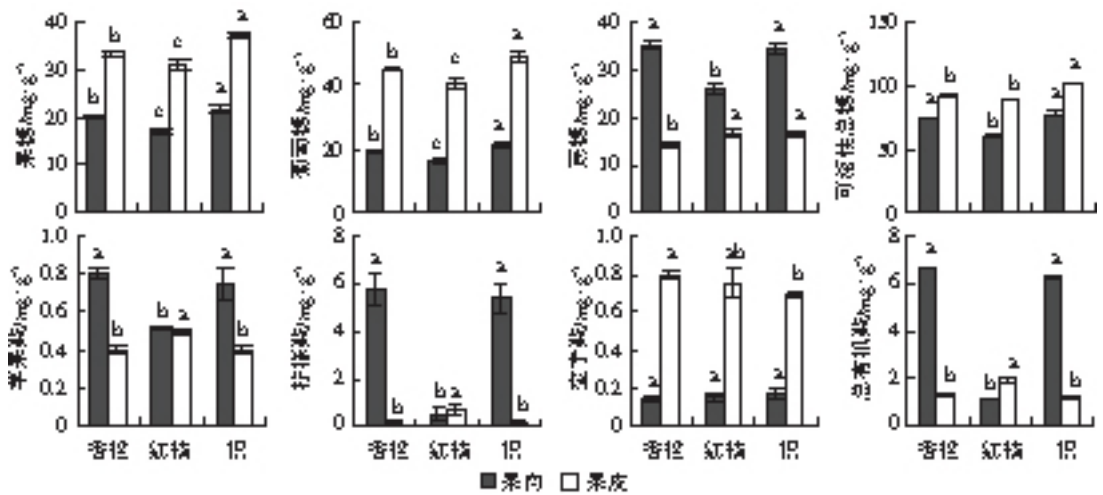


图1 重庆奉节铁佛果园8年生不同砧木鲍威尔脐橙成熟果实的糖酸含量

CsHKK1 表达量在各砧木脐橙之间无显著性差异。丙酮酸激酶基因 *CsPKP3* 表达量是红桔砧脐橙显著高于另外两种砧木脐橙 (*CsPKP3* 的表达促进蔗糖分解), 这与红桔砧脐橙果肉蔗糖及可溶性糖含量最低相对应。柠檬酸合成基因 *CsCS2* 和 *CsCS4* 的表达趋势不同, *CsCS2* 表达量是枳砧脐橙显著

高于另两种砧木脐橙, *CsCS4* 表达量在各砧木脐橙之间无显著性差异。枳砧脐橙果肉3种柠檬酸降解基因 *CsAC01*、*CsGDH1* 和 *CsGS1* 表达量均处于最低水平, 红桔砧脐橙果肉中 *CsGDH1* 和 *CsGS1* 表达量处于最高水平。这合理解释了枳砧脐橙果肉有机酸含量高而红桔砧脐橙含量低的现象(见图2)。

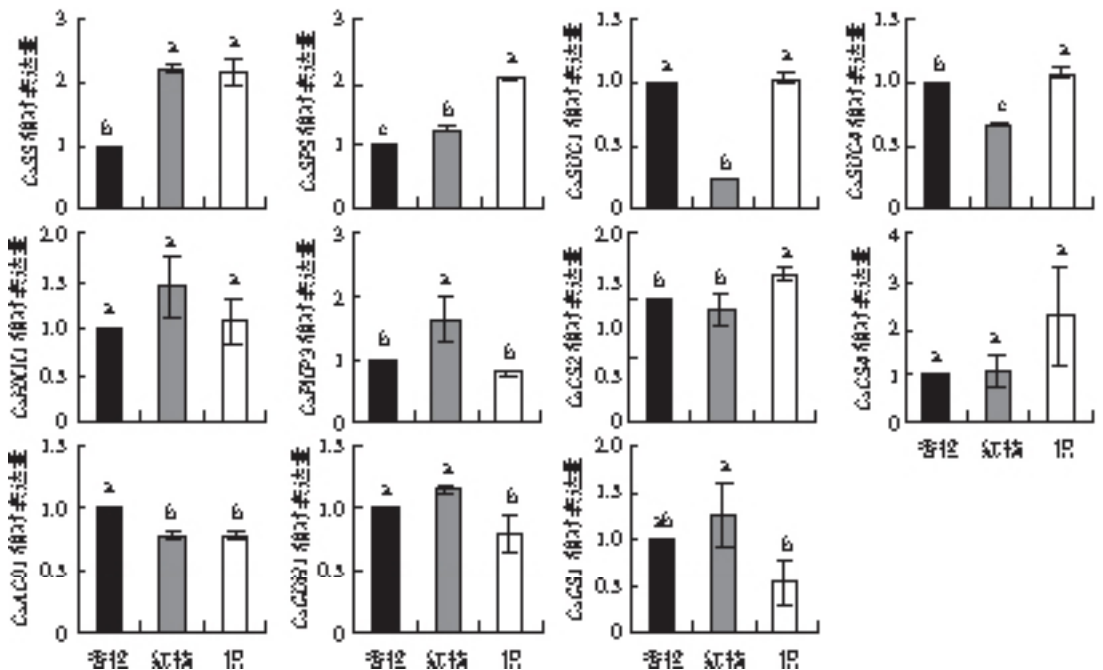


图2 重庆奉节铁佛果园8年生不同砧木鲍威尔脐橙成熟果肉糖酸代谢相关基因的表达量

3 讨论

砧木根系对土壤水分和营养元素的吸收能力不同,以及根系分泌的植物激素不同,均可能影响果实品质^[2]。同时,某些RNA可以通过植株韧皮部进行长距离运输,可能也是影响果实品质的重要因素^[4]。本研究比较了3种砧木脐橙果实的生理生化指标。结果表明,3种砧木脐橙果实的外观及内在品质都存在较大差异。枳砧脐橙果实小,果肉可溶性糖和有机酸含量高,风味浓;香橙砧脐橙果实大,果肉可溶性糖和有机酸含量与枳砧脐橙无显著性差异;红桔砧脐橙果实大小居中,果肉可溶性糖和有机酸含量显著低于前两种砧木脐橙,尤其是有机酸含量的差距较大。有研究表明,枳砧温州蜜柑果实的糖和酸含量都显著高于橙砧和红桔砧果实^[11],但产量相反^[12],本试验结果与此基本一致。

如何在转录水平解释上述结果呢?脐橙果肉中含量最多的可溶性糖是蔗糖。前人研究证明,蔗糖代谢酶在果实糖积累中起关键作用^[13]。由本试验结果可知,红桔砧脐橙果肉中蔗糖转运蛋白基因 *CsSUC1* 和 *CsSUC4* 表达量最低,糖酵解途径关键酶之一的丙酮酸激酶基因 *CsPKP3* 表达量最高^[14]。由此推测,红桔砧脐橙果肉可溶性糖含量最低可能的原因是,蔗糖转运过程较慢及糖酵解途径中消耗了更多的蔗糖。有研究发现,柑桔果实发育后期大量蔗糖转化为有机酸^[15],导致糖酵解及三羧酸循环途径不断增强^[16]。本研究结果显示,柠檬酸合成酶 *CsCS2* 在红桔砧脐橙果肉中表达量显著低于枳砧脐橙;谷氨酸脱羧酶基因 *CsGDH1* 和谷氨酰胺合成酶基因 *CsGS1* 均位于柠檬酸下游,属于重要的柠檬酸降解酶,红桔砧脐橙果肉中这两个基因的表达量显著高于枳砧脐橙,这与红桔砧脐橙果肉有机酸含量低于枳砧脐橙的结果保持一致。砧木影响柑桔果实糖酸含量是一个复杂的过程,可以通过多条代谢途径进行调控。红桔砧影响鲍威尔脐橙果实糖酸含

量最主要的途径,可能是影响其糖酵解-三羧酸途径中蔗糖的降解、柠檬酸的合成与降解。

参 考 文 献

- [1] 黄涛江,刘文华,王振兴,等.不同保果方式和气象因子对鲍威尔脐橙冬季落果的影响[J].中国南方果树,2011,40(5):5-7
- [2] LIU X, LI J, HUANG M, et al. Mechanisms for the influence of citrus rootstocks on fruit size[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(10): 2618-2627
- [3] 郑永强,邓烈,何绍兰,等.几种砧木对哈姆林甜橙植株生长、产量及果实品质的影响[J].园艺学报,2010,37(4):532-538
- [4] BENJAMIN G, TIETEL Z, PORAT R. Effects of rootstock/scion combinations on the flavor of citrus fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(47):11286-11294
- [5] 刘永忠,刘庆,熊晶晶,等.晚熟芽变脐橙在果实成熟阶段与原品种在糖酸代谢的差异[J].中国科学C辑:生命科学,2007,37(3):352-357
- [6] 付莉莉,吴巨勋,伊华林.脐橙晚熟突变体及其野生型果实柠檬酸代谢基因表达分析[J].园艺学报,2016,43(1):38-46
- [7] 淳长品,彭良志,雷霆,等.不同柑桔砧木对锦橙果实品质的影响[J].园艺学报,2010,37(6):991-996
- [8] 刘翔宇,李娟,黄敏,等.柑桔砧木对沙糖桔果实糖积累的影响[J].中国农业科学,2015,48(11):2217-2228
- [9] 刘永忠.脐橙(*Citrus sinensis* Osbeck)晚熟芽变性状形成机理研究[D].武汉:华中农业大学,2006
- [10] 吴巨勋.基于组学的奉节晚橙晚熟变异分子机理研究[D].武汉:华中农业大学,2015
- [11] CANTUARIAS-AVILÉS T, MOURÃO FILHO F D A A, STUCHI E S, et al. Tree performance and fruit yield and quality of 'Okitsu' Satsuma mandarin grafted on 12 rootstocks [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 123(3):318-322
- [12] HUSSAIN S, CURK F, ANJUM M A, et al. Performance evaluation of common clementine on various citrus rootstocks [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 150(2):278-282
- [13] YU X, WANG X, ZHANG W, et al. Antisense suppression of an acid invertase gene (MA11) in muskmelon alters plant growth and fruit development [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(11): 2969-2977
- [14] SUN XIAOHUA, ZHU ANDAN, LIU SHUZHEN, et al. Integration of metabolomics and subcellular organelle expression microarray to increase understanding the organic acid changes in post-harvest citrus fruit [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(11):1038-1053
- [15] CHEN M, XIE X, LIN Q, et al. Differential expression of organic acid degradation-related genes during fruit development of navel oranges (*Citrus sinensis*) in two habitats [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(5):1131-1140
- [16] LIN Q, WANG C, DONG W, et al. Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation [J]. Gene, 2015, 554(1):64-74

(责任编辑:李治飞)