

# 嫁接对网纹甜瓜果实中四种特征酯类香气物质含量及其合成相关酶活性的影响

许传强<sup>1</sup>, 韩玉雪<sup>1</sup>, 杨琳<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110866; 2. 黑龙江农业经济技术信息中心, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:**以网纹甜瓜“新汉城翠蜜”为接穗,“圣砧一号”白籽南瓜为砧木,研究嫁接对网纹甜瓜果实中酯类香气物质含量及其合成相关酶活性的影响。结果表明:嫁接降低了网纹甜瓜果实中乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸苯甲酯、乙酸-2-甲基丁酯的含量,在果实完熟时分别较自根网纹甜瓜降低了 26.36%、18.52%、13.76%和 14.7%。嫁接降低了酯类香气物质合成相关酶—醇脱氢酶(ADH)和醇酰基转移酶(AAT)酶活性,对 AAT 酶活性影响尤为明显。

**关键词:**嫁接;网纹甜瓜;酯类香气物质

**中图分类号:**S 642.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0041-04

甜瓜嫁接栽培已在生产中广泛应用,但甜瓜嫁接栽培在获得高产、抗病的同时,往往出现嫁接甜瓜品质下降等问题<sup>[1]</sup>。已有研究表明,薄皮甜瓜在嫁接栽培后,果实中香气物质总量及特征性酯类物质的相对含量都降低了<sup>[2]</sup>。网纹甜瓜果实的香气物质含量是其风味品质的重要指标之一。并且,乙酸酯类香气物质占其主要成分<sup>[3-6]</sup>。在酯类香气物质合成途径中,醇脱氢酶(ADH)和醇酰基转移酶(AAT)是其合成的关键酶,醛类物质在醇脱氢酶的催化下形成醇类物质,再经醇酰基转移酶催化生成酯类香气物质<sup>[7-8]</sup>。该试验采用顶空微萃取技术和 GC-MS 分析技术嫁接对不同时期网纹甜瓜果实中 4 种主要乙酸酯类香气物质含量的影响,以及嫁接对酯类香气物质代谢关键酶活性的影响,旨在探明嫁接影响网纹甜瓜果实中酯类香气物质合成的生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以网纹甜瓜品种“新汉城翠蜜”(Cucumis melon L.)为接穗,以白籽南瓜“圣砧一号”为砧木进行嫁接处理(简称为 G),以接穗自根苗为对照(简称为 CK)。基质育苗,基质组成为草炭:蛭石=2:1。将相同苗龄的嫁接苗和自根苗定植于沈阳农业大学园艺学院蔬菜基

地节能型日光温室,高畦栽培,畦面宽 0.9 m,畦底宽 1.4 m,畦高 20 cm,双行定植,株距 40 cm。随机区组设计,3 次重复。采用黑色地膜覆盖,滴灌。单干整枝,吊蔓栽培,每株 12~15 节之间留结瓜子蔓,采用人工授粉,单株留瓜 1 个,其它栽培管理与生产相同。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 测定项目及方法** 自开花授粉后 50、55、60 d 及完熟时分别取其网纹甜瓜果实中果肉,液氮速冻,超低温冰箱-80℃保存,以备测定。3 次重复。

**1.2.2 酯类物质收集与测定** 取嫁接和自根网纹甜瓜开花授粉后 50、55、60 d 及完熟时果实各 3 个(节位相同)。用清水和无离子水冲洗干净后,按四分法各取 1/4 果肉,取果肉 200 g,切成 2~3 cm 小块,用榨汁机打成匀浆,4 层纱布过滤去除泡沫,取 10 mL 瓜汁加入到 20 mL 顶空瓶中,添加 2 g 分析纯 NaCl 和 50  $\mu$ L 内标 1-辛醇(59.5 mg/kg),加盖,振荡使其溶解。将老化好的固相微萃取头插入样品瓶的顶空部分,推出纤维头,与瓜汁液面保持 0.5 cm 距离,40℃萃取 30 min,用于酯类物质的测定。采用 VARIAN CP-3800 气相色谱仪,参数条件及分析条件:CP sil 8CB 的柱子,不分流,36℃保持 2 min,12℃/min 升到 60℃,然后以 6℃/min 升到 140℃,再以 10℃/min 升到 240℃,保持 8 min,进样口 250℃,检测器 300℃,柱流速 2 mL/min。用甲醇配制 4 种酯类标样的混合液,分别稀释 1、2、4、8、16 和 32 倍。以 1-辛醇为内标,内标质量浓度为 59.5 mg/L。将不同浓度外标和内标各 2  $\mu$ L 加入到 0.5 mL 脱香果汁中,果汁脱香处理采用吴继红等<sup>[9]</sup>的方法。在相同的 SPME 和色谱条件下进行萃取分析。由此方法得到 4 条标准曲线,根据标准曲线进行定量分析。标准样品:乙酸乙酯、乙酸-2-甲基

第一作者简介:许传强(1979-),男,博士,讲师,现从事设施甜瓜栽培生理与品质调控研究工作。E-mail: xuchuanqiang@hotmail.com。

基金项目:沈阳农业大学青年基金资助项目(20070205)。

收稿日期:2011-05-24

1-丁酯、乙酸己酯、乙酸苯甲酯:购自 Sigma 公司和 Dikma 公司;内标 1-辛醇:色谱纯。

1.2.3 醇脱氢酶(ADH)活性及醇酰基转移酶(AAT)活性的测定 醇脱氢酶(ADH)活性参照 Longhurst 等<sup>[10]</sup>的方法,稍加改动。粗酶液的提取:取 3 g 样品液氮充分研磨呈粉末状,加入 6 mL 经 4℃ 预冷的提取液,组成如下:100 mM MES-Tris 缓冲液(pH 6.5), 2 mM DTT, 1% PVPP。充分混匀、浸提,15 000 r/min (4℃)离心 30 min,上清液用于 ADH 活性测定。酶活性测定:3 mL 反应体系由 2.4 mL 100 mM MES-Tris 缓冲液(pH 6.5)、0.15 mL 1.6 mM NADH、0.15 mL 80 mM 乙醛和 0.3 mL 粗酶液组成,反应温度 30℃,于 340 nm 下测定 OD 值。加酶液后 15 s 开始计时,记录 1 min 内 OD 值变化,酶活性以 U/mg(protein)表示。重复 3 次。醇酰基转移酶(AAT)活性参照 Fellman 等<sup>[11]</sup>和 Pérez 等<sup>[12]</sup>的方法,稍加改进。粗酶液的提取:取 3 g 样品,充分研磨,加 1 mg PVPP 和 6 mL 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)。16 000 r/min(4℃)离心 30 min,上清液用于酶活性测定。酶活性测定:反应体系由 0.5 M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM 乙酰辅酶 A, 200 mM 丁醇和 0.6 mL 酶液组成。在 35℃ 下反应 15 min 后,加入 150 μL 20 mM DTNB,室温下放置 10 min,在 412 nm 下测定 OD 值。酶活性以 U/mg(protein)表示。3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 嫁接对网纹甜瓜果实中 4 种特征酯类香气物质含量的影响

由图 1、2、3、4 可知,嫁接降低了网纹甜瓜果实中乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸苯甲酯、乙酸-2-甲基丁酯的含量。随着网纹甜瓜果实渐入完熟,嫁接与自根网纹甜瓜果实中乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸苯甲酯、乙酸-2-

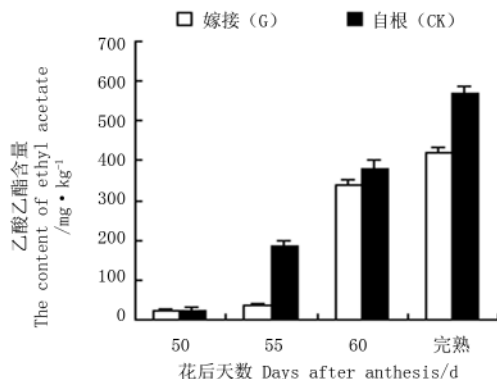


图 1 嫁接对网纹甜瓜果实中乙酸乙酯含量的影响

Fig. 1 Effect of grafting on ethyl acetate contents in the middle part of muskmelon mesocarp

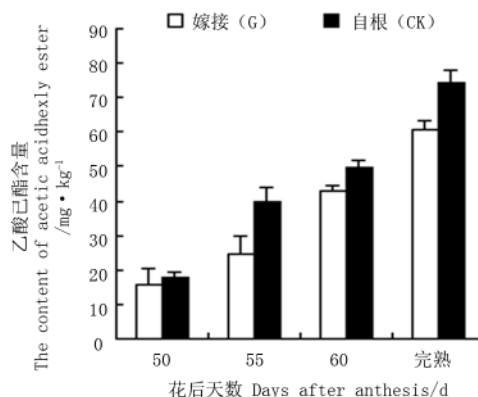


图 2 嫁接对网纹甜瓜果实中乙酸己酯含量的影响

Fig. 2 Effect of grafting on acetic acid hexyl ester contents in the middle part of muskmelon mesocarp

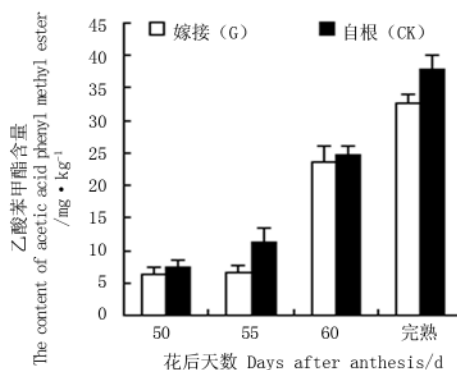


图 3 嫁接对网纹甜瓜果实中乙酸苯甲酯含量的影响

Fig. 3 Effect of grafting on acetic acid phenyl methyl ester contents in the middle part of muskmelon mesocarp

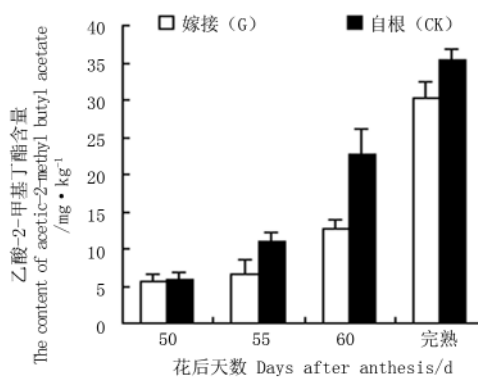


图 4 嫁接对网纹甜瓜果实中乙酸-2-甲基丁酯含量的影响

Fig. 4 Effect of grafting on acetic-2-methyl butyl acetate contents in the middle part of muskmelon mesocarp

甲基丁酯的含量逐渐升高,均在果实完熟时含量达到最大值。花后 50 d,嫁接与自根网纹甜瓜果实中乙酸乙酯、乙酸己酯均较低,且相差不大;花后 55 d,自根网纹甜瓜果实中乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸苯甲酯、乙酸-

2-甲基丁酯的含量迅速上升,而嫁接网纹甜瓜则表现在花后 60 d,较自根推迟了 5 d 左右。在花后 50~55 d,嫁接与自根网纹甜瓜果实中乙酸苯甲酯、乙酸-2-甲基丁酯的含量较低,二者差别不大,而在花后 60 d,二者含量迅速上升。在网纹甜瓜果实完熟时,嫁接网纹甜瓜果实中乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸苯甲酯、乙酸-2-甲基丁酯的含量分别较自根降低了 26.36%、18.52%、13.76%和 14.7%。可见,嫁接对网纹甜瓜果实中乙酸乙酯和乙酸己酯含量的影响较大,其中对乙酸乙酯含量影响最大。

## 2.2 嫁接对网纹甜瓜果实酯类香气物质合成相关酶活性的影响

### 2.2.1 嫁接对网纹甜瓜果实中醇脱氢酶活性的影响

醇脱氢酶(ADH)是甜瓜果实酯类香气物质合成的中间酶,为下游反应提供前体物质。从图 5 可以看出,嫁接降低了网纹甜瓜果实中 ADH 酶活性。随着果实渐入成熟,嫁接与自根网纹甜瓜果实中 ADH 酶活性均表现为逐渐降低。

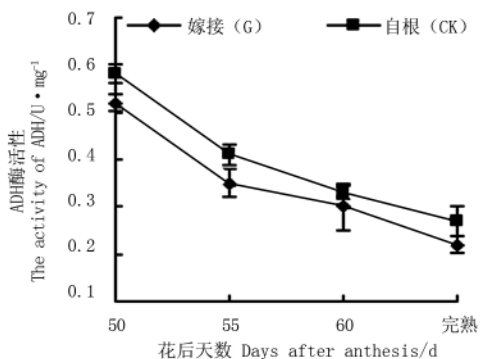


图 5 嫁接对网纹甜瓜果实中 ADH 酶活性的影响

Fig. 5 Effect of grafting on the activity of ADH in the middle part of muskmelon mesocarp

2.2.2 嫁接对网纹甜瓜果实中醇酰基转移酶活性的影响 醇酰基转移酶(AAT)是甜瓜果实酯类香气物质合成的关键酶。从图 6 可知,嫁接与自根网纹甜瓜果实中 AAT 酶活性变化趋势基本一致。花后 50~55 d,嫁接与自根网纹甜瓜果实中 AAT 酶活性变化较小;花后 55~60 d,二者 AAT 酶活性迅速增大;花后 60 d 至果实完熟期,二者 AAT 酶活性变化平缓。但嫁接明显降低了网纹甜瓜果实中 AAT 酶活性。

## 3 讨论

甜瓜果实成熟过程中,挥发性香气物质的组成和含量受其品种、栽培方式等因素的影响<sup>[2,13]</sup>。该试验结果表明,开花授粉后 50 d 到完熟期,嫁接与自根网纹甜瓜果实中 4 种特征酯类香气物质-乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸苯甲酯和乙酸-2-甲基丁酯的含量变化均表

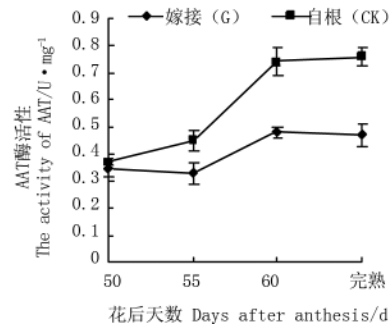


图 6 嫁接对网纹甜瓜果实中 AAT 酶活性的影响

Fig. 6 Effect of grafting on the activity of AAT in the middle part of muskmelon mesocarp

现为上升趋势,在完熟时期嫁接网纹甜瓜比自根网纹甜瓜果实中 4 种特征酯类香气物质分别降低了 26%、18.5%、15%、15%。可见,嫁接对网纹甜瓜果实中乙酸乙酯含量的影响尤为明显。

醇脱氢酶(ADH)和醇酰基转移酶(AAT)是酯类物质香气合成的相关酶,在酯类物质合成中扮演了重要的角色。醛类物质在醇脱氢酶的催化下形成醇类物质,再经醇酰基转移酶催化生成酯类香气物质。已有研究表明,随着甜瓜果实渐入成熟,果实中 ADH 活性呈下降趋势,AAT 活性呈上升趋势,与其相对应的果实中酯类香气物质含量也逐渐增加<sup>[14-15]</sup>。该试验研究表明,嫁接与自根网纹甜瓜果实中 ADH 和 AAT 酶活性变化趋势基本一致。随着果实渐入成熟,ADH 酶活性表现为下降的趋势,而 AAT 酶活性则逐渐上升。并且,AAT 酶活性的上升与甜瓜果实中 4 种酯类香气物质含量的增加具有同步性。但嫁接降低了网纹甜瓜果实中的 ADH 和 AAT 酶活性,这可能是嫁接降低了网纹甜瓜果实中特征酯类香气物质含量的关键原因之一。但也有报道认为,果实香气物质合成过程中,底物比 AAT 酶活性更重要<sup>[16]</sup>。因此,嫁接降低了网纹甜瓜果实中酯类香气物质含量,有可能是嫁接降低了网纹甜瓜果实中酯类香气物质合成底物所致,这还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 许传强,李天来,齐红岩,等. 嫁接对网纹甜瓜生长发育、产量及品质的影响[J]. 中国蔬菜,2005(6):12-14.
- [2] 齐红岩,魏敏,刘圆,等. 嫁接对薄皮甜瓜果实香气物质影响的初步研究[J]. 中国蔬菜,2008(2):21-24.
- [3] 张上隆,陈昆松. 果实品质形成与调控的分子生理[M]. 北京:中国农业出版社,2007:184-191.
- [4] Lucchetta L, manriquez D, El-Sharkawy I. Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing ester formation, regulatory, role of CoA-SH activity, and sequencer elements conferring substrate preference [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2007,55(13):5213-5220.

- [5] 张东晓. 日本关于厚皮甜瓜若干品种香气成分的研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(2): 45-46.
- [6] 刘圆, 齐红岩, 王博, 等. 不同品种甜瓜果实成熟过程中香气物质动态分析[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 49-54.
- [7] Manriquez D, El-Sharkawy I, Flores F B, El-Yahyaoui F, Regad F, Bouzayen M, Latche A, Pech JC. Tow highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics[J]. Plant Mol Biol, 2006, 61: 675-685.
- [8] Zhu Y M, Rudell R D, Mattheis P J. Characterization of cultivar differences in alcohol acyltransferase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression and volatile ester emission during apple fruit maturation and ripening[J]. Postharv Biol Technol, 2008, 49: 330-339.
- [9] 吴继红, 张美莉, 陈芳, 等. 固相微萃取 GC-MS 法测定苹果不同品种中主要芳香成分的研究[J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 101-104.
- [10] Longhurst T J, Tung J F, Brady C J. Developmental regulation of the expression of alcohol Dehydrogenase in ripening tomato fruit[J]. Food Biochem, 1990, 14: 421-423.
- [11] Fellman J K, Mattinson D S, Bostick B C, et al. Ester biosynthesis in 'Rome' apples subjected to low-oxygen atmospheres[J]. Postharvest Biol Tech, 1993(3): 201-214.
- [12] Pérez A G, Olias J M, Luaces P, et al. Biosynthesis of strawberry aroma compounds through amino acid metabolism[J]. Agric Food Chem, 2002, 4037-4042.
- [13] Aubert C, Bourger N. Investigation of volatiles in charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). characterization of aroma constituents in some cultivars[J]. Agric Food Chem, 2004, 52: 4522-4528.
- [14] Shalit M, Katzir N, Tadmor Y, et al. Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits[J]. Agric Food Chem, 2001, 49(2): 794-799.
- [15] 齐红岩, 关小川, 李岩, 等. 嫁接对薄皮甜瓜果皮和果肉中主要酯类、游离氨基酸及酯类合成相关酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(9): 1895-1903.
- [16] Pérez A G, Sanz C, Olias R, et al. Partial purification and some properties of alcohol Acyltransferase from strawberry fruits[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1462-1466.

## Effects of Grafting on Four Characteristic Ester Aromas Contents and Related Enzyme Activities in Muskmelon Fruit

XU Chuan-qiang<sup>1</sup>, HAN Yu-xue<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Heilongjiang Agricultural Economy Information Cener, Harbin, Heilongjiang 150001)

**Abstract:** In this experiment, using "New Seoul Chui honey" muskmelon as the scion, 'Sheng Zhen NO. 1' pumpkin as rootstock, effects of grafting on aroma esters contents and related enzyme activities in muskmelon fruit were studied. The results showed that, grafting reduced the contents of ethyl acetate, acetic acid hexyl ester, acetic acid phenyl methyl ester, acetic-2-methyl butyl acetate in muskmelon fruit, respectively 26.36%, 18.52%, 13.76% and 14.7% at mature period. Grafting decreased the related enzyme activities of characteristic aroma esters synthesis grafted enzymes, as alcohol dehydrogenase (ADH) and alcohol acyltransferase (AAT) activities, and on the AAT enzyme activity was particularly evident.

**Key words:** graft; muskmelon; ester aroma