

DOI:10.11937/bfyy.201509005

疏粒处理对“赤霞珠”葡萄果实含糖量及相关代谢酶活性的影响

孙庆扬¹, 韩 宁¹, 孙玉霞², 赵 悦¹, 韩爱芹¹, 赵新节¹

(1. 齐鲁工业大学 山东省微生物工程重点实验室, 山东 济南 250353; 2. 山东省农业科学院 农产品研究所, 山东 济南 250100)

摘 要:以酿酒葡萄品种“赤霞珠”为试材,分析了不同疏粒量处理对始熟期后葡萄叶片内容物、果实大小、果实糖酸含量及果实酸性转化酶活性的影响。结果表明:从始熟期开始随着果实成熟,对照和处理的果实纵径及糖含量均逐渐增加,而果实酸含量及叶片中可溶性糖含量均逐渐降低;与此同时,可溶性酸性转化酶活性都呈先降低后升高趋势而细胞壁酸性转化酶活性却持续升高。另一方面,在相同果实成熟期随疏粒量的增加,果实糖含量明显上升,酸含量明显下降,而可溶性酸性转化酶及细胞壁酸性转化酶的活性均升高。另外,疏粒处理对各时期果实纵径、叶片叶绿素影响不大,但随疏粒量的增加,各时期叶片可溶性糖含量却逐渐降低。对果实酸性转化酶活性、叶片可溶性糖及果实含糖量进行相关性分析发现,细胞壁酸性转化酶活性与叶片可溶性糖含量呈显著负相关而与果实含糖量呈显著正相关,而且随着果实疏粒量的增加,相关性有升高趋势。总之,葡萄果实成熟期疏粒处理对葡萄果实中的酸性转化酶产生一定影响,尤其是细胞壁酸性转化酶,最终可能改变了葡萄树体的库源关系,增加了果实库强,使更多的碳水化合物分配到果实中。

关键词:“赤霞珠”葡萄;疏粒;酸性转化酶;叶片可溶性糖;果实含糖量

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)09-0018-05

糖是果实品质重要的指示因子。葡萄叶片光合作用合成的碳水化合物以蔗糖的形式经过韧皮部运输到

果实,并在果实中水解成六碳糖或衍生物参与各种代谢和生物合成。其中酸性转化酶活性与果实含糖量密切相关,可以通过调控蔗糖在果实韧皮部卸载来影响果实含糖量。Devainh 等^[1]研究发现,提高酸性转化酶的活性是提高麝香葡萄含糖量的一种方式。根据可溶性和细胞分布,酸性转化酶可分为胞质可溶性酸性转化酶及细胞壁不溶性酸性转化酶。而且张晓燕^[2]研究发现,葡萄果实可溶性酸性转化酶在糖韧皮部共质体卸载中起主要作用,而细胞壁不溶性酸性转化酶在质外体卸载中起主要作用。葡萄始熟期则是韧皮部卸载路径从共质

第一作者简介:孙庆扬(1988-),女,硕士研究生,研究方向为葡萄与葡萄酒。E-mail:1009058695@qq.com.

责任作者:赵新节(1962-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为葡萄与葡萄酒。E-mail:zhaoxinjie1177@163.com.

基金项目:山东省科技发展计划资助项目(2012GGB01059);山东省自然科学基金资助项目(ZR2013CQ022);山东省现代农业产业技术体系专项基金资助项目。

收稿日期:2015-01-16

Abstract: Taking loofah variety ‘Nongfu loofah 601’ as materials, the seedlings of which were put under controlled lighting environments, with the full lighting percentage of 100%, 70%, 50%, 30%, respectively. The results showed that illumination intensity obviously impacted the growth of seedlings. With the enhancement of weak light stress and the extension of time, plant height, stem diameter, plant weight, leaf area, root shoot ratio were decreased in different degree, and compared with the control group, the difference was significant; in the weak light environment, loofah of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid and soluble sugar content showed a downward trend; compared with the control, the weak light stress significantly increased soluble protein content, proline content, and increased the permeability of cell membrane.

Keywords: weak light stress; loofah seedling; growth; physiological and biochemistry characteristics

体卸载向质外体卸载的转折期,同时也是葡萄从成长到成熟的转折期。

酿酒葡萄的品质对葡萄酒质量起着决定作用。而目前栽培常见的果实高负荷会引发葡萄树体早衰,严重影响果实的糖、酸及花色苷等代谢物含量造成果实品质下降^[3]。因此,葡萄限产方式和最优限产量成为近年来研究的重要内容。Kaps 等^[4]研究表明,酿酒葡萄‘Seyval Blanc’(“白谢瓦尔”)疏粒(即降低果穗松散度)比疏穗限产的果实可溶性糖含量更高。课题组前期研究也发现,在果实负荷相似的条件疏粒处理比疏穗处理的果实含糖量、花色苷含量及香气成分增加明显^[5],推测疏粒不仅可以限制果实负荷,还可以调节果际微环境,更利于果实库强增加,改善果树库源关系,但并不清楚是否与酸性转化酶活性调节有关。另外,合理的疏粒量也鲜有报道。

该试验以“赤霞珠”葡萄为试材,研究了不同疏粒量对不同成熟期葡萄果实酸性转化酶活性的影响,揭示酿酒葡萄叶片可溶性糖含量和果实含糖量与果实酸性转化酶的关系,以期能够为今后通过疏果粒限产提高果实品质的深入研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄品种为欧亚种酿酒葡萄“赤霞珠”(Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon),于 2005 年定植,采用单干单臂整形,南北行向,株行距 0.8 m×2.0 m,采用规范化田间管理。

1.2 试验方法

试验在山东蓬莱中粮长城葡萄酒(烟台)有限公司新港基地进行,随机选取长相一致的试验新梢(每梢均有 2 个果穗),于葡萄花后 70 d(2013 年 8 月 17 日)对其上葡萄果穗进行负载量调控。以保留所有果粒作为对照(CK);设 2 个处理:疏粒四分之一(T1/4),手工均匀疏除每穗果穗四分之一的果粒;疏粒一半(T1/2),手工均匀疏除每穗果穗一半的果粒。每种处理选取的新梢量均为 50 梢。

1.3 项目测定

1.3.1 不同疏粒处理对葡萄叶片(源)生长状况测定
测定时期均为花后 90 d、110 d 及 130 d 3 个时期。葡萄叶片面积:分别选取处理组和对照组新梢顶端的第 2 片新发端叶片,测定叶片主脉长度。叶片面积测定主脉长度,并按照回归方程: $Y=0.6933X^2+5.5069X-15.1966$ ($R^2=0.9419$)(X 为叶片主脉长度)计算^[6]。葡萄叶片叶绿素含量:分别选取处理组和对照组叶片,擦净表面污物,去除中脉剪碎;称取剪碎的样品 2 g,以 95%乙醇为

提取液,研磨、静置 3~5 min、过滤。提取液在波长 665、645 nm 下测定吸光度,以 95%乙醇为空白对照;按照试验原理中提供的经验公式,计算总叶绿素的含量。总叶绿素= $(20.0 \times A_{645} + 8.02 \times A_{665}) \times v / (1\ 000 \times w)$ 。葡萄叶片可溶性糖含量:分别选取处理组和对照组叶片,称取 0.5 g 叶片,置于研钵中加 80%乙醇研磨成匀浆,80℃水浴中不断搅拌 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,其残渣重复提取 1 次,合并上清液。活性炭吸附,过滤后取滤液稀释后测定。吸取提取液加蒽酮试剂 5 mL 混合,于沸水浴中沸腾 10 min,取出冷却,然后于分光光度计上进行测定,波长为 625 nm,测得吸光度,从标准曲线上查得滤液中的糖含量。

1.3.2 不同疏粒处理对葡萄果实(库)生长状况测定

葡萄果实纵横径的测量:不同疏粒处理选取葡萄各 20 粒(随机选取),应用游标卡尺测量葡萄果实的纵横径,并用电子分析天平测定其重量,计算果粒的平均粒重。葡萄还原糖量的测定:采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法),取 0.5 mL 合适稀释倍数的澄清葡萄汁于试管中,并加入 0.5 mL 配制好的 DNS 试剂,混匀,在沸水浴中煮沸 5 min,然后冷水冷却至室温,最后再加入 8 mL 蒸馏水,摇匀,同时以蒸馏水代替澄清葡萄汁做空白对照试验,于 540 nm 波长下测定吸光值,根据标准曲线计算还原糖含量。葡萄含酸量(滴定酸)的测定:采用 GBT15038 葡萄酒、果酒通用分析方法-指示剂法测定滴定酸。不同疏粒处理对葡萄果实酸性转化酶活性测定:首先进行样品预处理,葡萄成熟后采摘,用保温箱带回实验室,用纯净水清洗后擦干,液氮速冻,-80℃保存待测。测定前解冻、破碎。其次进行酶的提取,在 4℃下进行,参照 Miron 等^[7]以及王永章等^[8]的方法,稍做修改。提取缓冲液为 150 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),10 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L 抗坏血酸,2 mmol/L EDTA-Na₂,1 mmol/L Benzadine(苯甲眯),0.1 mmol/L PMSF 和 0.2%(v/v)β-巯基乙醇,3%(w/v)PVPP。称取一定量的果肉,加入 2.5 倍体积冷的提取缓冲液,于高速匀浆器中快速破碎组织至匀浆,4 层纱布过滤,滤液于 16 000 ×g 离心 20 min,上清液将用于可溶性酸性转化酶的纯化。离心得到的沉淀物用一定体积的提取缓冲液(不含 PVPP)洗涤,直至洗出液中不含蛋白为止,离心去上清液,沉淀用 2 倍体积的含 0.5 mol/L NaCl 的提取缓冲液充分悬浮后,低温(4℃)下振荡浸提 24 h,16 000×g 离心 20 min,上清液将用于细胞壁酸性转化酶的纯化。酶活性分析:可溶性酸性转化酶和细胞壁转化酶活性的测定参照 Miron 等^[7]的方法,测定反应液为 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.8),0.1 mol/L 蔗糖。用 3,5-二硝基

水杨酸测定其生成还原糖的量。以 37℃ 下每分钟催化产生 1 mg 还原糖的量作为 1 个活性单位。

1.4 数据分析

采用 SPSS 19.0 数据处理软件进行显著性分析和相关性分析

2 结果与分析

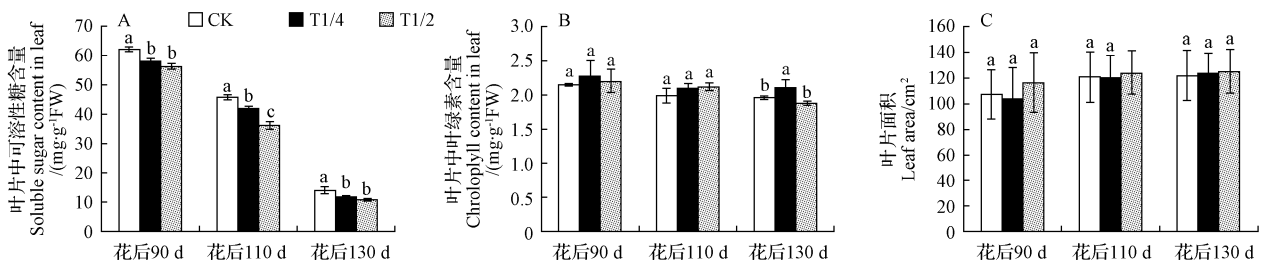
2.1 不同疏粒处理对葡萄叶片生长状况的影响

由图 1A 可以看出,随着果实发育,对照和处理的葡萄叶片可溶性糖含量都呈降低趋势,但疏粒处理的叶片可溶性糖含量降低的幅度比对照更大($P < 0.05$)。另外

随着果实发育,对照和处理的叶片叶绿素含量及叶片面积的差异并不显著($P > 0.05$,图 1B、C)。

2.2 不同疏粒处理对葡萄果实成熟的影响

如图 2A、B 所示,随果实发育,对照和疏粒处理的果实纵横径均逐渐增加,但与对照相比疏粒处理对各时期果实纵横径影响不大($P > 0.05$)。同时随果实发育,果实含糖量均逐渐增加,与对照相比疏粒处理的果实含糖量增加幅度更大($P < 0.05$,图 2C)。而果实酸含量的变化趋势正好与含糖量相反(图 2D)。



注:相同果实发育期内不同小写字母者表示差异达到显著水平 $P < 0.05$ 。以下同。

Note: Data in the same mature period with different lowercase letters show significant difference at $P < 0.05$. The same below.

图 1 疏粒处理对叶片可溶性糖含量(A)、叶绿素含量(B)和叶片面积(C)的影响

Fig. 1 Effect of berry-thinning on soluble sugar content of leaf (A), chlorophyll content of leaf (B) and leaf area (C)

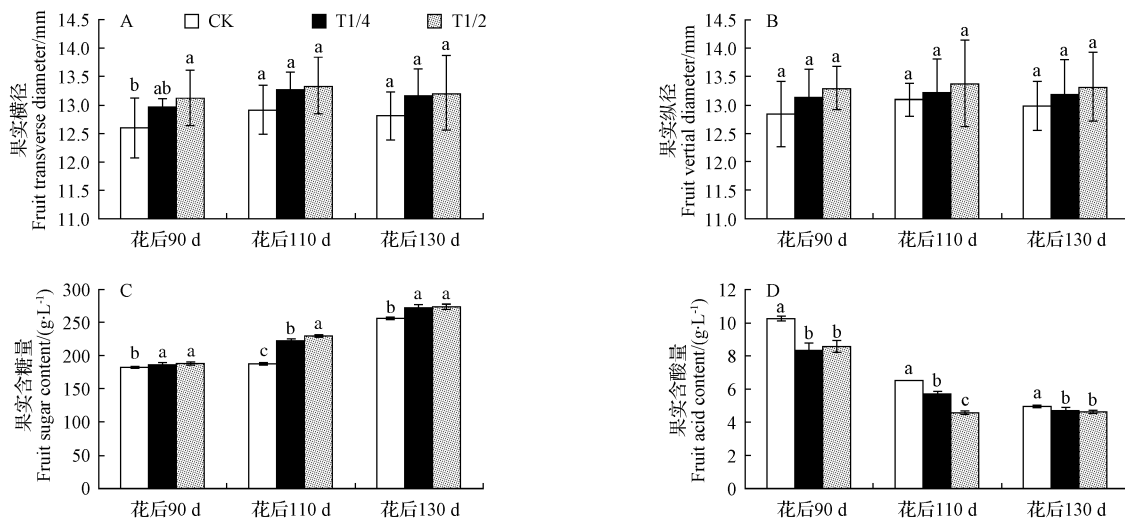


图 2 疏粒处理对果实横径(A)、纵径(B)、果实含糖量(C)及含酸量(D)的影响

Fig. 2 Effect of berry-thinning on diameter of fruit (A,B), sugar content(C), acid content(D)

2.3 不同疏粒处理对葡萄果实酸性转化酶活性的影响

由于酸性转化酶活性与果实含糖量密切相关,因此分析了不同果实发育期和不同疏粒处理的可溶性酸性转化酶(SAI)和细胞壁酸性转化酶(CWI)的活性。如图 3 所示,随果实成熟,对照和处理的 SAI 都呈先降低后稍升高趋势,而 CWI 活性则呈升高趋势。与对照相比,疏粒处理可明显提高各时期果实的酸性转化酶和细胞壁酸性转化酶的活性($P < 0.05$),而且 SAI 活性在各时期

随疏粒量的增加而明显增加($P < 0.05$)。尽管 CWI 活性在各时期随疏粒量增加也呈增加趋势,但直到花后 130 d 才达到差异显著水平($P < 0.05$)。

将不同时期对照和处理的叶片可溶性糖含量和果实含糖量及酸性转化酶活性与叶片可溶性糖含量、葡萄果实含糖量进行相关性分析,由表 1 可以看出,叶片可溶性糖含量和果实含糖量呈高度负相关, r 值分别为 -0.964 (CK)、 -0.997^* (T1/4)、 -0.999^* (T1/2) ($P < 0.05$)。

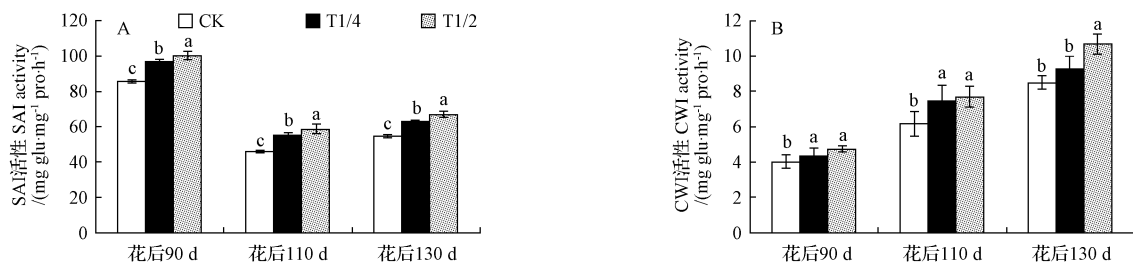


图3 疏粒处理对酸性转化酶活性的影响

Fig. 3 Effect of berry-thinning on acid invertase

SAI 活性与叶片可溶性糖及果实含糖量相关性值较低, CWI 活性与叶片可溶性糖及果实含糖量相关性较高,其中 T1/2 的 CWI 活性与叶片可溶性糖含量达到显著负相关($P<0.05$),与果实含糖量达到显著正相关($P<0.01$)。

表1 果实酸性转化酶活性和叶片可溶性糖含量、果实含糖量的相关性分析

Table 1 Correlation analysis between soluble sugar content of leaf, sugar content and acid invertase activity of berry

关系 Relationship	CK	T1/4	T1/2
叶片中可溶性糖-果实含糖量	-0.964	-0.997 *	-0.999 *
可溶性酸性转化酶-叶片可溶性糖含量	0.610	0.644	0.709
可溶性酸性转化酶-果实含糖量	-0.377	-0.699	-0.746
细胞壁酸性转化酶-叶片可溶性糖含量	-0.987	-0.948	-0.998 *
细胞壁酸性转化酶-果实含糖量	0.908	0.969	1.000 **

注:表中数据为相关系数,* 和 ** 分别表示显著差异 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

Note: Data were correlation coefficient and * and ** show significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

3 结论与讨论

对葡萄果穗进行疏果粒处理,不仅可以限制果实产量还可以调节葡萄果穗内部微域环境温湿度,更有利于果实的发育和果实品质的提高^[9]。除花后 130 d, T1/4 处理使叶绿素含量显著高于对照和 T1/2 处理外,疏粒处理对叶片面积、叶片叶绿素含量影响不大($P>0.05$) (图 1B、C)。推测“源”(叶片)合成碳水化合物的能力基本是不变的。进一步研究发现,随疏粒量增加可明显增加成熟果实含糖量($P<0.05$) (图 2C),但对果实的大小影响并不显著($P>0.05$) (图 2A、B),推测随着疏粒量的增加果穗整体库容量降低,“源”可充分满足“库”的需求。疏粒处理相比对照能汲取更多的营养物质,使果实发育更加充分。

葡萄是糖直接积累型植物^[10-11],叶片光合产物以蔗糖形式经韧皮部运输到果实,以还原糖的形式储存,因此糖代谢对果实的生长和发育特别是糖分积累至关重要。糖代谢关键限制酶是酸性转化酶^[12-13],因此提高酸性转化酶的活性是提高果实含糖量的重要途径。Pan 等^[14]的研究也发现,酸性转化酶活性大小是不同葡萄果实含糖量差异的主要原因。该研究也发现疏粒处理显

著提高了 SAI 和 CWI 的活性,从而增加了果实的含糖量。另外对照、T1/4 和 T1/2 叶片可溶性糖含量在葡萄果实成熟不同阶段含量差异显著,可能由于果实库强度在不同发育时期的差异引起的,果实库强度越高会分配到更多的碳水化合物,而使源叶片可溶性糖存储量降低^[15]。库强度的改变是库活力调节的结果^[16],而调节果实韧皮部蔗糖的卸出效率是改变果实库活力的关键环节。在果实发育成熟期,果实韧皮部主要是质外体卸载^[17]。有试验证明,CWI 更有利于质外体卸载,使蔗糖可以源源不断地从源组织到库组织运输^[18-19]。该研究中在果实成熟期 SAI 活性呈降低趋势,CWI 活性呈升高趋势(图 3A、B)。通过对表 1 的分析可以发现,SAI 活性与叶片可溶性糖含量和果实含糖量的相关性系数明显低于 CWI 与叶片可溶性糖含量和果实含糖量的相关性系数,说明在果实成熟期 CWI 较 SAI 对叶片可溶性糖含量和果实含糖量的限制作用更强,CWI 活性增加是叶片可溶性糖含量减少和果实含糖量增加的一个重要原因。在一定范围内,随着疏去果粒越多,果树负载量降低,疏粒处理 SAI 活性显著高于对照,CWI 活性也显著高于对照。因此疏粒处理可以提高果实酸性转化酶活性,进而提高果实含糖量。在花后 130 d,虽然 T1/2 处理的 SAI 活性和 CWI 活性显著高于 T1/4 处理(图 3A、B),但是果实含糖量和含糖量无显著性差异(图 2C、D)。可能是由于果实成熟后期含糖量升高到一定范围,果实源端与库端的膨压差减小,糖在库端的卸载效率降低^[20-21],果实膨压升高,糖基本无法运输进入果实,因此疏粒处理选择 T1/4 更为恰当,同时也兼顾到了果农的产量问题。

综上所述,疏粒处理促进了葡萄果实中糖的积累,因而改善了果实的内在品质。而成熟期果实中含糖量增加主要是调节糖代谢酶的活性实现的,尤其是果实细胞壁酸性转化酶。

参考文献

- [1] Devainh K A, Hemanth V H, Sheikh M B. Relationship between acid invertase activity and sugar content in grape species[J]. Journal of Food Biochemistry, 2011, 35: 1646-1652.
- [2] 张晓燕. 葡萄果实从成长到成熟的转折伴随着韧皮部卸载路径的转

变[D]. 北京:中国农业大学,2006.

[3] 张家荣. 负载量及其调控方式对酿酒葡萄果实中花色苷的影响[D]. 济南:齐鲁工业大学,2013.

[4] Kaps M L, Cahoon G A. Berry thinning and cluster thinning influence vegetative growth, yield, fruit composition, and net photosynthesis of 'Seyval blanc' grapes[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1989, 114: 20-24.

[5] 刘品何, 刘胜, 秦伟帅, 等. 疏果方式对"赤霞珠"葡萄挥发性物质的影响[J]. 北方园艺, 2014(9): 27-32.

[6] 谢兆森. 根域限制对葡萄果实发育、源库器官及其输导组织结构的影响[D]. 上海:上海交通大学, 2010.

[7] Miron D, Schaffer A A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill, and sucrose accumulation in *Lycopersicon hirsutum* Humb and bonpl[J]. Plant Physiology, 1991, 95: 623-627.

[8] 王永章, 张大鹏. 果糖和葡萄糖参与诱导苹果果实酸性转化酶翻译后的抑制性调节[J]. 中国科学(C辑), 2002, 32(1): 32-39.

[9] 刘品何. 疏果对酿酒葡萄果实及其葡萄酒挥发性物质的影响[D]. 济南:齐鲁工业大学, 2014.

[10] 陈俊伟, 张上隆, 张良诚. 果实中糖的运输、代谢与积累及其调控[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(1): 1-10.

[11] 林玲, 孙光明, 李绍鹏, 等. 园艺植物果实中糖代谢的研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2005, 11(4): 37-41.

[12] 卢彩玉, 郑小艳, 贾惠娟, 等. 根域限制对"巨玫瑰"葡萄果实可溶性糖含量及相关代谢酶活性的影响[J]. 园艺学报, 2011, 38(5): 825-832.

[13] 闫梅玲, 王振平, 范永, 等. 蔗糖代谢相关酶在赤霞珠葡萄果实积累中的作用[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 703-707.

[14] Pan Q H, Cao P, Duan C Q. Comparison of enzymes involved in sugar metabolism from Shang-24 (*Vinifera quinquangularis*) and *Cabernet Sauvignon* (*Vinifera vinifera*) at veraison[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2008, 15: 9-17.

[15] 刘淑慧, 侯智霞. 喷施蔗糖对蓝莓叶片和果实中可溶性糖含量变化的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(16): 8981-8984.

[16] Marcelis L F M. Effect of assimilate supply on the growth of individual cucumber fruits[J]. Physiologia pycnantha, 2006, 87: 1781-1791.

[17] Zhang D P. Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2010, 17: 1-8.

[18] Frommer W B, Sonnewald U. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species[J]. Journal of Experimental Botany, 1995, 46: 587-607.

[19] Patrk J W. Phloem unloading, Sieve element unloading and post-sieve element transport[J]. Annual Review of Plant Biology, 1997, 48: 191-222.

[20] Matthews M A, Thomas T R, Shackel K A. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: possible relation of veraison to turgor and berry softening[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2009, 15: 278-283.

[21] Thomas T R, Shackel K A, Matthews M A. Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and relation to firmness, growth, and the onset of ripening[J]. Planta, 2008, 228: 1067-1076.

Effect of Berry-thinning on Sugar Content and Relative Enzyme Activities During Berry Ripening in 'Cabernet Sauvignon' Grape

SUN Qing-yang¹, HAN Ning¹, SUN Yu-xia², ZHAO Yue¹, HAN Ai-qin¹, ZHAO Xin-jie¹

(1. Shandong Key Laboratory of Microbial Engineering, Qilu University of Technology, Jinan, Shandong 250353; 2. Institute of Agro-food Science and Technology, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100)

Abstract: Taking grape variety 'Cabernet sauvignon' as materials, the ingredient content of leaf, the fruit diameter, acid and sugar content and activities of acid invertase in berry of 'Cabernet Sauvignon' during fruit ripening of different degree by berry-thinning were studied. The results showed that whether berry-thinning or not, with berry ripening fruit diameter and sugar content in grape berries increased, while acid content of fruit and soluble sugar content of leaf decreased. And meanwhile acid invertase activity increased gradually with berry ripening. Furthermore, with an increasing degree of berry-thinning, the activities of soluble acid invertase and cell wall-bound acid invertase were enhanced obviously, in agreement with increasing in content of fruit sugar. However, the berry-thinning treatment had little effect on diameter of fruit and chlorophyll content of leaf, but the soluble sugar content of leaf decreased significantly in berry-thinning treatment compared with control. Correlation analysis showed the activity of cell wall-bound acid invertase was negative correlation with the soluble sugar content of leaf and was positive correlation with the sugar content of grape berries. Moreover, the correlation coefficient was higher with an increasing degree of berry-thinning. The results suggested that berry-thinning treatment had great influence on the acid invertase of fruit, especially cell wall-bound acid invertase in the berry mature period. And it might increase the fruit sink strength, and then change the relationship of sink and source therefore, more carbohydrate were allocated to fruit.

Keywords: 'Cabernet Sauvignon' grape; berry-thinning; acid invertase; soluble sugar content of leaf; sugar content of grape berries