

· 研究报告 ·

宁夏枸杞果实内源激素的变化及其与细胞壁成分和相关酶的关系

杨晓婉¹, 郑国琦^{2*}, 杨涓², 许兴¹, 卢迪¹, 杨乐¹

¹宁夏大学农学院, 银川 750021; ²宁夏大学生命科学学院, 银川 750021

摘要 采用高效液相色谱技术, 研究了不同发育时期宁杞1号和宁杞5号枸杞(*Lycium barbarum*)果皮和种子内源激素(玉米素(ZT)、赤霉素(GA₃)、生长素(IAA)和脱落酸(ABA))含量与果实生长发育的关系。结果表明, 宁杞5号果实横纵径和单粒重均大于宁杞1号, 果实发育前期, 尤其是缓慢生长期, 是宁杞5号果实大小和重量积累的关键时期。宁杞1号种子中的生长素含量与果实横径和果实单粒重均呈极显著正相关, 与果实纵径呈显著正相关。宁杞5号果皮中玉米素含量与果实横径和单粒重均呈显著正相关, 种子中生长素含量与果实横径和单粒重均呈显著正相关。玉米素促进细胞的分裂, 而细胞数目比细胞体积对决定果实大小的作用更大; 在缓慢生长期(开花后8–25天), 宁杞5号果皮和种子中的脱落酸含量均显著小于宁杞1号。以上两点可能是宁杞5号的横纵径和单粒重均大于宁杞1号的主要原因。宁杞1号果皮中的GA₃与半纤维素酶(Cx)活性的变化相反, 说明宁杞1号果实发育前期和中期果皮中高含量的GA₃对细胞壁中Cx活性有一定的抑制作用, 从而表现出果实膨大。宁杞5号果皮中的IAA与多聚半乳糖醛酸酶(PG)和果胶酯酶(PE), ZT与PE, ABA与Cx, 种子中的ZT与PE的变化均相反, 说明宁杞5号果实发育前期和中期果皮中高含量的IAA、ZT、ABA及种子中的ZT可促进果实的膨大。推测这可能是宁杞5号果实单粒重大于宁杞1号的主要原因之一。宁杞5号果皮中的ZT和种子中的IAA可以增强Cx的活性; 宁杞1号果皮中的ABA可以增强PE的活性, 进而促进果实的成熟。

关键词 宁杞1号, 宁杞5号, 内源激素, 形态指标, 细胞壁成分, 细胞壁相关酶活性

杨晓婉, 郑国琦, 杨涓, 许兴, 卢迪, 杨乐 (2014). 宁夏枸杞果实内源激素的变化及其与细胞壁成分和相关酶的关系. 植物学报 49, 30–40.

宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)隶属于茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium*), 为多年生落叶灌木(路安民和王美林, 2003)。宁夏枸杞具有悠久的栽培历史并生长于得天独厚的地理环境与气候条件下; 再加上特有的炮制手段, 由此便形成了宁夏枸杞皮薄、肉厚、粒大、味甘、色正、药效佳的道地品质(孙志刚, 2001)。果实软化是易腐果实成熟的一个标志, 而果实细胞壁的变化是引起果实软化的重要原因(Huber, 1983)。枸杞果实属于浆果, 细胞壁成分以及相关酶的变化是枸杞果实成熟的重要标志。近年来, 有关植物内源激素的研究越来越广泛, 目前关于宁夏枸杞所含激素的研究主要集中在外源激素对枸杞生长和繁殖方面的作用。对于枸杞果实发育过程中细胞壁成分的变化研究主要集中在枸杞果实细胞壁成分及相关酶活性的变化上(冯美等, 2012)。而内源激素含量变化与果实大小和细胞壁成分及其相关酶活性

的关系尚未见报道。果实体积的增大主要取决于细胞数目的增加和细胞体积的增大, 而细胞数目的增加和细胞体积的增大不仅受到激素的调控, 而且与细胞壁成分和细胞壁酶活性有关。因此, 本研究选取宁夏枸杞常规栽培品种宁杞1号和近年新培育的雄性不育品种宁杞5号(与宁杞1号混植授粉结实, 果实体积和百粒重较大)为材料, 从两品种的果皮和种子内源激素、果实大小和细胞壁成分的含量变化以及细胞壁相关酶活性变化入手, 探讨宁夏枸杞内源激素含量与果实生长发育的关系, 揭示导致宁杞5号果实较大的原因, 为枸杞的规范化种植提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为宁夏育新枸杞公司育种基地6年生宁杞1

收稿日期: 2012-12-18; 接受日期: 2013-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(No.81160517)

* 通讯作者。E-mail: zhengguoqi1977@163.com

号和宁杞5号枸杞(*Lycium barbarum* L.)。2012年5—7月中旬对宁夏枸杞夏果进行取样观察和测定。实验采取定点定株的方法,选取20株枸杞于5月20日用毛线标记同一天开放的花朵(花瓣紫堇色,花药坚挺,白色,未开裂),共标记5 000朵,分别于花后2、4、8、14、19、25、29和33天采集果实。果实分为两部分,一部分置液氮中速冻,带回实验室,置于-70°C以下的超低温冰箱中保存,用于内源激素含量的测定;另一部分于45°C烘箱中烘干后放入自封袋中,用于果实细胞壁成分及相关酶活性的测定。同期取样进行3次重复测定。

1.2 方法

1.2.1 不同发育时期果实横径、纵径和单粒重的测定

1.2.1.1 果实横径和纵径的测量

随机选取30粒枸杞果实,用千分之一游标卡尺测定果实横径和纵径。

1.2.1.2 果实单粒重的测定

随机选取30粒枸杞果实,用千分之一电子天平称量果实单粒鲜重。

1.2.2 不同发育时期果实内源激素含量的测定

将液氮中的宁杞1号和宁杞5号果皮和种子分开(花后2天为果皮和种子的混合样),分别提取玉米素(zeatin, ZT)、赤霉素(gibberellic acid, GA₃)、生长素(indole acetic acid, IAA)和脱落酸(abscisic acid, ABA)。提取方法参照闫师杰等(2010)的方法并加以改进。色谱条件:流动相为甲醇:水(含1%乙酸)=2:3(v/v);柱温35°C;流速1.0 mL·min⁻¹;检测波长为254 nm;进样量20 μL。标准品选用美国Sigma公司的产品。

1.2.3 不同发育时期果实细胞壁成分及其代谢相关酶活性的测定

1.2.3.1 细胞壁成分的提取及含量测定

细胞壁成分的提取参考朴一龙等(2006)的方法。称取5 g冷冻果肉组织放入6 mL 800 mL·L⁻¹乙醇中研磨,再用相同体积和体积分数的乙醇洗净研钵,将混合物一并沸水浴20分钟,冷却至室温后过滤,残渣依次用50 mL 800 mL·L⁻¹乙醇、50 mL 800 mL·L⁻¹丙酮、75 mL 1 000 mL·L⁻¹丙酮洗净。洗涤过程中,将残渣轻轻捣碎使之不

成团,得到的粉末在35°C条件下干燥24小时,备用。

果胶、纤维素及半纤维素的提取参照朴一龙等(2006)的方法并加以改进。果胶含量的测定参照韩雅珊(1992)的咔唑法,以半乳糖醛酸含量制作标准曲线,计算相应的果胶含量(韩雅珊, 1992)。纤维素含量的测定参照韩雅珊(1992)的蒽酮-硫酸法,并用葡萄糖含量制作标准曲线,计算相应的果胶含量。半纤维素含量的测定参照韩雅珊(1992)的方法,以葡萄糖为标准糖绘制标准曲线,用苯酚-硫酸法测定溶解物中半纤维素的含量。

1.2.3.2 细胞壁代谢相关酶的提取及其活性测定

酶液的提取参照张进献等(2006)的方法。称取去掉果皮的果肉3.0 g,加10 mL 40 mmol·L⁻¹ NaAc缓冲液(pH 5.2, 含100 mmol·L⁻¹ NaCl、2%巯基乙醇、5% PVP),冰浴匀浆,冰冻条件下过滤,滤液用于代谢相关酶活性的测定。

多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)活性的测定参照张飞等(2004)的方法,即采用比色法。以1 mL酶液在50°C、pH 5.0的条件下,1小时分解果胶产生1 mg半乳糖醛酸为一个酶活单位(U)。果胶酯酶(pectinesterase, PE)活性的测定参照高俊凤(2006)的方法。取20 mL 1%果胶溶液,置于100 mL锥形瓶中,加入2滴中性红溶液,用0.05 mol·L⁻¹ NaOH溶液滴定至红色消失;加入1 mL pH 7.0酶液,立即计时,并将锥形瓶放入30°C水浴中,摇动。待红色出现后,用0.05 mol·L⁻¹ NaOH溶液滴定至无色,重复保温、滴定,记录30分钟内滴加的NaOH总量。以每毫升酶液1分钟内释放1 mmol CH₃O为1个酶活单位(U)。纤维素酶(cellulase, Cx)活性测定参考张瑞萍(2002)的方法,并加以改进。采用DNS显色剂比色法,以每毫升酶液1分钟产生1 mg葡萄糖为一个酶活单位(U)。

1.3 数据处理

实验数据用Excel和SAS 8.2软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 果实横径、纵径和单粒重的变化

2.1.1 果实横径和纵径的变化

对宁杞1号和宁杞5号果实的横径和纵径的测量结果

(图1A)显示, 宁杞1号和宁杞5号果实的发育均可明显划分为第1次快速生长期(花后2–8天)、缓慢生长期(花后8–25天)和第2次快速生长期(花后25–33天)3个阶段。从图1A可以看出, 在整个生育期内, 宁杞5号的横径和纵径均大于宁杞1号。

第1次快速生长期, 宁杞1号果实横径的平均日增长量为 $0.26 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实中部横径净增长量的20.34%; 宁杞5号果实横径的平均日增长量为 $0.39 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实中部横径净增长量的25.07%。缓慢生长期, 宁杞1号果实横径的平均日增长量为 $0.08 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实中部横径净增长量的17.93%; 宁杞5号果实横径的平均日增长量为 $0.10 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实中部横径净增长量的18.33%。第2次快速生长期, 宁杞1号果实横径平均日增长量为 $0.60 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实中部横径净增长量的61.74%; 宁杞5号果实横径平均日增长量为 $0.66 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实中部横径净增长量的56.60%。

果实纵径的变化规律与横径基本相同(图1A)。第1次快速生长期, 宁杞1号果实纵径平均日增长量为 $1.18 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实纵径净增长量的41.26%; 宁杞5号果实纵径平均日增长量为 $1.17 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实纵径净增长量的37.28%。缓慢生长期, 宁杞1号纵径平均日增长量为 $0.25 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实纵径净增长量的24.78%; 宁杞5号纵径平均日增长量为 $0.32 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实纵径净增长量的29.34%。第2次快速生长期, 宁杞1号纵径平均日增长量为 $0.73 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实纵径净增长量的33.97%; 宁杞5号纵径平均日增长量为 $0.78 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实纵径净增长量的33.39%。

2.1.2 果实单粒重的变化

对不同发育时期果实单粒鲜重的测定结果(图1B)表明, 宁杞5号的单粒重大于宁杞1号。第1次快速生长期, 果实迅速增大, 宁杞1号果实鲜重平均日增长量为 $10.44 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实单粒鲜重的7.68%; 宁杞5号果实鲜重平均日增长量为 $14.41 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实单粒鲜重的6.97%。缓慢生长期, 宁杞1号果实鲜重平均日增长量为 $5.15 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实单粒鲜重的10.73%; 宁杞5号果

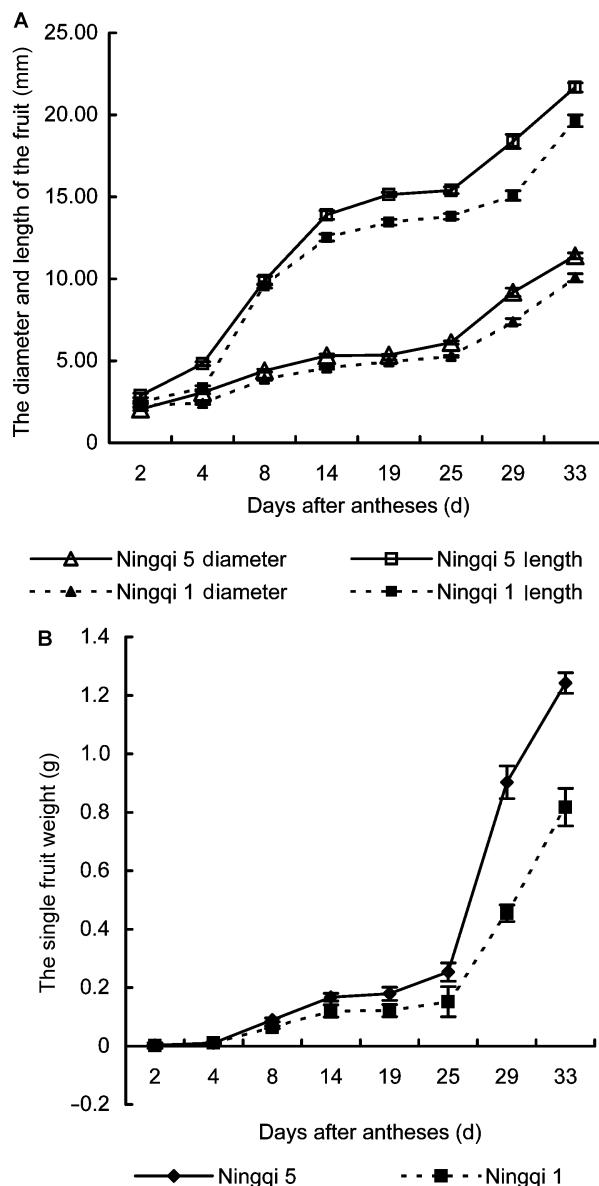


图1 宁杞1号和宁杞5号不同发育阶段果实形态指标的变化
(A) 纵径与横径; (B) 单粒重

Figure 1 Changes of fruit shape index of different development stages in Ningqi 1 and Ningqi 5
(A) Diameter and length; (B) Single fruit weight

实鲜重平均日增长量为 $9.66 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实单粒鲜重的13.25%。第2次快速生长期, 果实重量急剧增加, 宁杞1号平均日增长量为 $83.17 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成熟时果实单粒鲜重的81.59%; 宁杞5号平均日增长量为 $123.60 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 净增量占成

熟时果客单粒鲜重的79.78%。说明第2次快速生长期是果实鲜重增长的主要时期。

2.2 果实内源激素含量的动态变化

2.2.1 果皮和种子中玉米素含量的动态变化

分析宁杞1号和宁杞5号果皮和种子中ZT含量的变化规律, 从图2A可以看出, 宁杞1号和宁杞5号果皮和种子中的玉米素含量变化趋势基本相同。宁杞1号果皮中的玉米素含量在第1次快速生长期呈快速下降趋势; 而宁杞5号则呈先上升后下降的趋势。缓慢生长期, 宁杞1号和宁杞5号果皮中玉米素含量均呈先下降后缓慢上升的趋势。第2次快速生长期, 两品种果皮中的玉米素含量

均呈缓慢上升的趋势。宁杞1号和宁杞5号种子中的玉米素含量从花后4—8天呈快速下降的趋势, 在缓慢生长期表现为缓慢下降, 到第2次快速生长期又缓慢上升。

2.2.2 果皮和种子中赤霉素含量的动态变化

从图2B可以看出, 宁杞1号果皮中的赤霉素含量从第1次快速生长期到缓慢生长期一直呈上升趋势, 在第2次快速生长期则急速下降; 宁杞5号果皮中的赤霉素含量则在花后2—14天呈先上升后下降的趋势, 花后14—25天呈上升趋势, 花后25—29天则急速下降, 花后33天又略有上升。宁杞1号和宁杞5号种子中的赤霉素含量在花后4—8天略有下降。缓慢生长期, 宁杞

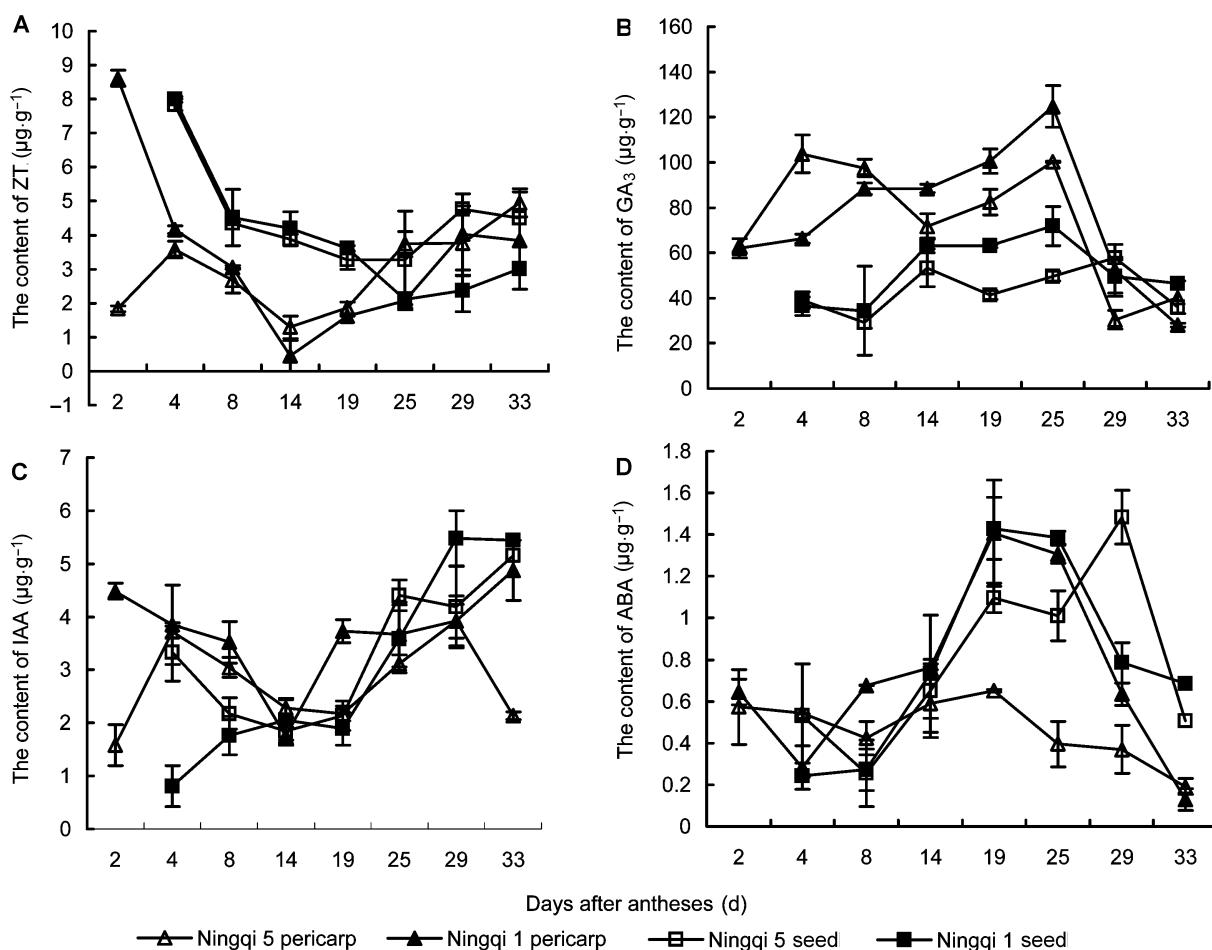


图2 宁杞1号和宁杞5号果实内源激素含量的变化

(A) 玉米素; (B) 赤霉素; (C) 生长素; (D) 脱落酸

Figure 2 Changes of endogenous hormone contents in Ningqi 1 and Ningqi 5

(A) Zeatin (ZT); (B) Gibberellic acid (GA₃); (C) Indole acetic acid (IAA); (D) Abscisic acid (ABA)

1号种子中的赤霉素含量一直呈上升趋势，且花后14—25天其上升趋势较为缓慢；而宁杞5号种子中的赤霉素含量则呈现先上升后下降之后再上升的趋势。宁杞1号种子中的赤霉素含量在第2次快速生长期则一直呈下降趋势；宁杞5号种子中的赤霉素含量则呈先上升后下降的趋势。

2.2.3 果皮和种子中生长素含量的动态变化

从图2C可以看出，宁杞1号果皮中的生长素含量与果皮中玉米素含量的变化规律相一致，即在第1次快速生长期呈快速下降趋势，在缓慢生长期呈先下降后上升的趋势，在第2次快速生长期又缓慢上升，果皮中的生长素和玉米素含量的最小值都出现在花后14天；宁杞1号种子中的生长素含量一直呈上升趋势，其中花后8—19天变化较为缓慢，花后19—29天其含量上升较快。宁杞5号果皮中的生长素含量在第1次快速生长期呈先上升后下降的趋势，花后8—19天呈下降趋势，花后19—29天又急速上升，到成熟时其含量又快速下降；宁杞5号种子中的生长素含量从花后4—14天一直呈下降趋势，花后14—19天略有上升，花后19天至成熟时呈上升趋势，花后33天达到最大值($3.320\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。宁杞1号和宁杞5号种子中的生长素含量变化较为一致，都是在成熟时达到最大值。

2.2.4 果皮和种子中脱落酸含量的动态变化

宁杞1号果实和种子中脱落酸的含量变化趋势基本一

致(图2D)，花后4—19天呈上升趋势，花后19天达最大值(果皮： $1.406\text{ }1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，种子： $1.429\text{ }1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)；花后19—25天其含量略有下降，在第2次快速生长期又急速下降。从图2D可以看出，缓慢生长期的果皮和种子中的脱落酸含量比第1次和第2次快速生长期都高，成熟时反而快速下降。第1次快速生长期，宁杞5号果皮中的脱落酸含量呈缓慢下降趋势，缓慢生长期呈先上升后下降，此后一直下降，到成熟时达最小值($0.191\text{ }9\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)，最大值出现在花后19天($0.651\text{ }8\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)；宁杞5号种子中脱落酸含量在第1次快速生长期呈下降趋势，从花后8天起，一直快速上升，花后29天达最大值($1.482\text{ }7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)，花后29—33天又快速下降。

2.2.5 4种内源激素含量与横径、纵径和单粒重的关系

宁杞1号和宁杞5号果皮和种子中4种内源激素含量与果实横径、纵径和单粒重的相关性分析结果(表1)表明，宁杞1号果皮中的赤霉素含量与果实单粒重呈显著负相关。宁杞1号种子中的玉米素含量与果实横径和纵径均呈显著负相关，种子中的生长素含量与果实横径和果实单粒重均呈极显著正相关，与果实纵径呈显著正相关。宁杞5号果皮中的玉米素含量与果实横径和单粒重均呈显著正相关，赤霉素含量与果实横径和单粒重均呈显著负相关，脱落酸含量与果实横径和单粒重均呈显著负相关。宁杞5号种子中的玉米素含量与果实纵径呈显著负相关，生长素含量与果实横径和单

表1 宁杞1号和宁杞5号果皮和种子中内源激素含量与果实形态指标的相关性

Table 1 The relational analysis between endogenous hormones and fruit shape index in Ningqi 1 and Ningqi 5

Endogenous hormone		Correlation coefficient					
		Diameter		Length		Single fruit weight	
		Ningqi 1	Ningqi 5	Ningqi 1	Ningqi 5	Ningqi 1	Ningqi 5
Pericarp	ZT	-0.246	0.680	-0.558	0.474	-0.056	0.720
	GA ₃	-0.446	-0.674*	-0.096	-0.521	-0.638*	-0.788*
	IAA	0.302	0.136	0.013	0.084	0.430	0.093
	ABA	-0.216	-0.794*	0.109	-0.606	-0.425	-0.822*
Seed	ZT	-0.648*	-0.286	-0.870*	-0.619*	-0.470	-0.119
	GA ₃	0.120	0.200	0.429	0.325	-0.057	0.148
	IAA	0.923**	0.724*	0.836*	0.528	0.884**	0.753*
	ABA	0.224	0.300	0.500	0.437	0.041	0.258

ZT、GA₃、IAA和ABA同图2。* 表示相关性达0.05显著水平；** 表示相关性达0.01显著水平

ZT, GA₃, IAA and ABA see Figure 2. * Correlation is significant at the 0.05 level; ** Correlation is significant at the 0.01 level

粒重均呈显著正相关。

2.3 生长期果实细胞壁成分含量及细胞壁代谢相关酶活性的动态变化

2.3.1 果实细胞壁代谢相关酶活性的变化

从图3A中PG活性的变化可以看出, 宁杞1号和宁杞5号中PG的活性在第1次快速生长期较低, 缓慢生长期两品种都呈快速上升趋势, 成熟时宁杞5号中的PG活性升至最高(2 861.103 9 U), 宁杞1号中的PG活性则呈急速下降趋势。宁杞1号中PG活性的最大值出现在转色期(花后29天)。宁杞5号中PG活性稍大于宁杞1号。

从图3B中PE活性的变化可以看出, 宁杞1号PE活性在花后19天最高, 宁杞5号PE活性则在花后14天最高, 此时都是两品种果实最硬的时期。宁杞5号PE活性在开花14天以后逐渐降低, 到成熟时, PE活性又稍有上升; 而宁杞1号PE活性一直呈先升高后降低的变化趋势, 到成熟时又降至最低。宁杞1号中PE活性一直稍大于宁杞5号。

从图3C中Cx活性的变化可以看出, 宁杞1号和宁杞5号中Cx活性变化趋势基本一致。从花后4—19天一直呈较低水平, 花后19天开始逐渐升高, 到成熟时, 两品种均达到最大值。

2.3.2 细胞壁成分含量的动态变化

图4A显示的果胶含量变化表明, 宁杞1号和宁杞5号中果胶的含量变化呈先上升后下降然后再上升的趋势。宁杞1号从花后29天到成熟时果胶含量呈下降趋势; 宁杞5号从花后25天到成熟基本呈下降趋势。

图4B中显示的纤维素含量变化表明, 宁杞5号中纤维素含量一直呈比较低的状态, 到成熟时降至最低(0.094 9%); 而宁杞1号的纤维素含量在花后14天达最大值, 此后一直下降, 花后19天到成熟时变化不显著。

图4C中显示的半纤维素含量变化表明, 宁杞1号和宁杞5号中半纤维素的含量变化趋势不显著。从花后4—29天, 宁杞5号中半纤维素含量一直大于宁杞1号, 而到成熟时, 宁杞5号中半纤维素含量急速下降, 并显著低于宁杞1号中半纤维素的含量。

为了探明宁杞1号和宁杞5号调节果实软化的关键酶, 进行了2个品种果实细胞壁成分含量和细胞壁代谢相关酶的相关性分析。从表2可以看出, 宁杞1号

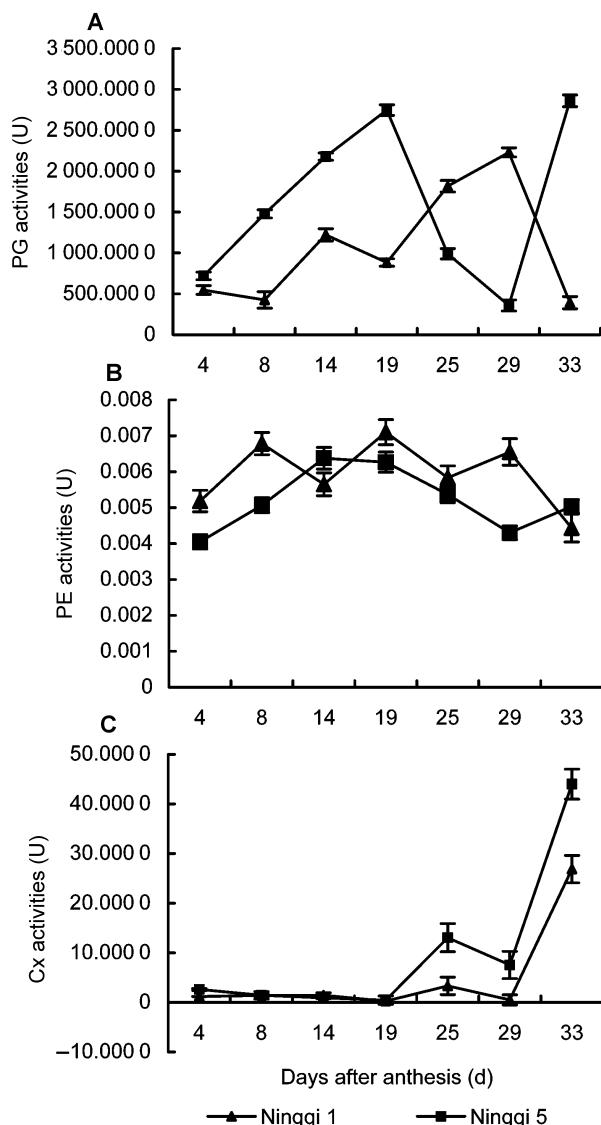


图3 宁杞1号和宁杞5号中多聚半乳糖醛酸酶(A)、果胶酯酶(B)和纤维素酶(C)活性的变化

Figure 3 Changes of polygalacturonase (PG) (A), pectinesterase (PE) (B), cellulase (Cx) (C) activities in Ningqi 1 and Ningqi 5

中的果胶含量与PG活性呈显著正相关, 与Cx活性呈显著负相关; 宁杞5号中的果胶含量与PE活性呈极显著正相关, 半纤维素含量与PG活性呈显著负相关。

2.4 果实发育期间4种内源激素含量与细胞壁成分及其相关酶的关系

为了探明宁夏枸杞果皮和种子中的激素含量与细胞

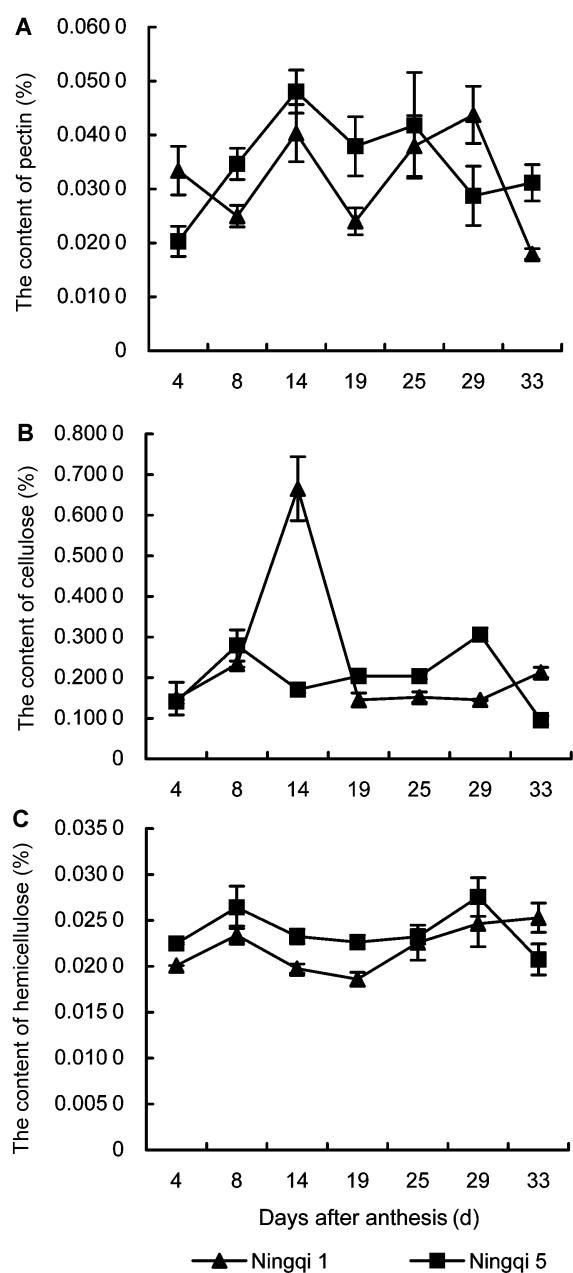


图4 宁杞1号和宁杞5号中果胶(A)、纤维素(B)和半纤维素(C)含量的变化

Figure 4 Changes of pectin (A), cellulose (B), hemicelluloses (C) contents in Ningqi 1 and Ningqi 5

壁成分及其相关酶的关系，我们进行了宁杞1号和宁杞5号果实发育期间果皮和种子中内源激素含量与细胞壁成分及其相关酶的相关性分析。结果(表3)表明，宁杞1号果皮中的玉米素含量与纤维素含量、生长素

含量与纤维素含量均呈显著负相关，果皮中的玉米素含量与半纤维素含量呈显著正相关，脱落酸含量与PE活性呈显著正相关，赤霉素含量与Cx活性呈显著负相关。宁杞1号种子中的生长素含量与半纤维素含量呈显著正相关。宁杞5号果皮中的生长素含量与果胶含量呈显著负相关，与半纤维素含量呈显著正相关，与PG活性呈极显著负相关，与PE活性呈显著负相关，玉米素含量与PE活性呈显著负相关，与Cx活性呈显著正相关，脱落酸含量与Cx活性呈显著负相关。宁杞5号种子中的玉米素含量与果胶含量和PE活性均呈显著负相关，生长素含量与Cx活性呈显著正相关。

2.5 果实发育期间4种内源激素含量与细胞壁相关酶活性的回归分析

为了探明宁杞1号和宁杞5号果皮和种子中4种内源激素对细胞壁成分及其相关酶活性的调节作用，将两品种果皮和种子中的内源激素含量与果胶、纤维素和半纤维素含量，PG、PE和Cx活性的变化进行了逐步回归分析，得出多元线性回归方程，并进行了偏相关检验和通径分析。表4显示回归方程和F值，其中 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 分别代表多聚半乳糖醛酸酶、果胶酯酶和纤维素酶； X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 分别代表玉米素、赤霉素、生长素和脱落酸。由表4可知，宁杞1号中的PG活性受果皮中的ABA和种子中的ZT调控，PE活性受果皮中的ABA和种子中的IAA和ZT调控，Cx活性受果皮中的ZT、IAA、ABA和种子中的IAA调控；宁杞5号中的PG活性受果皮中的IAA和种子中的ZT和GA₃调控，PE活性受果皮中的IAA和种子中的ZT调控，Cx活性受果皮中的ZT、IAA和种子中的IAA调控。

2.6 讨论

从果实体积和重量增长的曲线看，果实增长曲线大体分为2种，即单S型曲线和双S型曲线(陈杰忠和周碧燕，2002)。本研究结果表明，无论是宁杞1号还是宁杞5号，根据果实生长发育曲线可划分为第1次快速生长期、缓慢生长期和第2次快速生长期，属于典型的双S型曲线。在第1次快速生长期和缓慢生长期，宁杞5号果实净增量占成熟时果实中部横径净增量的百分数均大于宁杞1号；虽然宁杞5号的横径和纵径均大于宁杞1号(图1A)，但在第2次快速生长期，宁杞

表2 宁杞1号和宁杞5号果实细胞壁成分与细胞壁代谢相关酶活性的相关性分析**Table 2** The relational analysis between cell wall components and degrading enzyme activity in Ningqi 1 and Ningqi 5

Cell wall components	Correlation coefficient					
	PG		PE		Cx	
	Ningqi 1	Ningqi 5	Ningqi 1	Ningqi 5	Ningqi 1	Ningqi 5
Pectin	0.821*	0.418	0.183	0.885**	-0.610*	-0.154
Cellulose	-0.028	-0.534	-0.145	-0.120	-0.065	-0.550
Hemicellulose	0.145	-0.633*	-0.287	-0.282	0.571	-0.507

PG、PE和Cx同图3。* 表示相关性达0.05显著水平; ** 表示相关性达0.01显著水平

PG, PE and Cx see Figure 3. * Correlation is significant at the 0.05 level; ** Correlation is significant at the 0.01 level

表3 宁杞1号和宁杞5号果实发育期间果皮和种子中内源激素含量与细胞壁成分及其相关酶的相关性分析**Table 3** The relational analysis between endogenous hormone content and cell wall components and degrading enzyme activity in pericarp and seed during the development of Ningqi 1 and Ningqi 5

Lycium barbarum different varieties	Endogenous hormone	Correlation coefficient						
		Pectin	Cellulose	Hemicellulose	PG	PE	Cx	
Ningqi 1	Pericarp	ZT	-0.184	-0.681*	0.602	-0.139	-0.283	0.323
		GA ₃	0.268	0.081	-0.536	0.257	0.512	-0.637*
		IAA	-0.543	-0.839*	0.563	-0.204	-0.264	0.582
		ABA	0.196	-0.063	-0.473	0.424	0.673*	-0.544
	Seed	ZT	-0.088	0.045	-0.474	-0.579	-0.201	-0.234
		GA ₃	0.330	0.238	-0.316	0.561	0.128	-0.133
		IAA	0.045	-0.207	0.800*	0.455	-0.253	0.578
		ABA	0.083	-0.149	-0.236	0.490	0.290	-0.078
Ningqi 5	Pericarp	ZT	-0.599	-0.243	-0.168	-0.228	-0.722*	0.776*
		GA ₃	0.086	-0.058	-0.140	-0.143	0.143	-0.518
		IAA	-0.602*	0.512	0.621*	-0.973**	-0.806*	-0.327
		ABA	0.258	0.109	0.018	0.044	0.482	-0.847*
	Seed	ZT	-0.830*	-0.247	-0.054	-0.459	-0.750*	-0.070
		GA ₃	0.315	0.253	0.267	-0.362	0.104	-0.193
		IAA	-0.390	-0.259	-0.215	-0.194	-0.560	0.800*
		ABA	0.055	0.435	0.324	-0.311	-0.006	-0.146

ZT、GA₃、IAA和ABA同图2; PG、PE和Cx同图3。* 表示相关性达0.05显著水平; ** 表示相关性达0.01显著水平ZT, GA₃, IAA and ABA see Figure 2; PG, PE and Cx see Figure 3. * Correlation is significant at the 0.05 level; ** Correlation is significant at the 0.01 level

5号果实净增量占成熟时果实中部横径净增量的百分数却小于宁杞1号。在缓慢生长期, 宁杞5号纵径净增量占成熟时纵径净增量的百分数大于宁杞1号, 而在第1次快速生长期和第2次快速生长期, 宁杞5号纵径净增量占成熟时纵径净增量的百分数却小于宁杞1号。在缓慢生长期, 宁杞5号果实净增量占成熟时果实单粒鲜重的百分数大于宁杞1号; 虽然宁杞5号的单粒重量大于宁杞1号(图1B), 但在第1次和第2次快速生长期, 宁杞5号果实净增量占成熟时果实单粒鲜重的百分数却小于宁杞1号。由此可知, 果实发育前

期, 尤其是缓慢生长期, 是宁杞5号果实大小和重量积累的关键时期。

宁杞5号果皮中的玉米素含量与果实横径和单粒重均呈显著正相关, 脱落酸含量与果实横径和单粒重均呈显著负相关; 种子中的玉米素含量与果实纵径呈显著负相关, 生长素含量与果实横径和单粒重均呈显著正相关。果实体积的增大主要取决于细胞数目的增加和细胞体积的增大, 而幼果前期的细胞分裂是构成果形指数的细胞学基础(Coffinet et al., 1984)。Cowan等(2001)认为在决定果实大小的因素中, 细胞

表4 宁杞1号和宁杞5号果实发育期间果皮和种子中内源激素含量与代谢相关酶的回归分析

Table 4 The regression analysis between endogenous hormone content and degrading enzyme activity in pericarp and seed during the development of Ningqi 1 and Ningqi 5

Different varieties	Degrading enzyme	Pericarp	Seed
Ningqi 1	PG	$Y_1=597.6467+641.2027X_4$ $F=1.0968$	$Y_1=1907.7256-209.9363X_1$ $F=2.5258$
	PE	$Y_2=0.0049+0.0014X_4$ $F=4.4527$	$Y_2=0.0091-0.0004X_1-0.0005X_3$ $F=1.5047$
	Cx	$Y_3=-3.4557-10.5468X_1+14.9505X_3-22.4446X_4$ $F=16.1956$	$Y_3=-4.0114+3.0002X_3$ $F=2.5065$
Ningqi 5	PG	$Y_1=5446.3984-1314.1490X_3$ $F=89.8244$	$Y_1=5299.5855-358.2882X_1-46.8589X_2$ $F=1.5240$
	PE	$Y_2=0.0081-0.0010X_3$ $F=10.1328$	$Y_2=0.0072-0.0004X_1$ $F=6.8216$
	Cx	$Y_3=11.1170+12.0968X_1-13.3448X_3$ $F=46.1562$	$Y_3=-21.9592+9.6253X_3$ $F=8.8950$

Y_1 : 多聚半乳糖醛酸酶; Y_2 : 果胶酯酶; Y_3 : 纤维素酶; X_1 : 玉米素; X_2 : 赤霉素; X_3 : 生长素; X_4 : 脱落酸

Y_1 : Polygalacturonase (PG); Y_2 : Pectinesterase (PE); Y_3 : Cellulase (Cx); X_1 : Zeatin (ZT); X_2 : Gibberellic acid (GA_3); X_3 : Indole acetic acid (IAA); X_4 : Abscisic acid (ABA)

数目比细胞体积更重要。由于宁杞5号果皮中玉米素的作用,使宁杞5号的横纵径和单粒重均大于宁杞1号。由图2D可知,在缓慢生长期,宁杞5号果皮和种子中的脱落酸含量均显著小于宁杞1号。研究表明,脱落酸作为生长抑制类激素具有抑制细胞伸长的作用(王忠, 2000)。由于缓慢生长期是宁杞5号果实大小和重量积累的关键时期,所以缓慢生长期低含量的脱落酸也是导致宁杞5号果实和单粒重均比宁杞1号大的原因之一。

果实细胞壁成分中90%是多糖,以纤维素、半纤维素和果胶为主。在果实成熟过程中,新的酶系的形成使果肉细胞壁果胶和半纤维素的溶解作用明显增强,导致细胞壁局部降解,细胞壁的降解是果实成熟软化的主要原因(韩碧文, 2003)。薛炳烨和束怀瑞(2004)的研究表明,肥城桃(*Prunus persica*)两品种果实中细胞壁含量随着果实发育成熟而不断下降,可溶性果胶从8月1日至16日明显增加,此时果肉硬度下降最快。冯美等(2012)在研究枸杞果实发育过程中细胞壁组分及相关酶活性的变化时发现,枸杞果实发育过程中可溶性果胶含量先上升可能是由于原果胶降解,而到绿熟期和黄熟期果胶含量逐渐下降,可能是因为部分可溶性果胶降解为果胶酸的缘故,红熟期果实完全成熟软化,此时一些高分子量、高甲氧基化的果胶多糖在果胶降解相关酶的作用下发生降解,转

变为低分子、可溶于水的果胶多糖,这是导致红熟期可溶性果胶含量升高的原因。本研究结果(图4)显示,宁杞1号从开花后29天到成熟果胶含量呈下降趋势;宁杞5号从开花后25天到成熟果胶含量基本呈下降趋势。这与冯美等(2012)的研究结果相一致。如图4所示,宁杞5号纤维素含量一直呈比较低的状态,到成熟降至最低;而宁杞1号的纤维素含量在开花后14天达最大值,此后一直下降,花后19天至成熟变化不显著。花后29天到成熟,宁杞5号中半纤维素含量急速下降,并显著低于宁杞1号中半纤维素的含量。随着果实的发育,两品种细胞壁中的纤维素和半纤维素有不同程度的损耗,进而导致果实成熟软化。

细胞壁分化的生化控制主要是酶活性的变化,控制细胞壁的酶类主要有多聚半乳糖醛酸酶(PG)(又称果胶酶)、果胶酯酶(PE)和纤维素酶(Cx)等(赵云峰等, 2006)。李春燕等(2006)研究认为,PE、PG和Cx在脐橙和伏令夏橙生长发育过程中一直存在,随着PG和PE活性的增强,果胶物质分解,果实硬度下降。曾秀丽等(2006)在研究脐橙时发现,PE动态变化显示其活性高峰出现较PG早,可能说明对果胶的水解是由PE首先启动的。本研究结果(图3)显示,宁杞1号PE活性在花后19天最高;宁杞5号PE活性则在花后14天最高。而对于PG高峰,宁杞1号出现在花后29天;宁杞5号出现在花后19天。说明对果胶的水解,两品种都是

由PE首先启动的, 随着PE活性的增加, 果胶逐渐去甲酯化, 随后PG活性增加, 两品种的果实硬度随之下降。薛炳烨等(2006)研究认为, 随着草莓(*Fragaria ananassa*)果实的成熟, Cx活性不断升高。本研究结果与之一致, 即两品种中的Cx活性从花后29天到成熟表现为急速升高, 成熟时Cx活性均达到最大值。由图3可知, PG在果实发育过程中活性最高, 充分说明了PG对枸杞果实成熟软化起着较为重要的作用。通过对宁杞1号和宁杞5号果实细胞壁成分与细胞壁代谢相关酶的相关性分析(表2)可知, 宁杞1号中PG在果实软化中可能起着相对重要的作用(PG活性与果胶含量呈显著正相关); 而PG和PE在宁杞5号果实软化中都起着相对重要的作用(PG活性与半纤维素含量呈显著负相关, PE活性与果胶含量呈极显著正相关)。

有研究认为, IAA可能使细胞壁中的Cx活性增加, 从而使连接木葡聚糖与纤维素微纤丝之间的键断裂, 细胞壁松弛, 细胞水势逐渐下降, 细胞吸水, 进而导致体积增大(陈善波, 2008)。本研究结果与之一致, 宁杞5号种子中的IAA含量与Cx活性呈显著正相关(相关系数为0.800)(表3); 而宁杞1号果皮和种子中的IAA含量与Cx活性则无显著相关性。相关研究表明, 细胞分裂素(cytokinin, CTK)可以抑制与衰老有关的PE、PG和Cx等的mRNA的合成(王忠, 2000)。这也在本研究中得到了证实。如表3所示, 宁杞5号果皮中的玉米素含量与PE活性呈显著负相关, 种子中的玉米素含量与PE活性呈显著负相关。由本实验结果可知, 宁杞1号果皮中的ABA可以促进PE的活性, GA₃含量与Cx活性的变化相反, 说明宁杞1号果实发育前期和中期果皮中高含量的GA₃对细胞壁中Cx活性有一定的抑制作用, 从而表现出果实膨大。宁杞5号果皮中的IAA与PG和PE, ZT与PE, ABA与Cx, 种子中的ZT与PE的变化均相反, 说明宁杞5号果实发育前期和中期果皮中高含量的IAA、ZT、ABA及种子中的ZT对相应的细胞壁酶有一定的抑制作用, 从而表现出细胞壁紧凑、果实膨大。这也可能是宁杞5号果实大于宁杞1号的原因之一。宁杞5号果皮中的ZT含量与Cx活性、种子中的IAA含量与Cx活性呈正相关也说明果皮中的ZT和种子中的IAA可以增强Cx活性, 进而促进果实的成熟, 而宁杞1号果皮中的ABA可以增强PE活性, 从而促进宁杞1号果实的成熟。

陈善波(2008)对早蜜梨发育期间内源激素与细

胞壁活性变化的研究显示, IAA和GA₃调控PG活性的增强, ABA、GA₃和ZT促进PE活性的增强, IAA和ABA调控Cx活性的增强。本实验通过逐步回归分析, 发现宁杞1号中的PG活性受果皮中的ABA和种子中的ZT调控, PE活性受果皮中的ABA和种子中的IAA和ZT调控, Cx活性受果皮中的ZT、IAA、ABA和种子中的IAA调控; 宁杞5号中的PG活性受果皮中的IAA和种子中的ZT和GA₃调控, PE活性受果皮中的IAA和种子中的ZT调控, Cx活性受果皮中的ZT和IAA及种子中的IAA调控。

参考文献

- 陈杰忠, 周碧燕 (2002). 植物激素与果实生长发育的关系研究概述. 见: 中国园艺学会第五届青年学术讨论会论文集. 广州: 中国园艺学会第五届青年学术讨论会. pp. 43–50.
- 陈善波 (2008). 早蜜梨果实发育期间内源激素与细胞壁酶活性变化的研究. 硕士论文. 都江堰: 四川农业大学. pp. 41–43.
- 冯美, 张宁, 张锦涛, 张宏宝, 刘听利 (2012). 枸杞果实发育过程中细胞壁组分及相关酶活性的变化. 西北林学院学报 **27**, 40–42.
- 高俊凤 (2006). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社. pp. 205–207.
- 韩碧文 (2003). 植物生长与分化. 北京: 中国农业大学. pp. 2–23, 226–244.
- 韩雅珊 (1992). 食品化学实验指导. 北京: 北京农业大学出版社. pp. 33–33.
- 李春燕, 张光伦, 曾秀丽, 罗楠, 胡强 (2006). 细胞壁酶活性与甜橙果实质地的相关性研究. 四川农业大学学报 **24**, 73–76.
- 路安民, 王美林 (2003). 关于中药现代化中的物种鉴定问题——基于枸杞分类和生产问题的讨论. 西北植物学报 **23**, 1077–1083.
- 朴一龙, 赵兰花, 薛桂新 (2006). 梨果实在贮藏过程中细胞壁成分的变化. 果树学报 **23**, 880–883.
- 孙志刚 (2001). 宁夏枸杞药理研究进展. 西北药学杂志 **16**, 133–135.
- 王忠 (2000). 植物生理学. 北京: 中国农业出版社. pp. 264–294.
- 薛炳烨, 毛志泉, 束怀瑞 (2006). 草莓果实发育成熟过程中糖苷酶和纤维素酶活性及细胞壁组成变化. 植物生理与分子生物学学报 **32**, 363–368.

- 薛炳烨, 束怀瑞 (2004). 肥城桃两品种果实细胞壁成分和水解酶活性的比较. 园艺学报 31, 499–501.
- 闫师杰, 郭李维, 吴彩娥, 梁丽雅, 王继栋, 张丽娜 (2010). 高效液相色谱法同时测定鸭梨种子中3种内源激素. 分析化学 6, 843–847.
- 曾秀丽, 张光伦, 李春燕, 罗楠, 胡强 (2006). 三个脐橙品种果实主要细胞壁酶动态变化研究. 亚热带植物科学 35, 12–16.
- 张飞, 岳田利, 费坚, 袁亚宏, 高振鹏 (2004). 果胶酶活力的测定方法研究. 西北农业学报 13, 134–137.
- 张进献, 李冬杰, 张广华, 李青云, 葛会波 (2006). 不同钙处理对采后草莓果实细胞壁酶活性、果胶含量的影响. 北方园艺 (2), 24–26.
- 张瑞萍 (2002). 纤维素酶的滤纸酶活和CMC酶活的测定. 印染助剂 5, 51–53.
- 赵云峰, 林河通, 林娇芬, 陈绍军 (2006). 果实软化的细胞壁降解酶及其调控研究进展. 仲恺农业技术学院学报 19, 65–70.
- Coffinet MC, Robinson TL, Lakso AN (1984). A comparison of 'Empire' apple fruit size and anatomy in unthinned and handthinned trees. J Hort Sci 70, 375–378.
- Cowan AK, Cripps RF, Riehings EW, Taylor NJ (2001). Fruit size: towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. Physiol Plant 111, 127–136.
- Huber DJ (1983). The role of cell wall hydrolases in fruit softening. Hort Rev 5, 169–219.

Changes in Endogenous Hormone Contents and Cell Wall Component, Degrading Enzyme Activity and Their Relation in *Lycium barbarum*

Xiaowan Yang¹, Guoqi Zheng^{2*}, Juan Yang², Xing Xu¹, Di Lu¹, Le Yang¹

¹College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; ²College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract Using high-performance liquid chromatography, we examined the relationship between the content of endogenous hormones (zeatin [ZT], gibberellic acid [GA₃], indole acetic acid [IAA], abscisic acid [ABA]) during fruit growth and development in *Lycium barbarum* Ningqi 1 and Ningqi 5. The diameter, length, and single-fruit weight were greater in Ningqi 5 than Ningqi 1; the early stage of fruit development, especially in the slow growth period, was a critical period for Ningqi 5 and could increase fruit size and weight. In Ningqi 1, IAA content in seeds was positively correlated with diameter and single-fruit weight and length. In Ningqi 5, ZT content in pericarp and IAA content in seeds was positively correlated with diameter and single-fruit weight. ZT can promote cell division, and in fruit growth, the cell number is more important than the cell size. In the slow-growth period (8–25 d), the content of ABA in the pericarp and seed was lower in Ningqi 5 than Ningqi 1, which explains the greater diameter, length and single-fruit weight of Ningqi 5 than Ningqi 1. The changes in GA₃ and cellulase (Cx) were opposite, which indicated that Cx activity was inhibited by the high content of the pericarp GA₃ in prophase and metaphase in Ningqi 1, thus showing fruit swelling. The changes of IAA in pericarp and polygalacturonase (PG), pectinesterase (PE), ZT and PE, ABA and Cx, ZT in seeds and PE were opposite. As well, in prophase and metaphase of Ningqi 5, the high content of IAA, ZT and ABA in the pericarp and ZT in seeds could promote fruit expansion, which explains the larger fruit size in Ningqi 5 than Ningqi 1. In Ningqi 5, ZT content in the pericarp and IAA content in seeds could enhance the activity of Cx. In Ningqi 1, ABA content in the pericarp could enhance the activity of PE, then promote the maturation of fruit.

Key words *Lycium barbarum* cv. Ningqi No.1, *Lycium barbarum* cv. Ningqi No.5, endogenous hormone, fruit shape index, cell wall components, degrading enzyme activity

Yang XW, Zheng GQ, Yang J, Xu X, Lu D, Yang L (2014). Changes in endogenous hormone contents and cell wall component, degrading enzyme activity and their relation in *Lycium barbarum*. Chin Bull Bot 49, 30–40.

* Author for correspondence. E-mail: zhengguoqi1977@163.com

(责任编辑: 白羽红)