

# 1-MCP 处理对桃果实成熟软化及其 $\alpha$ -阿拉伯呋喃糖苷酶活性和基因表达的影响

阚娟, 刘俊, 金昌海

(扬州大学食品科学与工程, 江苏扬州 225127)

**摘要:** 本研究以软溶质型桃果实‘雨花三号’和硬溶质型桃果实‘加纳岩’为材料, 研究了 1-甲基环丙烯(1-MCP) 处理对两种不同溶质型桃果实成熟软化过程中的基本生理变化及细胞壁多糖降解相关的重要酶  $\alpha$ -阿拉伯呋喃糖苷酶的影响, 为进一步研究核果类果实成熟软化机理提供理论依据。主要研究结果如下: 1-MCP 有效延缓了‘雨花三号’和‘加纳岩’桃果实硬度的下降, 抑制了‘雨花三号’贮藏前 8 d 的乙烯释放, 对‘加纳岩’乙烯释放的抑制主要表现在贮藏 4 d 后。1-MCP 处理后对不同溶质型桃果实呼吸速率具有一定的抑制作用, 但对‘雨花三号’的抑制表现在贮藏前 10 d, 而对‘加纳岩’的抑制表现在贮藏 6 d 后。1-MCP 处理后  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因和酶活性受到抑制, 对‘雨花三号’和‘加纳岩’桃果实贮藏 6 d 和 12 d 时酶活性的抑制率均达 50% 左右, 果实软化延迟, 进一步证明  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶作用于细胞壁的降解受乙烯调控。

**关键词:** 桃; 软化; 细胞壁; 乙烯;  $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶

文章编号: 1673-9078(2014)10-42-46

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.008

## Effect of 1-Methylcyclopropene Treatment on Peach Softening and $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase Activity and Gene Expression

KAN Juan, LIU Jun, JIN Chang-hai

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

**Abstract:** In this study, ‘Yuhuasanhao’ (melting-flesh) and ‘Jianayan’ (non-melting-flesh) peach cultivars were used to study the effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on the basic physiological changes and activity of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (an important enzyme related to the degradation of cell wall polysaccharides) during the softening of the peach fruit. This study could provide a theoretical basis for further study of the ripening mechanism of drupe fruits. The main results were as follows: 1-MCP effectively delayed the decline of peach firmness and inhibited ethylene release during the first eight days of storage for ‘Yuhuasanhao’ and after four days of storage for ‘Jianayan’ cultivars. 1-MCP treatment showed a certain inhibitory effect on the respiration rate of different flesh types of peaches, which were observed during the first ten days of storage for ‘Yuhuasanhao’ variety, but after six days of storage for ‘Jianayan’ variety. 1-MCP treatment led to inhibition of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase translation and enzyme activity, and the inhibition rate after six days of storage for ‘Yuhuasanhao’ and 12 days of storage for ‘Jianayan’ was 50%. Peach fruit softening was delayed, further demonstrating that the role of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase on cell wall degradation was regulated by ethylene.

**Key words:** peach; softening; cell wall; ethylene;  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase

桃属于典型的呼吸跃变型果实, 成熟过程伴随着呼吸速率和乙烯释放量的增加。乙烯刺激了细胞代谢的改变, 对成熟果实的质地有一定的作用, 尤其对调节溶质型桃果实硬度的下降有明显的作[1]。1-MCP

收稿日期: 2014-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101586); 江苏省科技计划项目资助(BC2013401); 江苏省自然科学基金项目(BK2010310)

作者简介: 阚娟(1980-), 女, 博士, 讲师, 研究方向农产品贮藏与加工

通讯作者: 金昌海(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为农产品贮藏与加工

(1-methylcyclopropene, 1-甲基环丙烯)是乙烯作用的抑制剂, 其与乙烯受体的结合能力是乙烯自身的10倍以上, 在许多跃变型果实中阻止了乙烯引起的成熟作用, 但在不同品种中这种作用有所差异。通过对杏<sup>[2]</sup>、香蕉<sup>[3]</sup>、李<sup>[4]</sup>和苹果<sup>[5]</sup>等果实的研究表明, 1-MCP处理可提高跃变型果实的贮藏品质, 能较好的保持桃和油桃采后果实的硬度和酸度。近年来, 对1-MCP在桃果实采后贮藏的应用研究也逐渐深化, 在桃贮藏上的处理时间、浓度、方法与作用机理探讨始终不断。但是迄今缺乏对1-MCP对不同桃品种作用的综合比较。

$\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (EC 3.2.1.55;  $\alpha$ -Af) 属于水解酶家族, 作用于细胞壁中阿拉伯糖残基, 导致许多果实成熟过程中阿拉伯糖含量显著下降, 如日本梨<sup>[6]</sup>等。桃果肉细胞壁的中性糖中阿拉伯糖含量仅次于半乳糖醛酸, 以支链形式与细胞壁多聚体成分共价连结。 $\alpha$ -Af是通过作用于阿拉伯半乳糖等支链多聚体参与细胞壁多糖降解的重要酶。已有研究表明, 乙烯在 $\alpha$ -Af基因的表达过程中起重要作用, 乙烯能影响 $\alpha$ -Af mRNA的翻译或激活 $\alpha$ -Af原蛋白, 可能伴随着与成熟相关的PG等基因的表达<sup>[7]</sup>。桃果实 $\alpha$ -Af的激活可能与果实内源乙烯积累密切相关。但对 $\alpha$ -Af在不同溶质型桃果实成熟软化中的作用以及其与乙烯生物合成的关系还需进一步的研究。

本文以‘雨花三号’和‘加纳岩’两种溶质型桃为研究材料, 应用1-MCP处理不同溶质型桃果实, 揭示1-MCP处理后桃果实的成熟和软化特性的改变。同时研究了1-MCP处理后桃果实软化与 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性和基因表达之间的关系, 探明不同溶质型桃果实细胞壁代谢中重要酶与果实软化之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

供试品种软溶质型‘雨花三号’水蜜桃果实和硬溶质型‘加纳岩’桃果实。本试验选取‘雨花三号’和‘加纳岩’适熟期一部分材料以7~8个为单位, 装在聚乙烯薄膜塑料袋中, 20℃(95%以上的相对湿度)贮藏。实验处理包括: (1) 对照, 在20℃下密闭处理24h; (2) 20℃下用1  $\mu$ L/L 1-MCP (SmartFresh<sup>TM</sup>, Rohm and Hass 公司惠赠) 密闭处理24h。处理后的果实于20℃下贮藏0、2、4、6、8、10、12d后取果肉部分切成小块, 用液氮处理后装在聚乙烯薄膜塑料袋中, 并保存在-75℃超低温冰箱中用于分析实验。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 果实硬度的测定

采用GY-1型果实硬度计测定(调头直径3.5mm), 单位以N计算。每个果实胴部不同部位对称均匀选取六个点, 每次测量6个果实, 均匀取平均值。

#### 1.2.2 果实总可溶性固形物含量的测定

采用阿贝折射仪测定。

#### 1.2.3 乙烯释放量的测定

参照Jin等<sup>[8]</sup>方法进行。

#### 1.2.4 呼吸速率的测定

采用静置法。

#### 1.2.5 $\alpha$ -Af活性的测定

参照Jin等<sup>[7]</sup>的方法。

#### 1.2.6 桃果实总RNA提取

参照Lee等<sup>[9]</sup>方法。

#### 1.2.7 $\alpha$ -Af基因的RT-PCR和荧光定量PCR (real-time PCR)

参考Carolina<sup>[10]</sup>等方法, 根据NCBI网站上 $\alpha$ -Af基因序列信息(DQ486870.3), 用Primer premier5.0软件设计引物, RT-PCR特异性引物 $\alpha$ -Af (5'-CTTGCTGCTGCGAACATTAT-3'和5'-AAAAG CCTTGGA CCACTAC-3'); Actin (5'-GATTCTGGTG ATGGTGTGAGTCA-3'和5'-GAGAGATGGCTGGAA GAGGAC TT-3')用于内参基因。

荧光定量PCR引物 $\alpha$ -Af (5'-CGTCGAAGGTGA ATGGCTAC-3'和5'-CCAAGGTCCTCTGCTAGTTG-3'), Actin (5'-GGATTCTGGTGATGGTGTGA-3'和5'-CCAGCTCTTGTCTCGTAGTC A-3')用于内参基因。ABI7300荧光定量仪。Takara荧光定量试剂盒。

#### 1.2.8 数据分析

数据分析采用SPSS软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 1-MCP处理对桃果实采后贮藏过程中硬度变化的影响

由图1可知, 经1-MCP处理明显抑制了采后贮藏过程中桃果实硬度的下降。1-MCP处理的‘雨花三号’桃果实贮藏过程中硬度快速下降, 然而对照组的‘雨花三号’桃果实采后贮藏的2d内硬度迅速下降, 贮藏8天之后1-MCP处理的桃果实与对照组桃果实有着相似的果实硬度。可见, 经1-MCP处理明显延迟了‘雨花三号’桃果实硬度的下降, 但对果实的最终软化程度影响不明显。1-MCP对‘雨花三号’硬度的效应主要表现在果实的快速软化阶段(0~8d), 即可以明显延缓快速软化阶段的果实后熟软化进程。

硬溶质型桃果实‘加纳岩’在贮藏前期果实硬度下降幅度很小, 在后期发生急剧的下降, 1-MCP处理明显抑制了‘加纳岩’桃果实贮藏中后期硬度的下降( $p<0.05$ )。

### 2.2 1-MCP处理对桃果实采后贮藏过程中总可溶性固形物变化的影响

1-MCP处理后对两种溶质型桃果实采后贮藏过

程中 TSS 的影响较小。在 1-MCP 处理的‘雨花三号’和‘加纳岩’桃果实与非处理果之间 TSS 没有显著差异(图 2)。

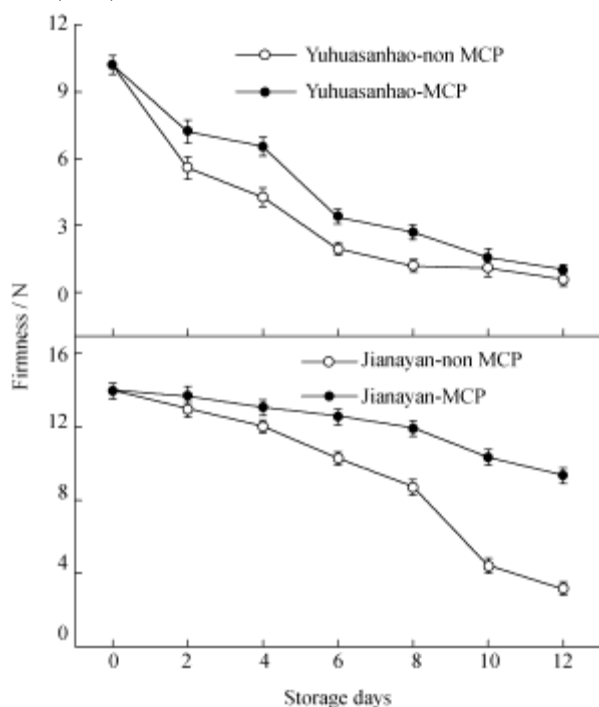


图 1 1-MCP 对桃果实采后贮藏过程中硬度的影响

Fig.1 Effect of 1-MCP on firmness of peaches during postharvest storage

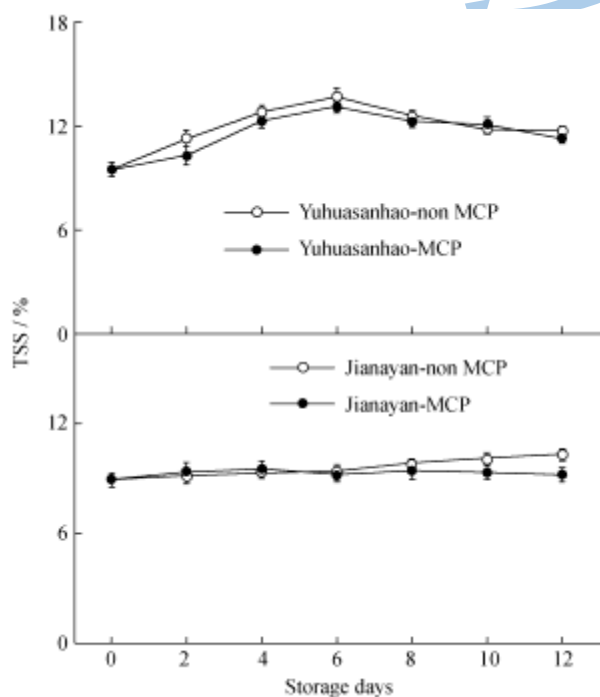


图 2 1-MCP 对桃果实采后贮藏过程中总可溶性固形物的影响

Fig.2 Effect of 1-MCP on TSS of peaches during postharvest storage

### 2.3 1-MCP 处理对桃果实采后贮藏过程中呼

### 吸速率的影响

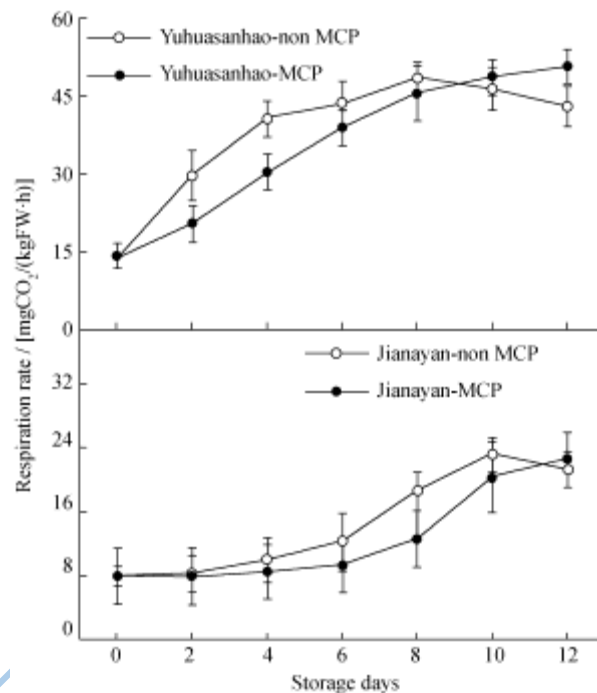


图 3 1-MCP 对桃果实贮藏过程中呼吸速率的影响

Fig.3 Effect of 1-MCP on respiration rate of peaches during postharvest storage

由图 3 可知,经 1-MCP 处理的‘雨花三号’桃果实贮藏过程中呼吸速率水平总体上明显低于对照组。可见 1-MCP 处理对‘雨花三号’桃贮藏前 8 d 呼吸速率的增加具有明显的抑制作用 ( $p < 0.05$ )。1-MCP 处理明显抑制了硬溶质型‘加纳岩’桃果实贮藏 2 至 10 d 过程中呼吸速率的上升 ( $p < 0.05$ )。

### 2.4 1-MCP 处理对桃果实采后贮藏过程中乙烯释放量的影响

从图 4 可见,1-MCP 处理的两种桃果实乙烯释放量与对照果均呈现相似的变化趋势。对‘雨花三号’桃果实,1-MCP 处理显著抑制了贮藏期桃果实的乙烯释放量,但并未推迟乙烯跃变峰值的出现,抑制效应主要表现在贮藏前期和中期 ( $p < 0.05$ )。对‘加纳岩’桃果实,1-MCP 处理对乙烯释放的抑制效应主要表现在贮藏中后期 ( $p < 0.05$ )。

### 2.5 1-MCP 处理对桃果实采后贮藏过程中 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性和基因表达的影响

1-MCP 处理抑制了‘雨花三号’桃果实贮藏过程中  $\alpha$ -Af 活性,且对贮藏前期和中期的抑制效果比较明

显。‘加纳岩’桃果实贮藏后期  $\alpha$ -Af 活性迅速上升，1-MCP 明显抑制了贮藏中后期  $\alpha$ -Af 活性，尤其在贮藏后期抑制效果显著 ( $p < 0.05$ )，对“雨花三号”和“加纳岩”桃果实贮藏 6 d 和 12 d 时酶活性的抑制率均达 50% 左右。对  $\alpha$ -AF 基因表达的研究表明，1-MCP 处理后对两品种桃果实中  $\alpha$ -AF 基因的表达都表现出抑制作用，与活性变化趋势相一致，1-MCP 处理对‘雨花三号’桃果实贮藏过程中  $\alpha$ -AF 基因的抑制作用主要表现在前期和中期，而对‘加纳岩’桃果实中  $\alpha$ -AF 基因的抑制作用主要表现在贮藏后期 ( $p < 0.05$ )。

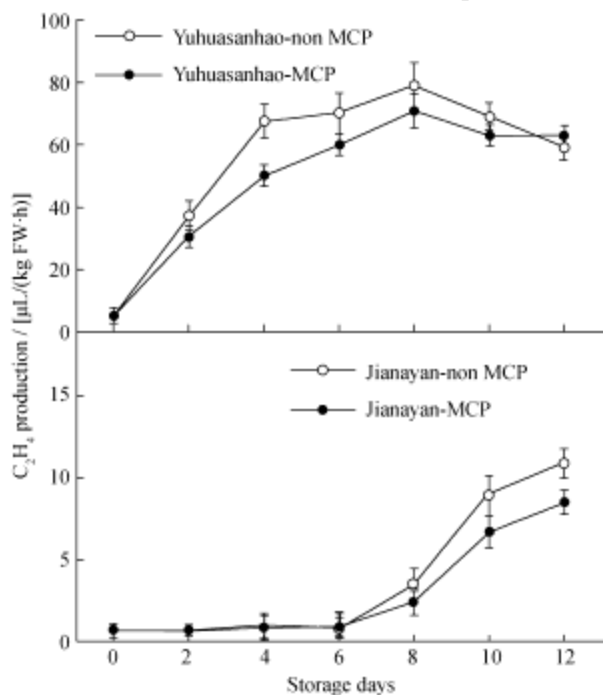


图 4 1-MCP 对桃果实贮藏过程中乙烯释放量的影响

Fig.4 Effect of 1-MCP on ethylene release of peaches during postharvest storage

### 3 结论

3.1 有研究证明，1  $\mu$ L/L 1-MCP 处理可显著延长桃果实贮藏期<sup>[11]</sup>。本研究中 1-MCP 在室温 (20  $^{\circ}$ C) 下处理两种类型桃果实 24 h 后，有效延缓了桃果实成熟过程。贮藏过程中呼吸速率和乙烯释放被抑制，果实软化过程被延迟。相似的结果在 Hayama<sup>[12]</sup>对桃的研究中也被证实。

3.2 本研究中在桃果实色泽转变期用 1-MCP 处理的桃果实与非处理果相比显著抑制了呼吸速率和乙烯释放量，但对两个品种的显著抑制期有一定差异，对软溶质型品种‘雨花三号’的显著抑制效应主要表现在贮藏前期和中期，而对硬溶质型‘加纳岩’主要表现在贮藏后期(图 3、图 4)。1-MCP 先与乙烯受体相结合，随后阻止乙烯的反应。随着时间推移，果实开始启动

或恢复乙烯生成。因此，果实通过增加新的乙烯受体位点的数量或 1-MCP 从受体上解离来恢复乙烯敏感性。桃果实经 1-MCP 处理后 TSS 与非处理果相比无显著不同，这与 Ergun 等<sup>[13]</sup>的报道相一致。

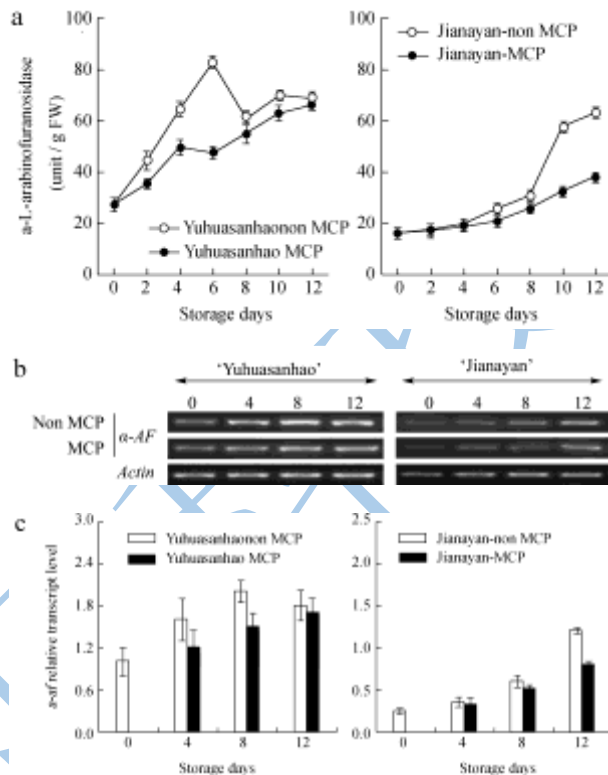


图 5 1-MCP 对桃果实采收后贮藏过程中 a-L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性和基因表达的影响

Fig.5 Effects of 1-MCP on a-AF activity and the expression of a-AF gene

Note: a: a-AF activity; b: RT-PCR analysis of a-AF expression; c: Quantitative real-time PCR analysis of the transcript level of a-AF gene, using Actin expression level as the control.

3.3 1-MCP 能不同程度的抑制 PG、PME、 $\beta$ -Gal 及纤维素酶的活性，这些酶均与果实成熟软化及乙烯诱导的衰老进程密切相关。每种酶在成熟过程中都表现了不同的活性模式。从前期的研究中发现， $\alpha$ -Af 可能是桃果实软化的关键酶<sup>[7]</sup>。本研究中，在桃果实软化开始就能检测到  $\alpha$ -Af 活性的增加，同时呼吸速率和乙烯释放开始增加。在果实呼吸跃变前用 1-MCP 处理，两种类型的桃果实硬度的下降均被显著延缓 (图 1)，同时，1-MCP 处理果实中  $\alpha$ -Af 活性和基因表达被抑制 (图 5)。在软化的果实中检测到了更高的  $\alpha$ -Af 活性和基因表达量 (图 5)。但对两种桃果实的显著抑制时期有所不同，‘雨花三号’桃果实，贮藏前期和中期抑制效果明显，而对‘加纳岩’桃果实，贮藏后期效果较明显。本研究结果表明，软化过程中  $\alpha$ -AF 基因表达和活性受乙烯调节。

3.4 桃果实经 1-MCP 处理后表现出软化延迟。然而，



软化速率的增加和  $\alpha$ -AF mRNA 表达和活性水平没有一定的相关性。有研究认为果实软化相关的关键酶如  $\alpha$ -Af (本文中研究) 可能在 1-MCP 处理后活性得不到完全恢复。然而, 1-MCP 处理果的硬度在后期的成熟阶段与非处理果相比略高<sup>[14]</sup>。这与本文的研究结果相一致。

3.5 有研究表明 1-MCP 处理后果实成熟过程中会表现出不寻常的软化和胶状质地。也有研究认为 1-MCP 处理果中  $\alpha$ -Af 被抑制会导致果实胶状质地的出现。

Huber<sup>[15]</sup>认为 1-MCP 处理后果实的软化模式在数量和质量上与正常成熟的果实相比有所不同, 在本研究中也发现了同样的结果。本研究结果表明, 在桃果实成熟过程中, 受乙烯调节的  $\alpha$ -Af 的协调作用在很大程度上是不可逆转的破坏。因此, 桃果实达到正常的硬度水平需要  $\alpha$ -Af 的参与, 且  $\alpha$ -Af 的缺失可能造成果实的胶状质地。1-MCP 处理后  $\alpha$ -Af 对软化的作用还需通过其他成熟阶段进一步研究证实。1-MCP 处理果用外源乙烯处理可作为解释 1-MCP 如何影响乙烯调节的桃果实软化的另一种途径。

#### 参考文献

- [1] Hayama H, Shimada T, Fujii H, et al. Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 4071-4077
- [2] Martino GD, Vizovitis K, Botondi R, et al. 1-MCP controls ripening induced by impact injury on apricots by affecting SOD and POX activities [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 39(1): 38-47
- [3] Gupta SM, Srivastava S, Aniruddha PS, et al. Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: Presence of distinct fruit specific, ethylene induced and ethylene repressed expression [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 42(1): 16-22
- [4] Khan AS, Singh Z. 1-MCP application suppresses ethylene biosynthesis and retards fruit softening during cold storage of 'Tegan Blue' Japanese plum [J]. *Plant Science*, 2009, 176(4): 539-544
- [5] Marin AB, Colonna AE, Kudo K, et al. Measuring consumer response to 'Gala' apples treated with 1-methylcyclopropene (1-MCP) [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 51(1): 73-79
- [6] Tateishi A, Mori H, Watari J, et al. Isolation, characterization, and cloning of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of Japanese pear [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(3): 1653-1664
- [7] Jin CH, Kan J, Wang ZJ, et al. Activities of b-galactosidase and a-l-arabinofuranosidase, ethylene biosynthetic enzymes during peach ripening and softening [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2006, 30: 515-526
- [8] Jin CH, Kashiwagi T, Mizuno M, et al. Structural changes in the cell wall pectic polysaccharides accompanied by softening of apple (*Malus pumila* Mill) cultivars Fuji and Kinsei [J]. *Food Preservation Science*, 1999, 25: 293-300
- [9] Meisel L, Fonseca B, González S, et al. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for Functional genomics analyses [J]. *Biological Research*, 2005, 38: 83-88
- [10] Carolina Di, Santo M1, Pagano EA, et al. Differential expression of alpha-l-arabinofuranosidase and alpha-l-arabinofuranosidase/beta-d-xylosidase genes during peach growth and ripening [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2009, 47(7): 562-569
- [11] Ortiz A, Graell J, López ML, et al. Volatile ester-synthesising capacity in 'Tardibelle' peach fruit in response to controlled atmosphere and 1-MCP treatment [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123: 698-704
- [12] Hayama H, Tatsuki M, Nakamura Y. Combined treatment of aminoethoxy vinylglycine (AVG) and 1-methylcyclopropene (1-MCP) reduces melting-flesh peach fruit softening [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 50(3): 228-230
- [13] Ergun M, Huber DJ. Suppression of ethylene perception extends shelf-life and quality of 'Sunrise Solo' papaya fruit at both preripe and ripe stages of development [J]. *European Journal of Horticultural Science*, 2004, 69: 184-192
- [14] Jeong J, Huber DJ, Sargent SA. Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea Americana*) fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 25: 241-256
- [15] Huber DJ, Hurr B M, Lee J S, et al. 1-Methylcyclopropene sorption by tissues and cell-free extracts from fruits [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 56: 123-130