

套袋促进荏梨果实色素的合成及 上调 *PbcrtZ* 基因的表达

李倩, 李铭桐, 王彩虹, 王玉玲, 杨绍兰
(青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109)

摘要: 通过测定花后不同时期套袋荏梨果实的外观品质和贮藏期间果实的失重率, 确定荏梨最佳套袋时期为花后 60 d。以花后 60 d 套袋的荏梨果实为试材, 分析了塑膜袋和无纺布袋处理的果实果皮中叶绿素含量、类黄酮含量和类胡萝卜素含量以及色泽相关差异基因 *PbcrtZ* 基因的表达模式。套塑膜袋和无纺布袋的荏梨果实发育阶段的叶绿素含量明显低于未套袋果实, 而类黄酮含量以及类胡萝卜素含量在花后 180 d 明显高于未套袋果实。*PbcrtZ* 基因在套塑膜袋和无纺布袋果实中的表达明显高于未套袋果实, 花后 180 d 分别为对照的 4.36 倍和 3.48 倍, 与类胡萝卜素含量和类黄酮含量差异一致。因此, 塑膜袋和无纺布袋套袋果实色泽呈黄绿色, 未套袋果实呈现绿色, 其中无纺布袋处理的果实外观品质和贮藏性明显优于塑膜袋套袋果实。

关键词: 荏梨; 套袋; 色泽; 色泽相关差异基因 *PbcrtZ*

文章编号: 1673-9078(2018)04-102-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.017

Bagging on Pigment Synthesis and Expression of *PbcrtZ* in 'Chili' Fruit

LI Qian, LI Ming-tong, WANG Cai-hong, WANG Yu-ling, YANG Shao-lan
(College of horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The best bagging time of Chili pear was 60 d after anthesis by determining the appearance quality and the weight loss rate during the storage period. The Chili pear fruit, which was bagged at 60 d after anthesis, was used as the material, and the contents of chlorophyll, flavonoids, carotenoids and the expression of the color-related difference gene *PbcrtZ* were determined in fruit peels treated with plastic fabrics and non-woven bags. The results showed that the content of chlorophyll in non-woven fabric and plastic bagged developmental Chili fruits was significantly lower than that in non-bagged fruits, and the contents of flavonoid and carotenoid were significantly higher than those of non-bagged fruits on 180 d after anthesis. In addition, the expression of *PbcrtZ* in non-woven fabric and plastic bagged fruits were higher than that in non-bagged fruits, and the expression on 180 d after anthesis was 4.36 and 3.48 times higher than that of the control group, which was in according with the difference of flavonoid content and carotenoid content. Consequently, the color of the fruits treated with non-woven fabrics and plastic bags was green-yellow and the non-bagged fruit showed a green color, and the fruits treated with non-woven fabrics showed better appearance quality and storage property.

Key words: Chili pear; bagging; color; *PbcrtZ*

荏梨, 又名莱阳荏梨、莱阳慈梨, 俗称莱阳梨, 是白梨系统中的优良品种, 主要栽培于山东莱阳地区, 是山东普遍栽培的白梨系统中的优良品种^[1]。其果肉汁多、肉白、细腻且果皮薄, 底色为黄绿色, 品质极佳。但荏梨果实的表面粗糙, 光泽暗淡, 果点大而明显, 呈深褐色, 易连片呈锈, 影响其外观品质。且在

收稿日期: 2017-11-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201608); 山东省现代农业产业技术体系果品产业创新团队项目 (SDAIT-06-06)

作者简介: 李倩 (1990-), 女, 在读硕士, 研究方向: 果实采后生理与分子生物学

通讯作者: 杨绍兰 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果实采后生理与分子生物学

梨在常温下耐藏性较差, 降低商品价值, 从而一定程度上限制了其在市场中的竞争力。

套袋是减少有害物质污染和提高果实外观品质的有效栽培措施之一^[1,2]。刁传芸等研究表明, 对梨进行套袋处理, 可有效地降低氯氰菊酯和高效氯氰菊酯的使用浓度, 并有效地降低了此类农药在梨果皮中的残留量^[3]。目前果园所用果袋材质大多为单层袋、双层袋、塑膜袋和液膜袋^[4]。黄春辉等在比较不同套袋处理对翠冠梨的影响中发现, 套袋可有效地改善翠冠梨的外观品质, 套袋后的翠冠梨不仅色泽饱满, 果面平滑光洁, 锈斑也明显减少, 其中以双层透光蜡纸袋效果最好, 其在不改变果实鲜质量的条件下, 有效地降低了石细胞的含量^[5]。张振铭等研究表明, 套袋可显

著改善砀山酥梨的外观品质,以双层袋效果最好,但是也对果实内在品质产生了一定的负面影响,如果实生长发育微环境(光、湿、气和热等)的改变可使果实的内在品质如糖、酸、硬度和石细胞等受到不同程度的影响^[6],其它相关研究也证明了套袋会影响果实的内在品质,而且不同材质的果袋对果实的影响不同^[2,7-9]。无纺布袋是最近几年推广的一种新材料果袋,其具有良好的透气、防水和透光性能,是一种能降解的新型环保材料。滕玉柱等认为,与纸袋相比,无纺布袋能明显提高葡萄浆果的综合品质,显著改善“红地球”和“玫瑰香”的果实色泽,且可溶性固形物、花青苷和维生素C的含量均有显著提升,而炭疽和白腐等病果率显著下降^[10]。

采前套袋能够明显改善果实的色泽形成。而影响果实色泽形成的主要途径有三类,包括叶绿素合成代谢途径、类黄酮合成代谢途径和类胡萝卜素合成代谢途径^[11-13]。目前荏梨果实套袋采用较多的为价格较低的绿色塑膜袋,因此,本试验选取新型无纺布袋和常用塑膜袋套袋处理,以期探明荏梨果实不同色泽形成机理。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于2013年在山东莱阳进行,分别于6月13日(花后60 d, 60 DAA)、6月18日(花后65 d, 65 DAA)和6月23日(花后70 d, 70 DAA)进行不同果袋套袋处理,果袋为塑膜袋和无纺布袋,其透光率分别为88.76%和66.47%,以不套果袋处理为对照。于2013年10月6日采收后立即运回实验室,去袋,选取无机械损伤和成熟度相对一致的果实,预冷后置于温度 $1\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷库中进行贮藏试验,每隔30 d取果一次。

1.2 试验方法

1.2.1 失重率的测定

失重率/ $\% = [(\text{采收时重量} - \text{贮后重量}) / \text{采收时重量}] \times 100\%$

1.2.2 叶绿素含量的测定

参照房贤一等的方法进行^[14]。

1.2.3 类胡萝卜素含量的测定

称取0.20 g样品放入研钵中,加入2~3 mL 95%乙醇,研成匀浆,再加95%乙醇10 mL,继续研磨至组织变白,静置3~5 min。过滤,并用95%乙醇定容至25 mL。用分光光度计(岛津UV-120)在665 nm、

649 nm、470 nm处分别测定提取液的吸光度值。

1.2.4 类黄酮含量的测定

参照Jia等的方法进行^[15]。

1.2.5 qRT-PCR检测

通过在线Primer3.0进行qRT-PCR引物设计。引物序列为PbertZup: GAGAGGCTGTGCGA GGAAGAA; PbertZdp: GCAGCACCAACAGATAG AGC,由上海生工生物工程股份有限公司合成。反应体系和程序参照Lu等^[16]。计算方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16,17]。每个样品进行3次RNA提取,每个RNA样品进行3次qRT-PCR重复。

1.2.6 统计分析方法

采用Origin 6.0软件(Microca Software Inc.,美国)进行数据处理和作图,采用DPS(Version 7.05,中国)软件进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 不同套袋时间及套袋材质的处理对荏梨果实外观品质的影响

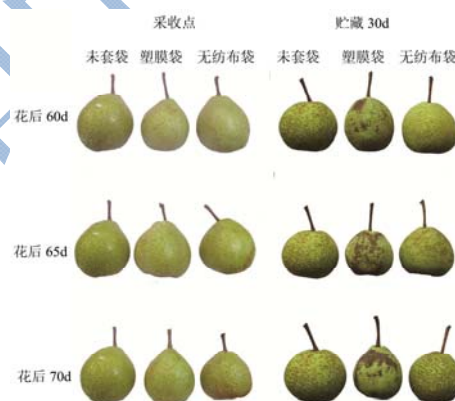


图1 不同套袋时间对荏梨果实采收点和贮藏期果实外观品质的影响

Fig.1 Effects of different bagging time on the appearance quality of Chili pear with different harvest day and storage time

荏梨果实采收时,花后60 d套袋和花后65 d套袋的果实表现出较好的外观品质,与未套袋果实相比,果实呈黄绿色、果点小、表面光洁细嫩、色泽鲜亮,而花后70 d套塑膜袋的荏梨果实色泽较淡,且套无纺布袋的果实果点易连片成锈。贮藏30 d后,套塑膜袋的荏梨果实皆出现黑皮病,且发病程度随着套袋时间推迟而加重。花后60 d无纺布袋处理的荏梨果实外观品质较佳,花后65 d和70 d套袋处理的荏梨果实表现出不同程度的失水及果点突出现象(图1)。

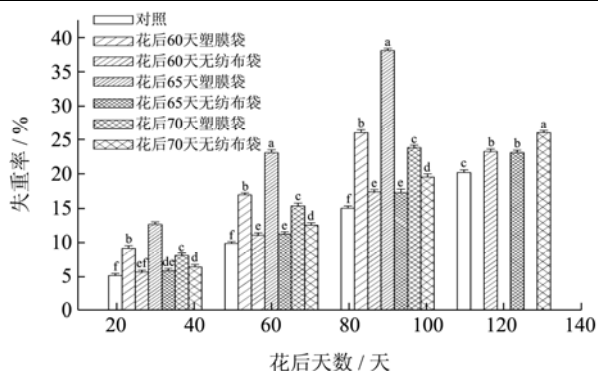


图2 不同套袋时间对荏梨果实贮藏过程中失重率的影响

Fig.2 Effects of different bagging time on the weight loss rate of Chili pear fruit during the storage period

注: 图中字母不同, 表示差异显著($p < 0.05$)。

随着贮藏时间的延长, 荏梨果实失重率呈逐渐升高的趋势, 其中以塑膜袋处理的失重率最高, 无纺布袋处理的失重率与对照无显著差异, 明显低于塑膜袋处理(图2)。塑膜袋处理的荏梨果实耐贮性最差, 于贮藏120d全部发生黑皮病, 失去商品价值。由不同套袋时间果实的失重率可知, 花后70d套袋处理的果实, 在贮藏过程中失重率最高, 花后60d处理的果实失重率最低, 最耐贮藏。

由图1和图2可知: 荏梨果实在花后60d进行无纺布袋套袋处理效果最好, 色泽鲜亮、呈黄绿色、果点小、无锈且果面光洁细嫩, 同时较耐贮藏, 失重率低。

2.2 不同套袋处理对荏梨果实发育阶段叶绿素含量的影响

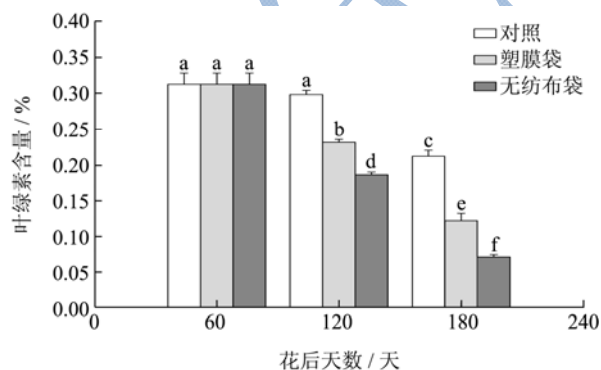


图3 不同套袋处理对果实果皮叶绿素含量的影响

Fig.3 Effects of different bagging treatments on the chlorophyll content in Chili pear peels

注: 图中字母不同, 表示差异显著($p < 0.05$)。

选择花后60d套袋处理的荏梨果实进行发育阶段相关生理指标的测定。由图3可以看出, 随着果实的不断发育, 对照、塑膜袋、无纺布袋3种处理的果实

果皮中叶绿素含量均呈下降趋势, 其中无纺布袋处理的果实果皮中叶绿素含量的下降趋势最快, 塑膜袋处理次之, 未套袋下降最缓慢。180d时, 未套袋、套塑膜袋和套无纺布袋果实果皮中叶绿素含量存在显著差异, 套无纺布袋的果实果皮中叶绿素含量最低, 未套袋的果实果皮中叶绿素含量最高。

2.3 不同套袋处理对荏梨果实发育阶段黄酮含量的影响

酮含量的影响

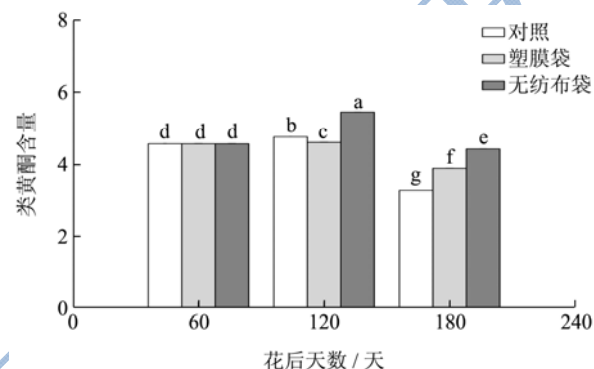


图4 不同套袋处理对果实果皮类黄酮含量的影响

Fig.4 Effects of different bagging treatments on the flavonoids content in Chili pear peels

注: 图中字母不同, 表示差异显著($p < 0.05$)。

由图4可以看出, 随着果实的发育, 未套袋果实果皮中类黄酮含量于花后120d逐渐下降, 塑膜袋处理和无纺布袋处理的果实果皮中类黄酮含量均呈先上升再下降趋势, 而三种处理下, 荏梨果实在采收时类黄酮含量存在显著差异: 套无纺布袋的荏梨果皮中类黄酮含量最大, 套塑膜袋的荏梨果皮中类黄酮含量次之, 未套袋的荏梨果皮中类黄酮含量最低。

2.4 不同套袋处理的荏梨果实果皮中 PbcrtZ

表达模式及类胡萝卜素测定

随着果实的生长发育, 荏梨果实中的 *PbcrtZ* 基因在未套袋果实果皮中呈下降趋势, 无纺布袋处理的果实果皮中呈上升趋势(图5)。在花后180d时, 未套袋, 塑膜袋和无纺布袋3种不同处理的果实果皮中 *PbcrtZ* 基因表达量存在显著差异: 套无纺布袋的荏梨果皮中 *PbcrtZ* 基因表达量最高, 套塑膜袋的荏梨果皮中 *PbcrtZ* 基因表达量次之, 未套袋的荏梨果皮中 *PbcrtZ* 基因表达量最低; 并且180d时, 无纺布袋处理的果实果皮中类胡萝卜素含量最高, 塑膜袋处理的果实果皮中类胡萝卜素含量次之, 未套袋处理的果实果皮中类胡萝卜素含量最低, 由此推测类胡萝卜素含

量与 *PbcrtZ* 基因相对表达强度呈正相关。

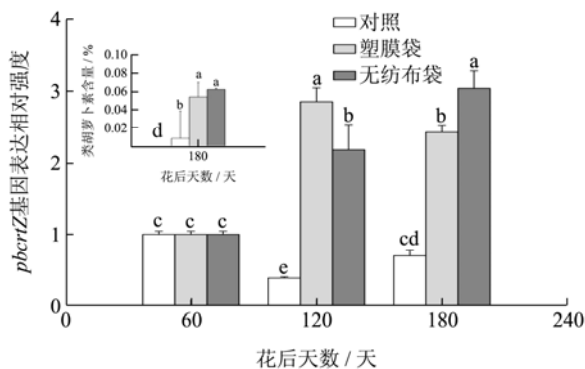


图5 不同套袋处理对荏梨果实果皮中 *PbcrtZ* 表达模式及类胡萝卜素含量的影响

Fig.5 Effects of different bagging treatments on the expression of *PbCrZ* and the content of carotenoids in Chili pear peels

注：图中字母不同，表示差异显著($p < 0.05$)。

3 讨论

合理套袋可有效地预防病虫害的发生，隔离不良环境的刺激（如：日灼等），从而改善果实的相关品质^[1,2]，提高果实色泽^[18]。而无纺布袋作为一种新兴的材料，近年来被广泛推广，有研究认为采前套无纺布袋可以抑制荏梨果实中 *PbPAL2* 的表达，从而减小果点、降低木质化程度，提高果实的外观品质，并较好地维持果实的贮藏性^[19]。还有研究表明用白色聚丙烯无纺布袋处理桃子，可使查尔酮合成酶（CHS）、二羟黄酮醇-4-还原酶（DFR）和葡萄糖类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶（UFGT）三种花青素生物合成基因表达增强，调节花青素的积累从而显著改善桃子的色泽^[20]。本试验对莱阳荏梨进行花后 60 d、65 d 和 70 d 套袋处理，发现莱阳荏梨在花后 60 d 用无纺布袋套袋效果较好，果实色泽鲜亮、呈黄绿色、果点小、果面光洁细嫩、耐贮藏。

叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮的含量与比例可以影响苹果果实的色泽^[21]。而自然界中，类黄酮参与许多功能的调节，是植物花、果实和种子的主要显色物质^[12]，与叶绿素和类胡萝卜素一起参与色泽调控。本试验发现在荏梨果实发育阶段，叶绿素含量呈逐渐下降趋势，套袋处理的叶绿素含量均显著低于未套袋果实，这与董新甜等发现的随着桃的成熟叶绿素含量逐渐降低，且套袋的降低率大于未套袋果实的结果相一致^[22]；同时本试验发现无纺布袋处理的果实果皮中类黄酮含量和类胡萝卜素含量均显著高于塑膜袋和未套袋处理的果实果皮中的类黄酮和类胡萝卜素的含量，而在荏梨果实的色泽受叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮的含量和比例的影响，所以对对照果实呈现绿色，无纺

布袋处理的果实呈现黄绿色。

我们前期对塑膜袋和无纺布袋果实的 RNA-Seq 研究中发现，二者在光合调控、苯丙氨酸代谢、糖代谢和色素合成通路中存在差异，根据 RNA-Seq 的数据，我们筛选了塑膜袋和无纺布袋套袋果实中的色泽合成差异基因 *PbcrtZ*^[23]。有研究认为 *CrtZ* 和 *CrtW* 是产生虾青素的最优组合，在将 *CrtZ*、*CrtW* 基因转入生菜中后，可使其发芽率增长 5.70%，并产生大量的虾青素脂肪酸、二酯和虾青素酯，且类胡萝卜素积累显著高于未转入 *CrtZ* 和 *CrtW* 的生菜^[24]。

4 结论

本试验也发现 *PbcrtZ* 基因在塑膜袋和无纺布袋套袋果实中表达上调，其高表达促进了类胡萝卜素的合成，由此推测 *PbcrtZ* 通过调节类胡萝卜素的积累与类黄酮、叶绿素一起调控荏梨果实色泽，使荏梨果实色泽鲜亮，呈现黄绿色。

参考文献

- [1] 张华云,王善广,牟其芸,等.套袋对莱阳在梨果皮结构和 PPO、POD 活性的影响[J].园艺学报,1996,23(1):23-26
ZHANG Hua-yun, WANG Shan-guang, MOU Qi-yun, et al. Effect of bagging on the peel structure and PPO, POD activity of *Pyrus bretschneideri* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1996, 23(1): 23-26
- [2] 辛贺明,张喜焕.套袋对鸭梨果实内含物变化及内源激素水平的影响[J].果树学报,2003,20(3):233-235
XIN He-ming, ZHANG Xi-huan. Influence of bagging on the fruit inclusion and endogenous hormones of yali pear variety [J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(3): 233-235
- [3] 刁传芸,任晓萍,蔺经,等.梨中氯氰菊酯、高效氯氰菊酯残留动态分析[J].江苏农业学报,2008,24(5):697-700
DIAO Chuan-yun, REN Xiao-ping, LIN Jing, et al. Dynamics of Cypermethrin and Beta-cypermethrin Residues in Pear [J]. Jiangsu J. of Agr. Sci., 2008, 24(5): 697-700
- [4] 文颖强,马锋旺.我国苹果套袋技术应用与研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(2):100-104
WEN Ying-qiang, MA Feng-wang. An advance in application and study of apple bagging technology in China [J]. Journal of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri. and For. (Nat. Sci. Ed), 2006, 34(2): 100-104
- [5] 黄春辉,柴明良,潘芝梅,等.套袋对翠冠梨果皮特征及品质的影响[J].果树学报,2007,24(6):747-751
HUANG Chun-hui, CHAI Ming-liang, PAN Zhi-mei, et al. Effects of bagging on fruit skin features and quality of

- Cuiguan pear cultivar [J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(6): 747-751
- [6] 张振铭,张绍铃,乔勇进,等.不同果袋对砀山酥梨果实品质的影响[J].果树学报,2006,23(4):510-514
ZHANG Zhen-ming, ZHANG Shao-ling, QIAO Yong-jin, et al. Effect of bagging with different types of bags on fruit quality of Dangshansu pear cultivar [J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(4): 510-514
- [7] Buganic R D, Lizada M C C, Deramos M B D. Disease control in philippine carabao mango with preharvest bagging and postharvest hot water treatment [J]. Acta Horticulture, 1997, 455: 797-804
- [8] 王贵元,夏仁学,曾祥国,等.套袋对红肉脐橙果肉中色素、糖及内源激素的影响[J].应用生态学报,2006,17(2):256-260
WANG Gui-yuan, XIA Ren-xue, ZENG Xiang-guo, et al. Effects of bagging on pigment, sugar and endogenous hormone contents of Cara Cara orange flesh [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(2): 256-260
- [9] 卜万锁,牛自勉,赵红钰.套袋处理对苹果芳香物质含量及果实品质的影响[J].中国农业科学,1998,31(6):1-5
BU Wan-suo, NIU Zi-mian, ZHAO Hong-yu. Effect of fruit -bagging treatment on the content of volatile aroma compounds and flesh quality of apple [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1998, 31(6): 1-5
- [10] 滕玉柱,樊连梅,沈俊岭,等.无纺布果袋(PP 果袋)对红地球和玫瑰香葡萄果实品质的影响[J].果树学报,2011, 28(5):787-791
TENG Yu-zhu, FAN Lian-mei, SHEN Jun-ling, et al. Effects of nonwoven PP fruit bag on berry qualities of Red Globe and Muscat Hamburg grape [J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(5): 787-791
- [11] 李栋栋,罗自生.植物衰老叶片与成熟果实中叶绿素的降解[J].园艺学报,2013,40(10):2039-2048
LI Dong-dong, LUO Zi-sheng. Chlorophyll breakdown in plant senescent leaves and ripening fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(10): 2039-2048
- [12] 沈忠伟,许昱,夏犇,等.植物类黄酮次生代谢生物合成相关转录因子及其在基因工程中的应用[J].分子植物育种, 2008,6(3):542-548
SHEN Zhong-wei, XU Yu, XIA Ben, et al. Transcription factors involved in plant flavonoid biosynthesis of secondary metabolism and its application in genetic engineering [J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(3): 542-548
- [13] 冯唐楷,李思光,罗玉萍,等.植物 β -胡萝卜素羟化酶研究进展[J].生物技术通报,2007,1:54-58
FENG Tang-kai, LI Si-guang, LUO Yu-ping, et al. The research of β -Carotene hydroxylase [J]. Biotechnology Bulletin, 2007, 1: 54-58
- [14] 房贤一,朱西存,王凌,等.基于高光谱的苹果盛果期冠层叶绿素含量监测研究[J].中国农业科学,2013,46(16): 3504-3513
FANG Xian-yi, ZHU Xi-cun, WANG Ling, et al. Hyperspectral monitoring of the canopy chlorophyll content at apple tree prosperous fruit stage [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(16): 3504-3513
- [15] Jia H J, Araki A, Okamoto G. Influence of fruit bagging on aroma volatiles and skin coloration of 'Hakuho' peach (*Prunus Persica Batsch*) [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35: 61-68
- [16] Lu G L, Li Z J, Zhang X F, et al. Expression analysis of lignin associated genes in hard end pear (*Pyrus pyrifolia Whangkeumbae*) and its response to calcium chloride treatment conditions [J]. J Plant Growth Regul, 2015, 34: 251-262
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [18] 张建光,王惠英,王梅,等.套袋对苹果果实微域生态环境的影响[J].生态学报,2005,25(5):1082-1087
ZHANG Jian-guang, WANG Hui-ying, WANG Mei, et al. Effect of bagging on microenvironments of apple fruits [J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(5): 1082-1087
- [19] 王玉玲,张新富,王彩虹,等.在梨套 PE 袋和无纺布袋对果点及贮藏失水的影响机理[J].园艺学报,2017,44(5):850-860
WANG Yu-ling, ZHANG Xin-fu, WANG Cai-hong, et al. The influence mechanism of pe and non-woven fabric bagging treatments on fruit spot and water loss during storage of 'Chili'pear [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(5): 850-860
- [20] Liu T, Song S, Yuan Y B, et al. Improved peach peel color development by fruit bagging. Enhanced expression of anthocyanin biosynthetic and regulatory genes using white non-woven polypropylene as replacement for yellow paper [J]. Sci. Hortic., 2015, 184: 142-148
- [21] Lancaster J E, Grant J E, Lister C E. Skin color in apples influence of copigmentation and plastid pigments on shade and darkness of red color in five genotypes [J]. J Amer. Soc. Hort. Sci., 1994, 119: 63-69
- [22] 董新甜,曹洪波,张飞燕,等.遮光性套袋对黄肉桃类胡萝卜素合成及相关基因表达的影响[J].园艺学报,2015, 42(4):

633-642

DONG Xin-tian, CAO Hong-bo, ZHANG Fei-yan, et al. Effects of shading fruit with opaque paper bag on carotenogenesis and related gene expression in yellow flesh peach [J]. *Acta Sinica Horticulturae*, 2015, 42(4): 633-642

- [23] Wang Y L, Zhang X F, Wang R, et al. Differential gene expression analysis of 'Chili' (*Pyrus bretschneideri*) fruit pericarp with two types of bagging treatments [J]. *Horticulture Research*, 2017, 4: 17005

- [24] Harada H, Maoka T, Osawa A, et al. Construction of transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly producing astaxanthin fatty acid esters and detailed chemical analysis of generated carotenoids [J]. *Transgenic Res.*, 2014, 23(2): 303-315

现代食品科技