

枣果纤维素酶对裂果发生的影响

栗现芳^{1,2}, 姚瑞¹, 赵瑞华¹, 陈国梁^{1,2}, 陈宗礼^{1,2}

(1. 陕西省红枣重点实验室, 陕西延安 716000; 2. 延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000)

摘要 [目的] 针对枣裂果问题, 探讨枣果纤维素酶对裂果发生的影响。[方法] 以陕北主栽品种木枣、骏枣和团枣的不同成熟期枣果的果皮和果肉为材料, 采用还原糖法(DNS法), 通过酶液提取和酶活性测定, 分析不同样品中的纤维素酶活性, 探讨不同裂果性品种、不同时期以及枣果不同组织中纤维素酶活性的动态变化趋势。[结果] 抗裂性木枣不同成熟期纤维素酶活性变化差异显著, 其中脆熟期活性最高; 极易裂性骏枣不同时期酶活性变化也呈显著差异, 裂果后活性明显下降; 较易裂性团枣不同时期酶活性变化差异不显著。不同组织间纤维素酶活性变化趋势基本相同, 差异均不显著。不同品种间易裂性骏枣纤维素酶活性高于抗裂性木枣和较易裂性团枣。[结论] 易发生裂果的脆熟期酶活性高, 抗裂性好, 而裂果一旦发生会导致酶活性降低, 并且裂果现象的发生与组织间的酶活性变化没有关系。

关键词 枣; 裂果; 纤维素酶

中图分类号 S665.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)27-0065-04

Effect of Cellulase on Jujube Fruit Cracking

LI Xian-fang^{1,2}, YAO Rui¹, ZHAO Rui-hua¹ et al (1. Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube, Yan'an, Shaanxi 716000; 2. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000)

Abstract [Objective] Aiming at the problem of jujube fruit cracking, the influence of cellulase on jujube fruit cracking was discussed. [Method] With the main varieties of jujube in Northern Shaanxi, Mu jujube, Jun jujube and Tuan jujube, in different fruit maturity stage and different tissue as materials, by the method of DNS, through the extraction of enzyme, the measurement of enzyme activity, enzyme activity of cellulose in different samples were analyzed, the dynamic change trend of cellulase activity in different fruit varieties, periods and tissues were discussed. [Result] The changes of cellulase activity in different mature period was significant in crack resistance jujube, which the activity of brittle ripe stage was highest; The enzyme activity changes in different periods of easy to crack of Jun jujube also showed significant difference, activity decreased significantly after cracking; The enzyme activity in different periods of easier to crack of tuan jujube was not significant. The trend of cellulase activity in different tissues was basically the same, and the difference was not significant. Among different varieties, the cellulase activity of fissility Jun jujube were higher than that of the crack resistance of the Mu jujube and Tuan jujube fissility group. [Conclusion] The enzyme activity in brittle ripe stage is highest, crack resistance is good, and cracking event will lead to reduction of enzyme activity, and there is no relationship between fruit cracking and changes of enzyme activities in tissues.

Key words Jujube; Fruit cracking; Cellulase

红枣, 为鼠李科木本植物枣的果实^[1], 是我国陕北地区的一大特产, 其味甜可口, 营养丰富, 富含多种氨基酸、维生素等营养物质^[2], 素有“活维生素 C 丸”的美誉^[3]。红枣还具有重要的药用价值, 对于脾胃虚弱、气血不足、心悸失眠等症状有很好的缓解^[4-6]。大枣富含的环磷酸腺苷对预防和治疗心肌梗塞、冠心病等心脑血管疾病有很大的作用, 同时还有防癌抗癌的功效^[7]。

红枣的适宜生态条件是干燥少雨、阳光充足的气候, 它适应能力特别强, 耐寒(-30℃)、耐高温(43℃)、耐盐碱、耐贫瘠, 特别是在干旱地区的枣树结出的果实, 品质尤佳。陕北黄河、洛河沿岸一带, 气候、土壤条件均适宜枣树生长, 因此许多市县的农民都以种植红枣为经济来源, 种植面积达 30 万 hm², 正常年景的产量在 20 万 t 左右^[8]。但近年来陕北红枣面临严重的裂果问题。一般年份裂果、烂果率达 15% 左右, 成熟期多雨的年份, 裂果率达到 50%~80%, 严重的年份裂果率高达 95% 以上^[9]。据报道, 自然条件下不同品种间裂果一般与降雨时间和成熟度有关。

目前国内已有很多学者致力于枣裂果问题的研究, 且主要集中在探讨果实解剖结构、果实理化特性、遗传特性、矿物质元素、外界环境条件等对裂果的影响, 对枣裂果发生的生理机制研究较少^[10-12]。解决枣裂果的方法, 目前的研究较多集中在栽培方面, 主要有选育抗裂品种、大棚栽培和加强土、肥、水综合管理等^[13]。其果实裂现象在水果中普遍存在, 在对荔枝及油桃中抗裂性不同的品种进行研究发现, 细胞壁代谢相关酶活性与裂果密切相关, 其中纤维素酶活性在易裂品种中较抗裂品种活性高^[14-16]。

笔者以陕北红枣主栽品种骏枣、团枣和木枣为材料, 采用还原糖法(DNS法)测定不同裂果性品种、不同时期以及枣果不同组织中纤维素酶的活性变化, 了解纤维素酶在不同品种中的时空表达模式, 对于探究纤维素酶对裂果发生的影响机制提供理论参考, 为后续抗裂品种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料。供试材料均采样自延安延川当地, 有白熟期、半红期、脆熟期、裂果后和完熟期 5 个时期的木枣、骏枣和团枣, 采集的枣果放入自封袋中保存, 并立即放置于冰盒中, 带回实验室后于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。其中, 木枣为抗裂性品种, 团枣为较易裂性品种, 骏枣为易裂性品种^[17-18]。

1.1.2 主要仪器。紫外分光光度计(UV2600), 日本岛津; 高

基金项目 陕西省教育厅专项科研计划项目(2013JK0735); 延安科学技术研究发展计划项目(2013-KN12); 延安大学校级科研计划项目(YDK2015-76); 陕西省科技厅农业科技创新与攻关项目(2016NY-138); 延安科学技术研究发展计划项目(2014CGZH-09)。

作者简介 栗现芳(1981-), 女, 河北魏县人, 讲师, 博士, 从事植物遗传育种研究。

收稿日期 2016-08-07

速冷冻离心机(HC-3614R)、电热恒温水浴锅(HH-S4),北京科伟永新仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9140A),上海齐欣科学仪器有限公司;超低温冰箱,德国;优普系列超纯水机(UPK-110),成都超纯科技有限公司;电子天平(FA1004N),上海精密科学仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂及配制方法。浓度为1 mg/mL的葡萄糖标准液:将葡萄糖在恒温干燥箱中105 °C下干燥至恒重,准确称取100 mg于100 mL小烧杯中,用少量蒸馏水溶解后,移入100 mL容量瓶中用蒸馏水定容,充分混匀。4 °C冰箱中保存(可用12~15 d)。3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液:准确称取DNS 6.3 g于500 mL大烧杯中,用少量蒸馏水溶解后,加入2 mol/L NaOH溶液262 mL,再加入到500 mL含有185 g酒石酸钾钠($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$, MW = 282.22)的热水溶液中,再加5 g结晶酚(C_6H_5OH , MW = 94.11)和5 g无水亚硫酸钠(Na_2SO_3 , MW = 126.04),搅拌溶解,冷却后移入1 000 mL容量瓶中用蒸馏水定容,充分混匀。贮于棕色瓶中,室温放置7 d后使用。0.1 mol/L pH 6.0的醋酸钠缓冲液;1%甲基纤维素。

1.2 方法

1.2.1 葡萄糖(G)标准曲线的制作。取8支洗净烘干的20 mL具塞刻度试管,编号后按表1加入标准葡萄糖(G)溶液和蒸馏水,配制一系列不同浓度的葡萄糖溶液。充分摇匀后,向各试管中加入1.5 mL DNS溶液,摇匀后沸水浴5 min,取出冷却后用蒸馏水定容至20 mL,充分混匀。在540 nm波长下,以1号试管溶液作为空白对照,调零点,测定其他各管溶液的光密度值并记录结果。以葡萄糖含量(mg)为横坐标,以对应的光密度值为纵坐标,绘制标准曲线。

表1 葡萄糖标准曲线制作

Table 1 The production of glucose standard curve

试管号 Tube No.	试剂 Reagent		
	葡萄糖标准液 Glucose standard solution//mL	蒸馏水 Distilled water mL	葡萄糖含量 Glucose content mg
1	0	2.0	0
2	0.2	1.8	0.2
3	0.4	1.6	0.4
4	0.6	1.4	0.6
5	0.8	1.2	0.8
6	1.0	1.0	1.0
7	1.2	0.8	1.2
8	1.4	0.6	1.4

1.2.2 纤维素酶的提取。参照宁正祥的方法^[19],取0.5 g样品于预冷的研钵中,加入4 mL冷的0.1 mol/L pH 6.0的醋酸钠缓冲液和少量石英砂,冰浴研磨匀浆,用3 mL醋酸钠缓冲液迅速冲洗研钵研棒,一并转移至离心管;低温(4 °C)下提取1 h;然后在低温(4 °C)下,10 000 r/min离心20 min,上清液作为待测粗酶液。

1.2.3 纤维素酶的活性测定。取2 mL 1%的甲基纤维素加

0.5 mL的酶液(空白管此时不加酶液),于37 °C下保温60 min,加入2.5 mL DNS终止反应,混合均匀(空白管加0.5 mL酶液)。立即放入沸水浴中显色5 min,流水冷却,加入20 mL H₂O稀释,摇匀后于540 nm波长下比色测定OD值。然后用3,5-二硝基水杨酸还原法测定生成的还原糖含量。

酶活力单位:1 mL酶液37 °C,pH 6.0条件下,1 h分解甲基纤维素产生1 μmol葡萄糖为一个酶活单位(U)。

$$\text{酶活力(U/g)} = \frac{[\text{葡萄糖含量(mg)} \times \text{酶液定容总体积(mL)} \times \text{稀释倍数} \times 5.56]}{[\text{反应液中酶液加入量(mL)} \times \text{样品重(g)} \times \text{时间(h)}]}$$

式中,5.56为1 mg葡萄糖的μmol数(1 000/180=5.56)。

1.3 数据处理 利用Excel数据分析功能进行数据整理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线制作 按照表1所示进行标准曲线制作,根据所测结果,以葡萄糖含量为横坐标,以吸光度为纵坐标,利用Excel 2010绘制标准曲线,得出回归方程及相关系数(图1);对测得的结果进行F检验,F值=47.909 46,P=0.000 083(P<0.01),差异极显著。R接近于1,说明两个相关性比较大。

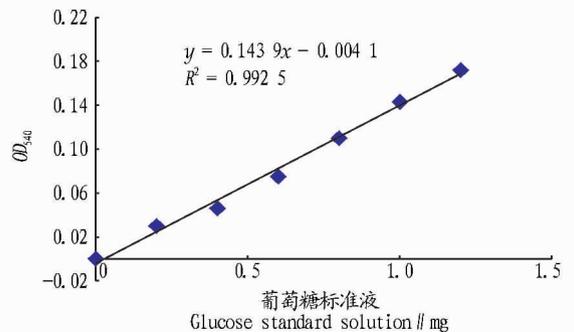
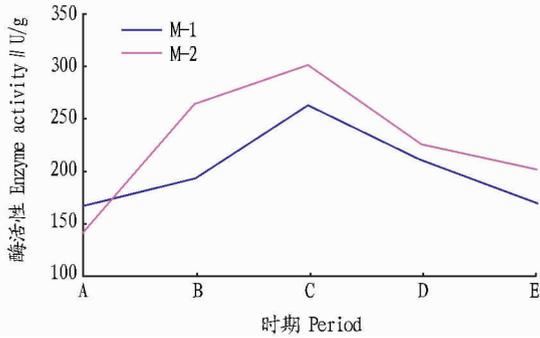


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Glucose standard curve

2.2 木枣不同时期果皮、果肉纤维素酶活性 通过对木枣品种不同成熟期取材、酶液提取、酶活性测定及比较分析(图2),结果表明,木枣果皮、果肉纤维素酶活性在不同时期的变化趋势基本相同,从白熟期到脆熟期纤维素酶活性逐渐上升,而脆熟期到完熟期呈降低趋势。不同时期方差分析 $P \approx 0.04(0.01 < P < 0.05)$,木枣同一组织在各个时期的变化存在显著差异,其中脆熟期酶活性表现最高;不同组织间方差分析 $P \approx 0.18(P > 0.05)$,同一时期果肉和果皮纤维素酶活性没有显著差异。

2.3 骏枣不同时期果皮、果肉纤维素酶活性 通过对骏枣不同时期不同组织酶活性比较分析(图3),结果表明,骏枣果皮、果肉纤维素酶活性在不同时期的变化趋势也基本相同,从半红期到裂果后纤维素酶活性逐渐下降,此时间段果皮和果肉纤维素酶活性趋势基本相同。裂果后到完熟期酶活性上升,且果肉纤维素酶活性高于果皮,上升趋势也较为



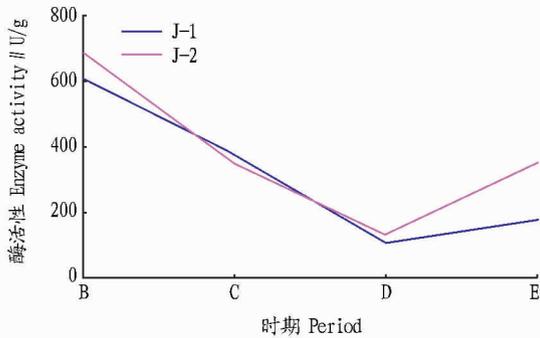
注:A.白熟期;B.半红期;C.脆熟期;D.裂果后;E.完熟期;M-1.木枣果皮;M-2.木枣果肉。

Note:A. White ripe season; B. Half red stage; C. Full red stage; D. After dehiscent fruit; E. Stage of complete ripeness; M-1. Pericarp of Mu jujube; M-2. Sarcocarp of Mu jujube.

图2 木枣(M)不同时期不同组织纤维素酶活性变化

Fig.2 The change of different organizations, different periods of cellulase activity in 'Mu' jujube

明显。不同时期方差分析 $P \approx 0.011$ ($0.01 < P < 0.05$), 骏枣同一组织在各个时期的纤维素酶活性变化存在显著差异,但未达到极显著;不同组织间方差分析 $P \approx 0.24$ ($P > 0.05$),同一时期果肉和果皮纤维素酶活性没有显著差异。



注:B.半红期;C.脆熟期;D.裂果后;E.完熟期;J-1.骏枣果皮;J-2.骏枣果肉。

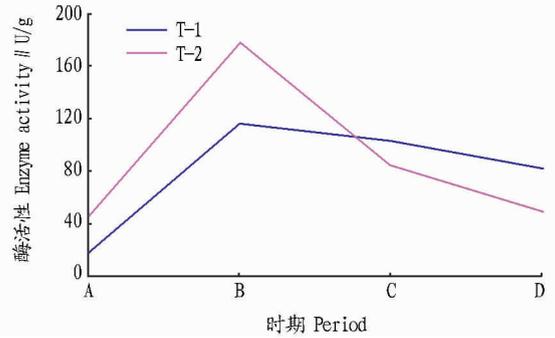
Note:B. Half red stage; C. Full red stage; D. After dehiscent fruit; E. Stage of complete ripeness; J-1. Pericarp of Jun jujube; J-2. Sarcocarp of Jun jujube.

图3 骏枣(J)不同时期不同组织纤维素酶活性变化

Fig.3 The change of different organizations, different periods of cellulase activity in 'Jun' jujube

2.4 团枣不同时期果皮、果肉纤维素酶活性 通过对团枣不同时期不同组织酶活性比较分析(图4),结果表明,团枣果皮、果肉纤维素酶活性在不同时期的变化趋势基本相同,从白熟期到半红期呈上升趋势,此时间段果肉纤维素酶活性高于果皮。半红期到裂果后果皮、果肉纤维素酶活性均呈下降趋势,在脆熟期后果肉纤维素酶活性低于果皮。不同时期方差分析 $P \approx 0.11$ ($P > 0.05$),不同组织间方差分析 $P \approx 0.69$ ($P > 0.05$),纤维素酶活性变化在团枣各个时期和果皮果肉间均没有显著差异。

2.5 不同品种枣果纤维素酶活性比较分析 从总体水平上比较不同品种、不同时期、不同组织酶活性的变化趋势(图



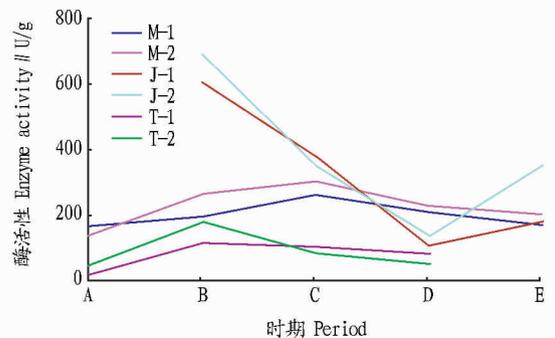
注:A.白熟期;B.半红期;C.脆熟期;D.裂果后;T-1.团枣果皮;T-2.团枣果肉。

Note:A. White ripe season; B. Half red stage; C. Full red stage; D. After dehiscent fruit; T-1. Pericarp of Tuan jujube; T-2. Sarcocarp of Tuan jujube.

图4 团枣(T)不同时期不同组织纤维素酶活性变化

Fig.4 The change of different organizations, different periods of cellulase activity in 'Tuan' jujube

5),表现为3个品种不同枣果组织间纤维素酶活性变化趋势均表现一致,没有显著差异;木枣和团枣纤维素酶活性变化趋于平稳,且木枣酶活性高于团枣,骏枣不同成熟期枣果纤维素酶活性变化幅度较大,在裂果后表现明显降低,除该时期外,均高于木枣和团枣。



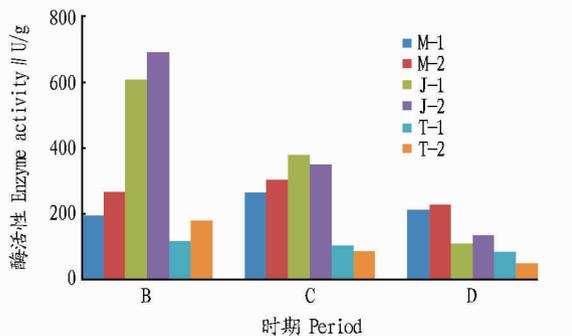
注:A.白熟期;B.半红期;C.脆熟期;D.裂果后;E.完熟期;M-1.木枣果皮;M-2.木枣果肉;J-1.骏枣果皮;J-2.骏枣果肉;T-1.团枣果皮;T-2.团枣果肉。

Note:A. White ripe season; B. Half red stage; C. Full red stage; D. After dehiscent fruit; E. Stage of complete ripeness; M-1. Pericarp of Mu jujube; M-2. Sarcocarp of Mu jujube; J-1. Pericarp of Jun jujube; J-2. Sarcocarp of Jun jujube; T-1. Pericarp of Tuan jujube; T-2. Sarcocarp of Tuan jujube.

图5 木枣、骏枣、团枣不同时期不同组织纤维素酶活性变化

Fig.5 The change of different organizations, different periods of cellulase activity in different breed

从枣果同一时期比较不同品种不同组织间酶活性的变化(图6),在半红期骏枣酶活性明显高于其他2个品种;团枣的纤维素酶活性整体水平都较低,木枣居中,且两者变化幅度较小,而骏枣变化幅度较大;从半红期到脆熟期木枣果皮、果肉纤维素酶活性上升,骏枣和团枣品种酶活性均下降;脆熟期到裂果后,木枣、骏枣和团枣果皮、果肉纤维素酶活性都呈下降趋势。



注: B. 半红期; C. 脆熟期; D. 裂果后; M-1. 木枣果皮; M-2. 木枣果肉; J-1. 骏枣果皮; J-2. 骏枣果肉; T-1. 团枣果皮; T-2. 团枣果肉。

Note: B. Half red stage; C. Full red stage; D. After dehiscent fruit; M-1. Pericarp of Mu jujube; M-2. Sarcocarp of Mu jujube; J-1. Pericarp of Jun jujube; J-2. Sarcocarp of Jun jujube; T-1. Pericarp of Tuan jujube; T-2. Sarcocarp of Tuan jujube.

图6 同一时期不同品种、不同组织纤维素酶活性变化比较

Fig. 6 The change of different organizations, different breed of cellulase activity in the same periods

3 讨论

纤维素酶(β -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶)是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称,它不是单体酶,而是起协同作用的多组分酶系,是一种复合酶,作用于纤维素以及从纤维素衍生出来的产物,将不溶性纤维素转化成葡萄糖。通过调查认为,果皮中的纤维素酶可以水解果皮中的纤维素,降低果皮的机械强度,增加果实裂果的易发性。对于荔枝的研究表明,其易裂品种“糯米糍”果皮中的纤维素酶活性高于其抗裂品种“淮枝”。

该试验中同一品种果肉中的纤维素酶活性在各个时期的变化趋势与果皮相似,差异均不显著。对同一品种同一组织的纤维素酶活性在各个时期的变化分析可得,抗裂性木枣果皮中纤维素酶活性从白熟期到脆熟期逐渐上升,脆熟期到完熟期酶活性呈降低趋势,变化差异显著,其中脆熟期酶活性表现最高;极易裂性骏枣果皮中纤维素酶活性从半红期到裂果后逐渐下降,裂果后到完熟期酶活性上升,变化差异显著;较易裂性团枣果皮中纤维素酶活性从白熟期到半红期呈上升趋势,半红期到裂果后呈下降趋势,变化差异不显著。

(上接第41页)

试验过程中发现茄子生长期长,花序花朵较少,花期不一致,往往导致点花次数增加,既费时费工又容易出现药害,而使用熊蜂则可有效避免上述问题,熊蜂授粉技术在茄子上的应用价值较高,前景十分广阔。但是农民对新技术认知和接受需要一定的时间和过程,今后工作中,应制定出熊蜂授粉技术规范,方便农户和企业进行操作,同时加大示范推广力度,以推动熊蜂授粉技术在茄子早春生产中的应用。

对于不同品种间纤维素酶活性在各个时期的变化整体水平分析得出,在半红期到脆熟期易裂性骏枣果皮中的纤维素酶活性高于较易裂性团枣和抗裂性木枣,而在裂果后可能由于裂果现象会使纤维素酶用于分解纤维素从而导致极易裂性骏枣和较易裂性团枣的纤维素酶活性均低于抗裂性木枣。因此,推测易发生裂果的脆熟期酶活性高,抗裂性好,而裂果一旦发生会导致供试品种酶活性降低;并且果皮和果肉间在任何一个品种任何一个时期都不存在显著性差异,说明裂果现象的发生与组织间的酶活性变化没有关系,具体作用原理还需后续试验进一步验证。

参考文献

- [1] 原超,范三红,林勤保. 红枣的功效成分[J]. 农产品加工,2010(9): 12-13.
- [2] 刘桂娟,蒋捷云. 未来我们喝什么[J]. 中国饮料发展趋势,2004(5): 3-5.
- [3] LI J W, FAN L P, DING S D, et al Nutritional composition of five cultivars [J]. Food chemistry, 2007, 103: 454-460.
- [4] 赵猛. 鲜枣储藏过程中 V_c 含量的研究 [J]. 华北农学报, 2000(4): 35-36.
- [5] 郑秀莲. 大枣的营养食疗价值 [J]. 中国蔬菜, 2000(4): 152-155.
- [6] 李雪花. 大枣多糖的抗活性氧研究 [J]. 广西科学, 2000(1): 23-29.
- [7] 刘孟军, 王永蕙. 枣和酸枣等 14 种园艺植物 cAMP 含量的研究 [J]. 河北农业大学学报, 1991(4): 20-23.
- [8] 樊保国. 山西枣果生产现状及产业化发展对策 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(2): 336-339.
- [9] 杨淑娟, 王宝明, 王小原. 枣裂果研究进展 [J]. 山西农业科学, 2009, 37(3): 86-89.
- [10] 辛艳伟, 集赞, 刘和. 裂果性不同的枣品种果皮及果肉发育特点观察研究 [J]. 中国农学报, 2006, 22(11): 253-257.
- [11] 王改莲. 枣裂果原因与预防措施的国内外研究概述 [J]. 山西林业科技, 2011, 40(3): 40-42.
- [12] 刘同才, 刘宝轻. 枣裂果的原因及预防技术 [J]. 河北果树, 2006(3): 55.
- [13] 白文平. 红枣裂果原因及防治栽培技术 [J]. 山西林业科技, 2007(1): 53-54.
- [14] 丁勤. 油桃裂果与膜脂过氧化关系 [J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 200-202.
- [15] 李建国, 黄旭明, 黄辉白. 裂果易发性不同的荔枝品种果皮中细胞壁代谢酶活性的比较 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(2): 141-146.
- [16] 曹一博, 李长江, 孙帆, 等. 抗裂与易裂枣内源激素含量和细胞壁代谢相关酶活性比较 [J]. 园艺学报, 2014, 41(1): 139-148.
- [17] 南娟, 汪有科, 李晓彬, 等. 陕北不同品种红枣裂果比较及抗裂剂研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2011(3): 181-187.
- [18] 汪星, 朱德兰, 杨荣慧, 等. 陕北山地红枣抗裂性研究 [J]. 果树学报, 2011(1): 82-85.
- [19] 宁正祥. 食品成分分析手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 690-691.

参考文献

- [1] 谢鹤. 熊蜂及其在现代农业授粉实践中的应用研究 [J]. 中国蜂业, 2012(7): 29-30.
- [2] 安建东, 黄家兴, 吴杰, 等. 熊蜂授粉和蜜蜂授粉对设施番茄产量与品质的影响 [C] // 第五届生物多样性保护与利用高新技术国际研讨会暨昆虫保护、利用与产业化国际研讨会论文集. 北京: 中国生物多样性保护基金会, 2005.
- [3] 陈红, 祝花, 王孝琴, 等. 熊蜂授粉技术在早春大棚番茄生产中的应用研究 [J]. 湖北农业科学, 2015, 54(4): 875-877.
- [4] 安建东, 童越敏, 郭国宝, 等. 熊蜂为温室茄子授粉试验 [J]. 中国养蜂, 2004, 55(3): 7-8.
- [5] 罗文华, 程尚, 戴荣国, 等. 地熊蜂为重庆温室茄子授粉的效果研究 [J]. 长江蔬菜, 2010(22): 32-34.