

外源钙对‘肥城桃’软化及褐变相关酶基因表达的影响

张泽杰, 付喜玲, 宋文亮, 肖伟, 高东升, 陈修德*, 李玲*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东泰安 271018

摘要: 以11年生‘肥城桃’ (*Prunus persica* cv. ‘Feicheng’)为试材, 研究硝酸钙溶液(Ca)、硝酸钙溶液+三氟拉嗪(Ca+TFP)对‘肥城桃’硬度、 β -Gal酶、多酚氧化酶(PPO)和相关基因表达水平的影响, 旨在探究外源钙缓解‘肥城桃’软化褐变的作用方式及途径。研究表明, 喷Ca处理可显著提高桃果实硬度, 降低果实褐变的发生, 显著提高果实的总钙含量; Ca+TFP处理对 β -半乳糖苷酶(β -Gal)活性具有明显的促进作用, 显著提高PPO活性; β -半乳糖苷酶相关基因(*Prupe.7G163100*)在果实发育前期表达量达到最大, 外源钙反向调控其表达; PPO相关基因在幼果期达到最大, 钙信号通过正向调控*Prupe.4G041400*和*Prupe.4G041800*, 反向调控*Prupe.4G041500*、*Prupe.4G041700*和*Prupe.4G041900*基因表达来调节PPO活性。综上可知, 外源钙一方面通过介导 Ca^{2+} -CaM信号系统抑制*Prupe.7G163100*基因表达, 调节 β -Gal酶活性, 提高果实硬度; 另一方面通过调节PPO相关基因表达改变酶活性来降低‘肥城桃’褐变率。

关键词: 桃; 钙; 钙信号抑制剂; β -半乳糖苷酶; 多酚氧化酶

‘肥城桃’ (*Prunus persica* cv. ‘Feicheng’)作为山东特有桃品种, 在山东种植面积达6000 hm²。近年来肥城桃果实品质严重下降(罗华等2012), 出现了缝合线软化、褐变等问题, 严重制约肥城桃产业的发展(张雪等2008)。植物钙营养元素的缺乏, 可导致桃果实缝合线的软化, 但土壤补施钙肥对果实缝合线软化影响较小(刘志民等2006)。而王雷等(2016)研究发现, 喷施不同种类的外源钙可有效缓解肥城桃品质下降问题。采后钙处理能有效提高‘黄冠’梨果实总钙含量, 抑制细胞壁各组成成分的降解及相关酶活性, 提高果实硬度(王玲利等2014)。喷钙可降低脐橙(*Citrus sinensis*)的采前褐变率, 提高果实商品性(李正国等2006)。但是, 对外源钙缓解果实病害、提高果实品质的途径与方式研究较少。

钙作为果树必需的营养元素之一, 一方面作为结构物质和膜保护剂在维持细胞壁强度和膜的完整性及稳定性上具有重要作用(关军锋和Max Saure 2005); 另一方面钙作为具有信号转导作用的第二信使(Reddy等2011), 通过钙信号转导系统可调控基因表达和细胞生理活动, 影响植物的生长发育。已有研究发现, 果实的软化细胞壁的降解密切相关, β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -Gal)作为一种细胞壁降解酶, 与植物细胞发育过程中壁的松弛和加固密切相关(Wallner和Walker 1975)。酶促褐变学说是目前普遍接受的解释果实褐变的学

说之一, 其关键因素是受多基因调控的多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO), Newman等(1993)发现在番茄中存在至少6个以上PPO基因, 苹果、梨和草莓中分别存在16种、8种、6种PPO相关基因(闫洪波等2017)。

前人对外源钙的研究多集中在采后生理方面, 外源钙对细胞壁酶及PPO活性分子调控途径方面研究较少。本实验以11年生‘肥城桃’为试材, 用硝酸钙溶液及具有 Ca^{2+} -CaM拮抗作用的钙信号抑制剂三氟拉嗪(trifluoperazine, TFP)溶液(Corpas和Barroso 2018)处理, 以清水为对照, 探究外源喷钙在缓解‘肥城桃’软化、褐变问题的作用途径与方式, 为科学解决‘肥城桃’品质下降问题提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

试验于2017年4月在山东省肥城桃研究所(36°18'N, 116°74'E)进行, 果园为理化性质良好的砂壤质风积黄壤土, 碱解氮为43.50 mg·kg⁻¹、速效磷为35.62 mg·kg⁻¹、速效钾为289.91 mg·kg⁻¹, 有机质为23.72 g·kg⁻¹。供试材料为树势健壮的11年生‘肥城

收稿 2018-07-05 修定 2018-11-28

资助 山东省林业科技创新项目(LYCX04-2018-21)和山东省现代农业产业技术体系果品创新团队-栽培土肥岗(SDAIT-06-01)。

* 共同通讯作者: 陈修德(chenxiude@163.com)、李玲(lil-ingsdau@163.com)。

桃’(*Prunus persica* L. cv. ‘Feicheng’), 砧木为毛桃。

1.2 实验处理

实验设3个处理: 清水(CK)、0.5% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液(简写为Ca)、0.5% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ +500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TFP(简写为Ca+TFP), 每个处理5棵树, 3次重复。在幼果期(5月初)、硬核期(6月初)、膨大期(7月初)和成熟期各喷施1次, 于上午10:00点前喷施, 重点喷施果实, 以果面滴水为限, 在处理6 h内有降雨补施1次。

分别在幼果期(5月初)、硬核期(6月初)、膨大期(7月初)、成熟期(8月初)和采收期(9月初)共5个时期进行取样, 在每株树相同部位随机选取10~20个生长一致果实(保证各处理在临近位置取样)。一部分样品液氮速冻, 带回实验室 -80°C 保存, 用于测定各种指标; 另一部分取回的样品, 用蒸馏水洗净切分, 105°C 杀青, 75°C 烘干, 测定果肉总钙含量; 硬度等指标在取回鲜样后立即处理进行测定。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 褐变现象的观察与统计

参照杨巍(2010)方法, 略有改进。不同钙处理后的‘肥城桃’果实采后室温存放5 d, 并在‘肥城桃’缝合线处切割, 观察果实内部褐变情况并进行拍照。

1.3.2 果肉硬度与脆度测定

按照吴玉森等(2013)方法, 略有改进。使用TA.XT plus型质构仪(英国Stable Micro Systems公司), 用完整的‘肥城桃’果实进行穿刺试验, 每个桃选取缝合线及对面2个部位进行测定, 每个处理随机取5个果实。质构仪自备的Texture Exponent 32软件进行数据计算。

1.3.3 总钙的测定

采用湿灰化法(全月澳和周厚基1982): 精确称取0.5 g烘干样于250 mL烧杯, 加 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (4:1, V/V)提取液25 mL, 盖表面皿。在电热板上加热除去多余酸, 在剩余1~2 mL液体时, 取下冷却。用20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氧化镧转移, 定容至刻度, 用原子分光光度计测定。

1.3.4 β -Gal酶活性测定

果实中 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -Gal)活性参考Wei等(2010)的方法进行测定。 β -半乳糖苷酶活性以1 h内产生1 μmol 硝基酚来表示1个酶活性单位(U)。

1.3.5 总酚含量测定

总酚含量测定参照严娟等(2013)的方法进行。称取果肉匀浆2.5 g, 利用60%的乙醇在 40°C 条件下避光超声波浸提1 h, $12\ 000\times g$ 低温离心。取上清液定容至25 mL进行下步试验。移取上清液1 mL, 加入5 mL蒸馏水和0.5 mL福林-酚, 摇匀, 30 s后加入3 mL Na_2CO_3 , 25 mL定容, 避光1 h, 756 nm记录吸光度。

1.3.6 多酚氧化酶活性测定

多酚氧化酶(PPO)活性测定方法参考《果蔬采后生理生化实验指导》(曹建康等2011), 略有修改。

1.3.7 β -Gal酶和多酚氧化酶基因相对表达量测定

在液氮中将样品研磨均匀, 用RNAprep Pure Plant Kit (DP441, TIANGEN)提取样品总RNA, Pri-me Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa)反转录试剂盒反转录cDNA。通过在桃基因组比对选取*Prupe.4G041400*、*Prupe.4G041500*、*Prupe.4G041700*、*Prupe.4G041800*和*Prupe.4G041900*, 共计5个PPO相关基因和1个 β -Gal相关基因。利用Primer 3.0 Input设计相关定量引物(表1)。按照SYBR® Pre-mix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus)试剂盒相关操作进行定量PCR反应。反应体系参照说明书。每个实验设置3次技术重复。荧光定量PCR反应条件: 95°C 预变性30 s; 95°C 变性5 s, 60°C 退火30 s, 39次循环; 结束后进行融解曲线和荧光定量值分析。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据计算。

1.4 数据处理与统计分析

利用SPSS 20.0软件进行结果分析, Excel 2007软件作图。

2 实验结果

2.1 不同钙处理对‘肥城桃’采收期果实外观鉴定

统计不同钙处理的‘肥城桃’果实在室温存放5 d后的褐变情况。结果如图1所示, Ca处理的果实相较对照(50%左右)及Ca+TFP处理的褐变情况较轻, 仅5%左右发病。Ca+TFP处理的果实90%以上都发生褐变, 且褐变严重, 果实完全丧失食用价值。

2.2 不同钙处理对‘肥城桃’采收期果实质地变化的影响

硬度与脆度不仅能评价果实软化程度, 更是评价商品价值的重要指标。对‘肥城桃’果实进行

表1 实验所用引物信息

Table 1 Information of primer sequences in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>Prupe.4G041700F</i>	TCCTCCTCCATCACAACTC	定量
<i>Prupe.4G041700R</i>	TGAGCATGTTCTTCTGTCG	定量
<i>Prupe.4G041900F</i>	GCATGGTGCAACAAGCTAAA	定量
<i>Prupe.4G041900R</i>	CTGCTGGAGAGTCCCAGTTC	定量
<i>Prupe.4G041400F</i>	GTCTATATGGCGTGGCTGGT	定量
<i>Prupe.4G041400R</i>	AGCTCGATGGCTTTGGAGTA	定量
<i>Prupe.4G041500F</i>	GCGTGAAAGTTCGAGACTCC	定量
<i>Prupe.4G041500R</i>	GGCCTTCTCTGCGTACTTG	定量
<i>Prupe.4G041800F</i>	TACAGGCAGATGGTGTCCAA	定量
<i>Prupe.4G041800R</i>	CTCAAAATTGGCTGGGTGT	定量
<i>Prupe.7G163100F</i>	GCAGGAACAAACAGAATCGC	定量
<i>Prupe.7G163100R</i>	GCCTAAACCTCCAGCATAA	定量
<i>β-actin-sybrF</i>	CTTATCTTCATCGGCGTCTTCG	定量
<i>β-actin-sybrR</i>	CTTCACCATTCCAGTCCCATGTC	定量

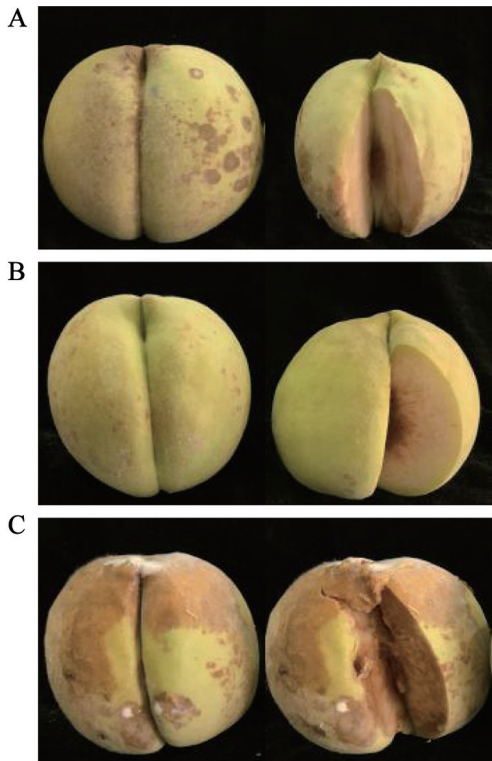


图1 不同钙处理的‘肥城桃’果实褐变情况
Fig.1 Browning of ‘Feicheng’ peach treated with different treatments
A: 对照; B: Ca处理; C: Ca+TFP处理。

钙加抑制剂搭配处理后, 在采收期统一取样, 利用质构仪测定不同钙处理果实的相关指标。结果如图2所示, 相较于对照来说, Ca处理在采收期硬度约提高了2倍, 具有显著性差异。Ca+TFP处理与对

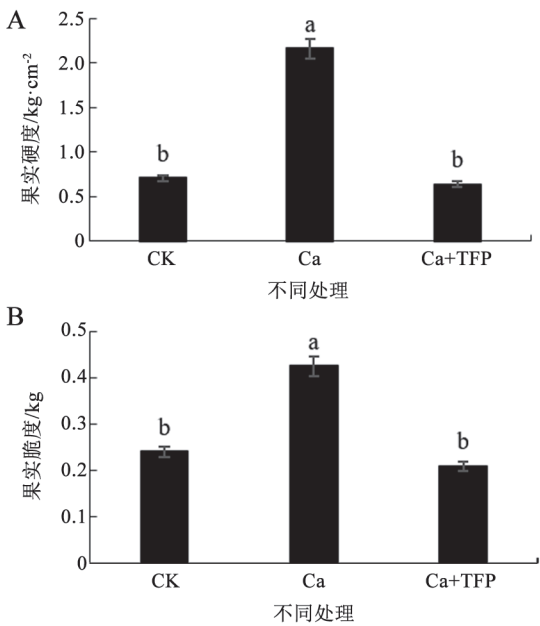


图2 不同钙处理的‘肥城桃’果实硬度(A)与脆度(B)的变化
Fig.2 Changes of hardness (A) and crispness (B) of ‘Feicheng’ peach fruit with different treatments
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下图同此。

照处理的果实硬度相差较小, 无显著差异。果实的脆度与硬度有相同的变化趋势, Ca处理的果实脆度比对照提高了70%, Ca+TFP处理与对照相比脆度降低了约13%。

2.3 不同钙处理对‘肥城桃’采收期果实总钙含量的影响

‘肥城桃’进行钙加抑制剂搭配处理后, 对采收

期果实的果肉总钙含量分别测定。结果如图3所示, 相比对照, Ca处理果肉钙含量提高了24%, 具有显著差异, Ca+TFP处理的果肉总钙含量与Ca处理之间无显著性差异。

2.4 不同钙处理对‘肥城桃’各时期果实 β -Gal酶活性的影响

‘肥城桃’果实各时期 β -半乳糖苷酶(β -Gal)活性测定结果如图4所示, 总体呈先升高后降低趋势, 在膨大期酶活性达到最大; 3种处理对 β -Gal酶活性影响差异较大, Ca处理与对照相比活性较低, 而Ca+TFP处理在各时期的酶活性均高于对照处理。

2.5 不同钙处理对‘肥城桃’ β -Gal基因表达量变化的影响

对未处理的肥城桃果实定量分析发现, *Prupe.7G163100*总体呈先升高后降低趋势, 果实发育前期表达量明显高于后期, 在硬核期表达量达到最大(图

5-A)。对幼果期不同钙处理的果实进行定量分析发现, *Prupe.7G163100*基因在Ca+TFP处理的果实中的表达量远高于对照和Ca处理的果实, Ca处理降低了果实中*Prupe.7G163100*基因的表达量(图5-B)。

2.6 不同钙处理对‘肥城桃’采收期果实总酚含量及多酚氧化酶活性的影响

在各时期进行钙加抑制剂搭配处理后, 在采收期统一取样, 测定不同钙处理果实总酚含量的差异。结果如图6所示, 各处理对果实总酚含量影响较小, 处理间无显著性变化; 对果实PPO活性进行测定后发现, Ca处理后PPO活性降低了约33%, Ca+TFP处理后PPO活性升高了近1倍的水平, 不同处理间差异显著。

2.7 不同钙处理对‘肥城桃’多酚氧化酶相关基因变化的影响

首先对未处理的‘肥城桃’果实的PPO相关基因定量分析发现, PPO相关的5个相关基因均在幼果期表达量达到最大, 且差异显著; 随后对幼果期不同钙处理的‘肥城桃’果实进行定量分析发现, Ca处理提高了*Prupe.4G041400*与*Prupe.4G041800*在果实中的表达量, Ca+TFP处理的果实基因表达量

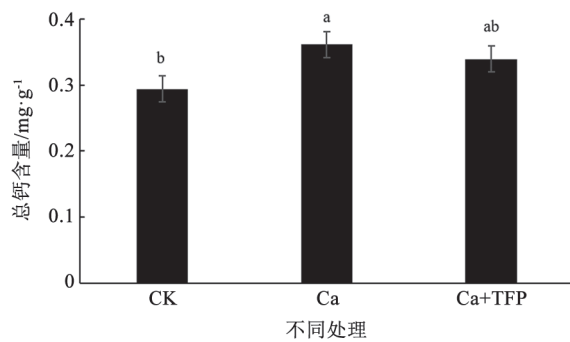


图3 不同钙处理下‘肥城桃’果肉总钙含量的变化
Fig.3 Changes of total calcium contents of ‘Feicheng’ peach with different treatments

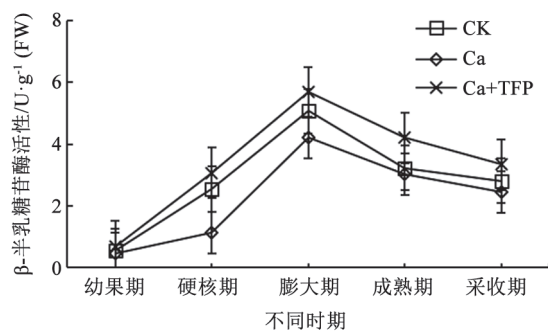


图4 不同钙处理下‘肥城桃’各时期果实 β -半乳糖苷酶活性的变化
Fig.4 Changes of β -Gal enzyme activities of ‘Feicheng’ peach in different stages with different treatments

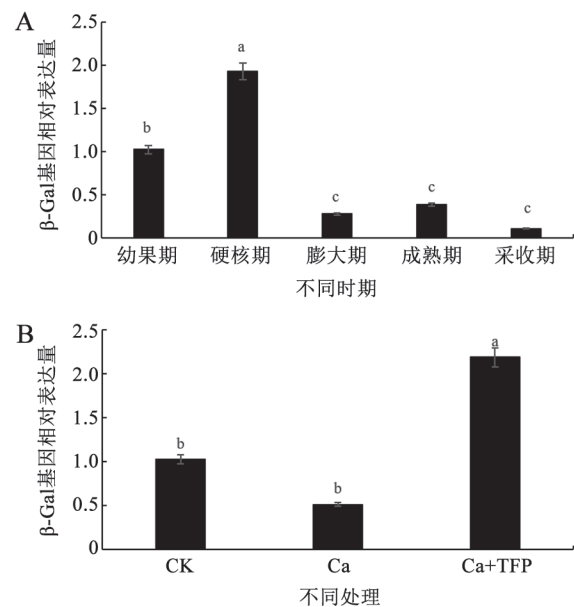


图5 不同果实发育期(A)与不同钙处理(B)的‘肥城桃’果实 β -半乳糖苷酶相关基因表达的变化
Fig.5 Changes of β -Gal-related genes expression in ‘Feicheng’ peach fruits at different fruit development stages (A) and with different treatment (B)

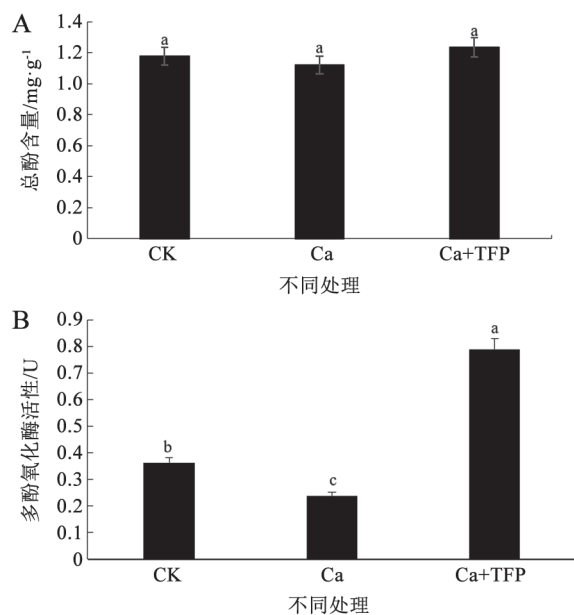


图6 不同钙处理的‘肥城桃’果实的总酚含量(A)和PPO活性(B)变化

Fig.6 Changes of total phenolic contents (A) and polyphenol oxidase activities (B) of ‘Feicheng’ peach fruit with different treatment

与对照无显著差异; Ca处理显著降低果实中*Prupe.4G041500*、*Prupe.4G041700*及*Prupe.4G041900*的基因表达量, Ca+TFP处理的果实基因表达量与对照相比有所下降, 但高于Ca处理的果实基因表达量。

3 讨论

矿质营养作为果树生长发育的物质基础, 一直以来是果树研究的重要方向之一。钙作为植物生长发育必需的中量营养元素, 对果实的影响远超过钾、氮、磷和镁等矿质元素。前人对钙素研究多数集中于钙的使用及不同钙肥种类对果树生长发育的影响(周君等2018), 外源钙对果树作用的途径与方式研究较少。已有研究发现, 植物中的钙不仅是一种重要的结构物质, 更是一种信号转导物质, 主要通过钙与钙靶蛋白结合进行信号转导(郑远和陈兆进2015)。在植物细胞内存在3种钙靶蛋白: 钙调素/类钙调蛋白(CaM/CML)、钙调磷酸酶B类似蛋白(CBL)以及钙依赖性蛋白激酶(CDPK)(Pandey等2013)。其中, 钙调素是高等植物中普遍具有的一类钙离子结合蛋白, 所以探究外源钙是否通过Ca²⁺-CaM信号转导系统调控果实发育对科

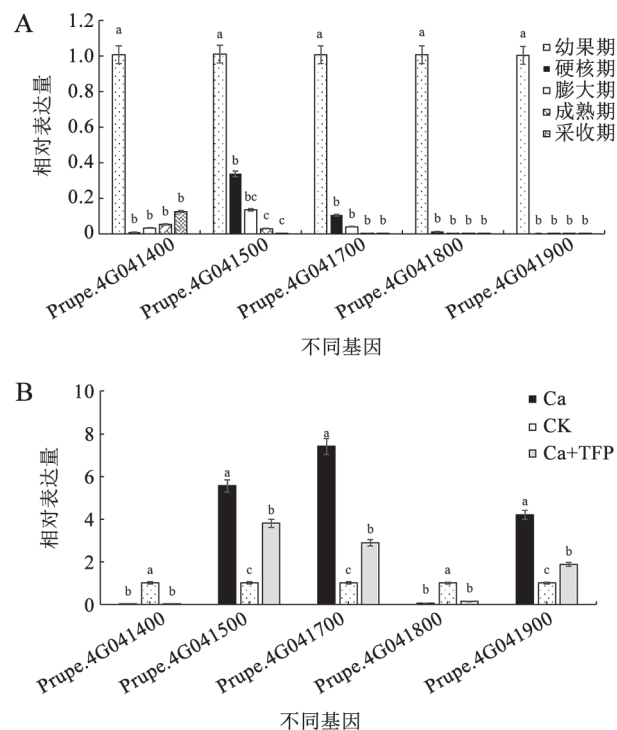


图7 不同果实发育期(A)与不同钙处理(B)的‘肥城桃’果实PPO相关基因的变化

Fig.7 Changes of polyphenol oxidase genes in ‘Feicheng’ peach fruits at different fruit development stages (A) and different treatment stages (B)

学解决‘肥城桃’软化褐变问题具有重要的指导意义, 外施TFP试剂可有效抑制植物体内Ca²⁺-CaM信使系统的正常调控作用(陈彤2006)。本试验以硝酸钙和具有Ca²⁺-CaM拮抗作用的抑制剂TFP为处理, 与对照相比发现, Ca处理可降低‘肥城桃’的腐烂、褐变率(图1), 并显著提高果实的硬度及脆度(图2), 这与曹永庆等(2008)研究结果一致。但Ca+TFP处理与Ca处理结果相反, 为此对不同钙处理果肉的总钙含量进行测定发现, Ca+TFP处理与Ca处理相比无显著性差异, Ca处理与对照相比约提高24%的钙含量, 具有显著性差异, 说明Ca+TFP处理未影响果肉对外源钙的吸收, 并不是Ca含量的差异导致Ca+TFP处理与Ca处理结果的不同。说明500 μmol·L⁻¹的TFP溶液抑制了外源钙介导Ca²⁺-CaM的信使系统缓解‘肥城桃’软化褐变的调控过程。

软化是影响果实品质的重要因素, 而过度软化不仅会引起果实的病害频发, 更严重制约了果

品的贮藏与加工。早有研究发现细胞壁的变化是造成果实软化的主要因素(Fischer和Bennett 1991), 而其一系列的变化是由多种细胞壁降解酶共同作用引起的(Brummell 2006)。Ali等(1995)人在芒果中研究发现 β -Gal活性与果实硬度的降低密切相关, Jin等(2006)研究发现 β -Gal与桃果实的软化密切相关, 且活性高峰期出现在果实成熟前期。吕燕荣等(2011)研究发现枣果实中ZJGal基因的表达式与 β -Gal活性在果实采收前均呈先上升后下降趋势, 在幼果膨大期达到高峰期。本试验对肥城桃果实的 β -Gal酶活性进行测定发现: 3种处理的 β -Gal酶活性均为先升高后下降趋势, 在膨大期出现活性最高峰。对未处理的肥城桃果实定量分析发现*Prupe.7G163100*基因变化趋势与 β -Gal酶活性变化基本一致, 在果实发育前期表达量达到最大, 这与前人研究结果一致。不同钙处理间相比, Ca处理在一定程度上抑制了 β -Gal酶活性, Ca+TFP处理提高了果实中 β -Gal酶活性。而*Prupe.7G163100*基因在果实发育前期对不同钙处理的响应模式与 β -Gal酶活基本一致, 说明外源钙通过 Ca^{2+} -CaM信号系统调控*Prupe.7G163100*基因表达, 从而改变 β -Gal酶的活性调控果实的软化。

褐变作为影响果实品质的主要病害, 严重制约了果品产业的发展, 备受果树研究者关注(孙蕾等2002)。褐变的发生是一个涉及衰老和胁迫等生理生化过程的复杂网络体系, 其发生须具备酶、底物和氧3个条件, 其中酚类物质普遍认为是酶促褐变的反应底物, 含量的高低与果实褐变程度密切相关(罗晓芳等1999), 而催化褐变反应的酶主要是PPO(也兰春等2004)。本实验中, 从3种处理的总酚含量来看, 除Ca处理的总酚含量稍有下降外, Ca+TFP处理与对照相比无显著性差异, 这与王雷(2015)研究结果一致, 说明Ca处理不会对肥城桃果实多酚含量造成显著影响。对PPO活性进行测定后发现, Ca处理对果实中PPO活性具有显著的抑制作用, Ca+TFP处理后PPO活性相比对照提高了近1倍, 说明 Ca^{2+} -CaM信号转导系统对PPO的活性具有重要的调控作用。

PPO作为一种多基因控制的酶类, 其活性受基因调控复杂, 对未处理的各发育期‘肥城桃’果实PPO相关基因定量分析发现, 5个PPO相关基因在

幼果期表达水平达到最大, 说明果实在幼果期开始合成PPO; 对不同钙处理的‘肥城桃’果实进行定量研究发现, *Prupe.4G041400*和*Prupe.4G041800*对钙信号的响应相同, Ca处理正向调控其表达, Ca+TFP处理显著抑制外源钙对基因的诱导作用; 从其余3种基因的响应模式可知, Ca处理显著降低基因表达量, Ca+TFP处理在一定程度上抑制了外源钙对PPO的抑制作用, 说明PPO相关基因对钙信号具有不同响应模式。5种PPO相关基因对钙处理的响应变化与PPO活性变化存在一定差异, 其原因一方面与细胞内钙浓度的变化形式及钙信号的转导途径多样性有关; 另一方面PPO是一种含铜金属酶类(Mayer 2006), 酶活性受体内铜离子变化的调控有关。

综上, 在‘肥城桃’果实发育期喷施0.5%的硝酸钙处理可提高‘肥城桃’果实的硬度, 显著降低‘肥城桃’的褐变率。外源钙一方面通过介导 Ca^{2+} -CaM信号系统抑制*Prupe.7G163100*基因表达, 调节 β -Gal酶活性, 降低细胞壁在果实发育期的降解速率, 使PPO与底物的隔离状态得以维持而降低果实的褐变; 另一方面通过介导 Ca^{2+} -CaM信号系统正向调控*Prupe.4G041400*和*Prupe.4G041800*、反向调控*Prupe.4G041500*、*Prupe.4G041700*和*Prupe.4G041900*等基因表达, 降低PPO酶活性来抑制‘肥城桃’褐变发生。

参考文献(References)

- Ali ZM, Armugam S, Lazan H (1995). β -Galactosidase and its significance in ripening mango fruit. *Phytochemistry*, 38 (5): 1109
- Brummell DA (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Func Plant Biol*, 33 (02): 103–119
- Cao JK, Jiang WB, Zhao YM (2011). *Experiment Guidance of Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Beijing: China Light Industry Press, 46–49 (in Chinese) [曹建康, 姜微波, 赵玉梅(2011). 果蔬采后生理生化实验指导. 北京: 中国轻工业出版社, 46–49]
- Cao YQ, Cao YP, Li Z, et al (2008). Effect of preharvest calcium sprays on quality attributes and flesh browning of Zhonghuashoutao peach fruit. *J Fruit Sci*, 25 (6): 811–815 (in Chinese with English abstrast) [曹永庆, 曹艳平, 李壮等(2008). 采前喷钙对中华寿桃采后贮藏品质及褐变的影响. *果树学报*, 25 (6): 811–815]
- Chen T (2006). Ca^{2+} -calmodulin inhibited by trifluoperazine is involved in the regulation of *Picea meyeri* pollen tube de-

- velopment (dissertation). Beijing: Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences (in Chinese with English abstract) [陈彤(2006). 三氟拉嗪抑制钙-钙调素对白杆花粉管生长的调节(学位论文). 北京: 中国科学院植物研究所]
- Corpas FJ, Barroso JB (2018). Calmodulin (CaM) antagonist affects peroxisomal functionality by disrupting both peroxisomal Ca^{2+} and protein import. *J Cell Sci*, 131 (2): jcs.201467
- Fischer RL, Bennett AB (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 42 (42): 675–703
- Guan JF, Saure M (2005). Calcium Nutrition and Physiology of Fruit Trees. Beijing: Science Press, 2 (in Chinese) [关军锋, Max Saure (2005). 果树钙素营养与生理. 北京: 科学出版社, 2]
- Jin CH, Kan J, Wang ZJ, et al (2006). Activities of β -galactosidase and α -L-arabino-furanosidase, ethylene biosynthetic enzymes during peach ripening and softening. *J Food Process Pres*, 30 (5): 515–526
- Li ZG, Li DG, Li CF, et al (2006). Effects of calcium spray during fruit development on peel pitting and quality of fengjie navel orange. *J Southwest Agric Uni*, 28 (6): 922–925 (in Chinese with English abstract) [李正国, 李道高, 李纯凡等(2006). 生长期喷钙对脐橙果实果皮褐变和品质的影响. 西南农业大学学报, 28 (6): 922–925]
- Liu ZM, Ma HP, Wang XH, et al (2006). Study on the physiological reasons caused the suture softening of peach fruit. *J Fruit Sci*, 23 (4): 519–522 (in Chinese with English abstract) [刘志民, 马焕普, 王兴华等(2006). 桃果实缝合线软化的生理原因探讨. 果树学报, 23 (4): 519–522]
- Luo H, Li M, Hu DG, et al (2012). Effects of organic fertilization on fruit yield and quality of Feicheng peach. *Plant Nutr Fert Sci*, 18 (4): 955–964 (in Chinese with English abstract) [罗华, 李敏, 胡大刚等(2012). 不同有机肥对肥城桃果实产量及品质的影响. 植物营养与肥料学报, 18 (4): 955–964]
- Luo XF, Tian XT, Yao HL (1999). Polyphenol oxidase activities and phenol contents in tissue culture. *J Beijing For Univ*, 21 (1): 92–95 (in Chinese with English abstract) [罗晓芳, 田砚亭, 姚洪军(1999). 组织培养过程中PPO活性和总酚含量的研究. 北京林业大学学报, 21 (01): 92–95]
- Lv YR, Ren XL, Zhou HL (2011). Cloning and expressing analysis of β -galactosidase gene in jujube fruit. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 31 (7): 1318–1325 (in Chinese with English abstract) [吕燕荣, 任小林, 周会玲(2011). 枣果实 β -半乳糖苷酶基因的克隆及表达分析. 西北植物学报, 31 (7): 1318–1325]
- Mayer AM (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67 (21): 2318–2331
- Newman SM, Eannetta NT, Yu H, et al (1993). Organization of tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol Biol*, 21: 1035–1053
- Nie LC, Sun JS, Xin B (2004). Studies on phenolic composition and polyphenol cuitivity in apple fruit. *Acta Horti Sin*, 31 (4): 502–504 [乜兰春, 孙建设, 辛蓓等(2004). 苹果果实酶促褐变底物及多酚氧化酶活性的研究. 园艺学报, 31 (4): 502–504]
- Pandey N, Ranjan A, Pant P, et al (2013). CAMTA₁ regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *Bmc Genomics*, 14 (1): 1–23
- Reddy AS, Ali GS, Celesnik H, et al (2011). Coping with stresses: roles of calcium-and calcium/ calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell*, 23 (6): 2010–2032
- Sun L, Wang TM, Qiao YJ, et al (2002). Review of the mechanism of fruit browning with reference to prevention. *Nonwood For Res*, 20 (2): 92–94 (in Chinese with English abstract) [孙蕾, 王太明, 乔勇进等(2002). 果实褐变机理及研究进展. 经济林研究, 20 (2): 92–94]
- Tong YA, Zhou HJ (1982). Fruit Tree Nutrition Diagnosis method. Beijing: Agricultural Press, (in Chinese) [仝月澳, 周厚基(1982). 果树营养诊断法. 北京: 农业出版社]
- Wallner SJ, Walker JE (1975). Glycosidases in cell wall-degrading extracts of ripening tomato fruits. *Plant Physiol*, 55 (1): 94
- Wang L(2015). Effect of Ca foliar feeding at growing season on calcium dynamics and quality of Feicheng peach (*Prunus persica* (L.) Batsch cv. Feicheng) (dissertation). Taian: Agricultural University of Shandong (in Chinese with English abstract) [王雷(2015). 喷施钙肥对肥城桃钙动态及果实品质的影响(学位论文). 泰安: 山东农业大学]
- Wang L, Li L, Chen XD, et al (2016). Effect of foliar Ca spraying on calcium dynamics, fractions and subcellular distribution of pulp cells of Feicheng peach. *Plant Nutr Fert Sci*, 22 (4): 1102–1110 (in Chinese with English abstract) [王雷, 李玲, 陈修德等(2016). 喷施钙对肥城桃果活性钙含量及其在亚细胞分布的影响. 植物营养与肥料学报, 22 (4): 1102–1110]
- Wang LL, Liu C, Huang YH, et al (2014). Effects of postharvest heat and calcium treatments on calcium fractions and cell wall metabolism of ‘Huangguan’ pear fruit. *Acta Horti Sin*, 41 (2): 249–258 (in Chinese with English abstract) [王玲利, 刘超, 黄艳花等(2014). ‘黄冠’梨采后热处理和钙处理对其钙形态及细胞壁物质代谢的影响. 园艺学报, 41 (2): 249–258]
- Wei JM, Ma FW, Shi SG (2010). Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biol Tec*, 56 (2): 147–154
- Wu YS, Zhang YM, Ji XH, et al (2013). Effects of natural grass on soil nutrient, enzyme activity and fruit quality of

- pear orchard in Yellow River Delta. *Sci Agric Sin*, 46 (1): 99–108 (in Chinese with English abstract) [吴玉森, 张艳敏, 冀晓昊等(2013). 自然生草对黄河三角洲梨园土壤营养、酶活性及果实品质的影响. *中国农业科学*, 46 (1): 99–108]
- Yan HB, Li GQ, Song YW, et al (2017). Comparative genomics analysis of the polyphenol oxidase genes among five Rosaceae species. *Chin J Tropic Crops*, 38 (2): 320–327 (in Chinese with English abstract) [闫洪波, 李桂琴, 宋亚伟等(2017). 5种蔷薇科树种多酚氧化酶比较基因组学分析. *热带作物学报*, 38 (2): 320–327]
- Yan J, Cai ZX, Zhang BB, et al (2013). Extraction and determination of total phenol in peach mesocarp. *Jiangsu J Agric Sci*, 29 (03): 642–647 (in Chinese with English abstract) [严娟, 蔡志翔, 张斌斌等(2013). 桃果肉总酚提取和测定方法的研究. *江苏农业学报*, 29 (3): 642–647]
- Zhang X, Liu ZM, Chen HJ, et al (2008). Changes of endogenous hormones during suture softening of peach fruit. *J Fruit Sci*, 25 (2): 172–177 (in Chinese with English abstract) [张雪, 刘志民, 陈华君等(2008). 桃果实缝合线软化过程中内源激素的变化. *果树学报*, 25 (2): 172–177]
- Zhen Y, Chen ZJ (2015). Organellar calcium signaling in plants. *Plant Physiol J*, 51 (8): 1195–1203 (in Chinese with English abstract) [郑远, 陈兆进(2015). 植物细胞器钙信号研究进展. *植物生理学报*, 51 (8): 1195–1203]
- Zhou J, Xiao W, Chen XD, et al (2018). Effect of exogenous calcium on leaf photosynthetic characteristics and fruit quality of ‘Whangkeumbae’ pear. *Plant Physiol J*, 54 (3): 449–455 (in Chinese with English abstract) [周君, 肖伟, 陈修德等(2018). 外源钙对‘黄金梨’叶片光合特性及果实品质的影响. *植物生理学报*, 54 (3): 449–455]

Effects of exogenous calcium on the softening and browning related enzyme genes expression of ‘Feicheng’ peach

ZHANG Ze-Jie, FU Xi-Ling, SONG Wen-Liang, XIAO Wei, GAO Dong-Sheng, CHEN Xiu-De*, LI Ling*

College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: The 11-year-old ‘Feicheng’ peach (*Prunus persica* cv. ‘Feicheng’) was used as a test material to study the effects of calcium nitrate solution (Ca) and calcium nitrate solution+trifluoperazine (Ca+TFP) on the hardness, the activities of β -Gal, PPO and related gene expression levels, in order to investigate the way of exogenous calcium alleviating the softening browning of ‘Feicheng’ peach. The results showed that spraying Ca treatment could significantly improve the hardness of peach fruit, reduce the occurrence of fruit browning, and significantly increase the total calcium content of the fruit. The Ca+TFP treatment could significantly promote the activity of β -galactosidase (β -Gal), significantly increase polyphenol oxidase (PPO) activity. The expression of β -Gal related gene (*Prupe.7G163100*) reached the maximum in the early stage of fruit development, and exogenous Calcium treatment reversely regulated its expression. And the expression of PPO related genes reached the maximum at young fruit stage, the calcium signal regulated PPO activity through positive regulation of *Prupe.4G041400* and *Prupe.4G041800*, reverse regulation of *Prupe.4G041500*, *Prupe.4G041700* and *Prupe.4G041900* gene expression. In summary, exogenous calcium inhibited the expression of *Prupe.7G163100* through the Ca^{2+} -CaM signaling system, regulated the β -Gal enzyme activity and increased the fruit firmness; on the other hand, it reduced the ‘Feicheng’ peach browning rate by regulating the expression of PPO-related genes and changing the enzyme activity.

Key words: peach; calcium; calcium signal inhibitor; β -Gal; PPO

Received 2018-07-05 Accepted 2018-11-28

This work was supported by Shandong Forestry Science and Technology Innovation Project (LYCX04-2018-21) and Shandong Province Modern Agricultural Technology System Fruit Innovation Team-Cultivation, Soil and Fertilizer (SDAIT-06-01).

*Co-corresponding authors: Chen XD (chenxiude@163.com), Li L (lilingsdau@163.com).