

doi: 10.11707/j.1001-7488.LYKX20220314

# 香榧假种皮开裂过程中组织结构、细胞壁代谢的变化\*

沈家怡 吴翠萍 姚佳 吴家胜 张瑞 胡渊渊

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室 杭州 311300)

**摘要:** 【目的】研究香榧假种皮开裂过程中细胞壁代谢及结构的变化,为进一步探明假种皮的开裂机制和探寻促进假种皮开裂的措施提供理论依据。【方法】在种实不同发育时期内,测定香榧假种皮的开裂率和硬度的变化,分析细胞壁组分及相关降解酶活性的变化,结合石蜡解剖结构的观察,揭示假种皮细胞壁代谢与结构变化在开裂过程中的作用;通过测定香榧种实乙烯释放率的变化,并利用外源乙烯利/乙烯作用抑制剂(1-甲基环丙烯,1-MCP)处理分析乙烯在假种皮开裂过程中的作用,探讨乙烯与假种皮开裂的关系。【结果】1)从134~154 DASP(DASP:突破种鳞后的天数),香榧假种皮的开裂率增加了10倍,硬度降低了61%,假种皮厚度增加了43%;假种皮开裂时(154 DASP),假种皮中靠近内表皮层的树脂道细胞群与其相邻树脂道细胞群之间的薄壁细胞降解,呈分离状态,且中间薄壁细胞层与内表皮层之间存在明显的分离层。2)从134~154 DASP,假种皮的水溶性果胶(WSP)总体上呈增加趋势,而CDTA可溶性果胶(SSP)和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>可溶性果胶(CSP)则呈降低趋势,其相关降解酶果胶甲酯酶(PME)和多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性均呈增加趋势,且PME和PG与硬度均呈显著负相关。3)从134~154 DASP,香榧种实的乙烯释放率呈先增后降的趋势,且外源喷施乙烯利溶液可显著提高香榧假种皮的开裂率,降低其硬度,且乙烯释放率的变化与其开裂率、硬度分别呈显著正相关和显著负相关。【结论】香榧种实从134 DASP开始逐渐进入开裂期,其假种皮的开裂是由内表皮层和中间薄壁细胞层共同作用发生的;假种皮的开裂与其果胶的代谢密切相关,乙烯的释放可促进开裂的发生。

**关键词:** 香榧; 开裂; 假种皮结构; 细胞壁代谢; 乙烯

中图分类号: S718.43 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2023)02-0086-10

## Changes of Anatomic Structure and Cell Wall Metabolism of *Torreya grandis* cv. 'Merrilii' Aril during Cracking

Shen Jiayi Wu Cuiping Yao Jia Wu Jiasheng Zhang Rui Hu Yuanyuan

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture Zhejiang A & F University Hangzhou 311300)

**Abstract:** 【Objective】The aril cracking of *Torreya grandis* cv. 'Merrilii' (*T. grandis*) is an important process for obtaining its seeds. The cracking period of *T. grandis* aril is long, which leads to high harvesting cost. This study aims to study the changes of cell wall metabolism and structure of *T. grandis* aril during the different growth stages, and provide theoretical basis for further exploring the mechanism of aril cracking and exploring measures to promote aril cracking. 【Method】During the different development stages of seeds, the changes of the cracking rate and firmness of *T. grandis* aril were measured, and the changes in cell wall components and its related degradation enzyme activity were also analyzed. Combined with anatomic structure observation of aril at different growth stages, the role of cell wall metabolism and structural changes in the cracking process was investigated. The ethylene production rate of *T. grandis* seeds was measured during growth stages, and the role of ethylene in the cracking process of aril was explored by using the inhibitor of ethephon/ethylene (1-methylcyclopropylene, 1-MCP), and the relationship between ethylene and the cracking of the aril was analyzed. 【Result】1) From 134–154 days after the seeds protrusion (DASP), the cracking rate of aril in *T. grandis* significantly increased by 10 times, the firmness significantly decreased by 61%, and thickness of aril increased by 43%. When arils were cracking (154 DASP), there were obvious separation layers between the resin canal near the inner epidermis and its nearby resin canal, as well as between the middle parenchyma cell layer and the inner epidermis. 2) From 134–154 DASP, the water-soluble pectin (WSP) in aril significantly increased, while the CDTA soluble pectin (SSP) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> soluble pectin (CSP) significantly decreased, and the activities of related degradation enzymes, such as pectin methyl esterase (PME) and polygalacturonase (PG) showed a significant increasing trend. In addition, PME and PG

收稿日期: 2022-05-09; 修回日期: 2022-10-14。

基金项目: 国家自然科学基金项目(32271922; 31800579); 国家自然科学基金联合基金项目(U20A2049); 浙江省基础公益研究计划(LGN20C160002)。

\* 胡渊渊为通讯作者。

activities were negatively correlated with its firmness. 3) From 134–154 DASP, the ethylene production rate of *T. grandis* seeds showed an increased at first and then decreased trend, and the spraying of ethephon solution was able to significantly increase the cracking rate of *T. grandis* aril, and decrease firmness. There was significantly positive correlation between ethylene production rate and cracking rate, or negative correlation between ethylene production rate and firmness. 【Conclusion】 *T. grandis* aril starts to gradually go into cracking stage since 134 DASP, and the cracking of *T. grandis* aril is affected by the inner epidermis layer and the parenchyma cell layer. Besides, the cracking of aril is closely related to the metabolism of pectin and ethylene production.

**Key words:** *Torreya grandis*; cracking; the anatomic structure of aril; cell wall metabolism; ethylene

香榧(*Torreya grandis* cv. ‘Merrilii’)为我国南方特有的珍稀坚果,其种仁富含优质脂肪酸、蛋白质和多种微量元素,营养价值高,盛果期公顷产值高达30万元以上,在助力乡村振兴、促进山区经济发展中发挥着重要作用。香榧假种皮开裂不仅是种子成熟采摘的重要标志,也是种子顺利去皮加工的关键环节(黎章矩等,2007)。生产上,每年“白露”节气时香榧逐渐开始进入开裂期,采收期持续15~20天,如不及时采摘,种子会脱落造成损失。然而,因分批采收成本高、耗时长,常存在未开裂青果大量采摘的现象,导致香榧品质良莠不齐,成品价格下跌,严重影响榧农的经济收入,限制香榧产业的健康发展。因此,开展香榧假种皮开裂机制及其调控的研究对香榧产业的可持续发展有着重要的现实意义和应用前景。

随着果实的成熟开裂,其果皮的硬度呈逐渐降低趋势(Jiang et al., 2019)。果实硬度是由果皮细胞壁各组成物质(果胶、纤维素、半纤维素、木质素和胞壁蛋白等)通过各种化学键交联形成交错伸延的网状结构决定的(Brummell, 2006)。大量研究表明,裂果不仅与果皮硬度密切相关(Yamaguchi et al., 2002; 沈颖等, 2020);还会受果皮结构的影响,如角质层厚度、表皮厚度、果皮细胞的大小及排列方式等(郭红彦等, 2019; 潘青华等, 2021; 辛海青等, 2021)。果皮开裂的实质是细胞壁结构及组分发生了复杂的降解、膨胀过程,包括果胶的水解及溶解、半纤维素和纤维素的解聚(Niu et al., 2020),参与这个降解过程的酶有果胶甲酯酶(pectin methylesterase, PME)、多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonases, PG)及纤维素酶(cellulase, CX)等(Chen et al., 2019; Niu et al., 2020);另外,过氧化物酶(peroxidase, POD)则可催化木质化及细胞壁结构成分(伸展蛋白、半纤维素和果胶)间酚基交联键的形成,使细胞壁硬化,延伸性降低(Andrews et al., 2002)。例如,与抗裂果的‘婆婆枣’(*Ziziphus jujuba* cv. ‘Popozao’)相比,易裂果的‘婆枣’(*Z. jujuba* cv. ‘Pozao’)和‘壶瓶枣’(*Z. jujuba* cv. ‘Hupingzao’)在果实着色期期间,其PG和CX活性增加,使其果皮细胞壁中物质分解增加,进而促进其裂果(宋宇琴, 2017);易裂品种荔枝果实

‘糯米糍’(*Litchi chinensis* cv. ‘Nuomici’)较抗裂品种‘淮枝’(*L. chinensis* cv. ‘Huaizhi’)具有更高的POD活性(李建国等, 2003)。此外,果实的开裂往往伴随着乙烯的大量释放,乙烯被认为是影响果实开裂的重要激素(Wakasa et al., 2006; Wang et al., 2016)。外源乙烯利处理可促进果实的软化、开裂(陈晶晶等, 2015; 张鹤华等, 2015; Chen et al., 2019)。可见,果实的成熟开裂常与其细胞壁代谢酶以及乙烯的释放密切相关。

果实产生裂痕会影响水果外观品质,且易传播病虫害,使果实降低或失去商品价值,目前有关裂果机制的报道多集中于水果类果实(Li et al., 2014; Thongkum et al., 2018);与水果类不同,许多粮油作物果实(如角果、荚果等)发育成熟后,其果实开裂,释放种子,这种传播种子的方式是其后代繁衍的重要保障。目前,有关香榧等坚果类果皮开裂的研究鲜有报道。鉴于此,本文通过研究不同发育时期香榧假种皮硬度、细胞壁组分、细胞壁酶活性和种实乙烯释放率的变化,探讨它们与假种皮开裂率的关系,并结合分析外源乙烯利对假种皮开裂率的影响,揭示香榧假种皮的开裂机制,为探寻促进假种皮开裂率的技术提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验点位于中国浙江省杭州市临安区於潜镇正大苗木场(30°10'N, 119°22'E),该基地于2001年采用“2+1”嫁接苗开始造林,砧木为2年生榧树,穗条为1年生“细榧”(*Torreya grandis* ‘xifei’)品种,2009年开始结实。基地统一采用常规施肥管理措施:每年2次翻耕施肥,第1次为3月中旬施入复合肥(300 kg·hm<sup>-1</sup>氮磷钾平衡复合肥)以促进新梢和雌球花发育;第2次为9月中旬采果以后施复合肥(300 kg·hm<sup>-1</sup>氮磷钾平衡复合肥)和有机肥(4 500 kg·hm<sup>-1</sup>商品羊粪),为第2年生长积累养分。此外,在秋季花芽分化前补施110 kg·hm<sup>-1</sup>硫酸钾。选择9棵香榧树为试验树,每3棵为1个重复,3个重复。2020年4月15日,50%的香榧种实开始突破种鳞,因此记为突破种鳞日,对

种实进行挂牌标记,此后的发育阶段以突破种鳞后的天数(days after the seeds protrusion, DASP)计算,分别于不同的发育阶段(113、124、134、144 和 154 DASP)对香榧种实进行采样及硬度测定,并采集对应时期的假种皮用液氮冷冻,储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续的生理试验。

## 1.2 测定方法

1.2.1 开裂率的调查 在4月15日,分别从四个方位中部各选择结果大枝组20个进行挂牌,由于香榧幼果前期存在落果现象,因此于113 DASP开始数下前期标记好的种实数量(每棵树至少有200个果实)记为总果数,定期数取假种皮开裂的香榧种实,统计时,多侧开裂或单侧开裂长度大于纵径的1/2计均为开裂果。每个时期的开裂率=裂果总数/总果数,裂果总数为截止调查时期的全部开裂果的累加值。每个重复选择1棵树作为开裂率的调查,3个重复。

1.2.2 假种皮硬度的测定 用FHM-1硬度计(日本)进行假种皮硬度的测定,测试深度为2 mm,探头直径为12 mm,每个果实赤道面上选取4个互相对称,取平均值。3个重复,每个重复测定10个果实,硬度单位为 $\text{N}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

1.2.3 假种皮解剖结构的观察 分别切取134 DASP(未大量开裂)和154 DASP(大量开裂)新鲜假种皮的横向结构小方块( $3\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ ),经FAA液固定24 h后,再按常规石蜡切片方法制作(辛海青等,2021)。最后,将制作好的石蜡切片在Olympus BX 60显微镜进行观察,并用Olympus DP 70全自动照相系统拍照。3个重复,每个重复分别采集3个果实赤道部位的假种皮。

1.2.4 假种皮细胞壁组分的测定 细胞壁物质(即乙醇不溶性物, AIR)的提取参考Vicente等(2007)的方法。分别于不同种实发育期,称取1 g香榧假种皮,加液氮研磨成粉末,再加入10 mL 95%乙醇,煮沸1 h。冷却后,依次用10 mL 95%乙醇、10 mL 氯仿:甲醇(1:1 v/v)、10 mL 丙酮进行逐级过滤,每次过滤弃上清液。最后,将过滤后的粉末物质置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘至恒质量,该粉末即为香榧假种皮的细胞壁物质,密封干燥保存。称取细胞壁物质0.1 g,分2次共加入14 mL蒸馏水提取,收集上清液得到水溶性果胶(WSP);再向沉淀物中分2次共加入14 mL  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  CDTA提取得到CDTA果胶(CSP);再向沉淀物分2次加入14 mL  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 提取得到 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 可溶性果胶(SSP)。纤维素和半纤维素含量的测定参照Vicente等(2007)的方法,木质素的测定参考Huang等(2013)的方法。

1.2.5 假种皮细胞壁降解酶活性的测定 多聚半乳糖醛酸酶(PG)和纤维素酶(CX)的活性采用DNS比色法测定,PG和CX的1个酶活力单位(U)表示为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下每克鲜样每小时分解产生1 mg产物。果胶甲酯酶(PME)活性测定方法参考Lohani等(2004)的方法,1个酶活力单位(U)被定义为在620 nm处吸光值每分钟变化0.01吸光度值。POD(过氧化物酶)活性则采用愈创木酚法(王学奎,2006),1个酶活力单位(U)被定义为在470 nm处吸光值每分钟变化0.005吸光度值。

1.2.6 香榧种实乙烯释放率的测定 分别于不同种实发育时期,采集18个香榧种实,称质量后再置于250 mL的收集瓶(提前在瓶盖上钻一取气小孔,用胶带封好),在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温下密封8 h。然而,利用已排气的注射器插入取气小孔,推拉数次使收集瓶内的气体混合均匀后,再抽取10 mL气样,用排水集气法将气体存入装满饱和硫酸铵溶液的50 mL青霉素小瓶中,待测。最后,通过Felix-900乙烯分析仪测定乙烯浓度,每个时期测定3个重复。

1.2.7 外源乙烯利对香榧假种皮开裂率的影响 于123 DASP采集一批无机械损伤、无病虫害、大小一致的未裂香榧种子,均匀地分为21份,每份(1.5 kg)装进1个镂空塑料框( $31\text{ cm}\times 24\text{ cm}\times 10\text{ cm}$ ),进行以下处理:取其中3框进行硬度测定作为处理前的初始值(记为0天),剩余的18框再进行以下处理:对照处理(CK),对香榧种实均匀喷施5 mL蒸馏水,再用自封袋密封24 h,放置室温( $25\pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 保存,再打开通风48 h;1-甲基环丙烯处理(1-MCP),喷施5 mL蒸馏水,并密封在 $200\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$  1-MCP(乙烯作用抑制剂)24 h,再打开通风48 h;乙烯利处理(ETH),喷施5 mL的 $3000\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  乙烯利,用自封袋密封24 h,再打开通风48 h。从采集种实当天开始每3天进行1次处理,共进行2次处理,并分别于采集种实的3和6天进行开裂率和硬度的测定,每个时间点每个处理3个重复(框)。

## 1.3 数据分析

试验数据通过Excel软件进行计算,方差分析采用SPSS 16.0软件进行分析,通过Sigmaplot 14.0作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发育时期香榧假种皮开裂率和硬度的变化

从113~124 DASP,香榧假种皮的开裂率非常低,几乎未发生开裂;此后其假种皮的开裂率开始缓慢增大,134 DASP时增至7.8%,但从134~154 DASP,则快速增至85.9%(图1A)。由图1B可知,从113~124

DASP, 香榧假种皮的硬度无明显变化; 但 124 DASP 之后, 其硬度呈快速降低的趋势, 从 134~154 DASP,

其硬度显著降低了 61%。

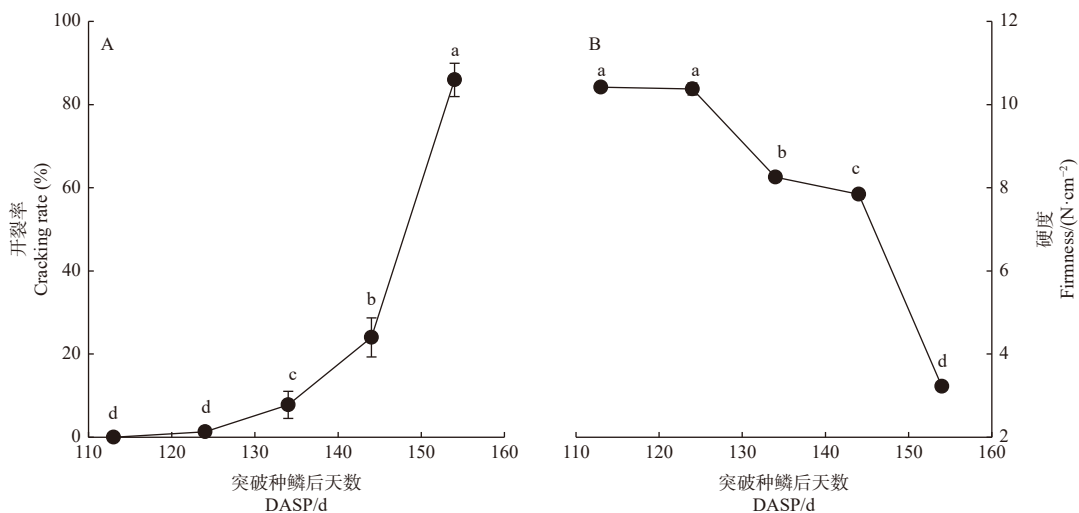


图 1 不同发育时期香榧假种皮开裂率和硬度的变化

Fig. 1 Changes in cracking rate and firmness of aril in *T. grandis* during seeds development

不同小写字母表示不同时期之间在 0.05 水平上差异显著。下同。

Different letters denote significant difference among the different growth stages at 0.05 level. The same below.

### 2.2 不同发育时期香榧假种皮解剖结构的变化

香榧假种皮是由内外表皮细胞层及中间薄壁细胞层组成; 其中外表皮细胞层细胞较小、排列紧密, 而中间薄壁细胞层由 3~4 层树脂道细胞群组成, 每个树脂道均有一圈上皮细胞, 各个树脂道之间均存在薄壁细胞, 内表皮层在靠近中间薄壁细胞层存在明显的离区(红星所示)(图 2A)。由图 2B 可知, 香榧假种皮开裂时, 其靠近内表层的树脂道细胞群逐渐纤维化, 并

分别与内表皮层、外层的树脂道呈明显的分离, 这与其解剖结构相一致, 靠近内表皮层的树脂道细胞群与外层树脂细胞群之间薄壁细胞破裂降解, 且靠近内表皮层的树脂道细胞群与内表层皮有明显的分离层(图 2B)。从 134~154 DASP, 香榧假种皮厚度和中间薄壁细胞层厚度分别增长了 1 014.2 和 1 070.9  $\mu\text{m}$ (图 2B)。

### 2.3 不同发育时期香榧假种皮细胞壁组分的变化

由图 3A 可知, 随种实发育时期, 香榧假种皮中的

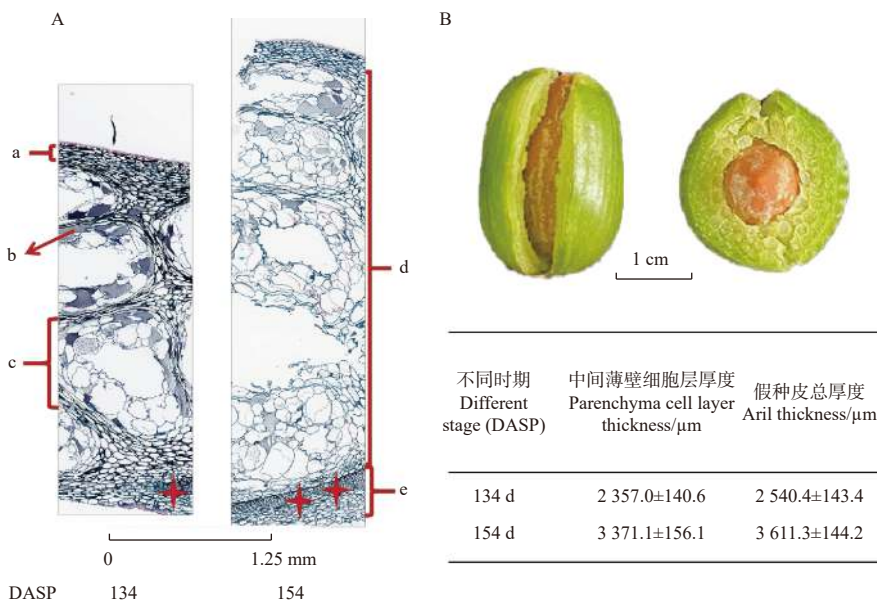


图 2 香榧假种皮开裂外观图及不同发育过程假种皮解剖结构的变化

Fig. 2 Appearance of aril cracking and changes in cell structure of aril in *T. grandis* during seeds development

(a)外表皮细胞层; (b)上皮细胞; (c)树脂道; (d)中间薄壁细胞层; (e)内表皮细胞层。

(a) Epidermal cell layer; (b) Epithelial cells; (c) Resin canals; (d) Parenchyma cell layer; (e) Endocarp cell layer.

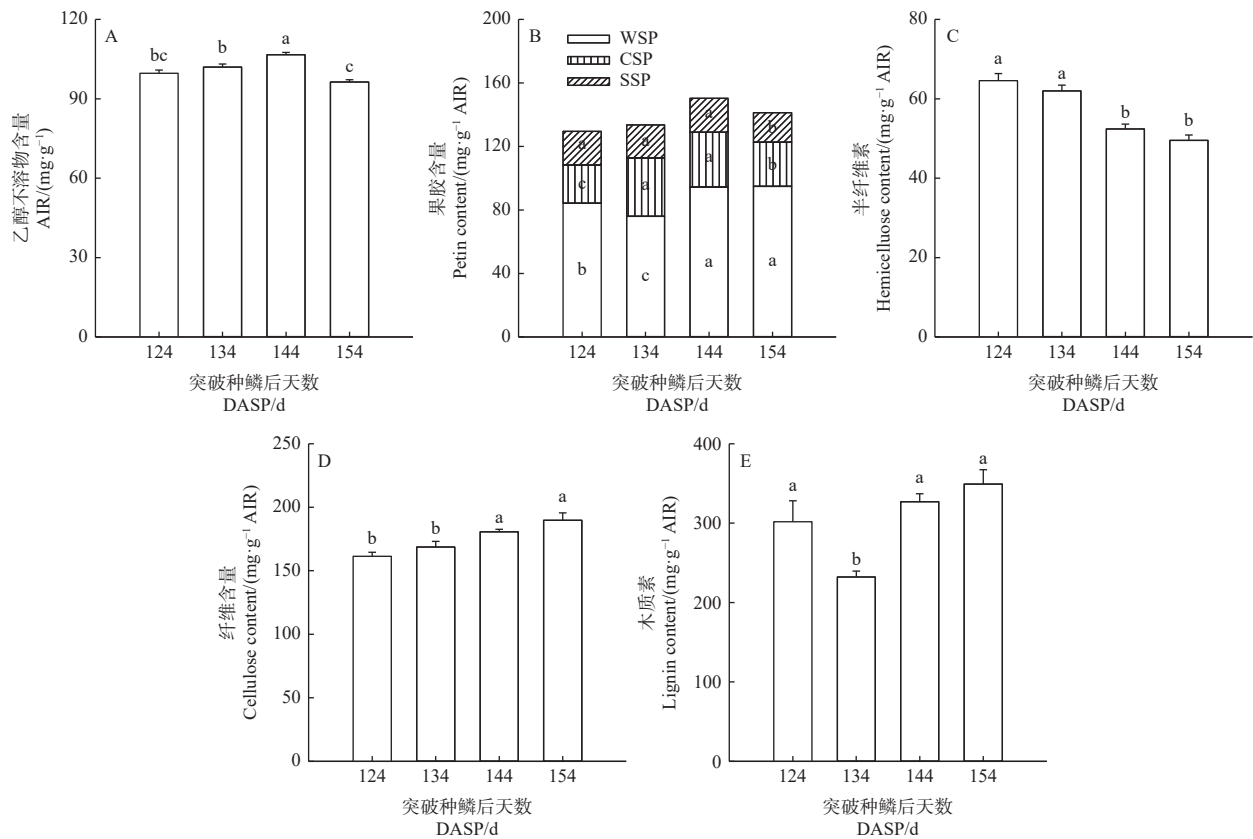


图3 不同发育时期内香榧假种皮细胞壁组分的变化

Fig. 3 Changes in cell wall components of aril in *T. grandis* during seeds development

乙醇不溶物含量(AIR)呈先增加后降低的趋势。从124~144 DASP, AIR显著增加了7%,表明此时香榧假种皮中细胞壁的合成大于分解;而144~154 DASP,细胞壁物质显著降低了9.7%,表明此时细胞壁的分解大于合成。从134~144 DASP,水溶性果胶(WSP)含量显著增加了24.8%;而从144~154 DASP,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>可溶性果胶(CSP)和CDTA可溶性果胶(SSP)分别显著降低了19.2%和13.3%(图3B)。从134~154 DASP,半纤维素含量随种实发育呈逐渐降低的趋势,而纤维素含量和木质素含量则相反,均呈逐渐增加的趋势(图3C-E)。

#### 2.4 不同发育时期香榧假种皮细胞壁降解酶活性的变化

随香榧种实发育,香榧假种皮的果胶甲酯酶(PME)、多聚半乳糖糖醛酸酶(PG)及纤维素酶(CX)活性均呈逐渐增强的趋势(图4)。从134~154 DASP, PME、PG、CX和POD活性分别显著增加了78.4%、16.6%、43.6%和92.4%。

#### 2.5 不同发育时期香榧假种皮开裂率、硬度与其细胞壁组分及降解酶活性的相关性

表1可知,香榧种实发育期间,假种皮的开裂率与硬度呈显著负相关,且假种皮开裂率的变化与其细胞壁降解酶(PME和CX)活性、POD活性均呈显著正

相关;假种皮硬度则与其细胞壁降解酶(PG、PME和CX)活性均呈显著负相关。

#### 2.6 不同发育时期香榧种实乙烯释放率的变化

从图5可知,随香榧种实发育其乙烯释放率呈先增后降的趋势。从124~144 DASP,香榧乙烯释放率增加了3.1倍,但144 DASP过后,其香榧乙烯释放率则显著降低。

#### 2.7 外源乙烯利及乙烯作用抑制剂(1-MCP)对香榧假种皮开裂的影响作用

由图6A可知,处理3天时,乙烯利处理(ETH)的开裂率显著高于对照处理(CK)和1-MCP处理(1-MCP),但CK与1-MCP之间的开裂率无显著差异;处理6天时,3个处理的开裂率之间均存在显著差异,其中ETH的开裂率最高,1-MCP的开裂率最低(图6)。3个处理之间的硬度变化与其开裂率有着相反的趋势,处理期内,1-MCP的硬度显著高于CK和ETH,CK则也显著高于ETH(图6B)。然而,3个处理之间的乙烯释放率则与其开裂率有着相似的变化趋势(图6C),通过进一步分析硬度、乙烯释放率与开裂率的相关性,发现假种皮的硬度变化与其开裂率呈显著负相关,而乙烯释放率变化则与其开裂率呈显著正相关(图6D)。

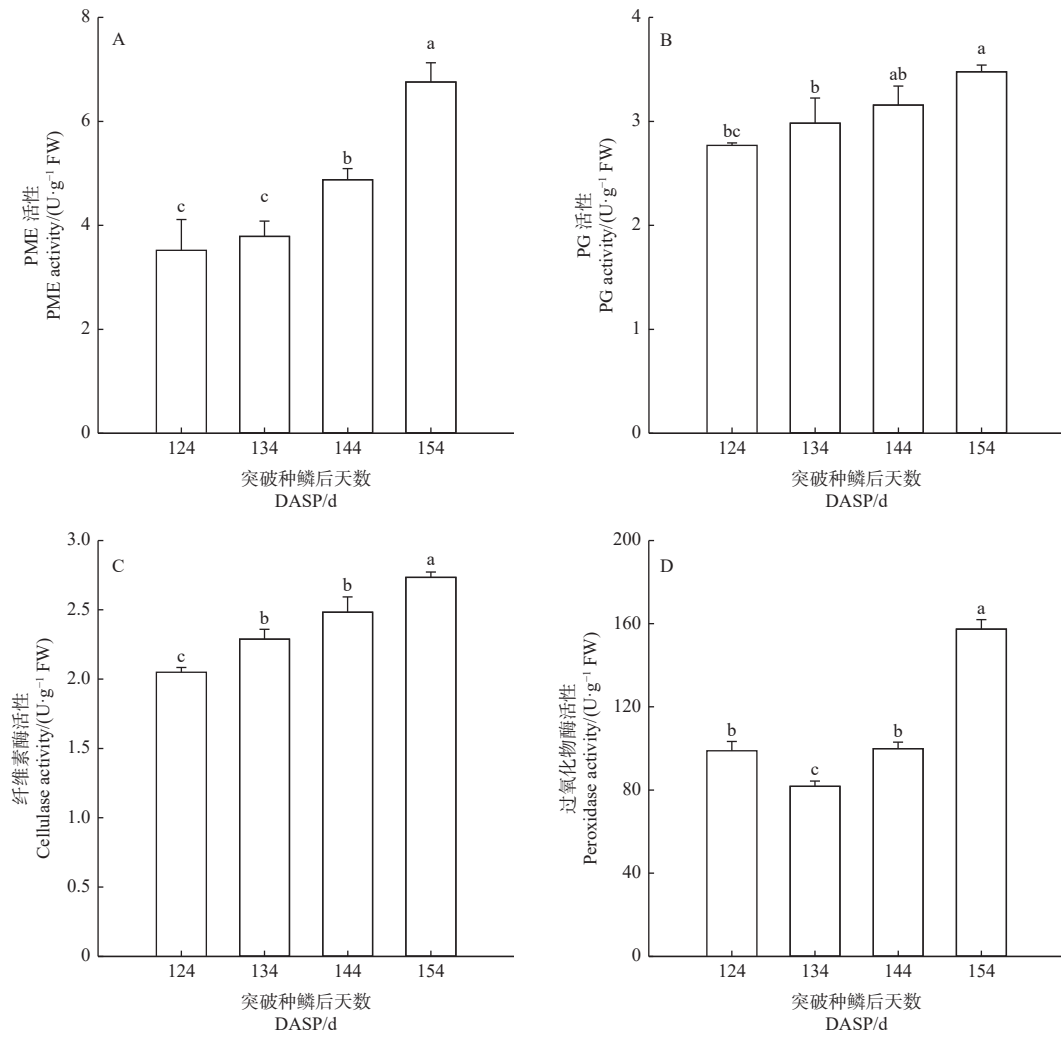


图4 不同发育时期内香榧假种皮细胞壁水解酶活性和氧化酶活性的变化

Fig. 4 Changes in cell wall degrading enzymes of aril in *T. grandis* during seeds development表1 种实发育过程中香榧假种皮开裂率与其硬度、细胞壁组分及其细胞壁代谢相关酶活性的相关性<sup>①</sup>Tab. 1 Correlations between cracking rate, firmness and cell wall components, their cell wall metabolism related enzyme activities of aril in *T. grandis* during seed development

指标 Index	开裂率 Cracking rate (%)	硬度 Firmness/ (N·cm <sup>-2</sup> )	PG活性 PG activity/ (U·g <sup>-1</sup> FW)	CX活性 CX activity/ (U·g <sup>-1</sup> FW)	PME活性 PME activity/ (U·g <sup>-1</sup> FW)	POD活性 POD activity/ (U·g <sup>-1</sup> FW)
开裂率 Cracking rate(%)	—	-0.975*	0.946	0.913	0.987*	0.956*
硬度 Firmness/(N·cm <sup>-2</sup> )	-0.975*	—	-0.974*	-0.951*	-0.964*	-0.871
乙醇不溶物 AIR/(mg·g <sup>-1</sup> FW)	-0.554	0.481	-0.283	-0.194	-0.415	-0.678
纤维素 Cellulose/(mg·g <sup>-1</sup> AIR)	0.907	-0.924	0.986*	0.992**	0.958*	0.780
水溶性果胶 WSP/(mg·g <sup>-1</sup> AIR)	0.686	-0.577	0.689	0.692	0.770	0.714
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 可溶性果胶 CSP/(mg·g <sup>-1</sup> AIR)	-0.184	-0.020	0.122	0.198	-0.110	-0.464
CDTA可溶性果胶 SSP/(mg·g <sup>-1</sup> AIR)	-0.925	0.914	-0.802	-0.746	-0.851	-0.904
半纤维素 Hemicellulose/(mg·g <sup>-1</sup> AIR)	-0.851	0.850	-0.944	-0.958*	-0.925	-0.739
木质素 Lignin/(mg·g <sup>-1</sup> AIR)	0.689	-0.539	0.604	0.584	0.740	0.789

① 表中数字为各参数之间的相关系数。\*: 在0.05水平上显著; \*\*: 在0.01水平上显著。The data in table are the correlation coefficient between parameters, \*refers to significant difference at 0.05 level; \*\* refers to significant difference at 0.01 level.

### 3 讨论

#### 3.1 香榧假种皮开裂过程中硬度及其结构的变化

随果实的成熟发育, 果皮的硬度呈逐渐降低的趋

势(沈颖等, 2020)。研究表明, 果皮的开裂率与其硬度呈显著负相关(Yamaguchi *et al.*, 2002)。本研究结果显示, 从134~154 DASP, 香榧假种皮的开裂率显著增加了10倍(图1A), 其硬度也从8.3 N·cm<sup>-2</sup>降低3.2

$N \cdot cm^{-2}$ (图 1B), 且开裂率与其硬度呈显著负相关, 表明香榧从 134 DASP 开始逐渐进入开裂期。

大量研究表明, 果实的开裂与其果皮或内部结构密切相关, 如枣裂果与其角质层厚度、表皮厚度及其表皮细胞、果肉细胞的排列有关(郭红彦等, 2019; 辛海青等, 2021)。通过对 4 种鲜食枣进行解剖结构观察, 发现裂果率与其亚表皮细胞大小、中果皮细胞大小及果肉细胞空腔大小等呈负相关(潘青华等, 2021)。本研究结果显示, 从 134~154 DASP, 香榧假种皮的中间薄壁细胞层厚度显著增厚了 43%(图 2), 表明假种皮开裂过程是由于其树脂道细胞群体积不断增大向外扩张, 且靠近内表皮层的第 1~2 轮树脂道细胞群要明显大于靠外的树脂道细胞群, 这为假种皮的开裂提供了由内向外的张力, 易造成各树脂道细胞群之间的薄壁细胞分离降解。此外, 内表皮层细胞与中间薄壁细胞层之间形成的离区也为其向外扩张解除

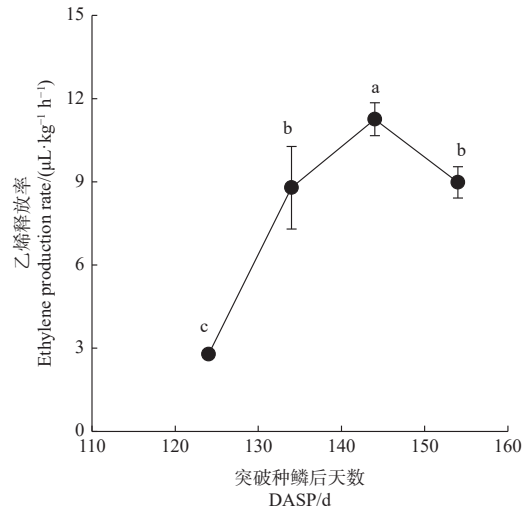


图 5 不同发育时期内香榧种实乙烯释放率的变化

Fig. 5 Change in ethylene production rate of seeds in *T. grandis*

了空间限制。由此可知, 香榧假种皮的开裂是由内向外的“涨开”, 这是由内表皮层和中间薄壁细胞层共

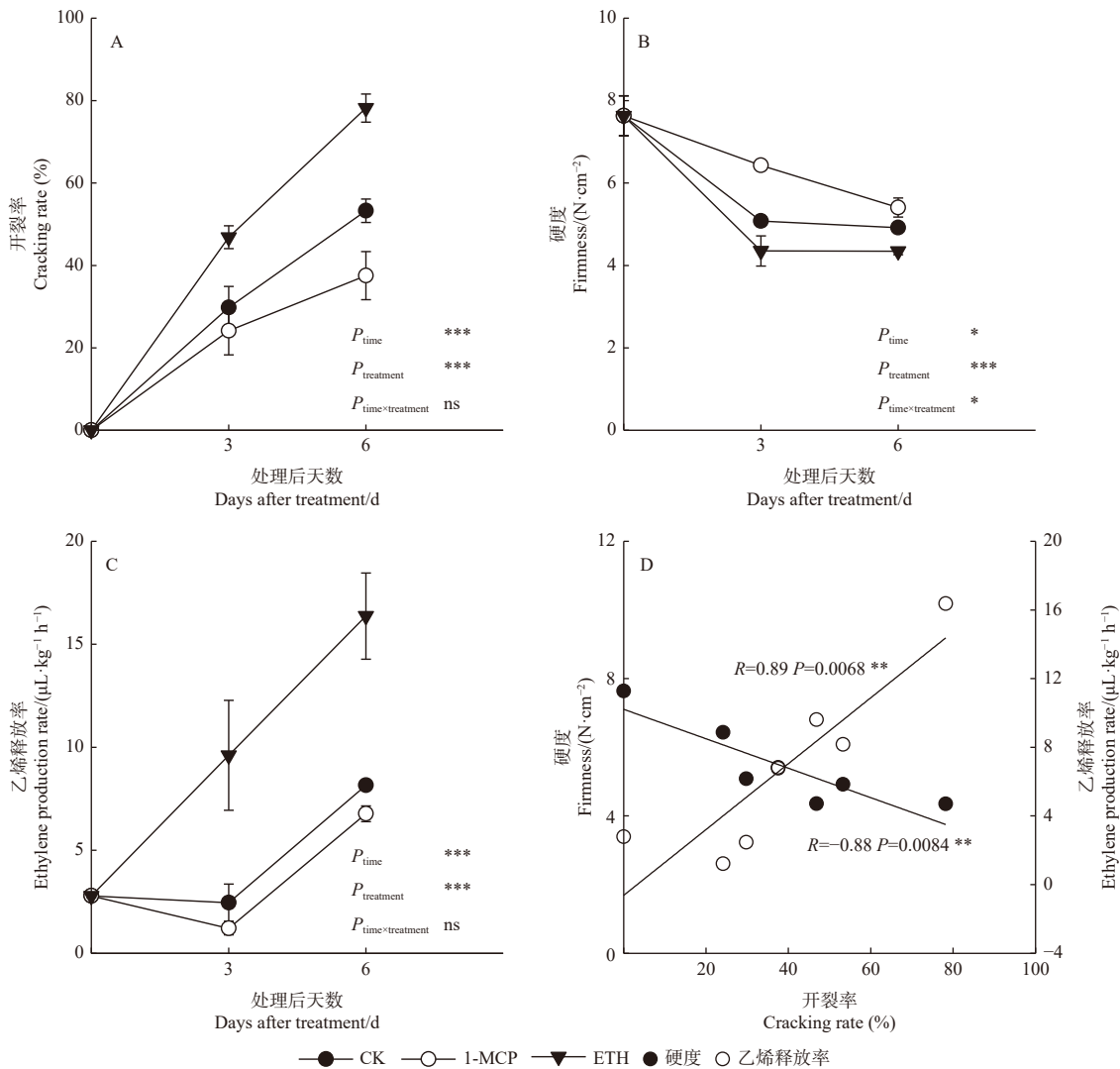


图 6 乙烯利及乙烯作用抑制剂(1-MCP)对香榧假种皮开裂率、硬度、乙烯释放率的影响作用

Fig. 6 Effects of ethephon and ethylene inhibitor (1-MCP) on cracking rate, firmness, ethylene production rate of *T. grandis* aril

同作用发生的。

### 3.2 香榧假种皮开裂过程中细胞壁代谢的变化

果实硬度的降低通常是与其细胞壁组分及细胞壁的降解有关(Bennett *et al.*, 2008)。有研究表明,果皮中的原果胶向水溶性果胶(WSP)的转变,则会促进胞间层降解,果皮软化(宣继萍等, 2015), 樱桃(*Prunus avium*)果实中的 WSP 含量会随其果实成熟逐渐增加(Basanta *et al.*, 2014)。还有研究表明,抗裂果品种的 WSP 显著低于易裂果品种,而 CDTA 可溶性果胶(SSP)和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 可溶性果胶(CSP)等原果胶含量则更高,致使果实硬度更大(杨磊等, 2021)。本研究结果显示,从 134~154 DASP,其 WSP 总体上呈增加趋势,而 CSP 和 SSP 则均呈降低趋势(图 3B),这与番茄(*Lycopersicon esculentum*)果实成熟过程中的果胶从 CSP 和 SSP 逐渐向 WSP 的转变一致(Gross *et al.*, 1979)。有研究表明,果皮细胞壁中半纤维素与果实硬度呈显著的正相关,与裂果率则呈显著负相关(邓佳等, 2016),这与本研究结果中半纤维素含量逐渐降低的趋势相一致(图 3C)。随枣果裂果的发生,其纤维素含量显著增加(栗现芳等, 2020)。本研究结果显示,从 134~154 DASP,假种皮中的纤维素含量呈显著增加的趋势(图 3D),这可能与假种皮中树脂道细胞群的纤维化有关(图 2B)。开裂种皮中的木质素含量要显著高于正常种皮(Mineo *et al.*, 2017; 2018; 安普南等, 2021),这是由于木质素的沉积会降低种皮的物理强度,可使其在外力的作用下易发生开裂。过氧化物酶(POD)是木质素合成的最后一步关键酶(Andrews *et al.*, 2002),开裂种皮中的 POD 活性约为正常种皮的 20.8 倍(安普南等, 2021)。同理,本研究结果显示,从 134~154 DASP,假种皮中的木质素含量显著增多(图 3E),是与其 POD 活性的显著增强有关(图 4D),表明木质素的沉积是假种皮开裂的重要原因。

植物发育过程中,细胞壁各组分含量在不断的变化,主要是通过细胞壁水解酶和细胞壁氧化还原酶的催化、聚合、解聚等作用直接或间接调节细胞壁的结构(裴健翔等, 2018)。易裂品种荔枝果实‘糯米糍’果皮中的 PG、CX 和 PME 活性均高于抗裂品种‘淮枝’(李建国等, 2003)。本研究结果显示,香榧假种皮的开裂期(134~154 DASP),假种皮中的 PME、PG 和 CX 活性均呈显著增加的趋势(图 4A~C),且假种皮硬度与其 PG、CX 和 PME 活性均呈显著负相关,其中 PME 变化还与其开裂率呈显著正相关(表 1),表明这 3 种细胞壁代谢酶在香榧假种皮的开裂过程起着十分重要的作用。综上所述,香榧假种皮的开裂与其细胞

壁组分的变化密切相关,尤其是其果胶的水解。

### 3.3 香榧假种皮的开裂过程乙烯释放率的变化及其与开裂率的关系

乙烯是一种重要的植物内源激素,在果实的成熟开裂过程中起着十分重要的作用(张鹤华等, 2015; 陈晶晶等, 2015; Chen *et al.*, 2019)。本研究结果显示,香榧种实的乙烯释放率在 144 DASP 达到峰值,此后开始降低(图 5);而从 144~154 DASP,假种皮的开裂率还呈快速增加趋势,硬度则也急剧降低(图 1),表明乙烯可能是作为一种信号激素影响香榧假种皮的开裂。采果前 18 天给核桃(*Juglans regia*)树干注射乙烯利和萘乙酸混合液可明显提高核桃青皮的开裂率(张鹤华等, 2015)。外源乙烯利处理 3 天后裂果品种 AP 番荔枝(*Annona squamosa* var. ‘African pride’)的果实开始开裂,但不易裂果品种 PO 番荔枝(*A. squamosa* var. ‘Prachin buri one’)则只是软化未发生裂果现象(陈晶晶等, 2015);而 Chen 等(2019)则发现外源乙烯利处理后促进番荔枝果皮中的果胶降解,进而使其果实发生开裂。还有研究表明,苹果(*Malus sylvestris*)贮存前经乙烯抑制剂 1-MCP 处理能更好的延缓果实的成熟软化(Saftner *et al.*, 2019)。与前人研究一致,本研究发现喷施 1 次乙烯利(3 000 μL·L<sup>-1</sup>)可显著提高假种皮的开裂率,处理 2 次则可提高至 78.2%(图 6A),喷施乙烯利后假种皮的硬度显著低于对照(图 6B),且开裂率分别与其乙烯释放率、硬度均呈显著正相关和负相关(图 6C、D),表明乙烯的释放能促进香榧假种皮的开裂。

## 4 结论

香榧假种皮的开裂主要与假种皮中果胶组分的改变及乙烯的释放有关。随假种皮的开裂,其水溶性果胶不断增加,且其相关细胞壁降解酶(PME、PG)活性也逐渐增强,这可能是其假种皮硬度降低的主要原因。此外,乙烯在假种皮的开裂过程也起着十分重要的作用,通过外源乙烯利处理可显著提高香榧假种皮的开裂率。

## 参 考 文 献

- 安普南,杨晓旭,刘畅,等. 2021. 菜豆种皮开裂过程中木质素含量及相关酶活变化. *黑龙江大学学报*, 12(2): 90-96.
- (An P N, Yang X X, Liu C, *et al.* 2021. Changes in lignin content and related enzyme activities during seed coat dehiscence of kidney bean. *Journal of Engineering of Heilongjiang University*, 12(2): 90-96. [ in Chinese ])
- 陈晶晶,段雅婕,莫亿伟. 2015. 裂果性不同的番荔枝品种果皮中细胞壁代谢相关基因的表达分析. *果树学报*, 32(5): 769-776.



- (Chen J J, Duan Y J, Mo Y W. 2015. Expression analysis of cell wall metabolism gene in pericarp of custard apple cultivars with different fruit cracking characters. *Chinese Journal of Fruit Science*, 32(5): 769-776. [ in Chinese ] )
- 邓 佳, 史正军, 王连春, 等. 2016. 钙处理对葡萄柚果实细胞壁物质代谢及其相关基因表达的影响. *植物营养与肥料学报*, 22(2): 450-458.
- (Deng J, Shi Z J, Wang L C, *et al.* 2016. Effects of calcium treatments on cell wall material metabolism and related enzyme activities and gene expression in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Chinese Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 22(2): 450-458. [ in Chinese ] )
- 郭红彦, 白晋华, 段风琴, 等. 2019. 钙处理对‘壶瓶枣’裂果细胞壁降解酶活性及组织结构的影响. *园艺学报*, 46(8): 1486-1494.
- (Guo H Y, Bai J H, Duan F Q, *et al.* 2019. Effect of CaCl<sub>2</sub> treatment on cell wall degrading enzymes activities and microstructure of fruit cracking of *Ziziphus jujuba* ‘Huping Zao’. *Chinese Journal of Horticulture*, 46(8): 1486-1494. [ in Chinese ] )
- 李建国, 黄旭明, 黄辉白. 2003. 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. *植物生理与分子生物学学报*, 29(2): 141-146.
- (Li J G, Huang X M, Huang H B. 2003. Comparison of activities of cell wall metabolic enzymes in pericarp of litchi varieties with different cracking susceptibility. *Chinese Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 29(2): 141-146. [ in Chinese ] )
- 栗现芳, 陈晓龙, 问徐鹏, 等. 2020. 枣易裂品种和抗裂品种各糖组分含量与裂果的相关性分析. *分子植物育种*, 18(18): 6180-6186.
- (Li X F, Chen X L, Wen X P, *et al.* 2020. Correlation analysis between the sugar components and fruit cracking in easily cracked and resistant jujube. *Molecular Plant Breeding*, 18(18): 6180-6186. [ in Chinese ] )
- 黎章矩, 戴文圣. 2007. 中国香榧. 北京: 科学出版社.
- (Li Z J, Dai W S. 2007. *Chinese Torreya grandis*. Beijing: China Science Press. [ in Chinese ] )
- 潘清华, 戚元勇, 张玉平. 2021. 北京鲜食品种枣果解剖结构与开裂性关系的研究. *山东农业大学学报*, 52(1): 41-45.
- (Pan Q H, Qi Y Y, Zhang Y P. 2021. Study on the relation between anatomical structure and cracking of fresh jujube fruit in Beijing. *Chinese Journal of Shandong Agricultural University*, 52(1): 41-45. [ in Chinese ] )
- 裴健翔, 李燕青, 程存刚, 等. 2018. 不同钙制剂对‘寒富’苹果果实硬度及相关细胞壁代谢物质的影响. *果树学报*, 35(9): 1059-1066.
- (Pei J X, Li Y Q, Cheng C G, *et al.* 2018. Effects of different calcium agents on fruit firmness and related cell wall metabolites in ‘Hanfu’ apple. *Chinese Journal of Fruit Science*, 35(9): 1059-1066. [ in Chinese ] )
- 沈 颖, 李芳东, 王玉霞, 等. 2020. 甜樱桃果实发育过程中细胞壁组分及其降解酶活性的变化. *果树学报*, 37(5): 677-686.
- (Shen Y, Li F D, Wang Y X, *et al.* 2020. A study on the variation of cell wall components and activities of their degradation enzymes in sweet cherry during fruit development. *Chinese Journal of Fruit Science*, 37(5): 677-686. [ in Chinese ] )
- 宋宇琴. 2017. 枣果实发育及其与裂果发生的关系. 太谷: 山西农业大学.
- (Song Y Q. 2017. The *Ziziphus jujuba* Mill fruit development and its relationship with fruit cracking. Taigu: Shanxi Agricultural University. [ in Chinese ] )
- 王学奎. 2006. 植物生理生化实验原理和技术. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 167-168.
- (Wang X K. 2006. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments. 2<sup>nd</sup> Ed. Beijing: Higher Education Press, 167-168. [ in Chinese ] )
- 辛海青, 周军永, 孙耀星, 等. 2021. 枣易裂与抗裂品种灌后果皮结构和扩张蛋白基因表达差异研究. *园艺学报*, 48(9): 1785-1793.
- (Xin H Q, Zhou J Y, Sun Y X, *et al.* 2021. Differences in the pericarp structure and the expression of expansin genes after irrigation between easily cracked and resistant jujube. *Chinese Journal of Horticulture*, 48(9): 1785-1793. [ in Chinese ] )
- 宣继萍, 王 刚, 贾展慧, 等. 2015. 李属植物果实成熟软化研究进展. *中国农学通报*, 31(31): 104-118.
- (Xuan J P, Wang G, Jia Z H, *et al.* 2015. Research advances of ripening and softening in *Prunus* fruit. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 31(31): 104-118. [ in Chinese ] )
- 杨 磊, 冯贝贝, 靳 娟, 等. 2021. 新疆6个大果红枣裂果性差异及其内在原因分析. *西北植物学报*, 41(8): 1364-1370.
- (Yang L, Feng B B, Jin J, *et al.* 2021. Differences in fruit cracking of six big fruit type jujube cultivars from Xinjiang and its internal causes. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica*, 41(8): 1364-1370. [ in Chinese ] )
- 张鹤华, 薛进军, 侯延杰, 等. 2015. 乙烯利和萘乙酸输液滴干对核桃青皮开裂率及果实品质的影响. *南方农业学报*, 46(6): 1058-1062.
- (Zhang H H, Xue J J, Hou Y J, *et al.* 2015. Effects of trunk transfusion and drip with ethrel and naphthalene acetic acid on cracking rate of green husk and fruit quality of walnut. *Chinese Journal of Southern Agriculture*, 46(6): 1058-1062. [ in Chinese ] )
- Andrews J, Adams S R, Burton K S, *et al.* 2002. Partial purification of tomato fruit peroxidase and its effect on the mechanical properties of tomato fruit skin. *Journal of Experimental Botany*, 53(379): 2393-2399.
- Basanta M F, Ponce N M A, Salum M L, *et al.* 2014. Compositional changes in cell wall polysaccharides from five sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars during on-tree ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 12418-12427.
- Bennett A B, Labavitch J M. 2008. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science*, 175, 130-136.
- Brummell D A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2): 103-119.
- Chen J J, Duan Y J, Hu Y L, *et al.* 2019. Transcriptome analysis of atemoya pericarp elucidates the role of polysaccharide metabolism in fruit ripening and cracking after harvest. *BMC Plant Biology*, 19: 219.
- Gross K C, Wallner S J. 1979. Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiology*, 63(1): 117-120.
- Huang W N, Liu H K, Zhang H H, *et al.* 2013. Ethylene-induced changes in lignification and cell wall-degrading enzymes in the roots of mungbean (*Vigna radiata*) sprouts. *Plant Physiology & Biochemistry*, 73: 412-419.
- Jiang F, Lopez A, Jeon S, *et al.* 2019. Disassembly of the fruit cell wall by the ripening-associated polygalacturonase and expansin influences tomato cracking. *Horticulture Research*, 6: 17.

- Li W C, Wu Y Y, Zhang H N, *et al.* 2014. *De novo* assembly and characterization of pericarp transcriptome and identification of candidate genes mediating fruit cracking in *Litch chinensis* Sonn. [International Journal of Molecular Sciences](#), 15: 17667–17685.
- Lohani S, Trivendi P K, Nath P. 2004. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology & Technology*, 31(2): 119–126.
- Mineo S, Naoya Y, Miho H, *et al.* 2017. Accumulation of proanthocyanidins and/or lignin deposition in buff-pigmented soybean seed coats may lead to frequent defective cracking. *Planta*, 245(3): 659–670.
- Mineo S, Michio K, Miho H, *et al.* 2018. Occurrence and tolerance mechanisms of seed cracking under low temperatures in soybean (*Glycine max*). *Planta*, 248(2): 369–379.
- Niu J, Shi Y, Huang K, *et al.* 2020. Integrative transcriptome and proteome analyses provide new insights into different stages of *Akebia trifoliata* fruit cracking during ripening. [Biotechnology for Biofuels](#), 13: 149.
- Saftner R A, Abbott J A, Conway W S, *et al.* 2019. Effects of 1-methylcyclopropene and heat treatments on ripening and postharvest decay in golden delicious apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(1): 120–127.
- Thongkum M, McAtee P M, Schaffer R J, *et al.* 2018. Characterization and differential expression of ethylene receptor genes during fruit development and dehiscence of durian (*Durio zibethinus*). [Scientia Horticulturae](#), 240: 623–630.
- Vicente A R, Powell A, Greve L C, *et al.* 2007. Cell wall disassembly events in boysenberry (*Rubus idaeus* L. × *Rubus ursinus* Cham. & Schldl.) fruit development. *Functional Plant Biology*, 34(7): 614–623.
- Wakasa Y, Kudo H, Ishikawa R, *et al.* 2006. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. [Postharvest Biology and Technology](#), 39(2): 193–198.
- Wang J Q, Sun L, Xie L, He Y Z., *et al.* 2016. Regulation of cuticle formation during fruit development and ripening in ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) revealed by transcriptomic and metabolomic profiling. [Plant Science](#), 243: 131–144.
- Yamaguchi M, Sato I, Ishiguro M. 2002. Influences of epidermal cell sizes and flesh firmness on cracking susceptibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars and selections. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71(6): 738–746.

(责任编辑 万贤崇)