锦橙采后果皮结构及生理特征变化与褐斑的相关性

李聪敏[1]，杨晓红[1,*]，郝春梅[1]，王日葵[2]，周 炼[2]，韩爱华[2]
(1.西南大学园艺园林学院，重庆 400715；2.中国农业科学院柑桔研究所，重庆 400712)

摘 要：研究常温通风库贮藏的北碚447锦橙果实产生褐斑前后的果皮结构及生理特征的变化趋势与褐斑的相关性。结果表明：褐斑后果皮皱缩、干瘪，形成不规则深棕色区域；油胞崩溃、萎缩，周围细胞变形，番红整染后样品着色深；果皮的游离过氧化物酶(soluble peroxidase，POD)、超氧化歧化酶(superoxide，SOD)和多酚氧化酶(polyphenoloxidase，PPO)以及果皮相对电导率(relative electric conductivity，REC)不仅相互间存在显著的相关性，与褐斑率也存在显著的相关性，它们相互作用，共同影响褐斑的发生。此外，PPO与总酚的含量变化没有线性相关性。因此，POD、SOD、PPO、REC可以作为观察褐斑发生的重要生理特征。

关键词：北碚447锦橙；果皮结构；果皮褐变；生理特征

Physiological, Biochemical and Microstructural Changes and Their Relationships with Peel Pitting of "Beibei 447 Jincheng" Orange during Postharvest Storage

LI Cong-min[1]，YANG Xiao-hong[1,*]，HAO Chun-mei[1]，WANG Ri-kui[2]，ZHOU Lian[2]，HAN Ai-hua[2]
(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China；
2. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract：To reveal the occurrence mechanism of peel pitting of "Beibei 447 Jincheng" orange, physiological, biochemical and microstructural changes of "Beibei 447 Jincheng" orange stored under normal temperature and ventilation condition were measured before and after pitting, and their relationships with pitting were investigated. After the formation of pitting, "Beibei 447 Jincheng" orange peel became crimpled and shriveled. Besides, disruption and atrophy of oil vacuole and deformation of cells around oil vacuole were both observed, and safranine dyed samples exhibited a deep color. A significant correlation was observed among peroxidase (POD), superoxide (SOD), polyphenoloxidase (PPO) activities and relative electrical conductivity (REC) or between these parameters and peel pitting rate. The occurrence of peel pitting was due to the interactions among these parameters. Moreover, there was no linear relationship between PPO activity and total phenol content. Thus, POD, SOD and PPO activities and REC can be considered crucial physiological features indicating peel pitting occurrence.

Key words："Beibei 447 Jincheng" orange；microstructure of peel；peel pitting；physiological features
中图分类号：S379.9 **文献标识码**：A **文章编号**：1002-6630(2010)06-0274-05

北碚447锦橙因品质和外观好、产量高、商品性强、适应性广，被列为长江柑橘带在重庆发展的首选品种。作为贮期较长的甜橙，采后果皮易出现不规则生理性褐斑。此病不仅影响了果皮的光洁度和内在风味品质，还降低了果实的商品价值。目前，国内外对果实贮藏中果皮褐变发生机理的研究相当重视，但由于果蔬褐变诱发因素复杂，关于其发病机理尚没有确切阐明。此外，关于果蔬褐变的机理研究多集中于荔枝、梨、草莓、甜樱桃等水果，对柑橘果皮褐斑病的研究较少且多以脐橙为研究对象。因此，本实验以锦橙为材料，研究贮藏期锦橙褐斑发生过程中相关生理特征的变化规律，以期为锦橙果实贮藏保鲜提供理论依据。

收稿日期：2009-04-16
基金项目："十一五"国家科技支撑计划项目(2006BAD22B01-01)
作者简介：李聪敏(1983—)，女，硕士研究生，研究方向为经济植物生物学与生物技术。E-mail：0212202737@163.com
*通信作者：杨晓红(1963—)，女，教授，博士，研究方向为植物生物学与生物技术。E-mail：yangxh2@swu.edu.cn
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

锦橙-北碚447果实于2007年11月底采自重庆北碚区歇马镇虎头山实验园。

氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、蛋氨酸(Met)(均为生化纯)；核黄素、EDTA-Na_2、抗坏血酸、焦儿茶酚、过氧化氢、碘化钾、钼酸铵、硫代硫酸钠、碳酸钙、愈创木酚、硝酸钴、重铬酸钾、偏磷酸、无水乙醇、三氯乙酸、没食子酸、液溴、酒石酸钾钠、硫酸铜、交联聚乙烯吡咯烷酮等(均为分析纯)；施保功(抑霉唑)(纯度50%)、2,4-二氯苯氧乙酸(纯度98%)。

1.2　仪器与设备

TU-1901双光束紫外-可见分光光度计　北京普析通用仪器有限责任公司；H-1850R高速冷冻离心机　长沙湘仪离心机仪器有限公司；液氮罐　成都金凤液氮容器有限公司；雷磁DDS-307电导率仪　上海精科实业有限公司；HH-4数显恒温水浴锅　国华电器有限公司。

1.3　方法

1.3.1　供试材料前处理

果实当天运回实验室，次日选择果面完好，大小、颜色均匀，成熟度基本一致的九成熟果实，用施保功(稀释倍数500×10^{-6})与2,4-二氯苯氧乙酸(稀释倍数250×10^{-6})浸果30s，晾干过夜后用PE薄膜单果包装，常温通风库中贮藏。

1.3.2　生理指标测定方法

愈创木酚法比色法[1]测量游离POD活性；碘液滴定法[2]测量过氧化氢酶(catalase，CAT)活性；VC氧化法[3]测量PPO活性；NBT还原法[3]测SOD活性；采用陈华[4]方法并略有改进测定果皮REC；Folin-Denis比色法[5]测定总酚含量。各项生理指标测定均分别随机选取健康果与褐斑果各5个，将果皮切碎充分混合后，取果皮4g，在液氮状态下研磨至粉碎，以上指标均重复取样3次。

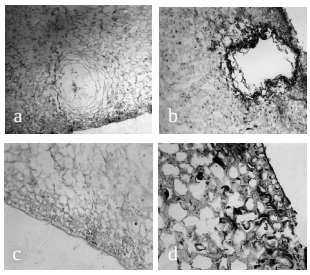
1.4　数据统计与分析：

实验数据用Excel工具进行数据整理和分析，t检验进行显著性分析($P<0.05$)；采用线性回归进行相关性分析。

2　结果与分析

2.1　北碚447锦橙褐变前后果皮显微结构比较

柑橘果皮包括外果皮、白皮层和内果皮。健康果外果皮致密、平整，角质层完整、连续分布。表皮细胞大小基本一致，近矩形，排列整齐，有序，无细胞间隙。紧挨表皮的是2～3层排列紧密的薄壁细胞，这些细胞多为圆形或类圆形、壁薄、细胞间隙小。越靠近果皮深处，细胞越大。油胞位于白皮层，多个、单层，顺着外侧白皮层呈球形排列。油胞较大，卵圆形。油胞间距大，油胞周围薄壁细胞多为卵圆形或者多边形。白皮层包含分生细胞，其形状和大小都是不规则的，细胞间隙大。样品番红整染后着色浅(图1a和1c)。



a.健康果果皮油胞(CK，×100)；b.锦橙褐斑果果皮油胞(×100)；c.健康果果皮结构(CK，×400)；d.锦橙褐斑果果皮结构(×400)。

图1　果实采后果皮形态及显微结构的变化

Fig.1　Microstructure change of "Beibei 447 Jincheng" orange peel before and after browning

褐变果外果皮出现皱缩、干瘪。角质层和表皮细胞均出现断裂不完整的情况。受损的组织表现为外果皮下的大量细胞出现结构改变。表皮细胞及薄壁细胞的细胞壁都稍有加厚。这些细胞质都是紊乱的，细胞中央出现许多细胞质分解后形成的物质。这些物质与番红染料的亲和性更高，染成了深红色。油胞形状发生改变，由卵圆形变成扁圆形、狭长形或者皱缩的多边形。油胞周围细胞也发生改变降解萎缩。番红整染后果皮组织着色较深，表明褐斑果果皮细胞壁的木质化程度较深(图1b和d)。

2.2　果皮氧化酶活性与褐变的关系

表1　果实采后果皮褐斑率的变化

Table 1　Pitting rate of "Beibei 447 Jincheng" orange peel during storage under normal temperature and ventilation condition

贮藏期/d	10	20	30	50	85	115
褐斑率/‰	0	0	0	25.16	37.88	59.69

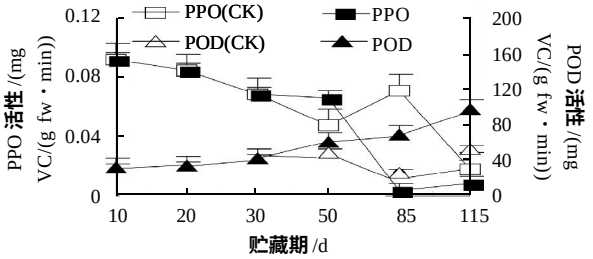


图2　果实采后果皮PPO和POD活性

Fig.2　Changes of PPO and POD activities of "Beibei 447 Jincheng" orange peel during storage under normal temperature and ventilation condition

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

如表1可知，采后褐斑大约出现在贮藏30d以后，且随着时间推移，褐斑率不断升高。如图2所示，随着贮藏期的延长，褐斑果的PPO酶活性趋势均整体下降；10～50d对照果PPO活性快速下降，50～85d略有上升，85～115d再次下降。到了贮藏末期褐斑果与对照果果皮的PPO活性基本可以忽略不计。贮藏50d褐斑果皮PPO活性高于对照，85～115d则相反，且都达到显著水平($P < 0.05$)。

在贮藏初期，果皮内游离POD活性较低(图2)。随着贮藏期的延长，对照果和褐斑果果皮POD活性均呈整体上升趋势。50～115d同期褐斑果游离POD活性总是高于对照果($P < 0.05$)。

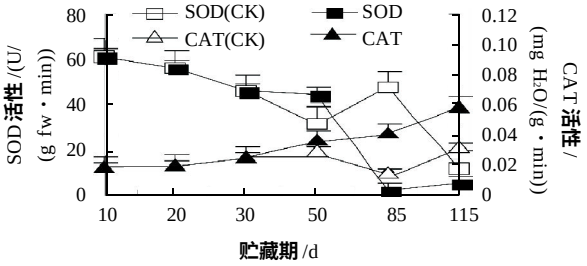


图3 果皮采后果皮SOD和CAT活性

Fig.3 Changes of SOD and CAT activities of "Beibei 447 Jincheng"orange peel during storage under normal temperature and ventilation condition

如图3所示，采后果皮SOD活性总体呈大幅度下降趋势，说明果皮清除活性氧的能力不断下降。50～85d同期褐斑果SOD酶活性显著低于对照($P < 0.05$)。

随着果实成熟度的增加，采后果皮CAT活性快速下降(图3)。30d后褐斑果皮与50d后对照果皮酶活性略有上升并平稳变化，可见采后初期果皮CAT清除H_2O_2能力下降，后期清除能力稳定。统计分析得知，50～115d同期褐斑果皮CAT酶活低于对照，但没有达到显著性水平($P > 0.05$)。

2.3 果皮相对电导率、总酚含量与褐斑的关系

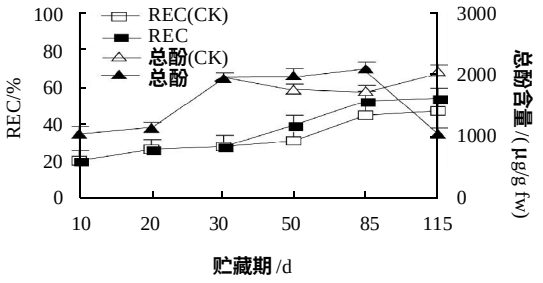


图4 果实采后果皮REC与总酚含量

Fig.4 Changes of REC and total phenol content of "Beibei 447 Jincheng"orange peel during storage under normal temperature and ventilation condition

由图4可知，采后10～30d果皮REC变化幅度较小，30d后REC均快速增加，85～115d果皮REC上升幅度减缓。总体说来，采后果皮REC整体不断升高。说明随着贮藏期果皮膜脂过氧化反应加剧，膜系统被破坏，膜透性增加，促进了细胞内电解质外渗，细胞不能维持正常的生理机能。果实贮后50～115d，褐斑果皮REC总是高于对照($P < 0.05$)，说明褐斑果果皮膜脂过氧化反应强于对照，膜损伤较大。

酚类物质是酶促褐斑的重要反应底物。贮藏前期果实总酚含量低，随着贮藏期延长，其上升幅度较大，20～30d总酚含量快速升高。30～85d褐斑果皮总酚含量缓慢上升，85～115d总酚含量急剧下降；对照则略有下降后再上升。50～115d褐斑果皮的总酚含量一直高于对照，115d时褐斑果皮的总酚含量显著低于对照($P < 0.05$)。

2.4 褐斑果实生理特征间的相关性分析

表2 褐斑果实生理特征间的线性相关性分析

Table 2 Correlation analysis among POD, SOD, CAT and PPO activities, REC and pitting rate of "Beibei 447 Jincheng"orange peel during storage under normal temperature and ventilation condition

指标	POD	PPO	SOD	CAT	REC	总酚
POD	1					
PPO	－0.87*	1				
SOD	－0.90*	0.88*	1			
CAT	－0.77	0.68	0.93*	1		
REC	0.85*	－0.97*	－0.95*	－0.80	1	
总酚	0.07	－0.26	－0.43	－0.63	－0.43	1
褐斑率	0.98*	－0.90*	－0.95*	－0.71	0.95*	0.04

注：* 表示指标之间的线性相关性显著。

整个贮期与褐斑有关的各项生理指标整体变化趋势均近似线性变化，且有文献称PPO和果实抗氧化酶体系均可能参与多种果蔬酶促褐斑[1,6-9]。因此，为了进一步分析上述酶活性与褐斑产生的关联程度，对指标之间进行简单的直线回归分析(表2)。

统计分析表明POD和REC与褐斑率呈显著正相关；SOD和PPO与褐斑率表现出较强负相关($P < 0.05$)，CAT和总酚与褐斑率线性关系不显著($P > 0.05$)。表明POD、SOD、PPO、REC均是影响褐斑发生的重要因素，可以作为研究褐斑发生的重要生理特征。

此外，SOD、POD、PPO和REC之间也存在相关性，说明以上几个生理生化特征不仅与褐斑率存在显著相关性，相互间也存在显著的相关性，它们相互作用共同影响褐斑的发生。

各生理指标与总酚均不具有线性关系，说明PPO和抗氧化酶体系的变化对于总酚的代谢没有直接的影响，不是其代谢的关键。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨 论

3.1 SOD 活性变化与褐斑的关系

SOD 主要功能是通过歧化成 H_2O_2 清除活性氧。Sala[6]证实高湿度条件下贮藏的“Navelina”脐橙果实 SOD、CAT 等多种酶活性小于低湿度贮藏的果实，同时高湿度条件下果实的褐斑率更高。寇莉萍等[7]用 0.08mm PE 袋包装苹果，保持袋内 CO_2 体积分数大于 40mL/L 并于 4℃和 0℃贮藏，观察到 SOD 活性下降的同时果肉褐变。但是董剑寒等[8]发现冷库和气调贮藏的梨果实 SOD 活性与褐变的直接关系不明显。本实验发现随着褐斑率的不断升高，贮期果皮 SOD 活性整体下降。此外，比较 50～115d 同期褐斑果与对照可知，褐斑果皮 SOD 酶活性显著小于对照($P < 0.05$)。本实验通过分析 SOD 与褐斑率的线性关系，证实 SOD 与褐斑率的变化是线性相关。因此，可以将 SOD 活性作为预测褐斑率变化的重要生理特征。

3.2 CAT 活性变化与果皮褐斑的关系

张有林等[9]发现不同温度下石榴果皮 CAT 酶活性都持续下降，同时褐斑指数上升，故认为 CAT 活性下降与褐变指数具有负相关性。本实验经线性回归分析认为，CAT 活性与褐斑率的相关性不显著($P > 0.05$)。植物细胞具有多种分布于各个区域的高效的活性氧清除机制[10]，CAT 仅存在于过氧物酶体中，与胁迫条件下细胞内过量 H_2O_2 的清除有关。其他细胞器如线粒体及胞浆中产生的 H_2O_2，主要通过 VC 氧化酶和谷胱甘肽氧化还原体系清除[11]。在无光合作用植物细胞内，线粒体是主要产生活性氧的源细胞器[12]，实验中观察到 CAT 活性与果皮褐斑率相关不显著可能就是因为锦橙果皮活性氧主要由线粒体产生的原因。这样的结果与杨书珍等[11,13-14]发现油桃、苹果、桃的 CAT 活性与 H_2O_2 并不完全负相关的结论相印证。

3.3 POD 活性变化对于果皮褐斑的影响

POD 在植物中具有多种同工酶，其作用十分复杂。寇莉萍等[7]认为 POD 活性下降促进了果肉的褐变。然而，高雪[15]认为常温贮藏的奉节脐橙 POD 活性整体上升与褐斑率具有相关性。褐斑严重的奉节脐橙 POD 活性较高。本实验分析 POD 活性与褐斑率的相关性分析，认为游离 POD 与褐斑率呈显著正相关，这与张刚等[10]研究一致。多年以前人们已经发现植物 POD 具有非均一性的特点。植物的 POD 同工酶与植物的种类、产地、发育过程等因素有关。因此，本实验与寇莉萍等[7]研究结果有出入，可能是因为其研究材料是苹果所致。

3.4 总酚与褐斑的关系

酚类物质是酶促褐变反应的底物。吴耕西等[16]发现鸭梨果心酚类物质含量高于果肉，褐变一般从果心开始发展到果肉，与酚类含量密切相关。本实验观察到锦橙果实褐斑前后总酚的变化分为两个阶段。因此，笔者认为总酚与褐变率的关系也应该分阶段分析。采后初期到 85d 时总酚的含量与褐斑率是正相关的，85～115d 总酚含量与褐斑率负相关。这可能与贮藏过程中果实的抗氧化活性不断变化有关。Cajuste 等[17]认为酚类物质对于抑制早熟脐橙果实褐斑起到一定的作用，总酚含量与植物的抗氧化活性显著正相关[18]。

3.5 PPO 活性与褐斑的关系

吴耕西等[16]研究发现鸭梨果心酚类物质含量在褐变初期有一个高峰值，PPO 活性在同期也出现高峰。然而鞠志国研究莱阳茌梨果实发现褐变最严重的果心含酚类物质最多，但 PPO 活性最低。认为 PPO 并不是启动果实褐变的关键酶，不同品种梨和梨果实的不同部位其褐变发生早晚与 PPO 活性的变化无明显的相关性。本实验统计可知，PPO 活性与总酚含量变化没有线性关系，说明 PPO 对总酚的代谢没有显著影响。造成研究结果不同的原因可能为 PPO 存在于部分含有质体的植物组织中，一般在幼嫩部分含量较多，而在成熟部分较少[20]。尽管有些研究者发现了细胞或组织中的酚类化合物含量与从其中分离的 PPO 活性之间的关系，但是体内大多数 PPO 活性是潜在的，要确定其在体内的实际活性非常困难。此外，Vaughn 等[21]使用细胞化学和体外酶学方法，用 tentoxin 处理绿豆组织导致 PPO 活性完全丧失却没有影响酚类物质在这些组织中的积累。这说明植物体中还存在其他重要的酚类代谢系统。因此，本研究认为 PPO 与总酚之间是否存在相关性还应该作进一步的探讨。

4 结 论

4.1 锦橙果实褐变后果皮形成不规则深棕色区域，皱缩、干瘪；油胞崩溃，萎缩，周围细胞变形，木质化程度加剧。

4.2 POD 和 REC 与褐斑率呈显著正相关；SOD 和 PPO 与褐斑率表现出较强负相关；CAT 和总酚与褐斑率线性不显著。因此，POD、SOD、PPO、REC 的变化均是影响褐斑发生的重要因素，可以作为研究褐斑发生的重要观察指标。

4.3 SOD、POD、PPO 和 REC 之间存在相关性，它们之间相互作用共同影响褐斑的发生。

4.4 POD、SOD、PPO、CAT、REC 与总酚线性关系不显著。

参考文献：

[1] BALLESTER A R, LAFUENTE M T , GONZÁLEZ-CANDELAS L. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-penicillium digitatum interaction[J].

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Postharvest Biol Technol, 2006, 39(2): 115-124.

[2] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[3] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.

[4] 陈华. 重庆三峡库区柑桔采后生理生化特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006: 15.

[5] 朱广廉, 钟诲文, 张爱琴. 植物生物学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 229-232.

[6] SALA J M, LAFUENTE M T. Antioxidant enzymes activities and rindstaining in‘ Navelate ’oranges as affected by storage relative humidity and ethlene conditioning[J]. Postharvest Biol Technol, 2004, 31: 277-285.

[7] 寇莉萍, 刘兴华, 李金龙, 等. 富士苹果果肉褐变对相关酶活性和膜质过氧化的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 171-182.

[8] 董剑寒, 王然, 宫静静, 等. 不同梨果实褐变特异性分析[J]. 中国农学通报, 2007, 23(4): 285-288.

[9] 张有林, 张润光. 石榴贮期果皮褐变机理的研究[J].中国农业科学, 2007, 40(3): 573-581.

[10] 张刚, 李里特, 丹阳. 果蔬成熟哀老中的活性氧代谢[J]. 食品科学, 2004, 25(增刊): 225-228.

[11] 杨书珍, 任小林, 彭丽桃, 等. GA3 处理对采后油桃果实膜脂过氧化的影响[J]. 西北植物学报, 2001, 21(3): 575-578.

[12] PUNTARULO S, GALLEANO M, SANCHEZ R A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination[J]. Biechim Biopys Acta, 1991, 1074: 277-283.

[13] 关军锋, 束怀瑞, 张良诚. 钙处理对红星苹果 H_2O_2 含量和 GSH-PX 活性的影响[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 391-392.

[14] 杨剑平, 韩涛, 李丽萍, 等. 热处理对桃贮藏期膜脂过氧化作用的影响[J]. 园艺学报, 1996, 23(1): 89-90.

[15] 高雪. 奉节脐橙果皮褐变生理及相关基因的分离研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2006: 8-42.

[16] 吴耕西, 周宏伟, 汪建民. 鸭梨酶促褐变的生化机制及底物鉴定[J]. 园艺学报, 1999, 19(3): 198-202.

[17] CAJUSTE J F, LAFUENTE M T. Ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting as related to phenolic metabolism and lignin content in‘ Navelate ’fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 45(2): 193-203.

[18] 冯健君, 陈俊伟, 徐红霞, 等. 果袋透光性对宁海白琵琶果实品质基抗氧化能力的影响[J]. 果树学报, 2009, 26(1): 66-70.

[19] 鞠志国, 朱广廉. 莱阳茌梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 356-361.

[20] 贺立红, 宾金华. 高等植物中的多酚氧化酶[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(4): 340-345.

[21] VAUGHN K C, DUKE S O. Tentoxin-induced loss of plaslidic polyphenol oxidase[J]. Physiol Plant, 1981, 53(4): 421-428.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net