

冷害对荔枝果皮膜脂过氧化和保护酶活性的影响

胡位荣^{1,2}, 张昭其¹, 季作樑¹, 刘顺枝²

(1 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642; 2 广州大学生物与化学工程学院, 广东广州 510405)

摘要:以广东省优良品种‘糯米糍’为试材,研究了荔枝 *Litchi chinensis* 果实在冷害温度贮藏过程中果皮膜脂过氧化与保护酶变化规律. 结果表明,糯米糍在 0℃下 21 d 时果面已经出现水渍状褐斑,褐变指数 2.45,果皮细胞相对电导率达到 56.4%,货架期仅 6 h,表明果实已经遭受不可逆的冷害. 0℃下 14 d 后果皮超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)和过氧化氢酶(CAT)活性下降,协调紊乱,导致果皮的 MDA 含量迅速增加. 3℃冷藏 7~14 d 的果实 SOD、CAT 活性维持较高的水平,不表现冷害,28 d 时出现衰老.

关键词:荔枝;果皮;冷害;膜脂过氧化;保护酶

中图分类号:S667

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)03-0006-04

Effect of chilling injury on membrane lipid peroxidation and activities of cell defense enzyme in litchi pericarp

HU Wei-rong^{1,2}, ZHANG Zhao-qi¹, JI Zuo-liang¹, LIU Shun-zhi²

(1 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 School of Biology and Chemistry Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Litchi cultivar ‘Nuomici’ was used to study membrane lipid peroxidation and activities of cell defense enzyme in pericarp when stored at (0±0.2) and (3±0.2) °C. Fruits stored at 0 °C for 21 days developed irreversible chilling damage. The chilling-injured fruits presented water-logging browning spots, relative conductivity of pericarp membrane was 56.4%, browning index 2.45 and shelf life only 6 h. During this process, the activities of superoxide (SOD), ascorbic acid-peroxidase (AsA-POD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) decreased or worked unbalance, which accumulated free radical and enhanced lipid peroxidation, as a result, malondialdehyde (MDA) content went up quickly. The SOD and CAT activities of fruits stored at 3 °C maintained higher level during 7–14 days and developed browning only after 28 days without chilling injury.

Key words: litchi (*Litchi chinensis* Sonn.); pericarp; chilling injury; membrane lipid peroxidation; cell defense enzyme

零上低温自发气调结合药物防腐冷藏是目前国内外荔枝商品化贮运保鲜的理想方法,但是荔枝是冷敏性亚热带水果,在冷藏期间易引起冷害. 国内外对荔枝果实冷害温度的报道结果不一. Akamin 等^[1]提出荔枝贮藏适温是 1.5 和 2 °C; Tongdee^[2]发现在 7 °C 以下荔枝可出现冷害症状;李察堂等^[3]认为 2 °C 可使荔枝遭受冷害;我国早期提出 1~5 °C 为荔枝贮藏适温^[4],现在则趋向荔枝最适贮藏温度为 3~5

°C^[5]. 黄晓钰等^[5]从果皮电解质渗漏率、呼吸强度、乙烯释放量、ACC 合成等研究了荔枝果实冷害温度及其与贮藏时间的关系. 本试验以广东省优良品种‘糯米糍’为材料,研究了在不同低温下荔枝果实的膜脂过氧化与保护酶变化动态,以进一步探讨荔枝果实冷害机理,为更好地进行荔枝的低温贮运提供理论依据.

收稿日期:2003-11-03

作者简介:胡位荣(1966-),男,副教授,博士. 通讯作者:张昭其(1965-),男,副研究员,博士.

基金项目:国家自然科学基金农业倾斜项目(30070534)

1 材料与方法

1.1 材料与处理

供试荔枝 *Litchi chinensis* 品种为‘糯米糍’,2001年和2002年均采自广州市从化。采后当天8 h内入库预冷,选取成熟度一致、无病虫害和机械损伤的果实,用5 g/L漂白粉及0.5 g·L⁻¹施保功(德国艾格福公司生产)洗果、防腐,晾干后用0.03 mm厚聚乙烯薄膜袋包装、封口,置入日本产SANYAN低温恒温箱中贮藏。处理温度分别为(0±0.2)、(3±0.2)℃。定期取果实观测。

1.2 方法

1.2.1 贮藏效果及货架期观察 贮藏后每隔7 d抽样统计果实褐变情况:0级果——果实全红;1级果——果实龟裂片尖变褐;2级果——果皮1/3以下变褐;3级果——果皮1/3~1/2变褐;4级果——果皮1/2以上变褐;5级果——果皮完全变褐。并计算褐变指数,褐变指数=∑(褐变级数×果实数)/总果数。货架期:以占出库时好果率(0+1+2级果)90%以上为标准确定。每次每处理随机抽查60个果实以上。重复3次。

1.2.2 果皮膜透性的测定 定期从12个果实中取果皮圆片30个,蒸馏水清洗2次后用滤纸吸干,放入50 mL具塞刻度试管中,加蒸馏水25 mL,室温(28~30℃)放置30 min,以DDS-11A型电导仪测定浸出液的电导度。随后再将果皮及浸出液回流煮沸30 min,测定果皮全渗电导度。以浸出液电导度占全渗时电导度的百分率表示膜透性大小。重复3次。

1.2.3 果皮丙二醛(MDA)含量的测定 参照邵从平等^[6]的方法,取荔枝果皮1.0 g液氮磨碎,加入预冷的5.0 mL 0.05 mol·L⁻¹ pH 7.8磷酸缓冲液和2 g/L PVP匀浆。4℃下16 000 r/min离心15 min,取上清液备用。取1 mL上清液于刻度试管中,加入3 mL硫代巴比妥酸,记下刻度,置于沸水浴中反应30 min,取出,冰水冷却,用双蒸水补足,4 000 r/min离心20 min,以5 g/L硫代巴比妥酸溶液为空白,分别测定 D_{532nm} 、 D_{600nm} 值,计算 $b(\text{MDA})/(\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1})$ 。重复3次。

1.2.4 果皮PPO、POD、AsA-POD和CAT活性的测定

按1.2.3方法提取酶液,测定SOD^[6]。另从12个荔枝果实取1.0 g果皮,液氮磨碎,加入预冷的5.0 mL 0.15 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.8)和2 g/L PVP匀浆。16 000 r/min 4℃离心15 min,上清液分别用于测定POD^[7]、AsA-POD^[8]、CAT^[7]酶活性。重复3次。

2 结果与分析

2.1 荔枝低温贮藏中的冷害症状及褐变指数变化

从外观上看,0℃下14 d的糯米糍果实果皮色泽正常,但红色显得暗淡;21 d时果面已经出现水渍状褐斑,分布较均匀,28 d时果实已严重冷害,果实几乎整果变褐,但果面无病斑,果肉完好,不流汁。3℃果实在21 d时才开始出现大小不等的褐斑,28 d时褐斑有所扩展,35 d后褐斑有病菌出现。果实经低温贮藏后移到室温,货架期随着冷藏时间的延长而缩短。0℃下21 d的果实在室温下,果面快速均匀变褐,货架期仅6 h,说明果实已经遭受不可逆的冷害;3℃下冷藏21和28 d的果实货架期分别是30和12 h。

从褐变程度看,荔枝果皮褐变指数随贮藏时间延长而增大(图1)。贮藏初期,果皮褐变较少,多为龟裂片尖变褐,但果皮一旦开始出现褐斑,则褐变速度加快。0℃果实在14 d内的褐变指数虽然较3℃果实略低,但14 d后即迅速增大,从14 d时的1.27上升到21 d时的2.45,28 d时达到3.97。3℃下果实的褐变指数增大相对缓慢,28 d时褐变指数达到2.67。

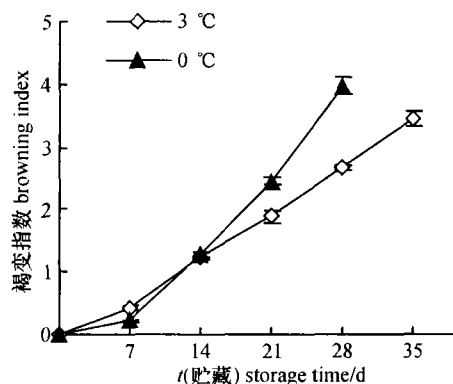


图1 低温贮藏对荔枝果皮褐变指数的影响

Fig. 1 Effect of low-temperature storage on browning index in litchi pericarp

2.2 低温下荔枝果皮膜透性的变化

经低温贮藏后,荔枝果实的电导率增加,且在同一贮藏温度下,随着贮藏时间的延长,电导率持续上升(图2)。0℃果实贮藏7 d时果皮细胞膜透性略低于3℃,但14 d后急剧增大,21 d时就已经超过50%,显著高于3℃果实($P < 0.05$)。3℃果实的电解质渗出率则相对平稳增加,28 d时为46.3%,35 d时也超过55.1%。相关性分析表明,糯米糍冷害褐变指数与果皮膜透性呈明显的正相关($r = 0.978^*$, $P < 0.05$)。

2.3 低温下荔枝果皮MDA含量的变化

MDA是膜脂过氧化作用的产物,它的大小可反映细胞膜系统受到伤害的程度。从图3可知,荔枝果

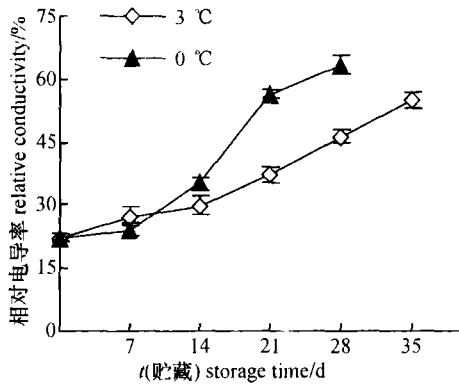


图2 低温贮藏对荔枝果皮细胞膜透性的影响

Fig. 2 Effect of low-temperature storage on cell membrane

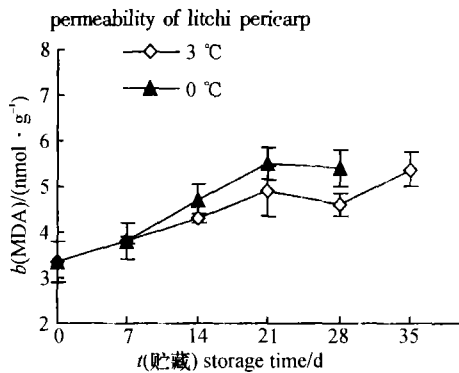


图3 低温贮藏对荔枝果皮 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effect of low-temperature storage on MDA

content in litchi pericarp

皮 MDA 含量在冷藏过程中随着贮藏时间延长而逐渐增加. 0 °C 下果皮 MDA 含量一直增加, 尤其是在 7 ~ 21 d 期间, 呈直线上升, 第 21 d 时的 MDA 含量比采收时鲜果的增加了 65.37%, 说明膜系统遭到了严重破坏. 3 °C 下果实的 MDA 含量总是低于 0 °C 果.

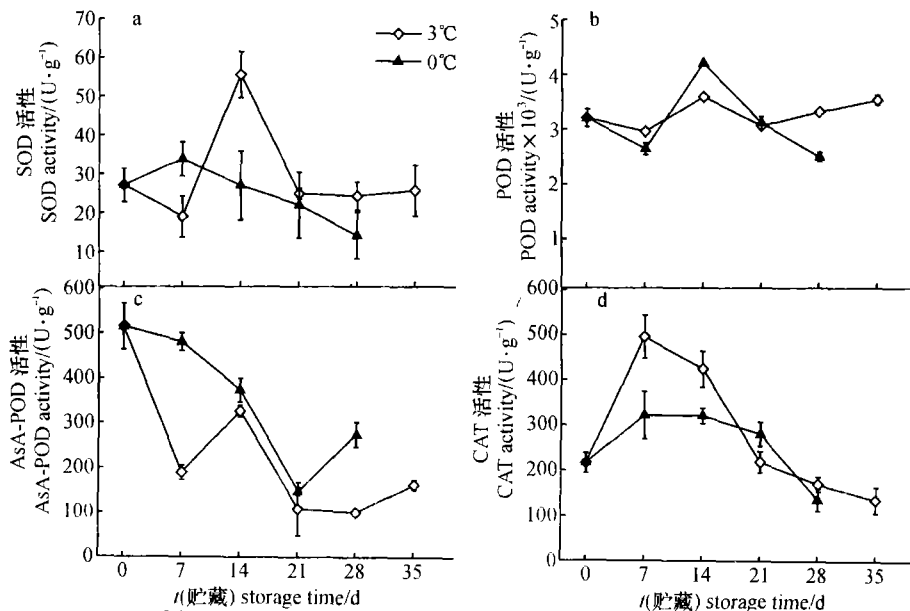


图4 低温对荔枝果皮 SOD、POD、AsA-POD、CAT 活性的影响

Fig. 4 Effect of low-temperature storage on SOD, POD, AsA-POD, CAT activities in litchi pericarp

2.4 低温下荔枝果皮保护酶活性的变化

2.4.1 SOD 活性 由图 4a 可看出, 0 °C 下 7 d 糯米糍果皮 SOD 活性略有升高, 随后则一直均匀降低. 3 °C 果实酶活性在贮藏开始的 7 d 下降, 但随后迅速上升, 14 d 时形成高峰后回落, 并维持在一定水平. 在贮藏中、后期, 3 °C 果实的 SOD 活性高于 0 °C 果实, 其中, 第 14 d 时 SOD 活性是 0 °C 的 2.06 倍. 说明在 0 °C 下, 糯米糍随着冷害程度的加剧, SOD 受到伤害, 活性下降.

2.4.2 POD 活性 POD 活性在 2 种低温条件下有相似的表现 (图 4b): 冷藏 7 d 均明显下降, 之后快速回升, 这是抗低温的反应, 14 d 后又开始回落. 在贮藏前期和后期, 0 °C 果实 POD 活性均低于 3 °C 果实. 虽然 0 和 3 °C 果实都在 14 d 时形成小峰, 但 0 °C 果的峰值高于 3 °C 果. 从整个贮藏过程看, 3 °C 果实的 POD 活性变化比较平稳, 一直维持在较高的活性水平上.

2.4.3 AsA-POD 活性 低温明显抑制了糯米糍果皮 AsA-POD 活性, 整个贮藏过程中都低于采收时的水平 (图 4c). 0 °C 下 AsA-POD 活性很快下降, 21 d 时到达最低点, 仅为采收时鲜果的 28.57%, 之后有所回升. 3 °C 下果实第 7 d 开始上升, 14 d 出现高峰值, 之后随着果实的衰老又呈下降趋势, 整个贮藏期, 3 °C 果实酶活性低于 0 °C 果.

2.4.4 CAT 活性 低温使荔枝果皮 CAT 活性先升高, 维持一段时间后再降低 (图 4d). 0 °C 果实的 CAT 活性基本都低于 3 °C 果实 (除第 21 d 外), 第 7 d 出现的高峰值为 3 °C 果实峰值的 64.9%.

3 讨论

热带亚热带果蔬在贮藏中易受到低温伤害,伤害发生时首先损伤细胞膜系统,使膜收缩、破裂,从而破坏了膜的选择透性,引起细胞内的物质外渗,细胞内的分室作用遭到破坏^[9],酶与底物接触发生反应,往往会导致组织褐变.在本试验中,当荔枝果实处于冷害温度环境下,果皮细胞膜系统透性持续增大,表明细胞区域化被解除,可能导致花色素苷、酚类从液泡中渗漏,在花色素苷酶、多酚氧化酶(PPO)、POD等的作用下,形成酚类物质,酚类物质氧化成醌,醌进一步聚合而成褐色物质^[10],于是果皮呈现褐变症状,因此,冷害发生过程中果实冷害褐变指数与果皮膜透性之间存在着较高的相关性.

冷害引起细胞膜系统损伤与自由基代谢失调有关^[11].在正常情况下,自由基与清除它们的酶类(SOD、CAT、POD等)区域化地分布在细胞内,细胞内自由基的产生和清除处于动态平衡状态,自由基水平很低,不会伤害细胞.但是当植物受到胁迫(如冷害)时,这个平衡就被打破,自由基累积过多,可能启动并加速膜脂过氧化链式反应或膜脂脱脂作用,同时,SOD等保护酶系统活性降低或活性变化不协调,导致积累许多有害的过氧化产物MDA,损伤大分子生命物质,引起一系列生理生化紊乱,最终导致膜的损伤和冷害发生.本试验发现,短期低温胁迫可以促使荔枝果皮SOD、CAT活性升高,提高了清除氧自由基的能力,以适应不良环境;但随着冷害时间延长,14 d时SOD、CAT活性迅速下降,同时POD、AsA-POD活性变化失调,导致自由基代谢平衡可能被打破,膜脂过氧化加剧,MDA含量增加,21 d时果实冷害加重,果皮褐变;其中,褐变指数与果皮MDA含量明显正相关($r=0.907^*$, $P<0.05$).王燕等^[11]在芒果、周云等^[12]在龙眼上也发现果实冷害与自由基代谢失调之间存在密切关系.庞学群等^[13]曾报道 H_2O_2 、 O_2^- 对荔枝花色素苷提取液有强烈的破坏作用,并导致花色素苷迅速变褐,进一步验证了这一点.

抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)能催化抗坏血酸与 H_2O_2 反应,使AsA氧化成单脱氢抗坏血酸^[8].在荔枝冷害时,糯米糍果皮AsA-POD活性一直快速下降,虽然Vc损耗减少,但 H_2O_2 的清除减少,导致活性氧增多,也促进果皮衰老、褐变,加剧了冷害.

可见,荔枝果实在冷害温度环境中,随着贮藏时间的延长,自由基清除酶系统活性下降或协调紊乱,

有利于形成更多的活性氧,导致细胞膜脂过氧化加剧,膜透性增大,果皮逐渐显现水渍状褐斑,冷害程度加重,直至完全变褐,果皮最终遭受永久性伤害.因此,荔枝果实冷害发生时,其内部的生理生化变化与果皮外部的褐变过程是一致的,褐变过程是内部代谢失调的外在表现.荔枝在 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 下贮藏14 d以后,果皮膜脂过氧化作用迅速加强,细胞膜透性显著增加,保护酶活性下降,从而引起冷害导致褐变;而 $3\text{ }^\circ\text{C}$ 贮藏下上述指标变化幅度小,到28 d以后表现衰老、褐变.说明糯米糍荔枝果皮在未作护色处理下,冷藏温度以 $3\text{ }^\circ\text{C}$ 左右为宜.

参考文献:

- [1] AKAMINE E K, GOO T. Respiration and ethylene production during ontogeny of fruit[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1973, 98(4):381-383.
- [2] TONGDEE S C, SCOTT K J, MCGLOSSON W B. Packaging and cool storage of litchi fruit[J]. CSIRO Food Research, 1982, 42(2):25-28.
- [3] 李察堂,蔡书芬,俞永标. 温度和数种不同处理对荔枝贮藏寿命的影响[J]. 中国园艺, 1983, 29(3):46-52.
- [4] 李来荣. 山地果树栽培研究[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1966. 100-112.
- [5] 黄晓钰,康德妹,季作樑. 荔枝果实的冷藏适温与冷害[J]. 华南农业大学学报, 1990, 11(3):13-18.
- [6] 邵从平,罗广华,王爱国,等. 几种检测超氧化物歧化酶活性反应比较[J]. 植物生理学通讯, 1983, (5):46-49.
- [7] 曾韶西. 低温光照下与黄瓜子叶叶绿素降低有关的酶促反应[J]. 植物生理学报, 1991, 17(2):171-182.
- [8] 中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1999. 315-316.
- [9] PALIYATH G, DROILLARD M J. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence[J]. Plant Physiol Biochem, 1992, 30:789-812.
- [10] 张昭其,庞学群,段学武,等. 荔枝采后果皮花色素苷的降解与花色素苷酶活性变化[J]. 中国农业科学, 2003, 36(8):945-949.
- [11] 王燕,李雪萍,季作樑. 芒果冷害对两种自由基清除剂的影响[J]. 园艺学报, 1995, 22(3):235-239.
- [12] 周云,季作樑,林伟振. 龙眼冷藏适温及其冷害的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(1):13-18.
- [13] 庞学群,张昭其,段学武,等. 氧化还原物质对荔枝果皮花色素苷稳定性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2):15-17.

【责任编辑 柴焯】