

猕猴桃采后果实冷藏与货架期脂氧合酶活性和 乙烯生成的变化

许文平, 陈昆松, 徐昌杰, 张上隆

(浙江大学果实分子生理与生物技术实验室/农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室 杭州 310029)

摘要:以布鲁诺美味猕猴桃果实为材料,研究冷藏和货架期间脂氧合酶(LOX)活性和乙烯合成的变化及其相互关系。结果显示,果实冷藏期间的LOX活性被显著抑制,自由基生成减少,ACC积累延缓,ACC氧化酶活性降低,乙烯释放量很低,果实维持较高的硬度,当冷藏果实转入20℃货架期,上述效应迅速被逆转,表现为LOX活性增加,ACC含量上升,乙烯合成增加,果实进入后熟软化。货架期间果实的后熟软化进程随着冷藏时间的延长而加快。

关键词:猕猴桃;果实;后熟;货架期;LOX;乙烯

Changes of Lipoygenase Activity and Ethylene Biosynthesis in *Actinidia* Fruit Stored at 0°C and on Shelf at 20°C After Cold Storage

XU Wen-ping, CHEN Kun-song, XU Chang-jie, ZHANG Shang-long

(Laboratory of Fruit Molecular Physiology and Biology, Zhejiang University/Key Laboratory of Horticultural Plant Development and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Hangzhou 310029)

Abstract: Kiwifruit Bruno (*Actinidia deliciosa*) was used to investigate lipoxygenase (LOX) activity, ethylene biosynthesis and their relationship during cold storage at 0°C and on shelf at 20°C after cold storage. Cold storage of fruit at 0°C markedly inhibited LOX activity, reduced the rate of free radical production, lowered ACC content, suppressed ACC oxidase activity and kept a low level of ethylene production, resulting in maintaining higher fruit firmness. LOX activity rapidly increased, ACC accumulated and ethylene climacteric appeared in fruit on shelf at 20°C after cold storage. The longer the fruit stored at 0°C, the quicker the fruit softened at 20°C after cold storage.

Key words: *Actinidia*; Fruit; Ripening; Shelf-life; Lipoxygenase (LOX); Ethylene

猕猴桃果实属于呼吸跃变型,采后果实后熟软化进程迅速,贮藏性差,延缓猕猴桃果实后熟软化进程是猕猴桃产业发展的一个关键环节。采用冷藏技术手段是最有效的解决途径之一。

乙烯是果实后熟软化的关键因子,有效调控乙烯的生物合成,可以促进或延缓果实的后熟软化^[1,2]。冷藏可以抑制采后猕猴桃果实的乙烯合成与释放,延缓果实的后熟软化进程^[3]。但有研究认为在有些果实的后熟软化过程中,乙烯只是一个决定后熟软化速度的因子,而非软化启动因子^[4~7]。

Baker等^[8]首次发现自由基清除剂可抑制果实组织切片的乙烯形成,并提出了自由基参与乙烯形成的学说。McRae等^[9]研究发现超氧自由基(O₂⁻)主要参与ACC向乙烯的转化。

脂氧合酶(LOX)是植物LOX途径中的一个关键酶。LOX以细胞膜释放的游离脂肪酸为底物,催化形成氢过氧化物、自由基和茉莉酸(JA)等促进衰老物质,直接或间接地参与了组织的衰老进程^[10],并与果实后熟软化密切相关^[4,11~13],认为LOX可能是乙烯生物合成的上游调节因子,并在乙烯生物合成

收稿日期 2002-10-28

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30170660)和浙江省自然科学基金重点资助项目(ZD0004)

作者简介 许文平(1973-)男,湖北武汉人,博士研究生,从事果实采后生理与分子生物学研究。陈昆松为通讯作者,Tel:0571-86971931;Fax:0571-86971009;E-mail:akun@zju.edu.cn

的系统 I 乙烯向系统 II 乙烯转变过程起作用^[14]。

本试验以猕猴桃果实为试材,研究果实冷藏与货架期间的果实软化与 LOX 活性变化、自由基生成速率和乙烯生物合成等的相互关系,进一步探讨冷藏对猕猴桃果实后熟软化调控的生理机制,为改进并优化果实后熟软化进程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

以美味猕猴桃布鲁诺(*Actinidia deliciosa* cv. Bruno)果实为试材,采后当日运抵实验室。经挑选后取大小均匀,成熟度相对一致的材料备用,每处理果实 50 ~ 150 kg。试验处理分别为:①20 ± 1℃(对照);②0 ± 1℃;③经 21 d 冷藏后,转入 20 ± 1℃的货架期后熟软化;④42 d 冷藏后,转入 20 ± 1℃的货架期后熟软化。定期随机取样,检测相关的品质和生理变化。试验按完全随机设计,设置年度间重复,即年度 I 和年度 II(season I 和 season II)2 个重复,试验数据采用 DPS 和 Origin 软件处理。

1.2 测定方法

1.2.1 LOX 活性的测定 按陈昆松等^[4]的方法进行。重复 3 次。

1.2.2 超氧自由基(O₂⁻)产生速率测定 按窦世娟等^[15]的方法进行。各重复 3 次。

1.2.3 ACC 含量的测定 按陈昆松等^[16]的方法测定。重复 3 次。

1.2.4 ACC 氧化酶 按许文平等^[14]的方法测定。重复 3 次。

1.2.5 果实乙烯释放量测定 按陈昆松等^[16]的方法进行。重复 3 次。

1.2.6 果肉硬度测定 用 GY-1 型果实硬度计(3.5 mm 测头)检测 10 个果实硬度。单果重复 10 次。

1.2.7 可溶性固形物(TSS)含量的测定 用手持折光仪检测 10 个果实 TSS 含量。单果重复 10 次。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃果实后熟进程中硬度、TSS 和乙烯释放量的变化

布鲁诺美味猕猴桃果实采后即置于 20℃ 下后熟软化过程中的硬度、TSS 含量和乙烯释放量变化如图 1。从果实硬度变化上看,年度 I 果实的硬度从采收到完全软化(硬度为 0)经历了 12 d,而年度 II 的果实在 9 d 内即完成这一过程。同一品种果实在不同年度间的这种硬度变化差异,可能是采收果实所处的生理发育阶段不同所造成的。因此,确定用于果实贮运的适宜采收成熟度是改善果实贮运性的重要基础。随着果实后熟软化进程中硬度的持续下降,TSS 含量呈增加变化,并于果实完熟时达到最高,以后略趋下降,不同年度的变化趋势基本一致(图 1)。

猕猴桃果实后熟软化进程中的乙烯合成呈典型的跃变变化,即有较明显的系统 I 乙烯合成阶段和系统 II 乙烯合成阶段,不同年度间系统 I 和系统 II 乙烯合成所持续的时间有较大的差异,年度 I 果实中系统 I 乙烯持续的时间比年度 II 果实的要长,二者分别为 10 d 和 3 d。值得注意的是,果实中乙烯跃变上升期的时间,是在果实快速软化阶段,甚至是果实快速软化后期(年度 I),并在果实完熟后出现乙烯跃变峰(图 2)。

2.2 冷藏期间猕猴桃果实软化进程、乙烯生物合成、LOX 活性和自由基产生速率的变化

通过比较 20℃ 和 0℃ 贮藏过程中的果实软化进程、乙烯生物合成、LOX 活性和自由基产生速率的变化等,探讨冷藏期间果实软化进程及其生理机制。

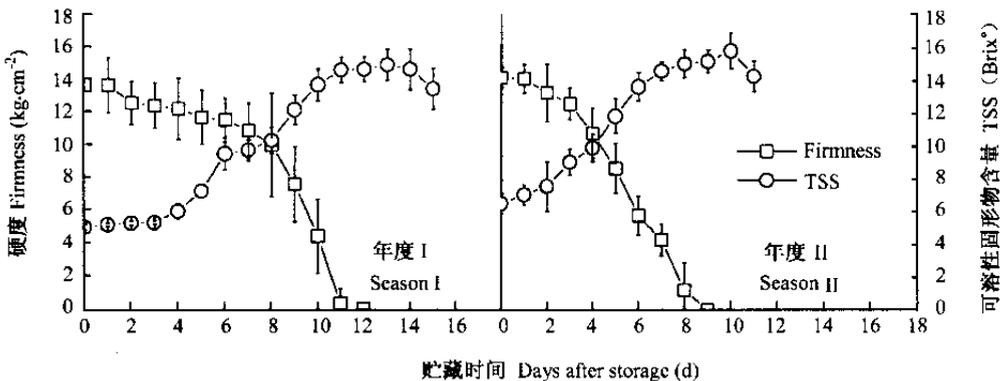


图 1 美味猕猴桃果实 20℃ 下后熟软化过程中果实硬度、TSS 含量的变化

Fig.1 Changes of firmness, TSS content in ripening *A. deliciosa* fruit at 20℃

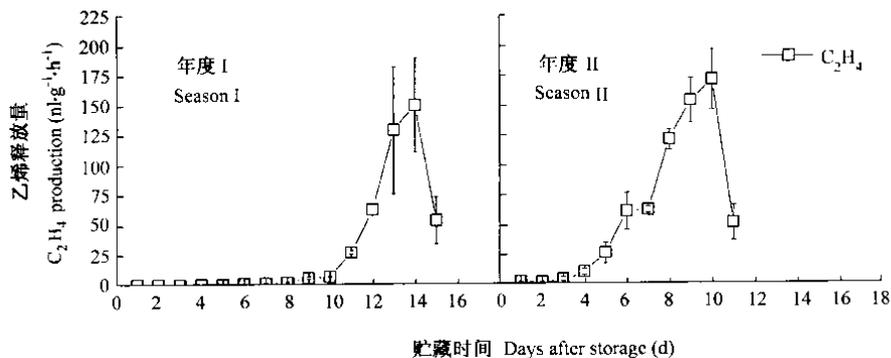


图2 美味猕猴桃果实 20°C下后熟软化过程中乙烯释放量的变化

Fig.2 Changes of ethylene production in ripening *A. deliciosa* fruit at 20°C

2.2.1 冷藏对猕猴桃果实软化进程的影响 采后果实分别贮藏于20°C和0°C下,以研究不同贮藏温度对猕猴桃果实后熟软化的影响,结果见图3。与20°C处理的相比,0°C低温冷藏果实的软化进程被明显延缓。年度I果实在贮藏的前5 d,硬度平均日下降速率为0.125 kg·cm⁻²·d⁻¹,后53 d平均日下降速率为0.027 kg·cm⁻²·d⁻¹;年度II果实在贮藏的前5 d和后85 d平均日下降速率分别为0.144 kg·cm⁻²·d⁻¹和0.122 kg·cm⁻²·d⁻¹。不同年度之间的冷藏效应存有差异,可能是果实发育过程气候条件的不同所致。冷藏对果实软化进程的影响主要是有效地延缓了果实的快速软化进程,这一结果与陈昆松等^[17]的相一致。由图3可知,不同年度果实的冷藏效应

差异与20°C下的后熟软化进程中的硬度变化差异(图1)相吻合。

2.2.2 冷藏对猕猴桃果实软化进程中 LOX 活性、自由基生成速率和乙烯生物合成的影响 进一步研究冷藏条件下,果实组织中的 LOX 活性和自由基产生速率的变化与乙烯合成的关系,发现0°C低温贮藏可显著降低果实组织中的 LOX 活性和自由基生成速率,在91 d 0°C贮藏期内,LOX 活性变化呈缓慢下降的趋势,自由基生成速率变化较为平缓,冷藏下果实的乙烯合成被显著抑制(图4)。2个年度的试验结果相似。

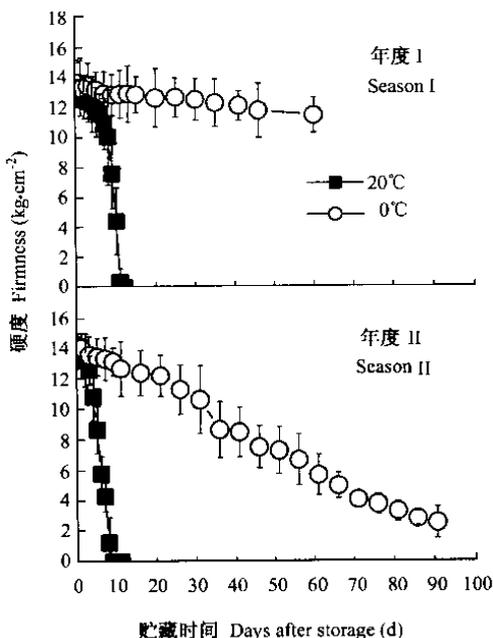


图3 不同贮藏温度对美味猕猴桃果实后熟软化进程的影响
Fig.3 Effects of different temperature on firmness and TSS content in *A. deliciosa* fruit

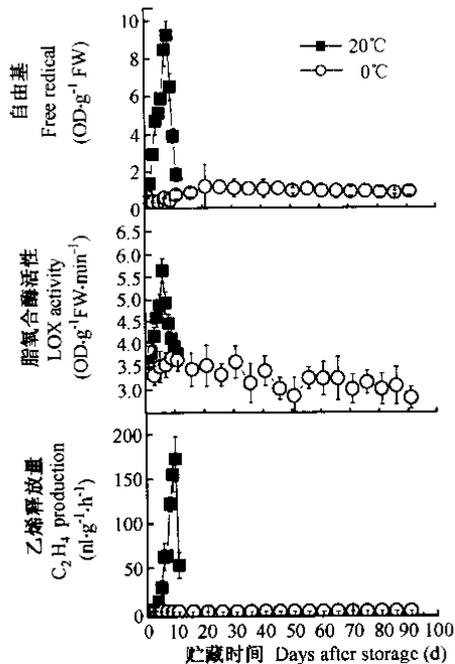


图4 冷藏对美味猕猴桃果实 LOX 活性、自由基产生速率和乙烯生物合成变化的影响(年度 I)
Fig.4 Effects of different temperature on ethylene biosynthesis, LOX activity and free radical production rate in *A. deliciosa* fruit(season I)

随着 0℃ 贮藏时间的延续,果实组织中 ACC 水平呈持续积累的趋势,根据在 46 d 的冷藏期内的 ACC 含量变化值,笔者将其分为 3 个不同的阶段,即 ① 贮藏的 1~5 d,ACC 水平处在 $1.39 \pm 0.41 \sim 1.79 \pm 0.46 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间;② 9~15 d,ACC 含量上升到 $5.73 \pm 0.16 \sim 5.90 \pm 2.00 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;③ 16 d 以后,ACC 含量维持在 $12.00 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 左右(图 5, B)。年度 II 的重复试验也得到相似结果。冷藏期间 ACC 含量的这种变化趋势与低温下 ACC 氧化酶活性被严重抑制有关(图 6)。

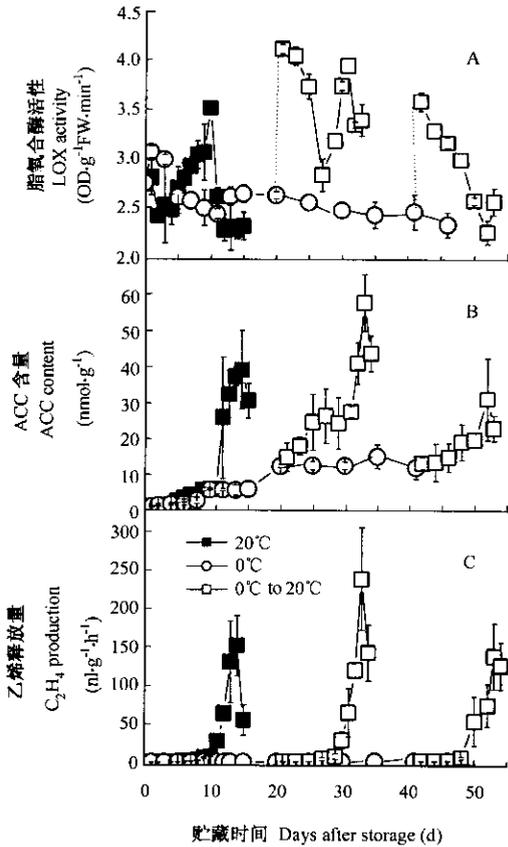


图 5 经不同冷藏时间后果实货架期间 LOX 活性、ACC 含量和乙烯释放量的变化(年度 I)

Fig.5 Changes in LOX activity, ACC content and ethylene production of *A. deliciosa* fruit during shelf-life at 20°C after cold-storage for different period(season I)

2.3 经不同冷藏时间后货架期间猕猴桃果实软化进程、LOX 活性和乙烯生物合成的变化

将经 0℃ 冷藏 21 d 和 42 d 后的果实分别转到 20℃ 下后熟,研究不同冷藏时间对果实货架期间的果实硬度、TSS 含量、LOX 活性和乙烯生物合成变化的影响,以探讨经不同冷藏时间后,货架期间果实的后熟软化进程差异及其生理学基础。

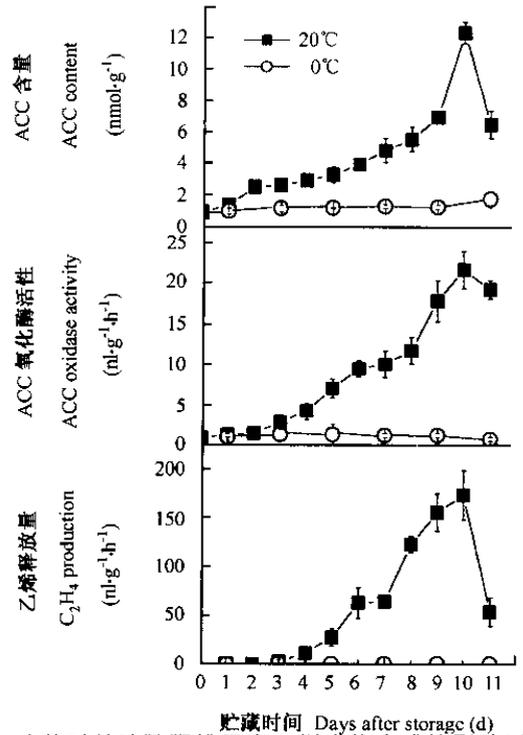


图 6 冷藏对美味猕猴桃果实乙烯生物合成的影响(年度 II)

Fig.6 Effects of different temperature on ethylene biosynthesis in *A. deliciosa* fruit(season II)

2.3.1 不同冷藏时间对货架期间猕猴桃果实软化进程的影响 随着果实冷藏时间的延长,货架期间的果实软化进程加快,果实后熟进程由对照(20℃后熟)的 12 d,依次递减为 10 d(0℃冷藏 21 d 后 20℃后熟)和 9 d(0℃冷藏 42 d 后 20℃后熟);同时, TSS 的积累也随着 0℃ 冷藏时间延长而加快(图 7)。

2.3.2 不同冷藏时间对货架期间 LOX 活性和乙烯生物合成的影响 经冷藏的果实一旦转入 20℃ 货架期后熟, LOX 活性即迅速增加,之后急剧下降,当乙烯进入跃变上升期,其活性水平再次增加,2 个不同冷藏时间果实货架期间的 LOX 活性变化趋势相一致,但冷藏 21 d 果实中的变化比冷藏 42 d 果实的更为明显(图 5, A)。

经冷藏的果实转至 20℃ 后熟,虽然环境温度急剧增加,但在后熟的前 5 d(冷藏 21 d 果实)和 4 d(冷藏 42 d 果实)内,组织中的乙烯合成仍维持在一个低水平,与同期 0℃ 贮藏果实相比,无显著的差异,此后随着 ACC 含量的迅速合成积累,乙烯开始进入跃变期(图 5, B)。

后熟果实进入乙烯跃变的时间长短也与低温贮藏时间的长短密切相关,20℃ 直接后熟、冷藏 21 d 后在 20℃ 后熟和冷藏 42 d 后在 20℃ 后熟果实进入

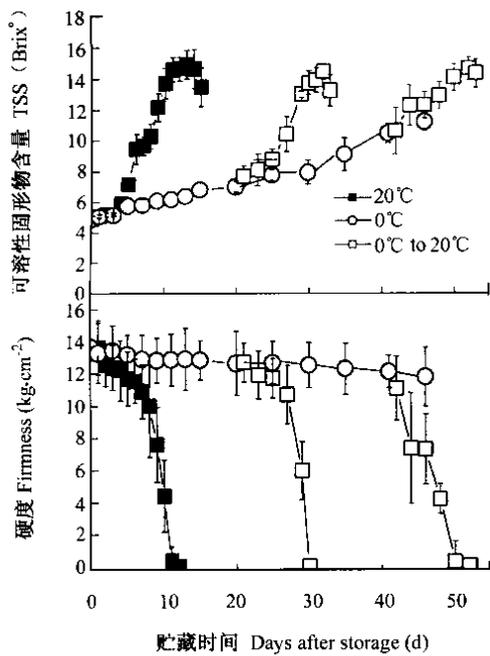


图7 经不同冷藏时间后果实货架期间硬度和 TSS 含量的变化(年度 I)

Fig.7 Changes in the firmness and TSS content of *A. deliciosa* fruit during shelf-life at 20°C after cold-storage for different period (season I)

乙烯跃变的时间分别为 10、8 和 6 d (图 5, C)。

3 讨论

LOX 途径是高等植物脂肪酸氧化的途径之一,其最初反应是脂酶催化甘油酯类(如磷脂)水解生成游离脂肪酸,其中不饱和脂肪酸亚油酸和亚麻酸作为 LOX 的直接反应底物,通过一系列生物反应生成自由基,脂质氢过氧化物和茉莉酸等组织衰老促进物质^[18]。

LOX 途径还可能在乙烯生物合成途径中起调控作用。已有研究表明,苹果果实贮藏过程,LOX 活性的增加分别与 ACC 积累和乙烯生成呈正相关^[19]。番茄^[20]和笋瓜^[21]果实中 ACC 合成酶基因的表达受活性氧和 JA 的调控,通过抑制 LOX 活性可以影响 ACC 合成酶基因的表达^[21]。笔者同事的一些研究结果也显示了 LOX 活性与 ACC 积累呈极显著的正相关(未发表资料)。这些结果显示了 LOX 可能参与了 ACC 的合成调控,但它是直接调控 ACC 的合成,还是通过其催化产物间接对 ACC 的合成起作用,尚不清楚。同时,LOX 途径中产生的自由基还参与了 ACC 向乙烯的转化^[8]。在跃变型果实猕猴桃的后熟软化进程中,LOX 活性增加开始在乙烯跃变之前,随

着 LOX 活性的增加,组织中自由基积累,ACC 含量上升,ACC 氧化酶活性增加,乙烯合成进入跃变期^[14],LOX 活性与果实硬度变化呈极显著的负相关($r = -0.8788^{**}$)^[17]。

LOX 调节组织衰老的主要机理有:参与了膜脂过氧化作用,导致细胞膜透性增加,促进胞内钙的积累,激活了磷脂酶活性,加速了游离脂肪酸进一步从膜脂释放,加剧了细胞膜的降解,膜脂过氧化产物和膜脂过氧化过程产生的游离自由基进而毒害细胞膜系统、蛋白质和 DNA,导致了细胞膜的降解和细胞功能的丧失,LOX 参与的膜脂过氧化作用产物可进一步生成茉莉酸和脱落酸等衰老调节因子,并参与了乙烯的生物合成,促进组织衰老^[17]。

陈昆松等^[17]的研究表明,猕猴桃果实的后熟软化有 2 个明显的阶段,即前期的硬度缓慢下降阶段(软化启动阶段)和后期的快速下降阶段,冷藏对果实后熟软化的效应主要表现在果实硬度快速下降阶段。本试验也得到相似的结果,同时发现冷藏对果实贮藏性的影响还依赖于果实的采收成熟度。笔者研究结果还显示,低温条件下,LOX 活性受到强烈抑制,自由基的生成速率下降,ACC 积累减缓,ACC 氧化酶维持低水平活性,乙烯释放量很低,果实的后熟软化进程被显著延缓;但这种现象可以为适宜的温度(20°C)迅速逆转,尤其是 LOX 活性的恢复非常迅速,表现为对温度的依赖性更为明显,而乙烯的合成以及果实的软化相对延后,明确了低温冷藏过程与货架期间 LOX 活性变化与乙烯生物合成的相互关系。同时也进一步证实了许文平等先前结果,即 LOX 可能是乙烯合成的上游调控因子^[14]。

综上所述,笔者认为,低温调控 LOX 活性是冷藏延缓猕猴桃果实成熟衰老进程的机制之一。低温抑制 LOX 活性,可以维持细胞膜系统的稳定性,减少自由基的生成,并进而影响 ACC 合成酶(ACC 水平)和 ACC 氧化酶活性,对乙烯的生物合成起调控作用,使果实的后熟软化进程得以延缓,低温对 LOX 等的这种调控机制,可以为适宜的温度所迅速逆转,也可能是维持冷藏稳定温度的重要理论基础之一。

References

- [1] 陈昆松,张上隆. 采后果实成熟衰老的分子生理学机理及其调控. 吴平,陈昆松主编. 植物分子生理学进展. 杭州:浙江大学出版社,2000:78-99.
Chen K S, Zhang S L. Molecular physiological mechanism and regulation of ripening and senescence of postharvest fruit. In: Wu P, Chen K S (eds): *Advances in Plant Molecular Physiology*. Hangzhou:

- Zhejiang University Publisher, 2000: 78 - 99. (in Chinese)
- [2] McGlasson W B. Ethylene and fruit ripening. *HortScience*, 1985, 20: 51 - 54.
- [3] Beever D J, Hopkirk G. Fruit development and fruit physiology. In: Warrington I J, Weston G C (eds). *Kiwifruit: Science and Management*, Auckland: Ray Richards Publisher, 1990: 97 - 126.
- [4] 陈昆松, 郑金土, 张上隆, Gavin Ross. 乙烯与猕猴桃果实的后熟软化. *浙江农业大学学报*, 1999, 25(3): 251 - 254.
Chen K S, Zheng J T, Zhang S L, Gavin Ross. The role of ethylene in kiwifruit ripening and softening. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1999, 25(3): 251 - 254. (in Chinese)
- [5] Matsumoto S, Obara T, Luh B S. Changes in chemical constituents of kiwifruit during postharvest ripening. *Journal of Food Science*, 1983, 48: 607 - 611.
- [6] Pratt H K, Reid M S. Chinese Gooseberry: Seasonal patterns in fruit growth and maturation, ripening, respiration and the role of ethylene. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 1974, 25: 747 - 757.
- [7] Wright H B, Heatherbell D A. A study of respiratory trends and some associated physio-chemical changes of chinese gooseberry fruit *Actinidia chinensis* (yang-tao) during the later stages of development. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1967, 10: 405 - 414.
- [8] Baker J E, Lieberman M, Anderson J D. Inhibition of ethylene production in fruit slices by a rhizobitoxine analog and free radical scavengers. *Plant Physiology*, 1978, 61: 886 - 888.
- [9] McRae D G, Baker J E, Thompson J E. The evidence for involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. *Plant and Cell Physiology*, 1982, 23(3): 375 - 383.
- [10] Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53: 275 - 297.
- [11] 吴敏, 陈昆松, 张上隆. 桃果实采后成熟衰老过程中的脂氧合酶活性变化. *园艺学报*, 1999, 26(4): 227 - 231.
Wu M, Chen K S, Zhang S L. Involvement of lipoxygenase in the postharvest ripening of peach fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 1999, 26(4): 227 - 231. (in Chinese)
- [12] 罗云波. 脂氧合酶与番茄采后成熟的关系. *园艺学报*, 1994, 21(4): 357 - 360.
Luo Y B. Effects of lipoxygenase on the postharvest physiology of tomato fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 1994, 21(4): 357 - 360. (in Chinese)
- [13] Droillard M J, Rouet-Mayer M A, Bureau J M, Lauriere C. Membrane associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. *Plant Physiology*, 1993, 103: 211 - 219.
- [14] 许文平, 陈昆松, 李方, 张上隆. 脂氧合酶、茉莉酸和水杨酸对猕猴桃果实后熟软化进程乙烯生物合成的调控. *植物生理学报*, 2000, 26(6): 507 - 514.
Xu W P, Chen K S, Li F, Zhang S L. Regulation of Lipoxygenase, jasmonic acid and salicylic acid on ethylene biosynthesis in ripening kiwifruit. *Acta Phytophdiologica Sinica*, 2000, 26(6): 507 - 514. (in Chinese)
- [15] 窦世娟, 陈昆松, 吕均良, 郑金土. 采后黄花梨 (*Pyrus Pyrifolia* Nakai) 果实中丙二烯氧合酶的生理功能. *植物生理与分子生物学报*, 2002, 28(2): 105 - 110.
Dou S J, Chen K S, Lü J L, Zheng J T. Physiological role of allene oxide synthase in postharvest "Huang-hua" pear fruit (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28(2): 105 - 110. (in Chinese)
- [16] 陈昆松, 于梁, 周山涛. 鸭梨果实气调贮藏的研究. *园艺学报*, 1991, 18(2): 131 - 137.
Chen K S, Yu L, Zhou S T. A study on CA storage of 'Ya-Li' pears. *Acta Horticulturae Sinica*, 1991, 18(2): 131 - 137 (in Chinese)
- [17] 陈昆松, 徐昌杰, 楼健, 张上隆, Gavin Ross. 脂氧合酶与猕猴桃果实的后熟软化的关系. *植物生理学报*, 1999, 26(2): 138 - 144.
Chen K S, Xu C J, Lou J, Zhang S L, Gavin Ross. Lipoxygenase in relation to the ripening and senescence of *Actinidia* fruits. *Acta Phytophdiologica Sinica*, 1999, 26(2): 138 - 144. (in Chinese)
- [18] 陈昆松, 张上隆. 脂氧合酶与果实的成熟衰老—文献综述. *园艺学报*, 1998, 25(4): 338 - 344.
Chen K S, Zhang S L. The role of lipoxygenase in ripening and senescence fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998, 25(4): 338 - 344. (in Chinese)
- [19] Marcelle R D. Relationship between mineral content, lipoxygenase activity, levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene emission in apple fruit flesh disks (cv. Jonagold) during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 1991, 1: 101 - 109.
- [20] Watanabe T, Seo S, Sakai S. Wound-induced expression of a gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and ethylene production are regulated by both reactive oxygen species and jasmonic acid in *Cucurbita maxima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39: 121 - 127.
- [21] Watanabe T, Sakai S. Effects of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). *Planta*, 1998, 206(4): 570 - 576.

(责任编辑 王红艳)