

高温锻炼对苹果果皮适应突发性强光能力的影响

郝燕燕^{1,2}, 李文来², 黄卫东^{1*}

(¹ 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; ² 山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801)

摘要: 以苹果的套袋果实为试材, 研究了离体条件下高温锻炼后果皮对自然强光的响应反应。结果表明: 高温锻炼明显提高果皮 POD 和 PPO 活性, 果皮甲醇提取物总抗氧化剂活性也明显提高, 其中表儿茶素、绿原酸、水杨酸含量提高。高温锻炼后将除袋果实移至自然强光下, 在短时间内果皮仍能维持较高的抗氧化能力, 对强光胁迫产生的自由基的清除能力比对照果实强, 从而可以延缓果实日烧症状的发生。

关键词: 苹果; 日烧病; 高温锻炼; 强光; 适应性; 酚类物质; 抗氧化

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1347-06

Effect of Preheating Acclimation on the Adaptation of Apple Fruit Peel to Sudden Excessive Sunlight

HAO Yan-yan^{1,2}, LI Wen-lai², and HUANG Wei-dong^{1*}

(¹ College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ² College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: The responses of fruit peel to natural strong sunlight after heat acclimation were studied with bag-removed apples. The results indicated that the activities of peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) in apple peel increased as a consequence of heat acclimation, and the contents of epicatechin, chlorogenic acid and salicylic acid (SA) increased. Meanwhile, the total antioxidant activities (TAA) of extraction from apple peel increased. Fruits exposed to natural strong sunlight after heat acclimation maintained higher antioxidant ability in fruit peel sometime during explosion, which suggested that preheating acclimation may render a higher ability of scavenging oxygenic free radicals to delay the appearance of fruit sunburn.

Key words: Apple; Sunburn; Heat acclimation; Excessive sunlight; Adaptability; Phenolics; Antioxidation

高温和强光 (尤其是 UV-B) 常引起果实日烧。关于高温与强光在果实日烧的形成中谁起主导作用, 目前有多种观点。Yuri 等 (2000) 报道, 温度对果实日烧的形成是一个主要诱因, 果实发生日烧是因为体积大而表面积小, 在强光照射下果实变成了一个热库。Ferguson 等 (1998) 的测定结果显示, 在夏季暴露于直射光下的苹果果实向阳面果皮及果肉温度比气温可高达 15℃。Chrader 等 (2003) 提出大田果实日烧的形成分需光与不需光两种, 不需日光照射引起的果实日烧称为热日烧或坏死性日烧, 果面温度一般达 (52 ± 1)℃ 才发生, 需日光照射的日烧是大田中最常见的一种, 果温在 46 ~ 49℃ 便发生。

强光与高温打破了果实表皮和下表皮的代谢平衡, 产生大量活性氧分子 (AOS), 即先天的“免疫系统”——氧化猝发, 进而启动体内其它级联反应, 导致膜损伤和结构改变, 细胞的分室化遭到破坏, 引起酚类物质的酶促和非酶促褐变, 造成果皮日烧 (Andrews & Johnson, 1996)。

收稿日期: 2007-03-09; 修回日期: 2007-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270918); 山西农业大学青年创新基金项目 (200219)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: huanggd@263.net)

高温锻炼可诱导果实抗日烧的能力。番茄离体或非离体果实对日烧的抗性可通过热处理来诱导 (Retig et al., 1974)。大田苹果在控温箱 45℃ 下处理 2 h, 可推迟日烧的发生时间, 且降低果实日烧率 (张建光 等, 2003)。

作者选择摘袋后易发生日烧的套袋苹果, 高温锻炼、离体摘袋, 消除了树冠微环境差异的影响, 保证了更精确地研究高温锻炼降低果实日烧发生的机制。

1 材料与方法

1.1 试材选择与处理

果实取自北京昌平中日友好观光果园。品种为宫藤富士 (*Malus domestica* Borkh. 'Fuji'), 砧木为八棱海棠 (*M. micromalus* Mark.), 树龄 10 年生, 树型小冠开心形, 株行距 5 m × 6 m。果园管理采用日本高效优质配套栽培技术, 树势健壮, 生长一致。

选取 20 棵树, 2003 年 6 月 14 日进行果实套袋。袋型选用北京富民厂生产的双层袋 (外袋外灰内黑, 15 ~ 19.5 cm × 15 cm; 内袋红色, 16.5 cm × 14.5 cm), 遮光性、防水性、通气性均优。

9 月上旬在树冠中部东南、南、西南方位选择套袋果实 200 多个带回实验室, 于晴天 (9 月 8 日) 下午 14: 00 (最高气温 32℃, 相对湿度 26%, 紫外辐射指数为 9) 将套袋果实去袋后选择大小一致的健康果实装进保鲜袋, 分 3 组进行, (28 ± 1)℃ (室温, 对照)、38℃ 和 48℃ 处理 2 h (试验进行 30 min 时果实表面与果皮 1 cm 果肉温度达到处理温度)。于上午 10: 30 置于强光下, 随机区组排列, 3 次重复。11: 30、14: 30、17: 00 取材, 每次每处理分别取 15 个健康果实, 用削皮机削皮 (约 2 ~ 3 mm) 后液氮速冻并碾碎, -80℃ 下保存待分析。

1.2 过氧化物酶 (POD) 和多酚氧化酶 (PPO) 活性的测定

参照 Zhou 等 (1993) 的方法。取 5 g 果皮液氮研磨, 加 25 mL 提取液进行细胞破碎。提取液组分: 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS), pH 6.0; 2% Triton X-100; 5 mmol/L PMSF; 5% PVPP。匀浆在 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液即为粗酶液。

PPO 活性测定的反应体系: 2 mL 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液 pH 5.0 + 1 mL 0.05 mol/L 邻苯二酚 (pH 5.0, PBS 配制) + 500 μL 粗酶液。反应体系混匀后立即在 420 nm 下测定 OD 值。PPO 酶活力 = $\Sigma \Delta A/t$, ΔA 代表光吸收度的变化, t 代表反应的时间。测定设 3 次重复。

POD 活性测定采用愈创木酚法。

1.3 果皮总抗氧化剂活性 (TAA) 测定

5 g 果皮加液氮研磨, 加 25 mL 80% 甲醇提取液, 细胞破碎机破碎, 4℃ 提取 12 h, 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液保存在 4℃ 用作以下测定系统的分析。

DPPH 测试体系 (1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 参照 Lu 和 Foo (2000) 的方法。清除 DPPH 自由基能力以 $\Delta OD/min$ 表示, 即 $[OD_{CK I} - (OD_{sample} - OD_{CK II})]/t$ 。测定设 3 次重复。

亚油酸测试体系参照 Ekwue 等 (1999) 的方法。抗氧化活性 = $(OD_{反应体系} - OD_{CK II}) / OD_{CK I} \times 100\%$ 。测定设 3 次重复。

1.4 果皮酚类物质的测定

5 g 果皮加液氮研磨, 加 25 mL 80% 甲醇提取液, 细胞破碎机破碎, 4℃ 提取 12 h, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液液相色谱分析酚类组成。采用 Schieber 等 (2001) 的外标法, 略作修改, 进行反相 HPLC 测定。

类黄酮色谱条件: C18 柱 u-Bondapak Phenyl (0.4 cm × 30 cm); 流动相: CH₃OH: H₂O (65%: 35%); 流速: 1.0 mL/min; 检测器: UV 365 nm × 0.1 AUFS; 回收率 > 95%。

绿原酸色谱条件同上, 只是检测器为: UV 254 nm × 0.1 AUFS; 回收率 > 85%。

水杨酸色谱条件: Novapak C18 柱 (0.4 cm × 15 cm); 流动相: CH₃OH: H₂O (30%: 70%); 流速: 0.7 mL/min; 检测器: UV 230 nm × 0.1 AUFS; 回收率 94%。

2 结果与分析

2.1 高温锻炼对果实日烧发生的影响

果实热处理后于 10:30 移至强烈的日光下, 16:00 时作为对照的部分果实已表现果皮光漂白, 经 38℃ 和 48℃ 高温锻炼 2 h 的果实全部正常。第 2 天 (晴朗无云) 10:00 左右对照果实向阳面呈现大片光漂白, 靠近果肩的果皮淡黄, 同时经过高温锻炼处理的果实也表现光漂白现象, 13:00 时几乎全部果实表现日烧症状, 对照日烧褐变严重。

以上现象说明, 套袋果实一次性全除袋后突遇强光易发生果皮日烧伤害, 38℃ 和 48℃ 高温锻炼可明显延缓日烧发生, 两个处理间的表现没有差异。

2.2 高温锻炼对果皮 POD、PPO 响应强光的影响

如图 1 所示, 48℃ 处理 2 h 后果实果皮 POD、PPO 活性明显升高, 但在自然强光照射 1.5 h 后迅速下降。

38℃ 处理 2 h 后 POD 和 PPO 活性也明显增强, 但不及 48℃ 处理效果; 在自然光照射后活性没有下降, 反而在短期内略有上升的趋势。

对照果实暴露于正午自然光下后果皮 POD、PPO 活性迅速上升, 在 14:00 明显超过高温处理果实, 随着日照强度的减弱和气温的下降, 在 17:00 时活性又回落下来。

以上结果表明, POD 和 PPO 活性的提前激活可以提高果实忍耐强光胁迫能力, 延迟果皮日烧发生, 而对照果实果皮 POD、PPO 活性在 14:00 出现高峰是对强光胁迫的应急反应。

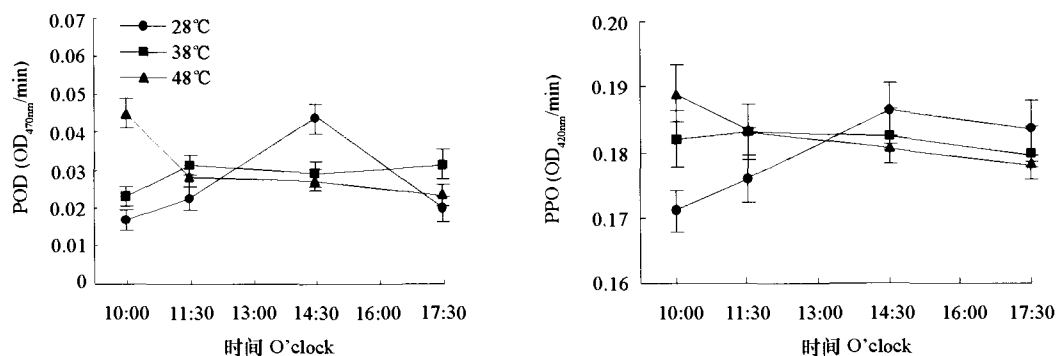


图 1 苹果果实高温锻炼后又突遇强光果皮中 POD 和 PPO 活性的变化

Fig. 1 Changes of the activities of POD and PPO under the sudden strong sunlight following heat acclimation

2.3 高温锻炼对果皮甲醇提取物抗氧化能力响应强光的影响

对甲醇提取物在 DPPH 体系和亚油酸体系进行抗氧化能力的测定结果 (图 2) 表明, 38℃ 和 48℃ 高温锻炼 2 h, 明显提高果实表皮的抗氧化能力, 即明显增强自由基 DPPH 的清除能力和抑制亚油酸氧化能力。

高温锻炼 2 h 后的果实突然暴露于上午的强光下, 果皮清除自由基 DPPH 的能力和抑制亚油酸氧化的能力与对照果实相比仍维持较高水平, 其中 38℃ 处理的果实果皮抗氧化能力最高。

对照果实抗氧化能力在日照前后始终较低, 转置强光下的最初 1.5 h 抗氧化能力稍有提高, 但不明显; 随后于 11:00 开始又略有下降。

根据在 DPPH 体系和亚油酸体系测定抗氧化能力的原理, 即抗氧化剂清除 DPPH 自由基的能力与清除 O_2^- 和 $OH\cdot$ 能力呈线性关系, 抑制亚油酸氧化的能力与保护膜脂过氧化能力具有相关性, 可以推测, 高温锻炼提高了果皮清除氧自由基的能力, 抑制了膜脂过氧化, 从而延缓果皮日烧症状出现。

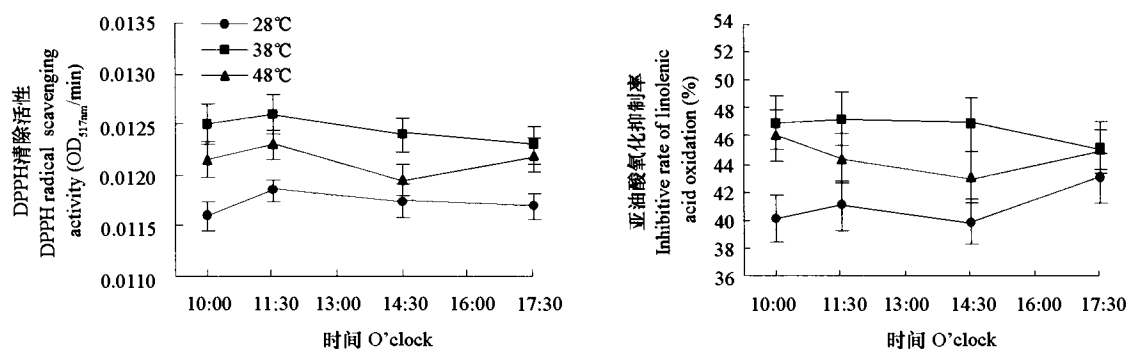


图2 苹果果实高温锻炼后在自然强阳光下果皮清除 DPPH 自由基能力与抑制亚油酸氧化能力的变化

Fig. 2 Changes of DPPH radical scavenging activity and inhibitive rate of linolenic acid oxidation in apple peel under the sudden strong sunlight following heat acclimation

2.4 高温锻炼对果皮酚类物质响应强光的影响

利用反相 HPLC 测定甲醇提取物的几种酚类化合物(-) - 表儿茶素、(+) - 儿茶素、水杨酸和绿原酸含量变化, 结果如图 3 所示。

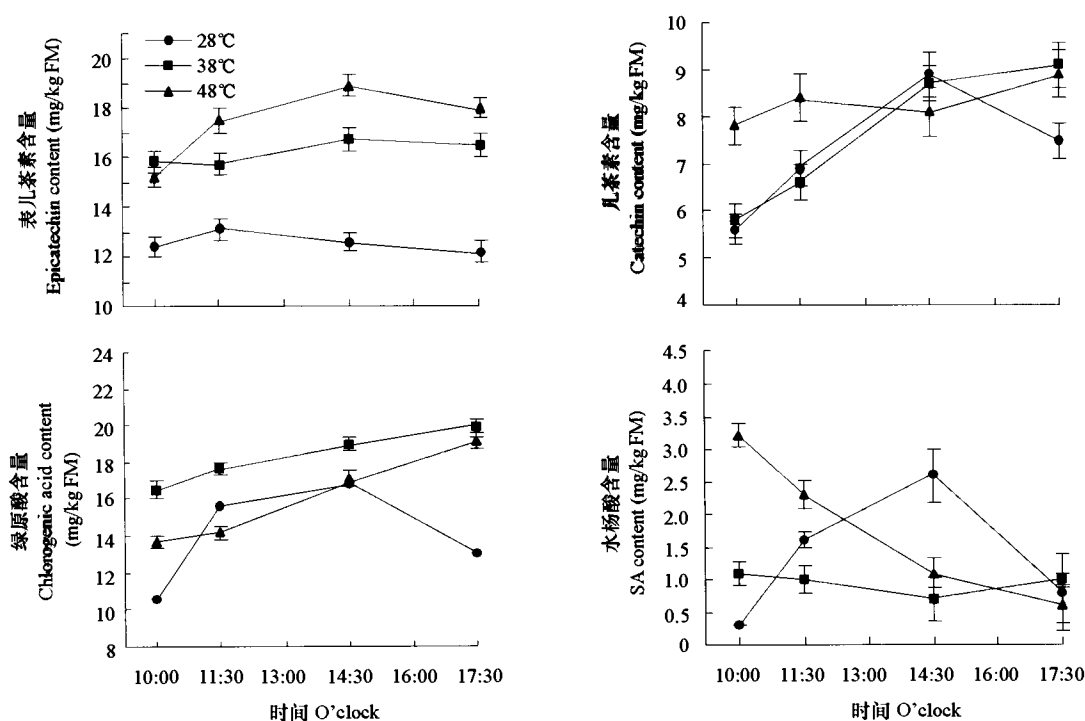


图3 高温锻炼后苹果果皮酚类物质对强光的响应变化

Fig. 3 The response of phenolic compounds in apple peel to strong sunlight following heat acclimation

38℃和48℃高温处理2 h后果皮内(-)-表儿茶素含量显著增加,转置强光后仍维持较高水平。48℃处理的果实在移至强光后的1.5 h(-)-表儿茶素表现了上升趋势。38℃处理的果实与对照相似,即转置强光后变化不太明显。

48℃高温处理果实2 h后果皮内(+)-儿茶素含量显著增加,38℃处理的果实(+)-儿茶素含量与对照相比变化不明显。当果实移至强光后,48℃处理的果实(+)-儿茶素含量变化不明显,对照与38℃处理的呈现上升趋势,17:00高温锻炼果实与对照差异不明显。

高温锻炼2 h后的果实果皮绿原酸含量明显增加,放置强光后仍持续上升。38℃处理的果实绿原酸含量一直最高。对照果实放置强光下后最初的1.5 h绿原酸含量迅速增加,但17:00又迅速下降。

48℃处理的果实果皮水杨酸含量显著增加,暴露于强光下后迅速下降。38℃处理的果实水杨酸含量也明显增加,但转置强光下后变化不明显。对照果实转置强光下水杨酸含量迅速增加,但15:00开始又迅速下降,以致于17:00对照与高温锻炼几乎无差异。

3 讨论

3.1 高温锻炼对果皮抗氧化能力的影响

本研究采用的套袋果实,由于长期处于几乎不透光的双层袋中,当一次性除袋后突然暴露于强光下,往往导致光氧化胁迫引起日烧发生。据报道,树冠外围暴露的果实比树冠内膛遮阳的果实抗日烧能力强,是由于暴露在日光下的果实受到环境的驯化,比树冠内膛果实较为适应引起日烧的高温与强光胁迫(Simpson et al., 1988)。

本研究表明,套袋果实在离体条件下高温锻炼后再暴露于强光下,同样可延缓日烧的发生,这与张建光等(2003)高温处理树体上果实的反应一致。

目前有关高温锻炼可以提高果实抗逆性的报道很多,38℃或42℃热处理可以抑制 γ -射线照射引起的葡萄苦斑凹陷(McDonald et al., 2002)。48℃热处理Niitaka梨3 h也可抑制果皮褐变(Ho & Seung, 2003)。

对抗氧化酶类POD和PPO的分析显示,高温锻炼可诱导果实抗氧化酶活性增强。对甲醇提取物的抗氧化能力分析表明,高温锻炼可增强果皮清除自由基活性,抑制膜脂过氧化。酚类物质作为抗氧化剂几乎已形成共识。Singh等(2002)研究发现用甲醇提取石榴果实果皮与种子酚类物质的效果最好。所以,本试验进一步对苹果果皮甲醇提取物的酚类化合物进行测定,结果表明高温锻炼可使果皮某些酚类物质如绿原酸、水杨酸和表儿茶素含量增加。

3.2 高温锻炼影响果皮对强光的响应

高温锻炼使果皮的抗氧化能力提高,果实移至强光下在短时间内仍能维持较高的抗氧化能力,对强光胁迫产生的自由基清除能力也比对照强,从而延缓果实日烧症状的发生。对照果实移至强光后果皮POD、PPO活性,以及活性较强的酚类化合物水杨酸、绿原酸对强光反应敏感,即在移至强光后短时间内表现出迅速上升趋势,可能是对突发性强光胁迫的应激反应,且在14:00达到高峰,14:00也正是日烧初期症状表现的前期,表明日烧症状出现前抗氧化酶类及一些活性分子表现了积极的应急状态。这也验证了目前公认的一种观点:SOD、POD、CAT、抗坏血酸—谷胱甘肽循环系统活性提高是植物对逆境胁迫响应的一种机制(Foyer et al., 1994)。

本研究中高温锻炼所设的两个温度相比,38℃处理完果实后,果皮抗氧化酶活性及某些酚类物质(如儿茶素、水杨酸)含量显著低于48℃处理的果实,但移至强光后,38℃处理的果实对强光反应呈现较为积极的响应状态,对甲醇提取物抗氧化能力测定表明高于48℃,说明温度过高虽然在升温的过程中使抗氧化能力加强,但是随着时间的延续果实的抗氧化系统达到极限,致使对进一步的胁迫反应迟钝,也正说明了高温锻炼所设温度与处理时间的交互作用。

References

- Andrews P K, Johnson J R. 1996. Physiology of sunburn development in apples. *Good Fruit Grower*, 47 (12): 33–36.
- Chrader L, Zhang J, Sun J. 2003. Environmental stresses that cause sunburn of apple. *Acta Hort.*, 618: 397–405.
- Ekwue A O, Wan H B, Cheng D T Y, Song Y H, Ju Z, Bramlage W J. 1999. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Postharvest Biology and Technology*, 16 (2): 107–118.
- Ferguson I B, Snelgar W, Lay-Yee C B. 1998. Expression of heat shock protein genes in apple fruit in the field. *Plant Physiol.*, 25: 155–163.
- Foyer C H, Descourvieres P, Kunert K J. 1994. Protection against oxygen radical: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, 17: 507–707.
- Ho K K, Seung K L. 2003. Effects of prestorage treatment by EDTA-Ca and heating on skin blackening and quality during cold storage in Niitaka pear fruits. *Han'Guk Wonye Hakhoechi*, 44 (1): 52–56.
- Lu Y R, Foo L Y. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace-vegetables. *Food Chemistry*, 68 (1): 81–85.
- McDonald R E, Miller W R, McCollum T G. 2002. Canopy position and heat treatments influence gamma-irradiation-induced changes in phenylpropanoid metabolism in grape fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125 (3): 364–369.
- Retig N, Aharoni N, Kedar N. 1974. Acquired tolerance of tomato fruits to sunburn. *Scientia Horticulture*, (2): 29–33.
- Schieber A, Keller P, Carle R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apples and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910 (2): 265–273.
- Simpson J, Rom C R, Patterson M. 1988. Causes and possible controls of sunburn on apple. *Good Fruit Grower*, 39 (2): 16–17.
- Singh R P, Chidambara-Murthy K N, Jayaprakasha G K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (1): 81–86.
- Yuri J A, Torres C, Bastias R. 2000. Sunscald on apple. II. Causes and biochemical responses. *Agro-Ciencia*, 16: 23–32.
- Zhang Jian-guang, Liu Yu-fang, Sun Jian-she, Kochhar S, Larry S. 2003. The relationship between fruit sunburn and heat acclimation in Gala apple. *Scientia Agricultura Sinica*, 36 (6): 731–734. (in Chinese)
- 张建光, 刘玉芳, 孙建设, Kochhar S, Larry S. 2003. 嘎拉苹果高温处理与果实日灼的关系. *中国农业科学*, 36 (6): 731–734.
- Zhou P, Smith N L, Lee C Y. 1993. Potential purification and some properties of monroe apple peel PPO. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 532–536.



欢迎订阅 2008 年《福建果树》

《福建果树》是福建省农业科学院果树研究所与福建省农业厅种植业管理局共同主办的果树科技期刊。重点报道亚热带果树最新科研成果、实用技术、品种资源、生产动态及国内外最新果树科技信息，科学实用，信息量大。本刊为季刊，国际标准 16 开，每期订价 6.00 元，全年 24.00 元；可随时汇款到编辑部订阅，免费邮寄；需挂号邮寄者，全年另加 12 元。欢迎订阅、投稿和发布广告，并欢迎代理，建立发行点（报酬优厚）。

地 址：福州新店埔党福建省农科院果树所《福建果树》编辑部

邮 编：350013

电 话：0591-87572655；87573975（传真）

E-mail: fjgs0591@yahoo.com.cn