

草酸对冷藏期间桃果实抗氧化系统和 PPO 活性的影响

郑小林^{1,2} 田世平^{1*} 李博强¹ 徐 勇¹

(¹中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093; ²湛江师范学院生物系, 湛江 524048)

摘 要: 桃 (*Prunus persica* L.) 栽培品种 ‘八月脆’ 果实采后经 5 mmol·L⁻¹ 草酸溶液浸泡 10 min 后在低温条件下贮藏, 与对照相比, 果实的 CAT 和 PPO 活性提高, SOD 和 POD 活性在贮藏 10 d 后较高; 还原型抗坏血酸 (AsA) 含量下降减缓; 超氧阴离子 (O₂⁻) 生成速率随贮藏增加, 过氧化氢 (H₂O₂) 含量先升后降, 但经草酸处理后 O₂⁻ 生成速率和 H₂O₂ 含量分别在 5 d 和 5、10 d 时显著低于对照。说明草酸处理通过提高果实抗氧化防御系统的能力和 PPO 活性来延缓果实成熟和增强果实抗病能力。

关键词: 桃; 草酸; 低温; 抗氧化酶; 多酚氧化酶; 活性氧; 贮藏

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 05-0788-05

Changes in Antioxidant Systems and Polyphenol Oxidase Activity in Peach Fruit Treated with Exogenous Oxalic Acid during Storage at Low Temperature

Zheng Xiaolin^{1,2}, Tian Shiping^{1*}, Li Boqiang¹, and Xu Yong¹

(¹ Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ² Biology Department, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: Peach (*Prunus persica* L. ‘Bayue Cui’) fruit were dipped in a 5 mmol·L⁻¹ oxalic acid solution for 10 min and then stored at low temperature for 20 days. Changes in antioxidant ability and polyphenol oxidase (POD) activity in the fruit were investigated during storage. The results showed that, as compared with control fruit, higher activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidases (POD), catalase (CAT) and PPO were observed and loss of ascorbate acid (AsA) was delayed. Moreover, to some extent, active oxygen species (AOS) production including superoxide (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) was inhibited in treated fruit. It was suggested that effects of oxalic acid on increases of antioxidant ability and PPO activity might be beneficial in delaying ripening process and enhancement of disease resistance in peach fruit during storage at low temperature.

Key words: Peach; Exogenous oxalic acid; Low temperature; Antioxidant enzyme; PPO; AOS; Storage

草酸是生物体的一种代谢产物, 在不同的生命体中发挥不同的功能^[1]。草酸因具有独特的理化特性和生化功能在木材腐烂、纸浆臭氧漂白、环境污染修复和植物诱导抗病性中发挥重要作用而备受关注, 外源草酸的应用已成为一个研究热点^[2~5]。研究发现草酸诱导植物的抗病性与其提高 POD 活性及诱导 POD 同工酶合成相关^[4,5]。草酸预处理水稻后, 在氧化胁迫下植株的 SOD 活性增加^[6]。Yoruk 等^[7]报道草酸影响 PPO 活性而控制香蕉切片褐变的发生。Kayashima 等^[8]认为草酸可以作为一种天然的抗氧化剂应用于自然或加工食物的贮藏中。目前, 有关外源草酸应用于采后水果保鲜的研究少见报道。本文报道桃栽培品种 ‘八月脆’ 采后草酸处理果实在低温贮藏下的活性氧、还原型抗坏血酸 (AsA) 和谷胱甘肽含量 (GSH)、以及 SOD、POD 和 CAT 等抗氧化酶和 PPO 活性的变化, 初步分析外源草酸对桃果实采后抗氧化能力和 PPO 活性的影响及其对延缓果实

收稿日期: 2004 - 11 - 17; 修回日期: 2005 - 03 - 07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471211)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: tsp@ns.ibcas.ac.cn)

成熟和提高果实抗病力的作用。

1 材料与方法

1.1 材料处理

试验材料为晚熟优质桃‘八月脆’(*Prunus persica* L. ‘Bayue Cui’), 采于北京市平谷果园。采集约八成熟、大小和着色基本一致的无病果实, 用通风车运回中国科学院植物研究所实验室后先入冷库预冷。第2天上午用 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草酸溶液浸果 10 min (草酸处理浓度和时间根据参考文献 [6] 及预备试验确定), 以浸水为对照。果实风干后将未受损伤的果实装于塑料箱中 (果实相互接触), 每箱 45 个果, 箱外套 0.05 mm 厚聚乙烯袋, 密封, 贮藏于 $(0 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。每 5 d 取样测定相关指标。另外, 将果实相互不接触放于塑料盘中, 每盘 10 个果, 外套 0.05 mm 厚聚乙烯袋, 密封, 贮藏于 $(0 \pm 1)^\circ\text{C}$, 观察果实腐烂状况。试验开始时果实的平均单果质量为 $(238 \pm 19.75) \text{ g}$, 最大横径和纵径分别为 $(8.10 \pm 0.35) \text{ cm}$ 和 $(7.82 \pm 0.35) \text{ cm}$ 。果实硬度为 $(11.06 \pm 0.25) \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 可溶性固形物 (TSS) 为 $9.18\% \pm 0.56\%$ 。

1.2 测定方法

从每处理中随机取 6 个果实, 取果实横径最大处皮下 2~5 mm 的果肉用于各指标测定。数据为重复的平均值 \pm 标准误, 用 SPSS 11.5 软件分析对照与处理的平均值间的差异水平。

1.2.1 酶活性的测定 取果肉 5.0 g, 加 30 mL $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 和 0.3 g PVPP, 匀浆后 20 000 g 离心 30 min。上清液为粗酶提取液, 用于测定 SOD (用南京建成生物技术研究所以“SOD 试剂盒”测定)、POD^[9]、CAT^[10] 和 PPO^[11] 活性。以上所有步骤均在 4℃ 下操作。SOD 以酶液抑制 50% 的肾上腺素还原为一个活力单位。POD、CAT 和 PPO 活性均以分钟 0.01 吸光度的变化为一个活力单位。考马斯亮蓝法测定酶提取液蛋白质含量。

1.2.2 AsA 和 GSH 含量测定 取果肉 5.0 g, 加 5% 的偏磷酸溶液 25 mL, 匀浆后 20 000 g 离心 25 min, 取上清液分别参照 Tanaka 等^[12] 和 Elman^[13] 的方法并稍加修改测 AsA 和 GSH 的含量。

1.2.3 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量的测定 取果肉 5.0 g, 加 20 mL $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.8 磷酸缓冲液和 0.3 g PVPP, 匀浆后 4℃ 下 15 000 g 离心 25 min, 取上清液测定 O_2^- 生成速率^[14]。

取果肉 2.0 g, 加 10 mL 冷丙酮, 匀浆后在 4℃ 下 15 000 g 离心 15 min, 取上清液测定 H_2O_2 的含量^[15]。

1.2.4 果实病情指数和腐烂率的统计 按果实表面病斑的大小分级。0 级: 无病斑; 1 级: 可见针头大小的病斑; 2 级: 病斑面积不超过表面积的 1/5; 3 级: 病斑面积占表面积的 1/5~1/2; 4 级: 病斑面积超过表面积的 1/2。病情指数 = (病级果数 \times 该级代表数值) / (调查总果数 \times 最高级代表数值) $\times 100$ 。以没有商品价值的 1~4 级果的百分率为果实腐烂率。每 30 个果实为 1 次重复, 重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 草酸处理后桃果实 SOD、POD、CAT 和 PPO 等酶活性的变化

在低温贮藏下, 果实 SOD 活性在采后 5 d 急剧降低至最低水平, 而后对照基本保持不变, 草酸处理果实则升高, 而且显著高于对照的水平 (图 1)。

对照果实的 POD 活性在采后 5 d 升高而后不断降低, 草酸处理果实则不断升高至 15 d 而后降低, 其中 10 d 后显著高于对照 (图 1)。

对照果实的 CAT 活性在采后 10 d 内急剧降低至几乎检测不出的水平, 而处理果实持续地降低, 在贮藏期的前 15 d 显著高于对照 (图 1)。

对照和处理果实 PPO 活性升高, 在采后 15 d 时达到峰值, 而后急剧下降到最低水平; 与对照相

比, 处理果实在 5 d 后显著高于对照 (图 1)。

2.2 草酸处理后桃果实的 AsA 和 GSH 含量变化

对照与处理果实的 AsA 含量均随贮藏时间的延长而不断降低, 但是在 10 和 15 d 时处理果实分别是对照的 114% 和 153%, 均显著高于对照, 说明草酸处理延缓了低温贮藏下果实的 AsA 的下降 (图 2, A)。果实 GSH 含量 5 d 后明显降低, 而后基本维持不变, 但在 20 d 时其含量极低, 几乎为零; 同时, 草酸处理与对照间没有显著差异 (图 2, B)。

2.3 草酸处理果实 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量的变化

整个贮藏期, O_2^- 生成速率均高于初始值并在采后 15 d 时达到峰值; 在采后 5 d 时处理果实的 O_2^- 生成速率显著低于对照水平 (图 3, A)。果实的 H_2O_2 含量在采后第 5 天急剧升高, 而后不断降低; 处理果实在 5 和 10 d 时均显著低于对照 (图 3, B)。

2.4 果实腐烂状况

处理和对对照果实在低温下贮藏 20 d 未出现病斑和腐烂; 转入常温 (25) 3 d 后腐烂剧增, 其中对照和处理果实的病情指数分别是 42.00% 和 25.00%, 果实的腐烂率分别是 84.00% 和 56.52% (表 1)。

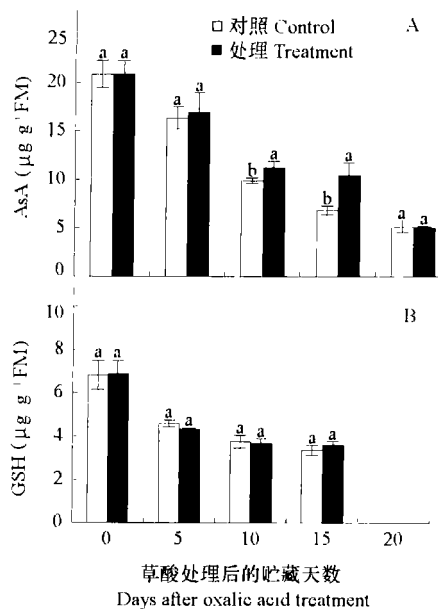
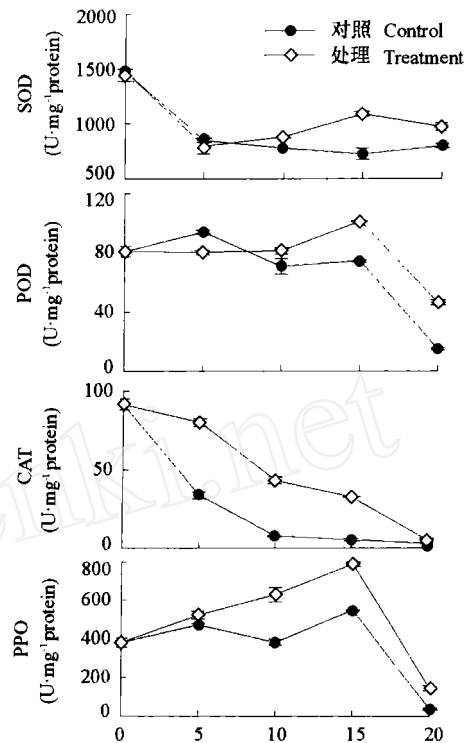


图 2 草酸处理与对照果实在低温贮藏下的 AsA 和 GSH 含量变化

Fig 2 Changes in AsA content and GSH content in untreated (control) and oxalic acid-treated peach fruit during storage at low temperature



草酸处理后的贮藏天数 Days after oxalic acid treatment

图 1 草酸处理与对照果实在低温贮藏下的 SOD、

POD、CAT 和 PPO 活性变化

Fig 1 Changes in activities of SOD, POD, CAT and PPO in untreated (control) and oxalic acid-treated peach fruits during storage at low temperature

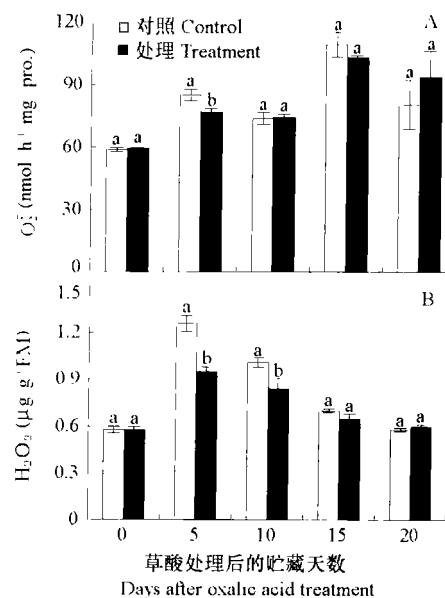


图 3 草酸处理与对照果实在低温贮藏下 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量的变化

Fig 3 Changes O_2^- production and H_2O_2 in untreated (control) and oxalic acid-treated peach fruit during storage at low temperature

3 讨论

果实成熟过程伴随氧化作用不断加强, 导致活性氧自由基 (AOS) 的累积, 所以往往产生氧化伤害^[16]; 然而, 果实的抗氧化防御系统, 包括酶促和非酶促防御系统清除 AOS 能够缓解氧化伤害, 其中 SOD、CAT、POD 等抗氧化酶的活性水平, 以及 ASA 和 GSH 等抗氧化剂的含量水平与延缓果实的成熟衰老密切相关^[9,17]; 同时, 越来越多的研究证明, 抗氧化酶的协同作用比单一酶在植物抗氧化过程中更具重要性^[9,18]。例如, Lacan 等^[9]报道甜瓜在贮藏中保持高水平 SOD 和 CAT 活性, 同时伴随高的 SOD/CAT 比率与延缓果实成熟密切相关。本试验结果表明: 草酸处理后, 在低温贮藏后期果实的 SOD 和 POD 活性升高 (图 1), 同时整个贮藏期果实的 CAT 活性降低极大地被阻碍 (图 1), ASA 的采后含量下降减缓 (图 2, A), AOS 水平包括 O_2^- 生成速率和 H_2O_2 含量在贮藏期出现不同程度的降低 (图 3)。说明草酸处理能够提高果实在低温贮藏下的抗氧化防御系统的能力, 从而有利于延缓果实成熟进程。

PPO 作为一种防护酶在植物的抗病机制中发挥重要的作用。Wang 等发现桃果实采后接种拮抗菌罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 或病原菌扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 后, 果实的 PPO 活性在常温和低温贮藏条件下均显著提高, 认为 PPO 在桃采后贮藏抗病性中具有重要作用^[19]。另外, POD 和 SOD 不仅与抗氧化相关, 也与植物的抗病性相关^[20~22]。据研究, 草酸诱导植物对真菌、细菌和病毒的系统抗性与其诱导植物的 POD 活性升高、新的 POD 同工酶形成等生理效应相关^[4,5]。其它一些化学试剂如水杨酸和茉莉酸甲酯诱导植物系统抗病性的获得与 SOD 活性诱导相关。例如, Foder 等^[21]认为 SOD 在抗病性中同样发挥作用, 因为水杨酸处理诱导烟草植株获得系统抗性时 SOD 活性提高。茉莉酸甲酯处理诱导 BX 烟草幼苗抗花叶病毒也得出了同样的结果^[22]。本试验结果表明草酸处理诱导提高了果实的 PPO 活性 (图 1), 而且导致果实贮藏后期 SOD 和 POD 活性显著提高 (图 1), 因此, 我们认为这些酶活性的提高有助于提高果实的抗病能力。值得说明的是: 本试验对照和草酸处理果实在低温下贮藏 20 d 内均没有发生病斑和腐烂, 然而, 当果实转入常温下 3 d 后草酸处理果实的病情指数和腐烂率显著低于对照 (表 1), 这种结果可能与草酸处理提高果实抗病能力, 以及草酸处理提高果实的抗氧化能力, 进而延缓果实成熟而缓和果实本身抗病力的下降等因素相关。

参考文献:

- Hodgkinson A. Oxalic acid in biology and medicine. London: Academic Press, 1977. 1~324
- Shimada M, Akamatsu Y, Tokimatsu T, Mii K, Hattori T. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. Journal of Biotechnology, 1997, 53: 103~113
- Roncen M B, Colan J F, Vidal T. Why oxalic acid protects cellulose during ozone treatment? Carbohydrate Polymers, 2003, 52: 411~422
- 郑光宇, 赵荣乐, 彭旭. 草酸可诱导甜瓜对 WMV-2 的系统抗性. 科学通报, 1999, 44: 1059~1062
Zheng G Y, Zhao R L, Peng X. Oxalate induce muskmelon resistance to WMV-2. Chinese Science Bulletin, 1999, 44: 1059~1062 (in Chinese)
- 张宗申, 彭新湘, 姜子德, 徐大高, 李明启. 非生物诱导剂草酸对黄瓜叶片中过氧化物酶的系统诱导作用. 植物病理学报, 1998, 28: 145~150
Zhang Z S, Peng X X, Jiang Z D, Xu D G, Li M Q. The systemic induction of peroxidase by oxalate in cucumber leaves. Acta Phytopathologica Sinica, 1998, 28: 145~150 (in Chinese)
- Peng X X, Liu Y H, Li M Q. Protective role of oxalate against oxidative-stress-induced degradation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Acta Phytophysiological Sinica, 2001, 26: 497~500
- Yoruk R, Balaban M O, Marshall M R, Yoruk S. The inhibitory effect of oxalic acid on browning of banana slices. Annual Meeting and Food Expo, Anaheim, California, 2002. 30G~18

表 1 果实低温贮藏 20 d 后转入 25℃ 下 3 d 的病情指数和腐烂率

Table 1 Disease index and fruit decay in untreated and oxalic acid treated fruit at 25℃ for 3 days followed by 20-day storage at 0℃

草酸浓度 Oxalic acid concentration (mmol · L ⁻¹)	病情指数 Disease index	腐烂率 Fruit decay (%)
0 (对照 Control)	42.00 a	84.00 a
5	25.00 b	56.52 b

注: 邓肯氏方差分析, 差异显著水平为 $P=0.05$ 。

Note: Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's multiple range tests ($P=0.05$).

- 8 Kayashima T, Katayama T. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1573: 1~3
- 9 Lacan D, Baccou J C. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted fruits. *Planta*, 1998, 204: 377~382
- 10 Beers R F, Sizer I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 1952, 95, 133~140
- 11 Tian S P, Xu Y, Jiang A L, Wang Y. Changes in enzymatic activity and quality attributes of late-mature peaches in response to controlled-atmosphere conditions. *Agricultural Sciences in China*, 2002, 35, 31~36
- 12 Tanaka K, Suda Y, Konda N, Sugahara K. O₃ tolerance and ascorbate-dependant H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1985, 25, 1425~1431
- 13 Ellman G L. Tissue sulphydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 82: 70~77
- 14 王爱国, 罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990, (6): 55~57
Wang A G, Luo G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiology Communication*, 1990, (6): 55~57 (in Chinese)
- 15 Mukherjee S P, Choudhuri M A. Implications of water stress induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in vigna seedlings. *Physiol. Plant*, 1983, 58: 166~170
- 16 Rogers S Y, Kumar M G N, Knowles N R. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Ann. Bot.*, 1998, 81: 203~211
- 17 Jimenez A, Creissen G, Kular B, Fim J, Robinson S, Verhoeven M. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*, 2002, 214: 751~758
- 18 Wu Y X, Tiedemann A V. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley exposed to ozone. *Environmental Pollution*, 2002, 116, 37~47
- 19 Wang Y S, Tian S P, Xu Y, Qin G Z, Yao H G. Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated with *Cryptococcus laurentii* or *Penicillium expansum* at 0 or 20 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 34: 21~28
- 20 Devi S R, Prasad M N V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings-implication of growth. *Biologia Plantarum*, 1996, 38, 387~395
- 21 Foder J, Gullner G, Adam A L. Local and systemic responses of antioxidant to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). *Plant physiology*, 1997, 114: 1443~1451
- 22 何红卫, 廖令洁, 肖文娟, 宾金华. 茉莉酸甲酯对烟草幼苗抗病毒的影响. *热带亚热带植物学报*, 2004, 12: 241~246
He H W, Liao L J, Xiao W J, Bin J H. Effect of methyl jasmonate on the resistance of tobacco seedling to TMV. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2004, 12: 241~246 (in Chinese)

新书推荐**《中国果树志·板栗 榛子卷》**

《中国果树志·板栗 榛子卷》由江苏省中国科学院植物研究所（又名江苏省中国科学院南京中山植物园）和山东省果树研究所共同主持，组织全国数十位专家合作，历经 20 余年编写而成。本书是首次对中国栗树资源进行较全面、系统调查研究的阶段性总结。它将对我国栗树生产和科学研究产生重要作用。内容重点放在栗树的种质资源上，也就是种、变种和品种资源的描述。

本卷总论部分分为六章，分别概要叙述了栗树的经济价值、栽培历史、栗属的分类、地理分布、生物学特性和栽培技术特点等；各论部分分为三章，阐述了品种分类和品种记载标准，并如实记述了栗属果树（主要是板栗）的种质资源，按地方品种群加以分类，共记载品种 334 个。为照顾栗树的生产实际和发展，其中还包括各产区及有关科研单位先后发掘出的一些有潜在价值的类型和优株。总论与各论文字比重约为 1:3。定价：100 元（含邮费）

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部，邮编 100081。