

# 苹果苦痘病的发生与钙、镁离子及抗氧化酶活性的关系

汪良驹 姜卫兵 何岐峰 范黄斌

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

**摘要:** 苹果苦痘病果实钙离子含量明显低于正常果实, 镁离子含量只有果肉外部显著高于正常果实。病果的超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT) 和愈创木酚过氧化物酶 (POX) 等活性明显低于正常果实。用  $\text{CaCl}_2$  溶液真空渗透处理苹果果实明显提高 APX 活性, 降低正常果实酶活性, 表明钙离子调节抗氧化酶活性。苦痘病果实缺钙富镁导致酶活性下降, 病果丙二醛 (MDA) 含量和细胞膜透性明显高于正常果实, 表明细胞膜系统的过氧化作用是病害发生的重要原因。

**关键词:** 苹果; 苦痘病; 钙; 镁; 抗氧化酶

**中图分类号:** S 661.1; S 432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 03-0200-06

人们对苹果苦痘病的研究已经有百余年历史, 发现果园肥水管理、树体养分、砧木种类、树龄、树势、修剪时期、树体负载量、果实着生部位、果实大小、种子数量、采收时期以及贮藏环境等因素都会影响发病率<sup>[1]</sup>。从发病的机理上看, 多数研究表明<sup>[2,3]</sup>, 果实缺钙或钙与其他元素之间失衡是病害发生的主要原因, 所以在生长前期树体喷钙<sup>[4]</sup>或者采收后果实浸钙<sup>[5]</sup>都能不同程度地降低发病率。但是缺钙引起苦痘病发生的生理机制还不清楚<sup>[6]</sup>。从钙的生理功能上看, 一般认为它具有维持离子平衡、细胞壁结构和膜功能等 3 个方面作用<sup>[7]</sup>, 并且有试验表明, 苹果果实采收后经渗钙处理可以防止胞间层的解体<sup>[8]</sup>。

本研究试比较苹果苦痘病果实与正常果实的钙、镁离子含量以及活性氧自由基代谢有关的酶类活性差异, 探讨果实渗钙或渗镁处理对这些酶类活性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试苹果品种为‘红富士’, 由江苏省农业资源开发局沛县禾达果园和丰县梁寨果园提供。果实采收于 1999 年 11 月中旬, 在室温条件下贮藏到次年 2 月下旬, 其间陆续剔除腐烂病、轮纹病等病原菌引起的病果, 选出正常果实与苦痘病果 (病斑直径 0.5 ~ 1.0 cm), 分别分析无机营养元素含量和抗氧化酶活性。

### 1.2 方法

1.2.1 钙、镁离子含量的测定 将苹果果实纵向剖开, 取出果核, 挑出种子, 并将果肉分成外 (花托皮层的外半侧果肉)、中 (花托皮层的内半侧果肉)、内 (果心线以内的果

肉) 3 部分。分别取种子和果肉外、中、内各部分, 称重烘干, 在 550 的茂福炉中灰化 24 h。然后用少量  $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$  洗涤, 再用去离子水定容至 50 mL。在原子吸收分光光谱仪 422 nm 波长处测定钙离子的含量, 在 285 nm 处测定镁离子含量。每处理重复测定 5 次, 取平均值。

1.2.2 抗氧化酶活性及丙二醛含量的测定 测定超氧化物歧化酶 (SOD)<sup>[9]</sup>、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT)<sup>[10]</sup>、愈创木酚过氧化物酶 (POX)<sup>[11]</sup> 活性和可溶性蛋白质及丙二醛 (MDA) 含量。用 pH 7.8 磷酸缓冲液 (PBS) 研磨提取苹果正常果实和病果果肉外部组织, 在 8 000  $\times g$  离心力下离心 15 min, 取上清液测定 SOD、CAT 和 POX 活性。可溶性蛋白质含量用考马斯亮兰法<sup>[12]</sup>测定。APX 活性分析时, 粗酶提取液 PBS 中加入 0.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  抗坏血酸, 按 Asada 法<sup>[13]</sup>测定酶活性。MDA 含量测定时用 3% 的磺基水杨酸作提取液, 按王爱国等<sup>[14]</sup>方法测定。抗氧化酶活性、可溶性蛋白质含量、MDA 含量各测定 5 次, 取平均值。

1.2.3 真空渗透处理 用 0.5 cm 的打孔器分别在苹果正常果实与病果的果肉外部取组织块, 清洗后浸泡于  $\text{CaCl}_2 100 \text{ mmol L}^{-1}$  或  $\text{MgCl}_2 100 \text{ mmol L}^{-1}$  溶液中, 真空处理 10 min。渗透平衡 4 h 后, 去除渗透液, 封口, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜。然后用 pH 7.8 的 PBS 磨碎提取, 在 8 000  $\times g$  下离心 15 min, 取上清液测定 SOD、APX、CAT、POX 活性, 其中测定 APX 活性时提取液中另外添加 0.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  抗坏血酸<sup>[13]</sup>。重复测定 5 次, 取平均值。

1.2.4 细胞膜相对透性的测定 用打孔器取苹果正常果实与病果果肉外、中、内不同部位组织块, 去离子水清洗 3 次, 加入 10 mL 去离子水, 真空抽气 10 min, 轻轻振荡平衡 30 min, 用电导仪测定出原初电导率  $C_0$ ; 然后在沸水浴中加热 20 min, 测定电导率, 得  $C_1$ 。重复测定 5 次, 取平均值。组织相对电导率  $\text{RC} = (C_0 / C_1) \times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果苦痘病果实与正常果实不同部位钙、镁离子含量

如图 1 所示, 苦痘病果实果肉外、中、内部以及种子的钙离子含量都极显著低于正常果实相应部位, 而且无论是绝对数量还是相对数量, 种子和果肉外部的钙离子含量最低, 表明缺钙与苹果苦痘病发生有着密切关系。

镁离子含量测定表明 (图 2), 苦痘病果肉外部镁离子的含量极显著高于正常果实, 但是两类果实中部与内部的镁含量没有达到显著差异水平, 而且病果种子镁含量还明显低于正常果, 表明果肉外部镁离子偏高与苦痘病发生有关。苦痘病果实果肉外部、中部、内部以及种子的  $\text{Mg/Ca}$  比值明显高于正常果, 其中以种子的差值最大 (表 1)。

表 1 苹果苦痘病果实与正常果实不同部位  $\text{Mg/Ca}$  比值

Table 1 The ratio of  $\text{Mg/Ca}$  in various parts of sound and bitter pitted apples

| 果 实<br>Fruit  | 外侧果肉<br>Outer flesh | 中部果肉<br>Middle flesh | 内侧果肉<br>Inner flesh | 种 子<br>Seed |
|---------------|---------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| 正 常<br>Sound  | 11.38               | 15.82                | 17.30               | 56.82       |
| 苦痘病<br>Pitted | 51.89               | 14.36                | 25.82               | 107.25      |

### 2.2 苹果苦痘病果实与正常果实抗氧化酶活性

对苹果的果肉外部抗氧化酶活性研究表明, 正常果实 SOD、CAT、POX 和 APX 活性均

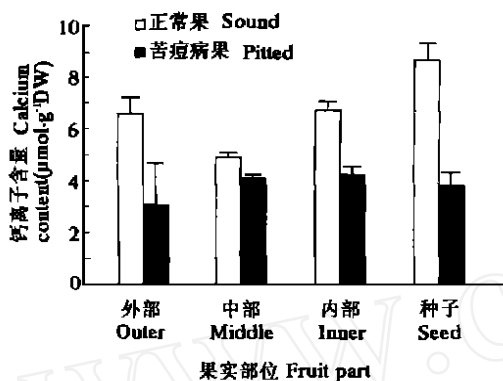


图1 苹果苦痘病果实与正常果实不同部位钙离子含量比较

Fig. 1 Calcium contents in the different parts of bitter pitted apple fruits and sound ones

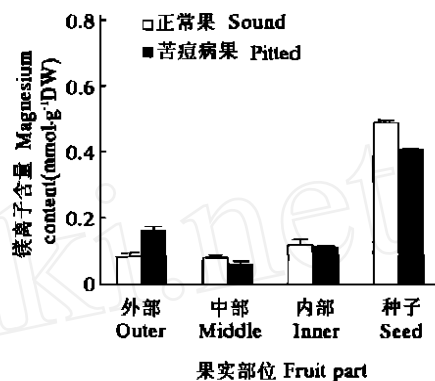


图2 苹果苦痘病果实与正常果实不同部位镁离子含量比较

Fig. 2 Magnesium contents in the different parts of bitter pitted apple fruits and sound ones

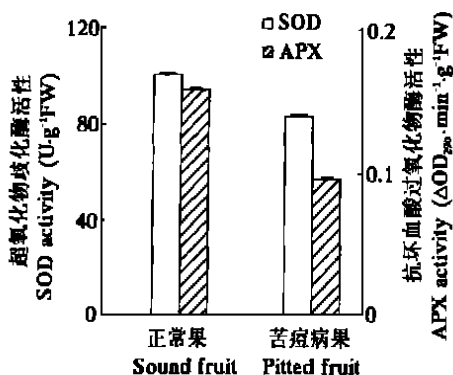


图3 苹果苦痘病果实与正常果实 SOD 和 APX 活性比较

Fig. 3 Comparison of activities of superoxide dismutase and ascorbate specific peroxidase between the sound and bitter pitted fruits

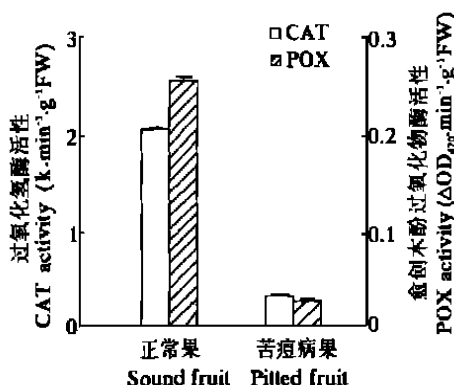


图4 苹果苦痘病果实与正常果实 CAT 和 POX 活性比较

Fig. 4 Comparison of activities of catalase and peroxidase between the sound and bitter pitted fruits

显著高于病果 (图3和图4), 说明发病果实清除活性氧自由基的能力明显低于正常果实。

### 2.3 $\text{CaCl}_2$ 或 $\text{MgCl}_2$ 处理对苹果果肉外侧组织切块 SOD、APX 活性的影响

图5表明,  $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{CaCl}_2$  或  $\text{MgCl}_2$  处理均明显提高苹果果实 SOD 活性, 表明 SOD 活性增加不是钙离子的特异性反应, 可能是对渗透胁迫的响应。相反, 苹果果实 APX 活性受到  $\text{CaCl}_2$  促进, 并被  $\text{MgCl}_2$  抑制, 说明 APX 活性上升是钙离子特异性调节的结果 (图6)。

### 2.4 苹果苦痘病果实细胞膜脂质过氧化程度与膜相对透性

从图7结果看, 苦痘病果实的 MDA 含量约为正常果实的3倍, 表明细胞膜脂质过氧化程度明显高于正常果实。从图8结果看, 苹果苦痘病果肉中部与内部的细胞膜相对透性与正常果实没有明显差异, 但是果肉外部的细胞膜相对透性明显高于正常果实, 因而, 苹果苦痘病发生实际上是膜脂质过氧化导致膜透性增大的结果。

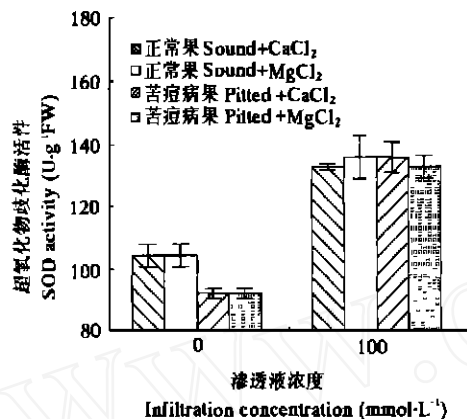


图5  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgCl}_2$  处理对苹果果实组织切块 SOD 活性的影响

Fig. 5 The effects of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  treatment on the SOD activity of apple fruits

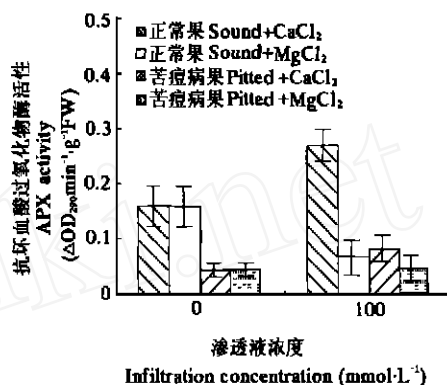


图6  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgCl}_2$  处理对苹果果实组织切块 APX 活性的影响

Fig. 6 The effects of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  treatment on the APX activity of apple fruits

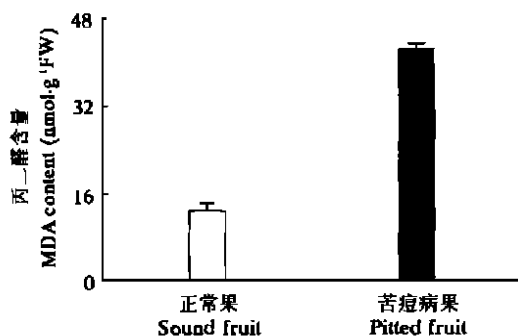


图7 苹果苦痘病果与正常果丙二醛含量比较

Fig. 7 Comparison of malonaldehyde contents between sound and bitter pitted apple fruits

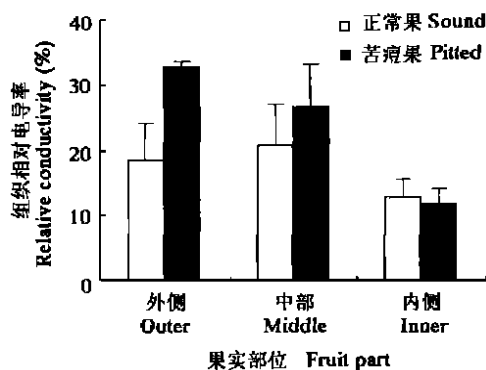


图8 苹果苦痘病果与正常果细胞膜相对透性比较

Fig. 8 Comparison of cell membrane permeability of various parts between sound and bitter pitted apples

### 3 讨论

长期以来, 缺钙导致苹果苦痘病发生的病理生理过程没有明确, 近年来有人怀疑缺钙与苦痘病发生有关<sup>[15]</sup>。本研究结果表明, 苹果苦痘病果实中钙离子含量的确明显低于正常果, 而且不仅仅某一部位低于正常果实, 而是包括种子在内的所有部位钙含量都低于正常果实 (图 1), 因而, 钙缺乏导致苹果苦痘病发生是无容怀疑的。除此之外, 镁离子含量过高也是造成苹果苦痘病的重要原因。曾有人报道在花后喷 1%  $\text{MgCl}_2$  降低苹果果实钙含量, 并使苦痘病发生率增加 4 倍<sup>[16]</sup>。但本研究结果表明, 苦痘病果实中镁含量高于正常果实仅仅表现在果肉外部, 果肉中部、内部无明显差异, 而且在种子中, 病果镁含量还低于正常果实 (图 2), 因而, 不能笼统地认为苹果果实镁离子含量高导致苦痘病的发生, 而是果肉外部的镁离子含量高导致了苦痘病的发生。

有学者用  $Mg/Ca$  比值来推测苹果苦痘病发生机率<sup>[17]</sup>, 但是  $Mg/Ca$  不能说明苦痘病发生的机理。从本研究结果看, 苦痘病果肉外部、内部以及种子的  $Mg/Ca$  比值的确明显高于正常果, 其中以种子的差值最大 (表 1)。但是为何苦痘病的发生只表现在果实表面, 而不表现在种子中, 显然, 用  $Mg/Ca$  比不能解释这一现象。

笔者认为, 苹果果实缺钙富镁并不直接导致苦痘病发生, 而是通过其他病理生理过程表现出来。一般认为, 钙与果实细胞膜稳定性有关。果实采收后虽然水分供应切断, 但是水分耗散并未减少, 果肉外部受到明显的水分胁迫<sup>[18]</sup>。本研究结果表明, 苦痘病果实抗氧化酶活性明显低于正常果实 (图 3 和图 4), 因而细胞抗氧化能力较弱, 膜脂质过氧化产物 MAD 含量高 (图 7), 膜相对透性, 特别是果肉外部细胞膜的相对透性明显高于正常果实 (图 8)。人为渗钙可以提高抗氧化酶活性, 而用  $MgCl_2$  处理则降低了 APX 等酶活性 (图 6)。因而苹果果实中钙可以调节细胞抗氧化酶活性, 防止膜脂质过氧化, 维护细胞膜正常功能, 防止胞间层的解体。

#### 参考文献:

- 1 Tomala K. Orchard factors affecting fruit storage quality and prediction of harvest date of apples. *Acta Hort.*, 1999, 485: 373 ~ 382
- 2 Ferguson I B, Watkins C B. Bitter pit in apple fruit. *Hort. Rev.*, 1989, 11: 289 ~ 355
- 3 Witney G W, Kushad M M. Correlation of pyruvate kinase activity with bitter pit development in apple fruit. *Sci. Hort.*, 1990, 43: 247 ~ 253
- 4 Kodde J, Jager A de, De Jager A. Fruit analysis. Results of earlier fruit analysis: pay great attention to calcium sprayings. *Groenten en Fruit*, 1990, 46 (4): 58 ~ 59
- 5 Burmeister D M, Dilley D R. Induction of bitter pit-like symptoms on apples by infiltration with  $Mg^{2+}$  is attenuated by  $Ca^{2+}$ . *Postharv. Biol. Tech.*, 1991, 1: 11 ~ 17
- 6 Perring M A. Incidence of bitter pit in relation to the calcium content of apples: Problems and paradoxes, a review. *J. Sci. Food Agric.*, 1986, 37: 591 ~ 606
- 7 Ferguson I B. Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *HortSci.*, 1988, 23: 262 ~ 266
- 8 Poovaiah B W. Molecular and cellular aspects of calcium action in plants. *HortSci.*, 1988, 23: 267 ~ 271
- 9 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化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
- 10 Bergmeyer H U. *Methods of enzymatic analysis*. 3th ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. 113
- 11 朱广廉, 钟海文, 张爱琴编. 过氧化物酶和多酚氧化酶活性的测定. *植物生理学实验*. 北京: 北京大学出版社, 1990. 37 ~ 40
- 12 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248 ~ 254
- 13 Asada K. Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymology*, 1984, 105: 422
- 14 王爱国, 邵从本, 罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. *植物生理学通讯*, 1986, (2): 55 ~ 57
- 15 Saure M X. Reassessment of the role of calcium in development of bitter pit in apple. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1996, 23: 237 ~ 243
- 16 Witney G W, Kushad M M, Barden J A. Induction of bitter pit in apple. *Sci. Hort.*, 1991, 47 (1, 2): 173 ~ 176
- 17 Lee H C, Choi I M, Kim W S. Influence of chemical treatment on occurrence and prevention of bitter pit during apple fruit maturing stage. *J. Crop Prot.*, 1997, 39: 25 ~ 33
- 18 Palta J P. Stress interactions at the cellular and membrane levels. *HortSci.*, 1990, 25: 1377 ~ 1381

## Studies on the Relationship of the Development of Bitter Pit in Apple Fruits with the Contents of Calcium and Magnesium and the Activities of Antioxidant Enzymes

Wang Liangju, Jiang Weibing, He Qifeng, and Fan Huangbin

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract :** The calcium contents in all parts of bitter pit apples were significantly lower than that of the sound ones, but only the contents of magnesium at the outer cortex significantly higher than the sound ones. The activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), catalase (CAT) and ascorbate specific peroxidase (APX) in the pitted fruits were significantly lower than that of the sound. Vacuum infiltration of apples with  $\text{CaCl}_2$  100 mmol/L increased activities of the above antioxidant enzymes, and the treatment of  $\text{MgCl}_2$  decreased the activities of POX, APX and CAT, implying the activities of these three enzymes were regulated by calcium. The contents of malonaldehyde and the relative conductivity were higher in bitter pit apple fruits, which showed that the peroxidation of membrane might be the important reason of the physiological disorder in apple with lower level of calcium.

**Key words :** Apple; Bitter pit; Calcium; Magnesium; Antioxidant enzyme

### 征 文

## 第 26 届国际园艺大会将在加拿大多伦多举行

大会由国际园艺学会主办, 美国园艺学会、美国马铃薯协会、美国果树学会协办, 加拿大园艺学会承办, 将于 2002 年 8 月 11 ~ 17 日在加拿大多伦多市举行。会议内容有园艺作物育种、栽培、植物保护、生物技术、园艺工程、采后技术、保护地栽培、城郊型园艺、教育培训、经济管理、无土基质、热带及亚热带园艺等。会议设大会、分组会、墙报和贸易展览, 并安排 2 ~ 3 天的专业参观。此届会议主席诺尔曼·卢尼 (Norman E. Looney) 博士表示尽力为中国与会专家寻找经费, 欢迎中国同行参加大会。

2001 年 10 月 15 日为论文摘要投稿截止日期, 2001 年 12 月 1 日通知论文摘要接受与否, 2002 年 3 月 1 日正式通知论文作者是口头发言还是墙报展示。2002 年 4 月 15 日为论文代表注册截止日期。收到论文全文截止日期为 2002 年 8 月 17 日。联系人地址:

1. XXVIth IHC

Congress Canada

49 Bathurst Street, Suite 101

Toronto, ON

Canada M5V 2P2

Phone: +1 416 504 4500

Fax: +1 416 504 4505

E-mail: IHCreg@congresscan.com

2. Dr. Yves Desjardins

Département de phytiologie

Pavillon Paul-Comtois, Local 3236C

Université Laval

Québec, Canada

G1K 7P4

Phone: +1 418 656 2131, Poste 2359

Fax: +1 418 656 7871

E-mail: Yves.Desjardins@plg.ulaval.ca

3. 刘广树

单位: 中国农业科学院

蔬菜花卉研究所科研处

地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号

邮编: 100081

电话: 010-68919531 010-68975140

传真: 010-62174123

电子信箱: ivfcass@public3.bta.net.cn