

1-甲基环丙烯对‘富有’甜柿采后主要生理指标及细胞超微结构的影响

胡芳^{1,2}, 马书尚¹, 张继澍^{1*}, 韩青梅², 赵刚¹, 武春林²

(西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100; ²西北农林科技大学, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要: 以完全甜柿‘富有’(*Diospyros kaki* L. ‘Fuyu’)为试材, 研究了在室温(20 ±2)贮藏条件下1-甲基环丙烯(1-MCP) 0.50 μL·L⁻¹处理对果实的影响。结果表明: 1-MCP处理可显著抑制其呼吸速率、乙烯释放速率和衰老软化进程; 1-MCP处理通过抑制果实中LOX活性的升高和MDA含量的积累, 一定程度上维持了果肉细胞器和膜系统的完整性, 延缓甜柿果实的软化衰老进程。

关键词: 柿; 1-甲基环丙烯; 软化; 超微结构; 贮藏

中图分类号: S 665.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 04-0487-06

Effects of 1-methylcyclopropene on Postharvest Physiology and Cell Ultra-structure of Pollination-constant and Non-astringent Persimmon During Storage

HU Fang^{1,2}, MA Shu-shang¹, ZHANG Ji-shu^{1*}, HAN Qing-mei², ZHAO Gang¹, and WU Chun-lin²

(¹College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The pollination-constant and non-astringent persimmon (*Diospyros kaki* L. ‘Fuyu’) were used to investigate the effects of 0.50 μL·L⁻¹ 1-MCP treatment on fruits at room temperature (20 ±2) during storage. The results indicated that 1-MCP significantly retarded respiration rate, ethylene production and fruit ripening. 1-MCP treatment inhibited the higher level of LOX activity and decreased accumulation of MDA content. It maintained the integrality of cell organelles and cell membrane and postponed the fruit ripening process to a certain extent.

Key words: persimmon; *Diospyros kaki* L.; 1-methylcyclopropene; softening; ultrastructure; storage

完全甜柿 (pollination-constant and non-astringent, PCNA) 果实采后易软化, 货架期短, 极大地限制了其长期贮藏和远距离营销。如何抑制甜柿果实成熟过程中的衰老软化, 延长贮运期和货架期, 是甜柿果实生产实践中急需解决的问题。通过抑制乙烯生成来延缓果实衰老软化进程, 延长货架期和贮运期已成为近年来的研究重点。低温能够显著抑制甜柿果实的乙烯释放速率, 但甜柿果实对低温 (0~4℃) 敏感, 易受冷害, 表现为果实内部凝胶化 (Collins & Tisdell, 1995), 失去其特有的商品价值。气调贮藏 (5%~10% CO₂, 5% O₂) 可有效延缓甜柿果实软化进程 (Park et al., 1997), 但成本高, 技术性强。1-甲基环丙烯 (1-MCP) 是一种新型乙烯受体抑制剂, 它优先以不可逆的方式结合到乙烯受体蛋白上, 阻断乙烯与受体的结合, 抑制乙烯诱导的生理效应,

收稿日期: 2008-11-21; 修回日期: 2009-03-09

基金项目: 美国罗门哈斯 (中国公司) 资助项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jishu@nwsuaf.edu.cn)

从而延缓果实成熟衰老进程 (Sisler & Serek, 1997)。由于 1-MCP处理具有操作简单、无毒、高效等优点, 现已广泛应用于延缓果实成熟软化和花卉产品的保鲜处理, 并作为研究乙烯作用机理的工具之一。

1-MCP处理可显著的延缓香蕉 (Golding et al, 1998; 张明晶和姜微波, 2006)、猕猴桃 (樊秀彩和张继澍, 2001; 丁建国等, 2003)、苹果 (韩冬芳等, 2003) 和柿 (朱东兴等, 2004) 等果实的成熟衰老, 延长贮运期。通过研究 1-MCP处理对甜柿果实采后相关主要生理指标及对果肉细胞超微结构变化的影响, 作者试图从微观上揭示出甜柿果实软化机制以及为 1-MCP在甜柿果实上的应用提供技术理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

供试甜柿品种为‘富有’ (*Diospyros kaki* L. ‘Fuyu’), 于 2006年 10月 12日 (果实果顶着色面积达 80%) 采自陕西省杨凌示范区日本甜柿示范果园。

采收当天运回实验室, 选取大小一致、无病虫害和机械损伤的果实, 0.1%多菌灵浸果 3 min, 晾干表面水分, 随机分为 2组。在 20℃下, 一组用浓度为 $0.50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1-MCP粉剂 (Ethylbe有效成分 0.14%, 美国 ROHM和 HAAS公司提供) 熏蒸处理 24 h (韩冬芳等, 2003), 另一组对照果实相同条件下密封 24 h, 但不加 1-MCP。将对照果实和经 1-MCP处理的果实分别装入带有塑料薄膜内衬的果箱里置于室温 (20 ± 2)℃, 相对湿度 85% ~ 90%条件下贮藏。对照和处理各设 3个重复, 每个重复 10个果实。

1.2 生理指标测定

参照韩冬芳等 (2003) 的方法, 呼吸速率用静置法测定, 乙烯释放速率用岛津 GC-14A 气相色谱仪测定。果肉硬度用意大利 FT-327型果实硬度计在果实赤道处去皮测定 (探头直径 11 mm, 测定深度 8 mm)。可溶性固形物用手持折光仪 (WYT-4型) 测定。每个测定项目各 3个重复, 每个重复 10个果实。

1.3 酶活性及相关物质含量测定

每 4 d随机从甜柿果实中取 10个果实, 切取相同部位果肉组织, 冷冻干燥 (SM FREEZE DRYER FDA5510型, -50°C , 5 mTorr) 48 h, 冰浴研磨成粉, -80°C 保存备用。称取 0.5 g果肉干粉, 加入酶液提取缓冲液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液, pH 7.8, 2% β -巯基乙醇, 1% PVP-40), 定容至 25 mL, 37°C 水浴浸提 30 min, 4°C , $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液即为待测酶液。

脂氧合酶 (LOX) 活性参照吴敏等 (1999) 的方法测定, 以 $\text{OD}_{234} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示; 丙二醛 (MDA) 含量参照赵世杰等 (1994) 的方法测定, 用 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

各重复测定 3次。

1.4 电镜样品制备

取果实赤道部皮下 5 mm深处约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的果肉, 用 4%的戊二醛前固定, 磷酸缓冲液清洗, 1%锇酸后固定, 丙酮梯度脱水, Epon812 环氧树脂包埋, LEICA ULTRACUT超薄切片机 (德国莱卡公司) 切片, 厚度为 70 nm, 切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后, 在 JEM-1230型透射电子显微镜 (日本电子株式会社) 下观察并拍照。

1.5 数据处理

试验数据采用 SPSS统计软件对相关指标进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 1-MCP处理对甜柿果实呼吸速率及乙烯释放速率的影响

‘富有’甜柿对照果实贮藏第4天出现高峰后急剧下降并于第8天缓慢上升,直至28 d贮藏结束(图1),1-MCP处理呼吸高峰比对照推迟12 d,且峰值仅为对照的68.8% ($P < 0.05$)。

乙烯释放速率呈现出先上升后下降再上升的趋势,都表现为2个明显峰值,对照在贮藏第4天和第24天,而1-MCP处理的比对照明显推迟12 d(分别为第16天和第32天);且除第16~18天外,处理的乙烯释放速率都较对照的低(图1)。

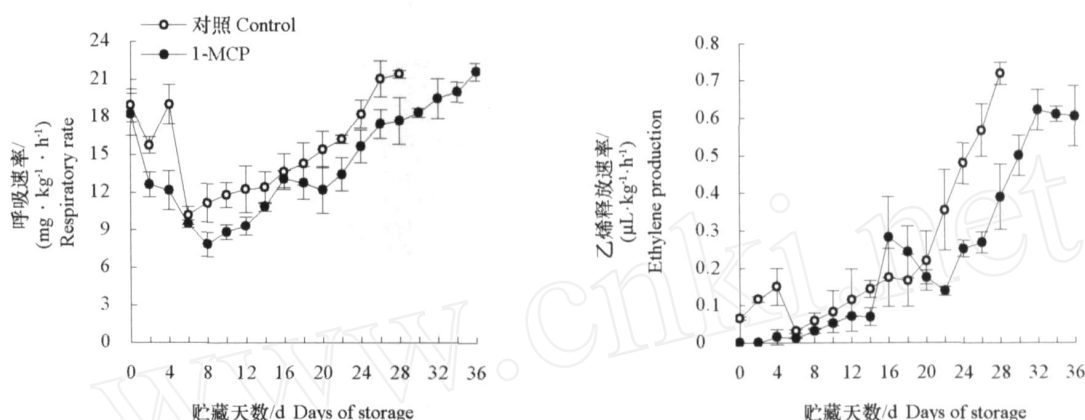


图1 1-MCP处理对果实贮藏期间呼吸速率与乙烯释放速率的影响

竖柱表示标准误, $n=3$, 下同。

Fig. 1 Effects of 1-MCP on respiratory rate and ethylene production of PCNA persimmon fruits during storage

Vertical bars represented mean \pm SE, $n=3$. The same below.

2.2 1-MCP处理对甜柿果实后熟软化进程中硬度、可溶性固形物含量的影响

1-MCP处理显著延缓果实的软化衰老进程,贮藏28 d时果实硬度仍保持在 $2.58 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$,是相应对照果实的12.28倍 ($P < 0.01$) (图2)。

处理期间可溶性固形物含量差异不显著,基本维持在13%左右。

2.3 1-MCP处理对甜柿果实贮藏期间 LOX活性和MDA含量的影响

室温贮藏期间甜柿果实 LOX活性和MDA含量整体上均呈现先上升后下降的变化趋势(图3)。对照果实贮藏 LOX活性迅速上升,4 d时达到高峰,然后急剧下降;1-MCP处理抑制 LOX活性的上升 ($P < 0.05$),但并未推迟峰值的出现,同期 LOX活性仅为对照果实的79.3%。对照和处理果实都在贮藏16 d时有个MDA峰值,但1-MCP处理的MDA活性始终低于对照的,其峰值也仅为对照的65.9% ($P < 0.05$),表明1-MCP通过降低活性氧代谢以减少膜脂过氧化而延缓果实的成熟衰老作用。

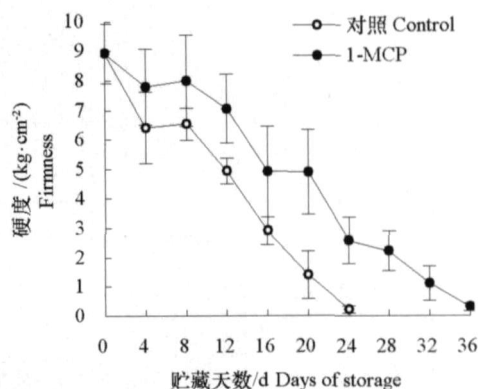


图2 1-MCP对甜柿果实贮藏期间硬度的影响

Fig. 2 The effects of 1-MCP treated on firmness of persimmon fruits during storage

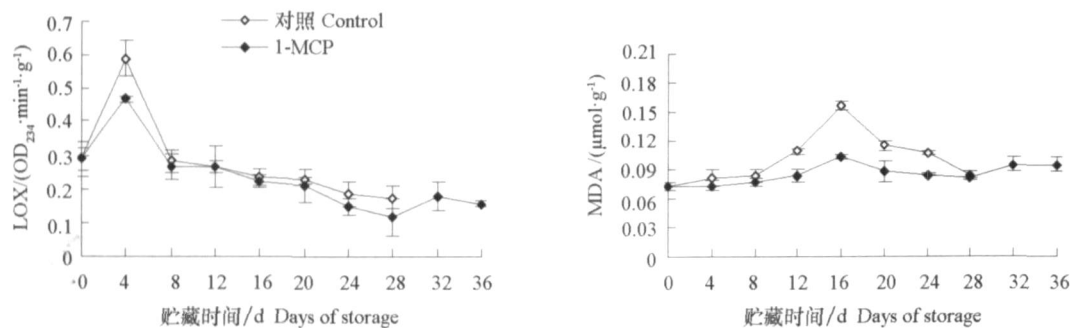
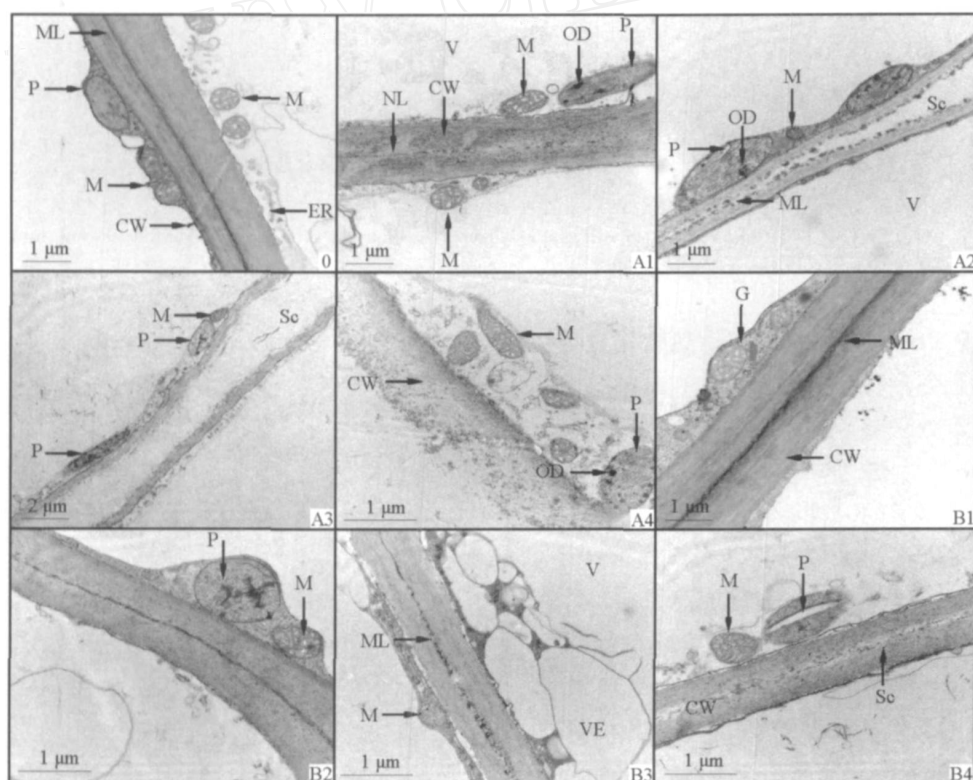


图 3 1-MCP对甜柿果实贮藏期间 LOX活性和 MDA含量的影响

Fig. 3 Effects of 1-MCP treated on LOX activity and MDA content of PCNA persimmon fruits during storage

2.4 1-MCP处理对甜柿果肉细胞超微结构的影响

在透射电子显微镜下观察, 刚采收的 (图版, 0) ‘富有’甜柿果肉细胞壁结构完整, 中胶层电子密度较高, 初生壁紧贴中胶层两边, 呈明—暗—明分区结构; 细胞大液泡化, 细胞质层较薄, 紧贴细胞壁, 内含大量结构完整、嵴发达的线粒体; 质体被膜清晰, 嗜锇颗粒分散其中; 粗面内质网及核糖体游离在细胞质中。



图版说明: 0: 刚采收时; A1~A4: 对照果实, 贮藏 4、8、12 和 16 d 时的果肉细胞超微结构; B1~B4: 1-MCP 处理的果实, 在贮藏 4、8、12 和 16 d 果肉细胞的超微结构。CW: 细胞壁; ML: 中胶层; CY: 细胞质; M: 线粒体; ER: 内质网; V: 液泡; VE: 囊泡; P: 质体; G: 高尔基体; OD: 嗜锇颗粒; Sc: 胞间裂痕。

Explanation of plates: 0: Freshly harvested fruit; A1 - A4: Ultrastructure of controlled PCNA fruit for 4, 8, 12 and 16 days respectively after ripening; B1 - B4: Ultrastructure of 1-MCP treated PCNA fruit for 4, 8, 12 and 16 days respectively after ripening CW: Cell wall; ML: Middle lamella; CY: Cytoplasm; M: Mitochondrion; ER: Endoplasmic reticulum; V: Vacuole; VE: Vesicle; P: Plastid; G: Dictyosome; OD: Osmophilic droplets; Sc: Slight crack

果实在成熟过程中细胞结构发生明显变化,对照果实贮藏 4 d 后中胶层开始降解,致密度降低,断续而不均匀,质体和线粒体结构完整(图版, A1);贮藏 8 d 后中胶层完全降解消失,出现胞间裂痕。质体被膜清晰,结构完整,嗜锇颗粒增多(图版, A2);贮藏 12 d 后,细胞裂痕进一步扩大,线粒体结构模糊,质体降解变形部分空泡化,嗜锇颗粒体积变大,出现质壁分离现象(图版, A3);贮藏 16 d 后大部分细胞壁边缘模糊,呈絮状;线粒体双层膜结构不明显,质壁分离现象严重(图版, A4)。而 1-MCP 处理的甜柿果实在贮藏 4 d 后细胞壁结构基本无明显变化(图版, B1);贮藏 8 d 后中胶层仍十分明显,但致密度降低,细胞器结构完整,清晰可辨(图版, B2);贮藏 12 d 后中胶层降解,细胞壁结构仍保持完整,部分降解,电子密度降低,线粒体、质体仍清晰可辨,出现大量囊泡并入液泡的现象(图版, B3);贮藏 16 d 后中胶层降解消失,细胞壁微纤丝结构紊乱,线粒体结构仍完整,质体降解出现空泡化,部分质膜发生凹陷(图版, B4)。

3 讨论

甜柿果实贮藏期间乙烯释放速率远远低于苹果(韩冬芳等, 2003)、猕猴桃(樊秀彩和张继澍, 2001)等,即使出现高峰也低于 $1 \mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,说明对乙烯极为敏感,微量的乙烯即可达到阈值,从而引发一系列生理生化反应。本试验中在室温条件下伴随果肉硬度的迅速下降,贮藏 4 d 出现跃变高峰,说明甜柿是典型的呼吸跃变型果实。甜柿食用品质的最佳时期是果实即将发生呼吸跃变之前,此时果实内可溶性糖含量最高,硬度较高,甜脆爽口;当发生呼吸跃变后,果肉内部组织迅速浆化失去甜柿特有的“甜脆”感(Collins & Tisdell, 1995)。因此控制甜柿果实的乙烯产生,推迟跃变的出现时间,是延长其货架期和贮运期的有效方法。1-MCP 能够通过优先结合乙烯受体,阻断乙烯反馈调节的生物合成,从而延缓果实成熟衰老进程(Sisler & Serek, 1997)。本研究表明室温下 $0.50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1-MCP 处理可以显著抑制‘富有’甜柿果实贮藏期间的呼吸速率、乙烯释放速率,并推迟果实呼吸高峰和乙烯高峰出现的时间。需要指出的是,1-MCP 处理的甜柿果实贮藏第 16~18 天时乙烯释放速率峰值远远高于对照,可能是 1-MCP 在植物组织中饱和效应的结果。1-MCP 的这种饱和效应在菠萝(Selvarajah, 2001)、香蕉(Golding et al, 1998)果实中也已得到证实,具体机理还有待于进一步的研究。此外,1-MCP 还可抑制果实硬度的下降,从而延缓果实衰老软化。

研究表明,果实软化是由于膜脂过氧化作用对细胞膜系统完整性的破坏而引起的结果,LOX 活性大小和 MDA 含量高低与膜脂过氧化程度密切相关(赵世杰等, 1994; 吴敏等, 1999)。试验结果表明,1-MCP 处理能够抑制甜柿果实中 LOX 活性的升高和 MDA 含量的积累,从而有效的维持膜系统的完整性。研究表明果实在成熟过程中组织结构及细胞内部发生一系列变化,其中细胞壁中胶层的逐渐降解是导致果实软化絮败的主要原因(吴明江等, 1995)。电镜试验结果表明,在贮藏过程中甜柿对照果实中胶层逐渐降解消失,细胞壁微纤丝结构紊乱呈絮状,出现细胞质壁分离现象;嗜锇颗粒是叶绿体的脂类仓库,与片层的合成密切相关,当果实趋于衰老,嗜锇颗粒逐渐数目增多,体积变大;线粒体是成熟衰老过程中较为稳定的细胞器(张玉等, 2005),贮藏后期线粒体才开始衰老。而 1-MCP 处理的甜柿果实果肉组织细胞壁结构变化趋势同对照果实,但衰退程度相对滞后(图版),与段玉权等(2004)在桃果实上的研究结果一致。综上所述,应用电子显微镜技术从微观上证明了 1-MCP 通过维持果肉组织细胞结构的完整性而有效保持甜柿果实的硬度,延缓甜柿果实的软化衰老进程,说明了结构与功能的统一性。因此, $0.50 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1-MCP 处理能够通过推迟呼吸跃变出现、维持活性氧代谢平衡,避免有害物质积累造成膜脂过氧化作用,较好的保持膜系统和果肉细胞超微结构的完整性,从而延缓了甜柿果实的成熟软化进程,延长贮运期,在生产实践上值得推广应用。

References

- Collins R J, Tisdell J S. 1995. The influence of storage time and temperature on chilling injury in Fuyu and Suruga persimmon (*Diospyros kaki* L.) grown in subtropical Australia. *Postharvest Biol Technol*, 6 (2): 149 - 157.
- Ding Jian-guo, Chen Kun-song, Xu Wen-ping, Xu Chang-jie. 2003. Regulation of 1-methylcyclopropene on the ripening and softening of postharvest kiwifruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (3): 277 - 280. (in Chinese)
- 丁建国, 陈昆松, 许文平, 徐昌杰. 2003. 1-甲基环丙烯处理对美味猕猴桃果实后熟软化的影响. *园艺学报*, 30 (3): 277 - 280.
- Duan Yu-quan, Feng Shuang-qing, Zhao Yu-mei, Ma Qiu-juan. 2004. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on flesh cell ultrastructure of refrigerator-stored peaches. *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (12): 2039 - 2042. (in Chinese)
- 段玉权, 冯双庆, 赵玉梅, 马秋娟. 2004. 1-甲基环丙烯处理对冷藏桃果肉细胞超微结构的影响. *中国农业科学*, 37 (12): 2039 - 2042.
- Fan Xiu-cai, Zhang Ji-shu. 2001. Effect of postharvest treatment with 1-MCP on physiology of kiwifruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (5): 399 - 402. (in Chinese)
- 樊秀彩, 张继澍. 2001. 1-甲基环丙烯对采后猕猴桃果实生理效应的影响. *园艺学报*, 28 (5): 399 - 402.
- Golding J B, Shearer D, Wyllie S G, McGlasson W B. 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biol Technol*, 14 (1): 87 - 98.
- Han Dong-fang, Ma Shu-shang, Wang Ying, Du Xiao-ying, Wu Chun-lin. 2003. Effect of 1-MCP treatment on ethylene production and quality retention of 'Delicious' apples. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (1): 11 - 14. (in Chinese)
- 韩冬芳, 马书尚, 王 鹰, 杜小英, 武春林. 2003. 1-MCP对新红星苹果乙烯代谢和贮藏品质的影响. *园艺学报*, 30 (1): 11 - 14.
- Park Y S, Na T S, Lee K M. 1997. Effects of O₂ and CO₂ treatments within polyethylene film bags on the fruit quality of non-astringent Fuyu persimmon fruits during storage. *Journal of Korean Society for Horticultural Science*, 38 (5): 510 - 515.
- Selvarajah S, Bauchot A D, John P. 2001. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol Technol*, 23 (2): 167 - 170.
- Sisler E C, Serek M. 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent development. *Physiol Plant*, 100: 577 - 582.
- Wu Min, Chen Kun-song, Zhang Shang-long. 1999. Involvement of lipoxygenase in the postharvest ripening of peach fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (4): 227 - 231. (in Chinese)
- 吴 敏, 陈昆松, 张上隆. 1999. 桃果实采后成熟过程中脂氧合酶活性变化. *园艺学报*, 26 (4): 227 - 231.
- Wu Ming-jiang, Zhang Zhong-heng, Yu Ping, Huang Jian, Liu Wu-lin. 1995. Studies on the ultrastructure and physiology of the interaction between cytoplasm and cell wall during apple softening. *Acta Horticulturae Sinica*, 22 (2): 181 - 182. (in Chinese)
- 吴明江, 张忠恒, 于 萍, 黄 剑, 刘武林. 1995. 苹果软化过程中质壁互作的生理和结构研究. *园艺学报*, 22 (2): 181 - 182.
- Zhang Ming-jing, Jiang Wei-bo. 2006. Effects of 1-MCP on the postharvest physiology and quality of banana fruits. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 22 (9): 270 - 273. (in Chinese)
- 张明晶, 姜微波. 2006. 1-MCP乙烯受体阻断剂对香蕉果实采后生理和品质的影响. *农业工程学报*, 22 (9): 270 - 273.
- Zhang Yu, Xu Xiang-yang, Li Jing-fu. 2005. Ultrastructural changes of fruits in tomato ripening mutant during storage. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 707 - 709. (in Chinese)
- 张 玉, 许向阳, 李景富. 2005. 番茄成熟突变体果实贮藏过程中细胞超微结构的变化. *园艺学报*, 32 (4): 707 - 709.
- Zhao Shi-jie, Xu Chang-cheng, Zou Qi, Meng Qing-wei. 1994. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. *Plant Physiology Communications*, 30 (3): 207 - 210. (in Chinese)
- 赵世杰, 许长成, 邹 琦, 孟庆伟. 1994. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. *植物生理学通讯*, 30 (3): 207 - 210.
- Zhu Dong-xing, Rao Jing-ping, Ren Xiao-lin, Pu Peng. 2004. Effects of postharvest treatment with 1-MCP on ripening and softening of persimmon fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (1): 87 - 89. (in Chinese)
- 朱东兴, 饶景萍, 任小林, 蒲 鹏. 2004. 柿果实 1-甲基环丙烯处理对成熟软化的影响. *园艺学报*, 31 (1): 87 - 89.