

宫内伊予柑果实发育期间色泽和色素的变化

王伟杰¹ 徐建国² 徐昌杰^{1*}

(¹ 浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 浙江杭州 310029; ² 浙江省柑桔研究所, 浙江台州 318020)

摘 要: 以宫内伊予柑为试材, 对果实发育期间色泽、色素种类及含量, 尤其是类胡萝卜素组分进行了研究。结果表明, 幼果中高含量的叶绿素使果实呈现青绿色, 采前 8 周起类胡萝卜素开始积累, 采前 4 周起随叶绿素含量下降黄色得以显现。果实类胡萝卜素主要存在于果皮中, 成熟果实果皮类胡萝卜素含量达囊瓣的 16.62 倍, 总量占整果的 83.62%。用高效液相色谱—二极管阵列检测 (HPLC - PDAD) 技术, 对采前 12 周至采收期的果皮类胡萝卜素组成进行了分析, 共分离出类胡萝卜素组分 23 种, 其中 7 种得到鉴定。在采收期果皮中, 已鉴定的类胡萝卜素中以 β -隐黄质和玉米黄素较丰富, 占总类胡萝卜素的 8.00% 和 6.78%; α -胡萝卜素不足总类胡萝卜素的 1%, 没有检测出 γ -胡萝卜素和番茄红素。果实成熟过程中 β -隐黄质及玉米黄素含量上升, 并伴随 α -胡萝卜素、叶黄质和 γ -胡萝卜素含量下降, 暗示类胡萝卜素的主链合成能力和环羟化活性急剧增强, 与此同时, 阿朴类胡萝卜素的出现则表明类胡萝卜素的裂解能力随果实成熟而上升。

关键词: 柑; 果实色泽; 类胡萝卜素; 色素

中图分类号: S 666.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 03-0461-05

Developmental Changes in External Color, Pigment Content and Composition in Citrus iyo Fruit

Wang Weijie¹, Xu Jianguo², and Xu Changjie^{1*}

(¹ Department of Horticulture, The State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China; ² Zhejiang Citrus Research Institute, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

Abstract: Developmental changes in the content and composition of pigments, especially carotenoids, in *Citrus iyo* Hort. ex Tanaka cv. Miyauchi fruit and their correlations with fruit coloration were studied. High content of chlorophylls in young fruit was responsible for its green color. Intensive increase in content of carotenoids and rapid loss of chlorophylls commenced at 8 and 4 weeks before harvest respectively, and both changes contributed to yellow color development in ripening fruit. 83.62% of total fruit carotenoids was found located in the peel, where carotenoid content was 16.62 times as high as that in the pulp. Composition of carotenoids in the peel within 12 weeks before fruit harvest was analyzed using high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC - PDAD). 23 carotenoids were separated and 7 of them were identified. Among identified carotenoids, β -cryptoxanthin and zeaxanthin were relatively abundant and accounted for 8.00% and 6.78% of total carotenoids respectively; α -carotene was less than 1% of total while γ -carotene and lycopene were undetectable. The increase in content of β -cryptoxanthin and zeaxanthin was accompanied by the decrease in content of lutein, α -carotene and γ -carotene during late fruit development, indicating that carotenoid pathway and β -ring hydroxylation activities were enhanced. Meanwhile, the appearance and accumulation of apo-carotenoids suggested an increase in carotenoid cleavage activities as the fruit ripened.

Key words: *Citrus iyo*; External fruit color; Carotenoids; Pigments

收稿日期: 2005 - 06 - 16; 修回日期: 2005 - 09 - 01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370989); 浙江省科技厅农业重点项目 (2005C22059)

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

致谢: 英国 Royal Holloway 的 Peter M Bramley 教授和 Paul D Fraser 博士提供了类胡萝卜素 HPLC 分析条件和技术指导, 谨致谢意。

类胡萝卜素的含量与组成直接决定成熟柑橘果实的色泽, 从而影响果实的商品性^[1,2]。很早以前人们就认识到柑橘果实发育后期由于叶绿素的降解而使类胡萝卜素得以显现, 但果实类胡萝卜素从什么时期开始显著积累, 尤其是发育过程中类胡萝卜素的组成发生何种变化, 知之不多。研究常局限于总类胡萝卜素^[3]或含量颇丰的如红肉脐橙的番茄红素和 β -胡萝卜素的分析^[4,5]。陶俊等^[6]应用 HPLC—紫外可见检测器和 C_{18} 柱从宫内伊予柑果皮中鉴定出 3 种类胡萝卜素组分, 但未对其在果实发育期间的变化进行研究。1996 年以来, 随着高效液相色谱—二极管阵列检测 (HPLC - PDAD) 技术以及 C_{30} 柱在柑橘类胡萝卜素分析中的应用^[7-10], 人们对柑橘果实类胡萝卜素组成的认识才有所增多, 但主要局限于甜橙, 尤其是果汁, 其它柑橘品种的类胡萝卜素研究尚罕见报道, 对杂柑类的色泽研究更加匮乏。

伊予柑是源于橘和甜橙的优良杂柑之一, 宫内伊予柑是 1955 年日本发现的伊予柑早熟优良枝变, 成花易, 产量高, 对疮痂病抗性以及抗旱性均比温州蜜柑强, 抗寒性比甜橙强, 果实大, 外形美观, 内质佳, 香味浓, 耐贮藏。浙江最早于 1981 年从日本引入, 先后在黄岩、象山等地试栽, 随后在浙江各地以及四川、重庆和福建等省市推广, 均表现了良好的适应性和优质丰产性能。宫内伊予柑以温州蜜柑、雪柑为中间砧高接时亲和力强^[11], 因而通过高接可迅速缩减温州蜜柑和低劣品种的栽培面积, 提高杂柑比例, 从而有利于柑橘品种结构的调整优化。宫内伊予柑色泽橙红, 光洁度好。本文报道宫内伊予柑果实发育期间色泽和色素含量及种类的变化模式。

1 材料与方法

1.1 试材及取样

以 1995 年高接于本地早 (枸头橙砧) 上的宫内伊予柑 (*Citrus iyo* Hort. ex Tanaka 'Miyachi') 为试材。从盛花后 1 周起每两周取有代表性的果实样品直至完熟采收。取样重复 3 次, 前期 (花后 1、3、5、7 周) 以 10 果为一重复, 花后 9 周起以单果为一重复。

1.2 色泽测定、色素含量与类胡萝卜素的 HPLC 分析

用 TC-P G 型色差计对果实色泽进行测定, 测试直径为 2 cm。每果随机取果实中部 4 个点进行测定, 取平均值。叶绿素和总类胡萝卜素含量测定按 Fadeel^[12]的方法进行。类胡萝卜素组分分析采用混合样品, 参照文献 [13, 14] 进行提取, 并略作改进, 皂化按 Fraser 等^[15]的方法进行。HPLC 分析条件按 Fraser 等^[15]及该研究小组对流动相组成的后续改进 (Fraser 和 Bramley, 私人通讯) 进行, 应用 Waters HPLC-PDAD 分析系统和 YMC C_{30} 类胡萝卜素分析柱, 流动相由溶剂 A (甲醇)、B (80% 甲醇, 含 0.2% 乙酸铵) 和 C (甲基叔丁基醚) 按比例混合组成: 0~6 min 由 95% A + 5% B 组成, 然后梯度改变至 7 min 为 80% A + 5% B + 15% C, 12 min 起梯度改变至 32 min 止为 30% A + 5% B + 65% C, 48 min 起梯度改变至 50 min 止为 95% A + 5% B, 然后维持至分析结束 (60 min)。柱温恒定于 25℃, 流速 1 mL/min, 进样体积 20 μ L, 检测器波长范围为 220~600 nm, 间隔 1.2 nm。用 Waters Empower (build 1154) 软件进行分析, 类胡萝卜素峰的鉴定通过标样保留时间和吸收光谱曲线双重确认。类胡萝卜素标样的获得同 Fraser 等^[15]。

2 结果与分析

2.1 果实发育期间的色泽变化

从花后 9 周 (7 月 7 日) 起测定了果实发育期间的色泽变化。L 代表明亮度, 果实成熟期间 L 值上升表明果皮类胡萝卜素积累导致的色泽加深不及叶绿素降解导致的色泽变浅影响大。a 代表红色与青绿色相比的程度, a 值越大表明果实越红, a 值为负则表示果实偏青。从图 1 结果可知, 果实到采收期时才偏红, 其它阶段均偏青。b 值代表黄色与蓝色相比的程度, b 值越大表明果实越黄, b 值在花后 21 周起急剧上升, 表明果实此时起黄色显现并加深, 与肉眼观察结果一致。

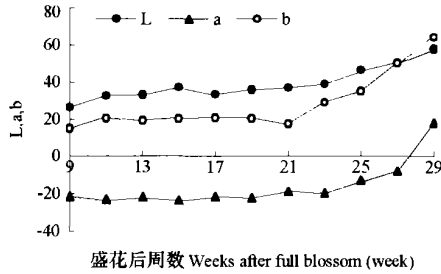


图1 宫内伊予柑果实发育期间色泽的变化

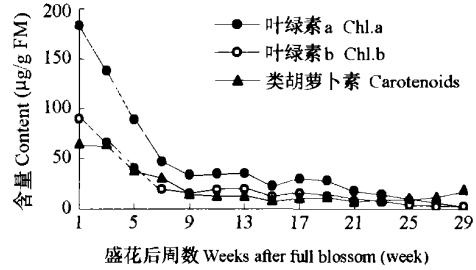
Fig. 1 Changes in fruit color of *Citrus iyo* during fruit development

图2 宫内伊予柑果实发育期间叶绿素和类胡萝卜素含量的变化

Fig. 2 Changes in content of chlorophyll and carotenoids during fruit development of *Citrus iyo*

2.2 果实发育期间叶绿素和类胡萝卜素含量的变化

花后 11 周内, 果皮与囊瓣 (果肉) 不易分离, 我们以整果为材料对色素含量作了分析。从花后 11 周分别对果皮和囊瓣的色素含量作了分析, 并计算出平均整果的色素含量 (图 2) 和色素总量 (图 3)。分析结果表明, 幼果叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量较高, 随果实发育其含量趋于下降, 类胡萝卜素含量在花后 21 周又趋于上升, 而叶绿素含量仍然下降 (图 2)。

果实膨大对果皮色素含量具有稀释作用, 因而叶绿素含量不能准确指示其降解阶段的开始, 而以单果叶绿素总量表示更为合适。由图 3 可知, 叶绿素仅在采前 4 周才进入降解阶段, 而叶绿素含量的下降在采前 12 周就已发生 (图 2)。果实发育中期叶绿素 a 和叶绿素 b 的总量最高, 而果实发育后期类胡萝卜素总量最高。图 3 所示, 花后 11 至 25 周, 果实叶绿素 a 和叶绿素 b 总量变化不大。尽管在这期间果实增重了 3.07 倍, 类胡萝卜素总量在果实发育前期呈缓慢增加的趋势, 花后 21 周起迅速增加, 在 8 周内增加 3.27 倍, 类胡萝卜素占总色素中的比例从采前 8 周的 23.35% 上升至采收时的 84.40%。

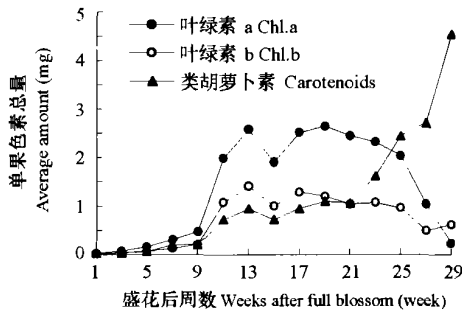


图3 宫内伊予柑果实发育期间单果叶绿素和类胡萝卜素总量的变化

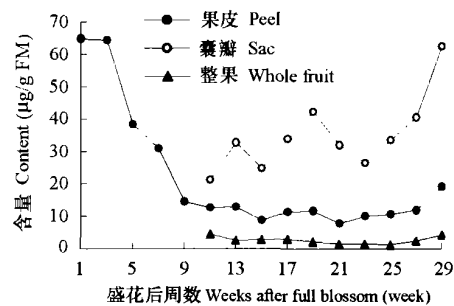
Fig. 3 Changes in amount of chlorophyll and carotenoids on a per fruit basis during fruit development of *Citrus iyo*

图4 宫内伊予柑果实发育期间果皮和囊瓣类胡萝卜素含量变化

Fig. 4 Changes in content of carotenoids in peel and sac of *Citrus iyo* during fruit development

果实类胡萝卜素主要存在于果皮, 以成熟果实为例, 虽然果皮质量仅占整果质量的 25.71%, 但果皮类胡萝卜素总量竟占整果的 83.62%, 果皮类胡萝卜素含量达囊瓣的 16.62 倍。果皮类胡萝卜素含量在花后 13 周和 18 周以及采收时出现高峰, 花后 19 至 23 周时的含量较大幅度下降与此时果皮旺盛生长和质量增加有关 (图 4)。

2.3 果实发育期间类胡萝卜素组成的变化

根据标准样品和吸收光谱进行定性分析, 从发育后期 (采前 12 周至采收) 的宫内伊予柑果皮样品中共分离出 23 个类胡萝卜素组分, 其中 7 个组分得到鉴定 (表 1)。

随着果实成熟, 果皮类胡萝卜素总含量明显上升, 但单一种类的含量变化不一。成熟果皮中含量

较丰富的 -隐黄质和玉米黄素含量均在成熟期显著上升,与此同时,叶黄质、组分 13、组分 16和 -胡萝卜素则在成熟果皮中消失, -胡萝卜素含量也随成熟急剧下降。

表 1 宫内伊予柑果实成熟期间果皮类胡萝卜素的组成

Table 1 Composition of carotenoids in peel of ripe Citrus iyo fruit

组分 Peak No.	保留时间 Retention time (min)	λ_{\max} (nm)	成分 Identification	丰度 Abundance (%)	组分 Peak No.	保留时间 Retention time (min)	λ_{\max} (nm)	成分 Identification	丰度 Abundance (%)
1	6.88	399, 421, 446		0.78	15	20.70	423, 441, 462		0
2	8.02	396, 421, 447		3.12	16	21.62	424, 446, 474		0.89
3	9.18	416, 441, 473		1.90	17	22.34	424, 446, 473		0
4	13.04	399, 423, 448		9.15	18	23.54	276, 286, 297	八氢番茄红素	2.14
5	13.60	378, 400, 425		2.59				Phytoene	
6	14.03	378, 401, 425		4.28	19	24.49	427, 450, 479	-隐黄质	8.00
7	14.77	394, 417, 444		13.61				-cryptoxanthin	
8	15.27	400, 419, 442		14.32	20	25.67	426, 447, 475		0.46
9	15.74	402, 427, 452		6.36	21	26.43	332, 347, 365	六氢番茄红素	0.80
10	16.34	422, 445, 473	叶黄质 Lutein	0				Phytofluene	
11	16.36	402, 426, 450		17.03	22	28.80	424, 446, 474	-胡萝卜素	0
12	17.98	428, 450, 478	玉米黄素 Zeaxanthin	6.78				-carotene	
13	18.97	421, 441, 468		6.88	23	30.24	425, 450, 477	-胡萝卜素	0.88
14	19.89	422, 445, 473		0				-carotene	

注: 丰度指采收期果皮中该类胡萝卜素峰面积占类胡萝卜素总峰面积的比例, 峰面积分别在 286 nm、347 nm和 450 nm处读取。

Note: Abundance is defined as percentage of the area of an individual peak against the total area of all peaks. The areas were recorded at 286 nm, 347 nm and 450 nm respectively.

3 讨论

柑橘类胡萝卜素易被叶绿素所掩盖, 从外观色泽难以准确判断类胡萝卜素开始积累的时期。分析结果表明, 类胡萝卜素从开花期就开始存在于果实(子房)中, 随后随着果实膨大而逐渐上升, 自采前 8周起类胡萝卜素急剧积累, 快速积累先于叶绿素降解的启动(图 3), 而不是通常所认为的同步启动^[9]。商业采收期的宫内伊予柑果实中类胡萝卜素含量仍处于快速上升时期, 因而推迟采收可在一定程度上有利于着色, 果实采收之后类胡萝卜素是否会继续积累尚有待进一步研究。

通过比较不同发育期的类胡萝卜素组成, 发现叶黄质含量在采前 12周时较低, 到采前 8周时成为含量最高的类胡萝卜素, 采前 4周时含量下降, 至采收时消失。随着果实发育, 叶黄质和 -胡萝卜素含量急剧下降直至消失, 而 -隐黄质和玉米黄素含量急剧上升, 表明类胡萝卜素合成由幼果期的主链为主转换为成熟期的主链为主。同时, 成熟果皮中积累相当少的 -胡萝卜素而积累较多的 -隐黄质和玉米黄素应该是由 -胡萝卜素羟化酶活性得以上升之故。因而, -环羟化活性的上升是宫内伊予柑果实成熟期间果皮类胡萝卜素代谢的另一个特点。

果实成熟期间果皮中新出现的类胡萝卜素组分 4~组分 9和组分 11的保留时间位于 13~16 min, 而这 7个组分的最大吸收波长较小(400~427 nm, 表 1), 而同时符合此两条件的通常是阿朴类胡萝卜素(裂解的类胡萝卜素)。因而, 裂解能力的上升是宫内伊予柑果实成熟期间果皮类胡萝卜素代谢的又一个特点。Navelate甜橙果实着色期间果皮中也出现和积累阿朴类胡萝卜素^[10], 表明类胡萝卜素的裂解还可能是多种柑橘果实成熟期间所共有的特性。

本研究揭示了宫内伊予柑果实发育与成熟期间果实色素的一些规律性变化, 发现在采前 8周果皮开始积累类胡萝卜素, 采前 4周开始脱青, 果皮类胡萝卜素的积累量远大于囊瓣, 果皮主链类胡萝卜素合成能力、-环羟化活性和裂解活性在果实成熟期间明显上升。同时, 未知类胡萝卜素组分的鉴定、类胡萝卜素裂解相关的酶及其基因的分离、类胡萝卜素代谢的调控途径及机制等问题均有待于进一步深入研究。

参考文献:

- 1 徐昌杰, 张上隆. 柑橘类胡萝卜素合成关键基因研究进展. 园艺学报, 2002, 29 (增刊): 619~623
Xu C J, Zhang S L. Advances in research of genes responsible for carotenoid biosynthesis in citrus. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (supplement): 619~623 (in Chinese)
- 2 徐昌杰. 柑橘果实类胡萝卜素研究进展. 园艺学进展, 2004, 6: 60~65
Xu C J. Research advances in citrus fruit carotenoids. Advances in Horticulture, 2004, 6: 60~65 (in Chinese)
- 3 王利芬, 夏仁学, 周开兵. 纽荷尔脐橙果皮色素组分和含量与果实着色的关系. 华中农业大学学报, 2003, 22 (6): 599~602
Wang L F, Xia R X, Zhou K B. The relation of the content and component of pigment in peel of navel orange and its peel colour. Journal of Huazhong Agricultural University, 2003, 22 (6): 599~602 (in Chinese)
- 4 王贵元, 夏仁学. 红肉脐橙果肉中番茄红素和 -胡萝卜素含量的变化及外源 ABA 和 GA_3 对其的影响. 园艺学报, 2005, 32 (2): 207~211
Wang G Y, Xia R X. Lycopene and beta-carotene content in flesh of Cara Cara orange and effects of exogenous ABA and GA_3 on their content changes. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (2): 207~211 (in Chinese)
- 5 王贵元, 夏仁学. 红肉脐橙果实发育过程中番茄红素、 -胡萝卜素、糖、GA、ABA 含量的变化. 园艺学报, 2005, 32 (3): 482~485
Wang G Y, Xia R X. Changes in the contents of lycopene, beta-carotene, sugar and endogenous GA and ABA in flesh during the fruit development of 'Cara Cara' orange. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (3): 482~485 (in Chinese)
- 6 陶俊, 张上隆, 徐建国, 刘春荣. 柑桔果实主要类胡萝卜素成分及含量分析. 中国农业科学, 2003, 36 (10): 1202~1208
Tao J, Zhang S L, Xu J G, Liu C R. Analysis of major carotenoid composition and its content in citrus fruit. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36 (10): 1202~1208 (in Chinese)
- 7 Rouseff R, Raley L, Hofsommer H J. Application of diode array detection with a C_{30} reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44 (8): 2176~2181
- 8 Lee H S, Castle W S, Coates G A. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. Journal of Chromatography A, 2001, 913 (1-2): 371~377
- 9 Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. Plant Physiology, 2004, 134 (2): 824~837
- 10 Rodrigo M J, Marcos J F, Zacarias L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52 (22): 6724~6731
- 11 徐建国, 陈国庆, 翁法令, 孙建华, 陈敏华, 徐小菊. 不同砧尾张温州蜜柑高接伊予柑的生长结果调查. 中国南方果树, 2001, 30 (5): 8~9
Xu J G, Chen G Q, Weng F L, Sun J H, Chen M H, Xu X J. An investigation on the growth and fruiting of top grafted *Citrus iyo* on *Citrus unshiu* with various rootstocks. South China Fruits, 2001, 30 (5): 8~9 (in Chinese)
- 12 Fadeel A A. Location and properties of chloroplasts and pigment determination in roots. Physiologia Plantarum, 1962, 15 (1): 130~147
- 13 Lee H S. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 (5): 2563~2568
- 14 陶俊, 张上隆, 张良诚, 徐昌杰, 陈俊伟. MPTA 对柑桔果皮类胡萝卜素形成的影响. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28 (1): 46~50
Tao J, Zhang S L, Zhang L C, Xu C J, Chen J W. Effect of MPTA on carotenoid biosynthesis in peel of citrus (*Citrus succosa* Hort. ex Tanaka) fruit. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002, 28 (1): 46~50 (in Chinese)
- 15 Fraser P D, Pinto M E S, Holloway D E, Bramley P M. Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. The Plant Journal, 2000, 24 (4): 551~558