

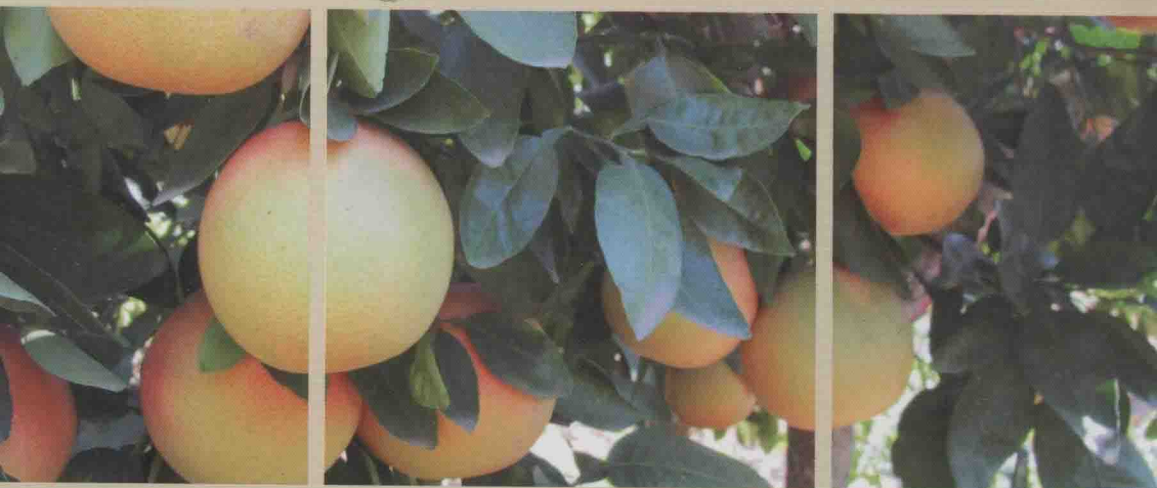
葡萄柚

PUTAOYOU

GUOSHI ZHUCANG PINZHI TIAOKONG JISHU

果实贮藏品质调控技术

邓 佳 史正军 刘惠民 著



科学出版社

葡萄柚果实贮藏品质调控技术

邓 佳 史正军 刘惠民 著



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书从葡萄柚的生产实际出发,以多个科研项目研究成果为基础,根据葡萄柚的生长发育规律和质地品质变化情况,采用概述与专题研究相结合的方式,全面系统地介绍生产中适用的葡萄柚果实贮藏质地品质调控技术。本书着重介绍果实成熟软化细胞壁代谢机理、生长期矿质元素施肥对质地品质的调控技术、生长期植物激素喷施对质地品质的调控技术及采后物理方法对质地品质的调控技术。

本书结合作者的研究结果和生产实践经验,深入浅出地讲解物理、化学方法对葡萄柚果实质地品质的调控技术,具有较强的科学性、实用性、可操作性,对葡萄柚生产具有较强的指导作用,适合葡萄柚栽培技术人员、相关果树研究人员和农林院校有关师生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

葡萄柚果实贮藏品质调控技术 / 邓佳等著. — 北京: 科学出版社, 2015.9

ISBN 978-7-03-045100-2

I. ①葡… II. ①邓… III. ①葡萄柚-贮藏 IV. ①S666.309

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 132953 号

责任编辑: 杨 岭 孟 锐 / 责任校对: 王 翔

责任印制: 余少力 / 封面设计: 墨创文化

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

成都创新包装印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年9月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2015年9月第一次印刷 印张: 7.75

字数: 160千字

定价: 59.00元

前 言

葡萄柚(*Citrus paradisi* Macf.)属芸香科柑橘属植物,是柚类偶然变异的柑橘,其果实在枝上成串悬挂,簇生如同葡萄,所以称为葡萄柚。葡萄柚果实富含维生素C、柚苷和橙苷,具有消除疲劳、助消化、清热退火、减肥和保养肌肤等保健疗效,果实可用于鲜食,制做果汁和罐头,果皮可提取香精油、果胶和柚苷,具有较高的营养、经济价值。我国在20世纪20年代末从美国引进葡萄柚试种,在浙江、四川、广东和台湾等地区有少量零星种植,没有形成产业。云南省在21世纪初开始进行葡萄柚引种栽培,目前已筛选出适宜云南热区种植的4个品种,建成葡萄柚种质资源保存圃和推广示范园,并带动周边少数民族地区农户、企业广泛种植,种植面积在全国居首。该果品的规模化生产丰富了“云果”的产品系列,增强了“云果”的市场竞争力,取得了良好的区域经济效益和生态效益。采后葡萄柚果实因后熟衰老质地劣变,易产生大量病害,导致腐烂,造成果实在流通过程中的较大损耗。目前,国外葡萄柚果实采后贮藏技术以气调冷藏、辐照、涂膜和使用杀菌保鲜剂为主,国内普遍采用通风常温库藏和使用杀菌防腐剂,由于云南葡萄柚引种栽培起步较晚,对其贮藏技术研究滞后,当前的果实贮藏方法仍以化学杀菌为主,对贮藏质地品质调控技术的研究还远远不够,极大程度地限制了葡萄柚果实的流通性,严重影响了其商品价值及经济效益。

本书主要以西南林业大学葡萄柚引种栽培课题组多年葡萄柚栽培与利用研究成果为素材,采用概述与专题研究相结合的方式,全面系统地介绍葡萄柚果实质地品质调控研究的最新成果,是邓佳、史正军等共同努力的结果。各章分工如下:第一章为果实细胞壁代谢对质地品质影响的概述(邓佳、刘惠民、史正军);第二章介绍生长期矿质元素(钙、硼)施肥处理对葡萄柚果实贮藏质地品质的调控(邓佳、张南新、严毅);第三章介绍生长期植物激素(赤霉素、水杨酸)叶面喷施处理对葡萄柚果实贮藏质地品质的调控(李贤忠、张晓敏、王连春);第四章介绍采后物理处理(热处理、浸泡处理)对葡萄柚果实贮藏质地品质的调控(邓佳、史正军、张南新)。

本书的编写和出版得到国家国际科技合作专项项目“国外鲜食杂交柚优良品种引进、联合研发及示范(2014DFA31060)”、国家林业局科技成果推广项目

“美国葡萄柚新品种及优质高效栽培技术推广(〔2010〕47号)”、云南省科技创新强省计划项目“美国葡萄柚优良品种引进与推广示范(2009AC005)”等资助。鉴于编者水平有限，书中难免存在不足之处，恳请读者予以指正。

编者

2015年4月于昆明

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 果实发育成熟软化过程细胞壁变化	3
1.2.1 细胞壁结构变化	4
1.2.2 细胞壁组分变化	6
1.3 细胞壁降解酶活性变化	9
1.3.1 多聚半乳糖醛酸酶(PG)	9
1.3.2 果胶甲酯酶(PME)	10
1.3.3 纤维素酶(Cx)	12
1.3.4 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶(α -L-Af)	14
1.3.5 β -半乳糖苷酶(β -Gal)	15
1.4 果实质地变化的调控	17
1.4.1 钙、硼元素对果实质地品质调控	17
1.4.2 外源激素对果实质地品质调控	18
1.4.3 采后热处理对果实质地品质调控	20
1.5 本研究的目的、意义和主要内容	21
1.5.1 研究的目的、意义	21
1.5.2 研究的主要内容	21
第 2 章 采前钙、硼处理对葡萄柚果实贮藏期细胞壁代谢及相关 降解酶基因表达的影响	22
2.1 材料与方法	22
2.1.1 试验材料	22
2.1.2 试验指标及测定方法	22
2.1.3 果实总 RNA 的提取、cDNA 合成、实时定量荧光 PCR	24
2.1.4 数据统计与分析	25
2.1.5 主要仪器与试剂	25
2.2 结果与分析	27
2.2.1 采前钙、硼处理葡萄柚果实贮藏期硬度、失重率、可溶性 固形物的变化	27
2.2.2 采前钙、硼处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁组分含量的变化	29

2.2.3	采前钙、硼处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁降解酶活性的变化	33
2.2.4	采前钙、硼处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁降解酶基因表达	39
2.3	讨论	43
2.3.1	采前钙、硼处理对贮藏期葡萄柚果实硬度、失重率、可溶性固形物含量的影响	43
2.3.2	采前钙、硼处理对贮藏期葡萄柚果实细胞壁组分含量的影响	45
2.3.3	采前钙、硼处理对贮藏期葡萄柚果实细胞壁降解酶活性及其基因表达的影响	46
2.4	小结	47
第3章	采前赤霉素、水杨酸处理对葡萄柚果实贮藏期细胞壁代谢及相关降解酶基因表达的影响	50
3.1	材料与方法	50
3.1.1	试验材料	50
3.1.2	试验指标及测定方法	50
3.1.3	果实总 RNA 的提取、cDNA 合成、实时定量荧光 PCR	50
3.1.4	统计与分析	50
3.2	结果与分析	51
3.2.1	采前赤霉素、水杨酸处理葡萄柚果实贮藏期硬度、失重率、可溶性固形物的变化	51
3.2.2	采前赤霉素、水杨酸处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁组分的变化	53
3.2.3	采前赤霉素、水杨酸处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁降解酶活性的变化	58
3.2.4	采前赤霉素、水杨酸处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁降解酶基因表达	64
3.3	讨论	68
3.3.1	采前赤霉素、水杨酸处理对贮藏期葡萄柚果实硬度、失重率、可溶性固形物含量的影响	68
3.3.2	采前赤霉素、水杨酸处理对贮藏期葡萄柚果实细胞壁组分含量的影响	69
3.3.3	采前赤霉素、水杨酸处理对贮藏期葡萄柚果实细胞壁降解酶活性及其基因表达的影响	69
3.4	小结	71
第4章	采后钙、热处理对葡萄柚果实贮藏期细胞壁代谢及相关降解酶基因表达的影响	74
4.1	材料与方法	74

4.1.1	试验材料	74
4.1.2	试验指标及测定方法	74
4.1.3	果实总 RNA 的提取、cDNA 合成、实时定量荧光 PCR	75
4.1.4	统计与分析	75
4.2	结果与分析	75
4.2.1	采后钙、热处理葡萄柚果实贮藏期硬度、失重率、可溶性 固形物的变化	75
4.2.2	采后钙、热处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁组分含量的变化	77
4.2.3	采后钙、热处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁降解酶活性的变化	82
4.2.4	采后钙、热处理葡萄柚果实贮藏期细胞壁降解酶基因表达	88
4.3	讨论	92
4.3.1	采后钙、热处理对贮藏期葡萄柚果实硬度、失重率、可溶性 固形物含量的影响	92
4.3.2	采后钙、热处理对贮藏期葡萄柚果实细胞壁组分含量的影响	93
4.3.3	采后钙、热处理对贮藏期葡萄柚果实细胞壁降解酶活性 及其基因表达的影响	94
4.4	小结	96
第 5 章	全书总结及展望	98
5.1	总结	98
5.2	展望	99
5.2.1	主要创新点	99
5.2.2	今后工作深入研究的建议	99
参考文献		100

第 1 章 绪 论

1.1 引 言

我国是柑橘的主要原产地之一。柑橘在中国的栽培历史已有 4000 多年，作为我国的主要传统栽培果品，几千年来，人们从未间断过对柑橘种植、采收、贮藏等方面的研究。近年来，我国柑橘生产发展迅猛，但柑橘的生产具有一定的季节性和区域性。长期以来，我国柑橘品种配套栽培不合理，导致果实采收期相对一致，市场销售时间相对集中，经济价值较低。据统计，目前，我国柑橘品种在 11~12 月成熟上市的中熟品种占 75%，9~10 月上市的早熟品种占 20%，12 月以后的晚熟品种仅占 5% 左右，而 5~9 月为我国柑橘上市销售的空档(陈竹生，2004)。此外，我国以个人或家庭承包为主的柑橘生产种植经营模式存在经营管理不善、贮藏设施和技术不匹配等问题，严重制约柑橘产业系统、规模化发展，导致产、供、销分离。据报道，我国水果的年平均损耗为 25%~30%，每年造成经济损失超过 1000 亿元，而发达国家的年损耗普遍低于 5%(胡佳羽等，2008)。新鲜柑橘果实含水量高，保存不当，易发生生理病害，造成变质腐烂，通过贮藏保鲜和营销手段既能缓解产销矛盾，保障市场供应，又能促进果品种业持续健康发展，最终使生产者、经营者和消费者都能受益(郝春梅，2009)。关于柑橘贮藏方法运用，我国早在隋代已有相关记载，《隋书》说：“文帝好食柑，摘黄柑，以蜡封其蒂献之，香气不散。”又如《桔录》云：“采藏之日，先净埽一室，密糊之，勿使风入，布稻藁其间，堆柑橘于地上，屏远酒气。旬日一翻拣之，遇微损谓之点柑，即拣出，否则侵损附近者。”上述文献表明，我国古代劳动人民很早就知道柑橘果实蒂部是枯水先出现、最易发病的地方，蒂部蜡封对减少枯水、保持新鲜、减少病害都有益，这是自发气调技术在柑橘保鲜上的最早应用。此外，古代人们还发现，自然低温室内堆藏法因其贮藏量大、操作方便、管理容易、效果明显和实用性强被广泛应用(庄虚之，1994)。我国古代柑橘贮藏技术在各时期均有不同程度的发展，但在采后生理方面的研究则起步较晚，采后贮藏和流通技术虽有长足发展，但与国外相比还比较落后，使得目前每年柑橘果品经济损失巨大。近年来，随着柑橘生产的发展和市场竞争的日趋激烈，采后贮藏保鲜和商品化处理已成为提高柑橘果实商品性状和经济效益的重要环节(郝春梅，2009)。

果实质地品质包括果品内在和外表的某些特性，指人们凭手、口腔等触觉器官感受到的果实特征，通常用硬度、脆度、多汁、柔软、棉性等词语描述果实质

地特性。果实质地变化是果实发育成熟及采后软化最明显的变化,是果实采收和贮藏过程中品质评价的重要指标,质地软化一方面使果品硬度达到理想食用状态,另一方面又使果实易受机械损伤、病菌感染腐烂,降低果实品质和经济价值,同时也给运输、贮藏、销售等带来许多问题(魏建梅,2009)。果实质地不仅明显反映出柑橘类果实生理病害情况,同时也是果实贮藏的一个重要品质特性。柑橘采后受贮藏温度、空气湿度和采后病害等因素影响,贮藏过程中易发生生理病害和病原性病害。生理病害主要有枯水病、水肿病、蒂腐病和褐斑病;病原微生物病害有青霉病、绿霉病和黑腐病。其中生理病害又称生理失调,是水果在贮藏过程中出现的非侵染性病害,它是水果对环境胁迫和生理胁迫的一种反应。柑橘的多种主要生理病害都与果实质地有关,病变组织不同程度发生于果皮与果肉组织,具体表现为果皮异常变厚、果汁细胞失水,果实病变组织松软和呈水渍状,以及果皮下陷皱缩,出现不规则片状深褐色革质病斑等。柑橘采后生理病害除引起果实内、外品质大幅度下降外,还可导致微生物二次感染引起果实腐烂,极大地降低柑橘果实商品价值。为防止柑橘贮藏过程中病害发生,目前,国内外柑橘贮藏技术方法有以下几种:简易贮藏(包括埋藏、窖藏、通风库贮藏等)、低温贮藏、气调贮藏、留树贮藏、涂膜贮藏、化学贮藏(包括植物生长调节剂、防腐杀菌剂、无毒化学药剂等)(胡佳羽等,2008;刘东柱,1990)。

柚类(*Citrus grandis* Osbeck)果形硕大,果肉晶莹脆嫩,风味清香独特,是重要的特色柑橘果品之一(刘顺枝等,2010)。葡萄柚,英文名“grapefruit”,香港称“西柚”,是柚和甜橙天然杂交选育而成的杂交种,属芸香科柑橘属柚类,为四大柑橘类群(甜橙类、宽皮柑橘类、柠檬和来檬类、葡萄柚和柚类)之一,结果时果实悬挂簇生如葡萄,所以称之为葡萄柚。葡萄柚果实柔软多汁,酸甜中略带苦味,风味独特、口感好,主要用于鲜食,还可用于果汁加工,制做囊瓣罐头和色拉原料,果皮可提取香精油和果胶,种子可提取油,是一种鲜食和加工兼用的重要水果(郭林榕等,2001;李国华等,2009)。葡萄柚的成熟期从当年9月至翌年5月,大大有利于改善我国现有柑橘成熟期集中(9~12月)的市场弱点,采后适宜合理的贮藏技术可以减少葡萄柚生理病害发生,使葡萄柚贮藏期延长2~4个月,可周年供应市场(郭林榕等,2001)。目前,我国葡萄柚的研究主要集中在引种栽培技术、果实内含物及精油提取以及果实品质营养成分分析等方面(吴海波等,2005;赵芬萍等,2011;施迎春等,2012;李贤忠等,2008)。国外葡萄柚采后贮藏研究多集中在病原性病害和低温贮藏冷害方面,应用防腐杀菌剂处理及预温热处理能有效防止果实贮藏腐烂和低温冷害发生(Miller et al., 1996; Porat et al., 2000; Biolatto et al., 2005)。国内外相关研究报道,葡萄柚采收采用留树挂果贮藏、气调贮藏、涂蜡贮藏、塑料薄膜单果包装贮藏能有效延长葡萄柚贮藏期,维持果实品质,其中气调、涂蜡、塑料薄膜单果包装贮藏能明显控制果实呼吸、抵制水分蒸发、减少果实失重,降低果实腐烂率(刘东柱,1990;

刘顺枝等, 2010; Petracek et al., 1998; Shellie, 2002)。

近年来, 我国柚类果实产量、质量的大幅提高和出口竞争力的增强, 对柚果的贮运保鲜技术提出了越来越高的要求。柚类果实采后贮藏基本生理问题还需要系统地深入研究(比如果实细胞壁物质降解、细胞壁降解酶活性变化等问题), 相关贮藏新技术仍然有待于不断地深入探索(如热处理、安全的动植物抑菌活性物质、包装材料、不同贮藏技术结合在柚类果实上的应用等)(刘顺枝等, 2010)。

1.2 果实发育成熟软化过程细胞壁变化

果实生长发育的一个重要时期是成熟过程, 它是一个复杂的发育调控阶段, 期间果实组织内进行复杂的生理生化的变化, 最后导致果实在色泽、质地和风味上的转变。其中, 质地软化是果实发育成熟和采后最明显的变化。这种变化一方面使果实口感和风味发生变化达到理想食用状态, 但另一方面使果实易受到机械损伤、病腐而缩短贮藏寿命, 直接降低果实食用性和商品性, 同时也为运输、贮藏、加工等带来许多不便。作为果实采收和贮藏过程中品质评价的重要指标之一, 果实软化问题一直是采后工作科学研究者关注的焦点问题, 它为相关领域的植物生理学家和生物化学家提供了一个探讨细胞壁水解酶变化伴随发育过程细胞壁结构改变的研究机会。近年来, 围绕果实软化机理问题, 国内外许多专家学者对细胞壁结构成分、细胞壁水解酶变化及其基因表达调控等方面进行了大量研究, 取得了重大的成就和进展。

果实质地是果实品质的一个重要评价指标, 通常用果肉硬度表示。果肉细胞大小、细胞间结合力、细胞膨压以及细胞构成物的机械强度决定了果实硬度(吴彩娥等, 2001)。果实质地是一个综合性的概念, 常用于表示果实组织软硬程度、食用口感、触摸手感及外观视觉等状态(高海生等, 2012)。从生理上看, 果实质地主要取决于以下三个因素: ①细胞间的结合力, 其中果胶起重要作用, 一般来说, 随着果实的成熟软化, 原果胶减少, 可溶性果胶增加; ②细胞壁构成物质的机械强度, 细胞壁由多糖、蛋白质、木质素和脂质等物质组成, 果实中多糖类物质所占比例较大, 其中包括纤维素、果胶等, 纤维素对果肉质度影响较大; ③细胞间的紧张度, 由于细胞壁膨压的存在, 细胞之间的紧张度决定着果肉的韧度和脆度(李里特, 1998)。

果实软化是果实发育成熟过程中最明显的变化之一。虽然果实软化机制尚未完全清楚, 但传统研究认为, 细胞壁结构变化及其组分物质解聚和果实质地软化具有密切联系, 其中多种细胞壁水解酶参与的多糖解聚和糖分变化是引起果实软化的主要原因之一(魏建梅, 2009)。

1.2.1 细胞壁结构变化

细胞壁是细胞的支撑物,许多研究表明,细胞壁结构的改变、成分的降解是导致果实软化的主要原因。从植物解剖学和生物化学角度来看,植物细胞的细胞壁由胞间层、初生壁及次生壁三部分组成,其中胞间层又称中胶层,为相邻两细胞所共有,主要是由果胶多聚物组成,具胶粘和柔软的特性,既可将相邻细胞粘连在一起,又可缓冲细胞间的挤压(朱广廉,1995)。初生壁是细胞生长时所形成的部分,一般较薄,1~3 μm ,由原生质分泌的纤维素、半纤维素和少量果胶在胞间层上所构成,具有弹性,能使细胞保持一定的形状和伸缩性。次生壁是指细胞生长停止后沉积在初生壁里面的那部分,一般较厚而坚韧,5~10 μm ,是由原生质分泌的纤维素及少量的半纤维素和木质素在初生壁上构成,其上存在着大量纹孔,胞间连丝穿过纹孔及次生壁和胞间层与相邻细胞相互连接,从而进行物质交流(张维一,1993)。与次生壁相比,初生壁对细胞壁活性作用更重要,其形成过程、结构特点更复杂,所以该部分是细胞壁研究的主要对象。细胞壁的初生壁主要是由硬度较大的纤维素-半纤维素网络结构中嵌入果胶多糖和结构蛋白构成(Carpita et al., 1993)。Knee 和 Barteley(1981)指出,果实细胞壁的分子骨架是由纤维素的原纤维和半纤维素一起构成的,半纤维素由木葡聚糖的葡萄糖醛酸-阿拉伯木聚糖组成,通过氢链连接在纤维素基质上,分散的果胶质由鼠李半乳糖醛酸聚糖联接组成,通过半乳糖、阿拉伯聚糖和阿拉伯半乳糖联接到纤维素-半纤维素复合体上,这样就形成果胶-纤维素-半纤维素(P-C-H)总体结构。

近年来的研究还表明,细胞壁超微结构中还包括多种蛋白质及其他物质(张维一,1993),初生壁蛋白质分子含量高达10%,伸展蛋白是细胞壁蛋白的主要成分,细胞壁蛋白可以是结构组分(如具有伸展作用富含羟脯氨酸的糖蛋白)、细胞壁酶(水解酶和氧化酶等)、功能蛋白质(如抗病蛋白)等,细胞壁中各组分的相对含量在不同果实中变化很大,尽管其化学组分有明显差别,但也具有某些普遍性。其中由 Lamport 和 Epstein(1983)所提出的细胞壁结构“经纬模型”理论有较大的影响,该理论认为,细胞壁是由两个交联在一起的多聚物-纤维素的微纤维丝和穿过微纤维的伸展素网络交织而成的结构,悬浮在亲水的果胶-半纤维胶体中构成。木葡聚糖两端以氢链将平行于胞壁面排列的纤维素纤维丝锁定住,使其不可滑动,构成细胞壁结构的“经”,而“纬”则是一些具有螺旋构象或无螺旋构象的伸展素(富含羟脯氨酸的糖蛋白)通过酪氨酸交联(酪氨酸间的二苯醚链)连接而构成的伸展素网络,这个网络垂直于胞壁面,与微纤维网络交织,构成了细胞壁的骨架;果胶物质则以无定型基质形式围绕这两种网络。由于细胞壁的复杂性和多样性,至今未能提出一个合适的三维结构模型(Lamport, 1986; 陆胜民等, 2001a; 张鹏龙等, 2010)。

前人对园艺作物果实细胞壁结构已做了大量研究,包括不同品种、部位、时期及不同生境条件等。目前,前人认为,果实软化的最初原因是细胞壁内部结构的破坏,主要是由半纤维素、纤维素、果胶的降解导致的。细胞壁的改变包括原果胶降解为可溶性果胶,半纤维素、纤维素降解,同时还包括细胞壁结构物质的重排(屈红霞等,2001)。在果实成熟早期,由于细胞的膨大,胞间区域细胞机械分离,这种作用在果实接近成熟时继续进行(Bouranis 等,1992)。在果实成熟过程中,随着微纤维丝间果胶和纤维素物质的溶解,微纤维丝结构变得松弛而软化、细胞壁变薄、细胞变圆且趋于分散,导致细胞壁结构破坏,果实硬度下降(Dawson et al., 1992)。果实成熟衰老过程中,由于果胶的活动,胞间层逐渐溶解,大量细胞壁结构消失,使得相邻细胞失去连接,彼此分离而导致细胞间聚合的丧失(茅林春等,1999;屈红霞等,2001)。

细胞壁结构的变化与果实成熟软化关系密切。脐橙果实瓢囊壁的厚度和韧性随果实的发育进程而降低,未成熟时果实瓢囊壁细胞结构完整,细胞壁纹理清晰,中胶层和微纤丝致密,线粒体、质膜和质体清晰可见,成熟时果实瓢囊壁细胞中胶层和微纤丝模糊,质膜解体并残存,细胞器空泡化(曾秀丽等,2006)。用电镜观察不同采收成熟度油桃果实贮藏前细胞壁的结构变化,未成熟果实细胞壁整齐、厚度一致、结构完整,中胶层电子密度高;进入完熟期的果实中胶层溶解、细胞间隙增大、质壁分离、部分初生壁开始降解、微纤丝松懈、细胞器变形或解体,果实开始出现衰老的特征。对不同成熟度油桃贮藏后观察发现,果实成熟度越高,细胞结构破坏越严重。中胶层分解、细胞间隙增大、细胞壁部分解体,是果实最终衰老软化的直接原因,同时也是果实衰老软化进程的微观表现(孙芳娟等,2009)。苹果在果实软化初期,细胞壁致密、排列整齐,随着软化进程,果实中胶层和细胞壁逐步解体,壁间产生空隙,果实软化(李治梅,2005),这与猕猴桃、菠萝的细胞变化相同(Scalzo et al., 2005)。用透射电镜观察刚采收后的梅果果肉,细胞壁整齐、厚度一致,呈明—暗—明分区结构,果肉细胞排列紧密,没有胞间隙。贮藏后期,细胞壁松懈,微纤丝排列不整齐,胞间层分解,形成絮状空隙,细胞间黏合力丧失,最终导致果实完全软化(陆胜民等,2001a)。罗自生等(2005)对柿果实细胞超微结构的观察发现,采收时,柿果细胞壁结构完整,中胶层为薄的高电子密度的暗层,初生壁与中胶层结合紧密;随果实后熟,中胶层基因溶解,初生壁因中胶层的溶解而发生漂移,甚至部分初生壁局部发生降解变薄,果肉硬度迅速下降。桃果实在成熟前期,细胞壁结构完整,细胞质及内含物紧贴细胞壁,内含物丰富,伴随果实成熟软化,细胞壁构造也发生了明显的变化,发生质壁分离,细胞内含物密度降低,细胞壁松散,间隙增大,微纤丝明显松懈,从而导致果肉组织的软化。这些结果充分表明了细胞壁结构变化与果实的成熟软化具密切关系(阚娟等,2012)。

1.2.2 细胞壁组分变化

高等植物细胞壁的共同特征是均由纤维素、半纤维素、果胶物质和蛋白质等大分子组成。不同组织细胞壁组分的比例有显著差异。双子叶植物细胞壁大约有30%纤维素、30%半纤维素、35%果胶和5%蛋白质,其中90%左右是多糖。细胞壁多糖主要是由纤维素、半纤维素和果胶类物质组成,它们是由一种单糖缩合而成(聚甘露糖和聚半乳糖),或几种单糖(如木聚糖、阿拉伯糖、半乳聚糖等)缩合而成(Fry, 1988; 颜季琼等, 1998)。许多研究认为,细胞壁结构被破坏的原因是细胞壁物质的大量分解,包括果胶物质、半纤维素、纤维素的解聚,同时伴随细胞壁结构物质的重排(屈红霞等, 2001)。

1.2.2.1 果胶

果胶是细胞壁的重要组成部分,主要存在于中胶层,初生壁也有一部分果胶。组成果胶多糖的主要成分有半乳糖、半乳糖醛酸、鼠李糖、阿拉伯糖等。果胶与胞壁细胞之间的粘连,主要通过 Ca^{2+} 与细胞壁中胶层中部分去酯化的半乳糖醛聚糖连接在一起(Jarvis et al., 2003; Vincken et al., 2003)。果胶质在果实成熟之前呈不溶状态,即原果胶,这时果肉质地坚硬,细胞结构完整。果实果胶分子中的主链为 α -(1 $\rightarrow$ 4)连接的半乳糖醛酸线状聚合体。中间插入的鼠李糖单位,又称鼠李半乳糖醛酸聚糖,可分为光滑区和毛状区两个区域。光滑区的特征是 α -(1 $\rightarrow$ 4)的半乳糖醛酸和其甲酯的线状共聚物,其间插入 α -(1 $\rightarrow$ 2)连接的残基,且在空间分布较具规律,鼠李糖残基以 Ca^{2+} 连接形式插入固定间隔地出现在去甲基化位置;毛状区的特征是由12个不同的单糖组成的杂聚体,包括鼠李半乳糖醛酸聚糖Ⅰ和鼠李半乳糖醛酸聚糖Ⅱ两个小区(Fry, 1988)。前者带有许多富含阿拉伯糖和半乳糖的侧链(主要为阿拉伯聚糖、半乳聚糖、阿拉伯半乳聚糖等),而后者的侧链相对较少(Habibi et al., 2004)。果胶物质不溶于乙醇,在高浓度乙醇中交联成絮状物。果胶间的交联方式包括 Ca^{2+} 桥及其他离子链、氢链、糖苷链、酯链和苯环耦合。通过选择抽提的方法,可以提取各种形式的果胶成分,如水溶性果胶、螯合剂可溶性果胶和 Na_2CO_3 可溶性果胶等。水溶性果胶主要为可溶性果胶和果胶酸,螯合剂可溶性果胶主要为离子链结合的果胶,如 Ca^{2+} 桥结合的果胶, Na_2CO_3 可溶性果胶主要水解酯链,溶解一些螯合剂不溶的果胶(Jarvis et al., 1981)。

很多果实在成熟过程中都伴随着果胶的变化,主要表现在成熟果实中原果胶降解,可溶性果胶含量上升以及果胶的平均分子量的显著下降(Ashraf et al., 1981)。有证据表明,成熟过程中,果胶物质有两个过程起作用:长链的去聚合或缩短,以及多聚体中甲基的除去(去酯化)。Huber 等对番茄、鳄梨的研究发

现,伴随果实成熟过程,番茄果实果胶物质的去聚化表现为果汁黏性的下降;鳄梨的原果胶含量下降而水溶性果胶含量上升,总果胶的去酯化从85%下降到45%(Huber et al., 1993)。此外,果胶降解增加细胞壁交联网络的细孔大小,导致软化后期细胞壁膨胀,使底物更容易受到酶的作用(Redgwell et al., 1997)。果胶的降解在成熟的后期尤为集中,并与果实品质退化有关。在贮藏过程中,果实硬度下降,原果胶逐渐降解为可溶性果胶,细胞结构随之受损,果肉硬度迅速下降。Brummell等(2004)对桃的研究结果表明,随果实成熟软化,果实硬度明显下降, Na_2CO_3 可溶性果胶含量明显下降,而螯合剂可溶性果胶含量增加。“Fuji kiku-8”苹果成熟中,果肉硬度几乎呈线性下降,水溶性果胶含量显著增加,螯合剂可溶性果胶含量初期略有增加后渐趋降低,而 Na_2CO_3 可溶性果胶含量几乎呈线性下降(Ortiz et al., 2011)。对草莓(Figueroa et al., 2012)、梨(Zhou et al., 2011)、油桃(Ortiz et al., 2010)、蓝莓(Vicente et al., 2007)的研究也有类似的结果。董涛等(2007)研究发现,红肉脐橙、纽荷尔脐橙和塔罗科血橙3个品种甜橙果实总果胶和原果胶含量在果实发育过程中呈逐渐下降趋势,而水溶性果胶呈上升趋势。

1.2.2.2 半纤维素

双子叶植物细胞初生壁中,主要的半纤维素是中性的木葡聚糖和酸性的阿拉伯木聚糖(McNeil et al., 1984)。木葡聚糖是一条直链的 β -(1 $\rightarrow$ 4)吡喃葡萄糖残基的多聚物,在其葡萄糖残基的6-位碳上有规律地连有木糖和含木糖、半乳糖和果糖的复杂侧链。其规律是连续3个带木糖的葡萄糖残基被一个不带侧链的葡萄糖残基隔开(Fry, 1989)。木葡聚糖通过氢链连接到纤维素和共价链连接到果胶上(Varner et al., 1989)。

半纤维素的降解与果实的软化紧密相关,虽然细胞壁中半纤维素的量变化不大,但研究表明,在果实成熟过程中,半纤维素的分子量逐渐变小,在大部分果实中都已检测到,如:番茄(Maclachlan et al., 1994; Brummell et al., 1999)、柠檬(McCollum et al., 1989; Rose et al., 1998)、猕猴桃(Redgwell et al., 1991)、鳄梨(O'Donoghue et al., 1992; Sakurai et al., 1997)、柿(Harpster et al., 2002)、桃(Brummell et al., 2004)。

半纤维素在果胶提取之后选用不同浓度的碱性溶液提取,稀碱和浓碱分别提取到疏松结合和紧密结合的半纤维素。在番茄和柿子中,降解作用只发生在紧密结合的半纤维素中(Tong et al., 1988; Cutillas-Iturralde et al., 1994; Harpster et al., 2002)。而在柠檬和桃子果实中,降解作用在疏松结合和紧密结合的半纤维素都有发现(Rose et al., 1998; Brummell et al., 2004)。木葡聚糖主要存在于紧密结合半纤维素中,一般在疏松结合半纤维素中含量少,且在紧密结合半纤维素中的木葡聚糖的变化都相似。番茄(Harpster et al., 2002)和鳄梨

(O'Donoghue et al., 1992)果实由未成熟到成熟阶段的木葡聚糖片段的分子量明显变小,然而在果实完全成熟阶段的木葡聚糖片段分子大小,相对于未成熟阶段只是适度地变小,并未完全断裂成小分子片段。尽管分子量较小的半纤维素聚体的出现可以用来解释半纤维素一些成分的部分降解,但是最近的研究提出了另外的解释,即认为半纤维素相对分子量的下降可能涉及富含甘露糖苷和葡萄糖苷残基的损失,也可能是合成较小分子量的葡甘露聚糖的结果(赵博, 2005)。

半纤维素的降解在果实软化和细胞壁结构变化中具有重要的作用。它在纤维素之间起横向连接的作用,其中的木葡聚糖降解可能是至关重要的因素,同时也伴随其他多聚糖的降解。半纤维素木葡聚糖的解聚,是半纤维素-纤维素网络发生松动的必要条件,所以细胞壁膨胀被认为是半纤维素和纤维素微纤丝之间的连接变弱(Cosgrove, 1997, 2000)。纤维素-半纤维素网络的损失,是细胞膨胀的一部分,并伴随果胶的溶解。

1.2.2.3 纤维素

纤维素是葡萄糖单元通过 β -(1 $\rightarrow$ 4)糖苷链聚合而成的线状长链大分子结构。纤维素分子以微纤维丝的结构形式存在于细胞壁内,大约2000个纤维素分子组成一个微纤维丝,它们以三维晶体形式有序地围绕细胞排列,被非纤维素多糖和蛋白质包埋在致密基质中,既维持了细胞的形状,又增强了细胞壁的强度和韧性,纤维素多糖占细胞初生壁物质的20%~30%。纤维素微纤丝借助大量的链间氢链由纤维长链结合而成,大量链内和链间的氢链使其具有高度的稳定性和抗化学降解能力,不易被胞内的水解酶降解(颜季琼等, 1998)。

尽管纤维素结构的改变与果实的成熟软化可能有关,但是许多果实的实验研究结果表明,纤维素的降解并不是果实软化的关键因子之一(Brummell, 2006)。Platt-Aloia(1980)等通过显微镜观察发现,鳄梨成熟时,纤维状物质从细胞壁中损失掉。当整个细胞壁,包括纤维素溶解在LiCl中,未分解的大分子在成熟期的鳄梨果实中被观测到(O'Donoghue et al., 1994),同时伴有结晶状的纤维素含量升高,说明外部纤维素链发生了解聚。然而鳄梨果实细胞壁的解聚非常特别,不具有典型性。Maclachlan等(1994)对番茄细胞壁物质进行果胶、半纤维素提取,采用凝胶色谱对得到的纤维素成分进行分析,发现纤维素分子大小在番茄果实成熟过程中没有变化。对猕猴桃果实成熟过程中纤维素多糖变化进行 ^{13}C 核磁共振的研究,发现即使果实细胞壁充分解聚,但纤维素微纤丝仍没发生本质上的变化(Newman et al., 2002)。

纤维素含量在大多数果实成熟过程中没有下降(Maclachlan et al., 1994; Sakurai et al., 1997),但也尚无明显的证据表明纤维的降解对果实软化过程不起主要作用,纤维素降解作用发生在外部的葡萄糖链中,这些链与多糖分子的横向连接与否,可能对细胞壁的特性具有较大影响。

成熟期间,初生壁强度的下降、细胞间连接的减少导致了细胞壁多糖发生一系列的降解。上述讨论的细胞壁组分的系列变化表明,果实软化是包括细胞壁多糖降解等多种因素共同作用的结果,且不同物种间差别较大。同物种间细胞壁多糖的改变也有较大区别,甚至同物质不同品种间也有差别(Hiwasaki et al., 2004; Rosli et al., 2004)。不同物种间,细胞壁成分的差别、细胞壁改变的差异以及不同的形态(如细胞大小、形状等)都有助于改变成熟果实的硬度、质地和多汁性。细胞壁的不同变化可能是成熟期间细胞壁降解酶基因表达、调控的结果(徐晓波, 2008)。

细胞壁改变的程度将最终影响果实的质地品质。例如:鳄梨细胞壁降解的程度非常高,阿拉伯糖含量减少、果胶大量溶解和降解,导致了成熟果实极度软化;相反的,在西瓜中,这些因素都表现出很低的水平或不存在,因此成熟时质地较脆。成熟时表现为脆性的果实(如苹果、西瓜)果胶溶解和降解的程度都很低,这表明细胞间连接的完整性是保持果实脆度的一个重要因素(徐晓波, 2008)。

1.3 细胞壁降解酶活性变化

1.3.1 多聚半乳糖醛酸酶(PG)

多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)是主要的细胞壁水解酶之一,其主要功能是水解果实细胞壁中果胶酸的 α -(1 $\rightarrow$ 4)-D-半乳糖苷链,生成低聚的半乳糖醛酸或半乳糖醛酸,使细胞壁结构解体,导致果实软化(Brummell et al., 2004; Wakabayashi et al., 2000)。细胞壁中 PG 的作用底物主要为半乳糖醛酸残基,而在细胞壁中,半乳糖醛酸残基通常为高度甲基化的,必须先经过果胶甲酯酶(PME)的去甲基化作用后才能成为 PG 的作用底物(Carpita et al., 1993; Jarvis, 1984)。

根据 PG 对底物作用方式的不同,把 PG 分为两类,即内切多聚半乳糖醛酸酶(endo-PG)和外切多聚半乳糖醛酸酶(exo-PG)。endo-PG 以内切方式随机水解底物多聚半乳糖醛酸内部的 α -(1 $\rightarrow$ 4)半乳糖苷链,断裂多聚半乳糖醛酸链;exo-PG 以外切的方式有顺序地从半乳糖醛酸多聚链的非还原端释放出一个单体(Pressey, 1987; Crooks et al., 1983)。endo-PG 对底物的特异性较强,exo-PG 则较弱。大多数果实中既有 exo-PG,又有 endo-PG,如离核桃(Pressey et al., 1971)、蕃木瓜(Chan et al., 1982)等;有些果实仅有 exo-PG 活性,如甜瓜(McCollum et al., 1989)、草莓(Heber, 1984)等,柿不存在 endo-PG 或其含量低于检测水平(Cutillas-Iturralde et al., 1993)。苹果原来一直被认为仅有 exo-PG 活性,但最新研究表明,苹果也有 endo-PG 活性(Fischer et al., 1991)。exo-PG