

壳寡糖和壳聚糖处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实品质和抗病性的影响

邓丽莉^{1,2}, 尹保凤¹, 曾凯芳^{1,2}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (2. 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715)

摘要: 以 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 处理为阳性对照, 探讨 1.50% 壳寡糖和 0.50% 壳聚糖浸泡处理在改善乙烯褪绿引起的柑橘果实果蒂病害及果实失水方面的作用, 并探讨其对果实基本贮藏品质和抗性相关指标的影响。结果表明, 外源乙烯、50.00 mg/kg 2,4-D、1.50% 壳寡糖和 0.50% 壳聚糖复合处理对蜜橘果实内部品质均无显著影响。但 1.50% 壳寡糖和 0.50% 壳聚糖能延缓乙烯褪绿引起的果实失重, 且效果优于 50.00 mg/kg 2,4-D 处理。1.50% 壳寡糖可以诱导乙烯褪绿蜜橘果皮 PPO、POD、PAL、GLU 活性以及总酚、类黄酮含量的显著增加, 对果皮 CHI 活性有一定的诱导作用; 0.50% 壳聚糖对乙烯褪绿蜜橘果皮 PPO、POD、PAL、CHI 和 GLU 活性均表现出显著的诱导作用, 对果皮总酚和类黄酮含量有一定的诱导作用; 50.00 mg/kg 2,4-D 处理仅表现出对果皮 POD 和 PAL 的显著诱导作用, 对果皮 PPO、GLU 活性和总酚、类黄酮含量仅表现出一定的诱导作用。壳寡糖和壳聚糖在替代商业上柑橘褪绿技术中 2,4-D 的使用方面具有潜在的应用价值。

关键词: 蜜橘; 乙烯; 褪绿; 壳聚糖; 壳寡糖; 2,4-D; 病害控制

文章编号: 1673-9078(2017)2-167-175

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.026

Effects of Post-harvest Applications of Oligochitosan and Chitosan on the Quality and Resistance of Ethephon-degreened Citrus Fruit to Disease

DENG Li-li^{1,2}, YIN Bao-feng¹, ZENG Kai-fang^{1,2}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

(2. Chongqing Special Food Programme and Technology Research Center, Chongqing 400715, China)

Abstract: The effects of 1.50% oligochitosan and 0.50% chitosan treatments on the control of stem-end rot and fruit water loss caused by ethephon degreening and indices related to basic fruit storage and disease resistance were assessed using 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment as a positive control. The results indicated that external ethylene, 50.00 mg/kg 2,4-D, 1.50% oligochitosan, and 0.50% chitosan treatments had no significant adverse effects on the storage quality of citrus fruits. However, 1.50% oligochitosan and 0.50% chitosan were superior to 2,4-D to reduce fruit weight loss caused by ethylene degreening. Treatment with 1.50% oligochitosan significantly increased the activity of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), and β -1,3-glucanase (GLU). Furthermore, it improved the total phenolic and flavonoid content in the peel of ethephon-degreened citrus fruit and increased the activity of chitinase (CHI) to a certain extent. Treatment with 0.50% chitosan also significantly increased the PPO, POD, PAL, CHI, and GLU activities, and although not significant, it appeared to improve the total phenolic and flavonoid contents. In contrast, 50.00 mg/kg 2,4-D treatment only caused significant inductions of POD and PAL activities in the peel, but had limited effects to increase the activity of PPO and GLU as well as total phenolic and flavonoid content. In conclusion, oligochitosan and chitosan are potentially valuable to replace 2,4-D for commercial post-harvest citrus degreening.

Key words: mandarin; ethylene; degreening; oligochitosan; chitosan; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; disease control

收稿日期: 2016-01-31

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (31401540); 重庆市博士后科研项目特别资助项目 (Xm2014106); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (SWU113047); “十二五”国家科技支撑计划资助项目 (2015BAD16B07)

作者简介: 邓丽莉 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 果蔬采后生理与生物技术

通讯作者: 曾凯芳 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏工程

为了促进早熟及早采柑橘果皮的转色、减少早采损失和提高果实的商品性,商业上通常对早熟或早采柑橘果实进行乙烯褪绿处理,以加速果皮中叶绿素的分解,促进类胡萝卜素的积累,从而改善果实的外观品质^[1-3]。但乙烯褪绿处理在促进柑橘果实着色的同时,会加速果实、特别是果蒂部位蒂腐病(*Diplodia stem-end rot*)和炭疽病(*anthracnose*)等病害的发生^[4]。当褪绿过程使用的乙烯浓度高于所需浓度时,蒂腐病发病率明显增加。商业化的乙烯处理过程中,使用的乙烯浓度通常超过降解叶绿素所需的浓度,因而可能由于蒂腐病的发生引起较大损失。此外,乙烯褪绿也可能对果实采后耐贮性有不良影响^[5]。目前商业上采用2,4-D辅助处理来解决这些问题^[6],但由于2,4-D生产过程中二噁英类副产品的存在,对环境和人类健康均构成一定的危害,且2,4-D的长期使用易导致病原菌抗药性增强等问题。随着人们食品安全及环保意识的增强,欧盟标准限制使用2,4-D,很多柑橘进口国家也严格限制其使用量。所以,从果实的安全性及消费者的可接受性等角度考虑,寻求新的可以作为2,4-D替代品的天然活性物质,用于解决或减缓柑橘果实乙烯褪绿处理引起的上述问题具有重要意义。

壳聚糖(Chitosan, CTS)又名几丁质、甲壳糖和壳多糖等,是甲壳素的N-脱乙酰基产物。壳寡糖(oligochitosan, COS)是甲壳质C2位脱乙酰基后衍生成的壳聚糖再降解后的产物。壳聚糖和壳寡糖具有无毒性、可生物降解性、良好的生物相容性等特性。壳聚糖处理能够延缓桃、番茄等果蔬的后熟衰老^[7],还可以作为激发子诱导果实产生防卫反应。壳寡糖也能够诱导植物产生多种抵抗生物和非生物胁迫的防御反应,促进植物中具有抑菌活性的挥发性成分、防御酶和结构相关物质的积累^[8,9]。本实验室前期研究表明,壳聚糖和壳寡糖处理能够诱导柑橘果实对柑橘青、绿霉菌、炭疽病菌的抗性^[10,11],延缓贮藏果实的失重^[12,13]。这两种物质对于柑橘果实乙烯褪绿过程中产生的果蒂病害和失重增加问题等可能具有潜在的改善作用。

因此,基于本实验室前期研究结果,本文以0.50%壳聚糖和1.50%壳寡糖与乙烯利对柑橘果实进行复合褪绿处理,通过测定褪绿过程中,处理果实抗病相关物质含量和酶活性,以及品质指标的变化,探讨壳寡糖和壳聚糖在柑橘果实褪绿过程中替代2,4-D使用的可行性,并初步阐述其可能的机理,以期对柑橘乙烯褪绿技术的改善提供一定的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料及处理

1.1.1 果实

实验果实为无核蜜橘,产地为重庆北碚。果实为果肉成熟果实,果皮色泽为绿色(a^* , -9.82 ± 0.43 ; a^*/b^* , -0.367 ± 0.026 ; Hue, 110.14 ± 1.34)。果实采收后立即运回实验室,选择大小均匀、色泽一致、无病虫害及无机械损伤等外观品质基本一致的健康果实作为试验材料。用2.00%次氯酸钠溶液浸泡1~2 min对果实进行表面杀菌,然后用自来水冲洗干净,并在室温下晾干(20~25 °C)后备用。

1.1.2 壳聚糖、壳寡糖、乙烯利和2,4-滴钠盐

壳寡糖和壳聚糖使用浓度参考实验室前期研究结果确定。壳聚糖购于济南海得贝海洋生物工程有限公司,脱乙酰度大于90%,粘度为30 cps,用0.50%醋酸溶液配置浓度为0.50% (m/V)的壳聚糖溶液,并用1 mol/L NaOH溶液调节其pH至5.40。壳寡糖购于济南海得贝海洋生物工程有限公司,分子量1500~2000 D,用自来水配置浓度为1.50% (m/m)的壳寡糖溶液。

乙烯利(ETH)购于四川省兰月科技有限公司,有效成分含量(m/m)40.00,用自来水配置浓度为1000.00 mg/kg的乙烯利溶液。2,4-滴钠盐(2,4-D)购于四川国光农化股份有限公司,有效成分含量为85.00%,剂型为可溶粉剂,用自来水配置浓度为50 mg/kg的2,4-D溶液。

1.1.3 处理方法

根据实验室前期研究结果,壳寡糖和壳聚糖诱导处理后1 d接种,果实表现出最强的诱导抗性^[14,15]。综合考虑预实验筛选结果,本试验中将受试果实分为4组,分别进行如下处理:(1)乙烯利处理组(对照组);(2)乙烯利+2,4-D复合处理组;(3)乙烯利+1.50%壳寡糖溶液处理组;(4)乙烯利+0.50%壳聚糖溶液处理组。(1)和(2)组果实用自来水浸泡处理1 min,(3)组果实于1.50%壳寡糖溶液中浸泡处理1 min,(4)组果实于0.50%壳聚糖溶液中浸泡处理1 min,浸泡后的果实置于室温放置24 h后;(1)、(3)和(4)组果实置于1000.00 mg/kg乙烯利溶液浸泡处理1 min,(2)组果实置于1000.00 mg/kg乙烯利溶液(含50.00 mg/kg 2,4-D钠盐)中浸泡处理1 min,所有果实自然晾干后,单果包装(polyethylene; area=150 mm×150 mm; thickness=0.015 mm),置于20 °C,85~90% RH环境中贮藏。分别于贮藏的第0、2、4、6、8和10 d取果实赤道部位果皮(1~2 cm宽)和果肉,放置于-70 °C备用,用于各项相关指标的测定。每个处理重复3次,共计90个果实,4个处理共360个果实。

1.2 材料方法

1.2.1 果皮色差指数测定

采用 UltraScan@PRO 色差仪测量。根据 CIE (International Commission on Illumination) Lab 颜色空间,以标准白板 ($L^*=96.22$ 、 $a^*=6.03$ 、 $b^*=15.06$) 为参照物,测定果实赤道部位果皮 a^* 和 b^* 值, H^* 即色调角,也叫色度值,当 $a^*>0$ 、 $b^*>0$ 时, $H^*=\tan^{-1}(b^*/a^*)$; $a^*<0$ 、 $b^*>0$ 时, $H^*=180^\circ+\tan^{-1}(b^*/a^*)$ 。每个处理测 30 个果实,每个果实取赤道处对应 2 点,取平均值^[16,17]。

1.2.2 果实失重率的测定

失重率的测定方采用称重法进行,每处理 30 个果实,重复 3 次,失重率的计算公式如下式(1)。

1.2.3 果实品质指标的测定

果实可溶性固形物、可滴定酸和还原型抗坏血酸含量的测定参照曹健康等方法^[18]。果实可溶性固形物含量测定采用手持糖量计法(爱宕 PAL-1 型数字手持式折射仪);可滴定酸含量测定采用 NaOH 滴定法;还原型抗坏血酸含量的测定采用 2,6-二氯酚酚滴定法。

1.2.4 果实病害指数的测定

蜜橘果实褪绿前后果蒂常见症状如图 1 所示,果实病害指数的测定参照 Knight 等方法并有修改^[19]:将病害分为 4 个级别,即:无(1);轻微(2);中等(3);严重(4)(如图 2 所示)。病害指数的计算公式见下式(2)。

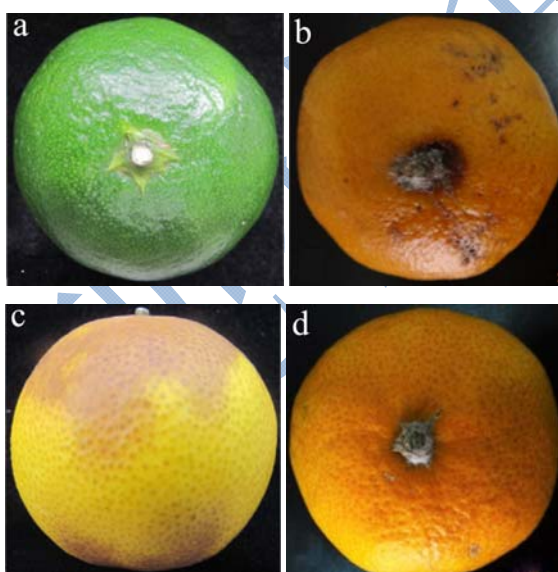


图 1 乙烯褪绿过程蜜橘果果蒂常见病害症状

Fig.1 Symptoms of stem-end rot disease in ethephon-degreeneed mandarins

$$\text{失重率}(\%) = \frac{\text{贮藏果实的原始重量} - \text{贮藏后果实重量}}{\text{贮藏果实的原始重量}} \times 100 \quad (1)$$

注: a 为健康果实, b-d 为发病果实。

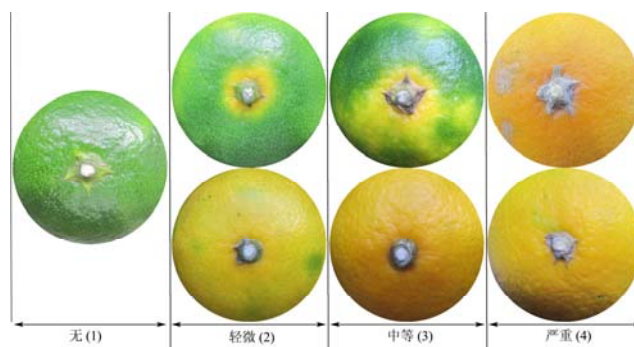


图 2 乙烯褪绿过程蜜橘果实病害级别

Fig.2 Disease severity scores of ethephon-degreeneed mandarins

1.2.5 果皮总酚、类黄酮含量的测定

果皮总酚、类黄酮含量的测定参照 Deng 等方法进行^[11]。取 1.00 g 果肉组织与预冷的 20.00 mL、1% HCl-甲醇溶液充分研磨提取后过滤,取 1.00 mL 滤液于三角瓶中,在用移液管加入 5.00 mL、1% HCl-甲醇提取液摇匀后用于比色。以每克(鲜重)果皮组织在波长 280 nm 处吸光度值表示总酚含量,表示为 OD_{280}/g FW;以每克(鲜重)果皮组织在波长 325 nm 处吸光度值表示类黄酮含量,表示为 OD_{325}/g FW。

1.2.6 抗病相关酶活性测定

蜜橘果皮苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、多酚氧化酶(polyphenoloxidase, PPO)、几丁质酶(chitinase, CHI)和 β -1,3-葡聚糖氧化酶(β -1,3-glucanase, GLU)活性的测定参照 Deng 等方法进行^[11]。所有测定重复 3 次。

酶液提取参见 Deng 等方法进行^[11],酶活测定体系如下:

(1) PAL 活性测定:取两支试管,一支为反应管,一支为对照管。分别向两支试管中加入 3.4 mL、50 mmol/L、pH 8.8 的硼酸-硼砂缓冲液,在 37 °C 水浴条件下预保温平衡 10 min。然后,在反应管中加入 0.5 mL、20 mmol/L L-苯丙氨酸溶液,在对照管中加入等量的 50 mmol、pH 8.8 的硼酸-硼砂缓冲液,将试管继续置于 37 °C 保温 60 min。保温结束后,向两支试管中加入 0.1 mL、6 mol/L 盐酸溶液以终止反应。分别测定样品反应管和对照管中溶液在波长 290 nm 处的吸光度值 (OD_1 和 OD_0),重复三次。以每小时每克柑橘果皮组织(鲜重)酶促反应体系吸光度值增加 0.01 为一个 PAL 活性单位 (Unit)。

病害指数=Σ(病害级别×该级别果实占总果实的百分比) (2)

(2) POD 活性测定: 3 mL 的反应体系中, 加 2.7 mL、pH 6.8 的磷酸缓冲液 (0.1 mol/L), 0.1 mL、4% 的愈创木酚、0.1 mL、0.5% H₂O₂ 和 0.1 mL 离心上清液, 测定 470 nm 处室温下反应 3 min 吸光值的变化, 以每分钟吸光值变化 1 为一个酶活力单位 (U)。

(3) PPO 活性测定: 在 3 mL 的反应体系中, 加 2 mL、pH 6.8 的磷酸缓冲液 (0.1 mol/L)、0.9 mL、50 mmol/L 的邻苯二酚、0.1 mL 上清液, 测定 420 nm 处室温下反应 3 min 吸光值的变化, 以每分钟吸光值变化 1 为一个酶活力单位 (U)。

(4) CHI 活性测定: 取 0.05 mL 粗酶液, 加入 0.5 mL、10 mg/mL 的胶状几丁质悬浮液和 0.95 mL、100 mmol/L, pH 5.2 的醋酸缓冲液混合后在 37 °C 保温培养 1 h。然后往该混合液中加入 0.1 mL、3% 的脱盐蜗牛酶, 继续在 37 °C 保温培养 70 min, 以释放生成 N-乙酰葡萄糖胺 (Glc-Nac) 单体。保温后取出反应混合液, 立即加入 0.2 mL、0.6 mol/L 的四硼酸钾溶液后, 并在沸水浴中煮 3 min, 然后迅速冷却。冷却完毕, 加入 2 mL 用冰醋酸稀释 5 倍的对二甲氨基苯甲醌 (DMAB) 储备液 (称取 10 g DMAB 溶于 87.5 mL 冰醋酸和 12.5 mL 10 mol/L 盐酸中于 4 °C 保存, 临用前用冰醋酸稀释)。在 37 °C 保温培养 30 min 显色, 然后测定 585 nm 吸光值。以每秒钟每克样品分解胶状几丁质产生 1×10⁻⁹ mol Glc-Nac 为一个酶活性单位 (unit)。重复 3 次。

(5) GLU 活性测定: 取 100 μL 粗酶提取液, 加入 100 μL、0.4% 的昆布多糖 (Sigma) 溶液, 于 37 °C 保温反应 45 min 后, 加入 1.8 mL 蒸馏水和 1.5 mL DNS 试剂, 在沸水浴加热 5 min 终止酶促反应。煮沸后迅速冷却, 然后用蒸馏水将显色的反应液稀释至 25 mL, 混匀, 测定 540 nm 光吸收值。以每秒钟每毫克样品分解昆布多糖产生 1×10⁻⁹ mol 葡萄糖为一个酶活性单位 (unit)。

1.2.7 数据分析

所有数据用 Excel 2010 统计分析并绘图; 应用 SPSS 17.0 软件对数据进行方差分析 (ANOVA), 利用 Duncan's 多重比较对差异显著性进行分析, *p*<0.05 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 壳寡糖、壳聚糖和 2,4-D 处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实品质的影响

2.1.1 壳寡糖、壳聚糖和 2,4-D 处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实外观和色差值的影响

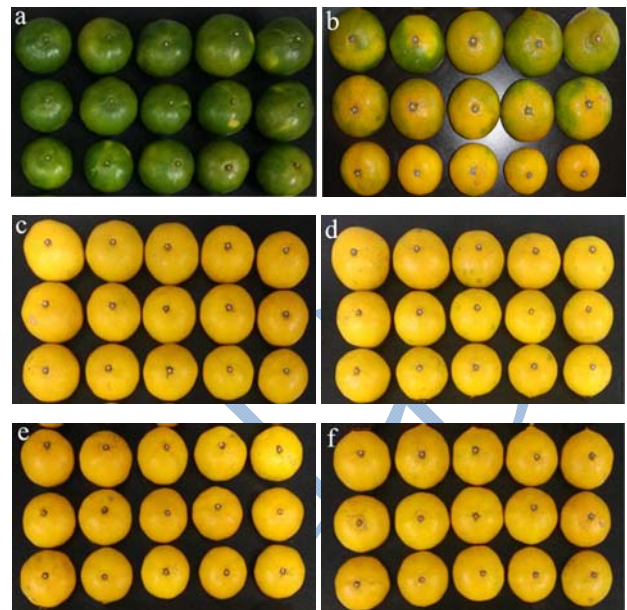


图3 壳寡糖、壳聚糖和 2,4-D 处理后“乙烯褪绿蜜橘”室温贮藏条件下 (20 °C) 果皮表观颜色比较

Fig.3 Comparison of peel colors of ethephon-degreened mandarins stored at room temperature (20°C)

注: a 为空白对照组, b~f 进行褪绿处理后 10 d, 具体处理分别为 Control、Ethephon (ETH) (1000.00 mg/kg)、ETH+2,4-D (50.00 mg/kg)、ETH+COS (1.5%)、ETH+CTS (0.5%)。

受试蜜橘果实褪绿处理后, 果皮颜色有明显的褪绿转黄过程, 褪绿处理后 10 d, 果实的表观颜色变化如图 3 所示。由图可知, 1.5% 壳寡糖和 0.5% 壳聚糖复合处理不影响乙烯褪绿果实外观颜色的转变, 果实无着色不均等不良现象, 而 2,4-D 复合处理果实有比较明显的着色不均现象, 果实着色较浅。

表 1 壳寡糖、壳聚糖和 2,4-D 处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实色差值 a*, a*/b* 和色度值 (Hue) 的影响 (8 d)

Table 1 Effects of oligochitosan, chitosan, and 2,4-D treatments on the a*, a/b*, and hue values of ethephon-treated Wase satsuma mandarin fruits (8 d)

| | Ethephon (ETH) | ETH+2,4-D | ETH+1.5% COS | ETH+0.5% CTS |
|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| a* | 15.12±0.51 ^a | 14.36±0.33 ^a | 14.77±0.36 ^a | 15.24±0.52 ^a |
| a*/b* | 0.225±0.008 ^a | 0.212±0.001 ^b | 0.223±0.006 ^a | 0.230±0.007 ^a |
| Hue | 77.33±0.43 ^b | 78.02±0.04 ^a | 77.46±0.32 ^b | 77.07±0.38 ^b |

如表 1 所示, 乙烯褪绿蜜橘果实 2,4-D 复合处理果实着色弱于单独乙烯处理组和其他复合处理组。贮藏第 8 d, 1.5% 壳寡糖和 0.5% 壳聚糖复合处理组蜜橘果皮 a*, a*/b* 和 Hue 与单独乙烯处理组均无显著差

异 ($p>0.05$)。乙烯单独处理组、壳寡糖复合处理组和壳聚糖复合处理组 a^* 值分别比 2,4-D 复合处理组果实高 5.29%、2.86% 和 6.13%；乙烯单独处理组、壳寡糖复合处理组和壳聚糖复合处理组 a^*/b^* 值分别比 2,4-D 复合处理组果实高 6.13%、5.19% 和 8.49%；2,4-D 复合处理组果实 Hue 值分别比乙烯单独处理组、壳寡糖复合处理组和壳聚糖复合处理组高 0.89%、0.72% 和 1.23%。

2.1.2 壳寡糖、壳聚糖和 2,4-D 处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实失重率的影响

蜜橘果实采收后，自身呼吸作用和蒸腾代谢仍在进行，果实组织中水分和水溶性营养成分会随着果实贮藏期的延长而流失加剧，这一变化主要表现在贮藏过程中果实失重率的增加。乙烯褪绿处理加速蜜橘果实失重率增加。由图 4A 可知，2,4-D 复合处理可以延缓乙烯褪绿处理引起的果实失重，贮藏第 2、4 和 6 d，2,4-D 复合处理组果实失重率分别比单独乙烯处理组低 8.24%、13.90% 和 5.89%。作为植物生长素类物质，2,4-D 采前、采后处理均能延缓果蔬组织的成熟衰老进程，降低果实失重^[6]；壳聚糖具有良好的成膜性，在果实表面形成一层有一定阻隔性的膜，抑制呼吸和乙烯释放，从而能够减少营养损耗和水分蒸发^[20]；另外，壳聚糖的抑菌性以及诱导植物抗病性等性质，可以延缓果实采后衰老和病害发生，从而降低果实失重^[10-12]。壳寡糖处理能够诱导贮藏过程中柑橘果实组织中结构相关物质积累，抑制果皮中果胶类物质的降解，有效降低柑橘果实贮藏过程中的失重率^[21]。由图可以发现，壳寡糖和壳聚糖复合处理对乙烯褪绿过程中失重的控制效果明显优于 2,4-D 复合处理，贮藏第 6 d，1.50% 壳寡糖、0.50% 壳聚糖复合处理组果实失重率分别比 2,4-D 复合处理组果实低 17.50% 和 14.30%。但壳聚糖、壳寡糖处理组之间，失重率无显著差异。表明适宜浓度的壳聚糖或壳寡糖在控制乙烯褪绿引起的果实失重方面比 2,4-D 具有更好的效果。

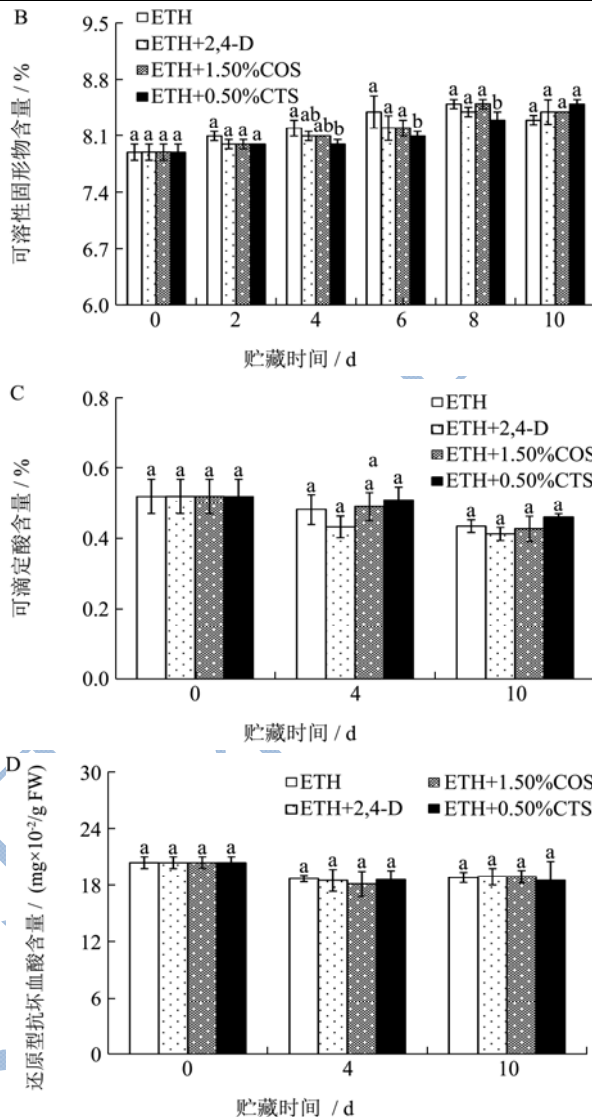


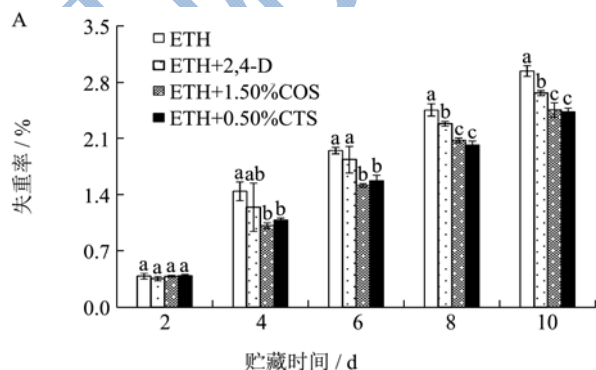
图 4 壳寡糖、壳聚糖和 2,4-D 处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实失重率 (A)、可溶性固形物 (B)、可滴定酸 (C) 和还原型抗坏血酸 (D) 含量的影响

Fig.4 Effects of oligochitosan, chitosan, and 2,4-D treatments on weight loss (A), soluble solid content (B), titratable acid content (C), and reducing ascorbic acid content (D) of ethephon-treated Wase satsuma mandarin fruits during storage at 20 °C

注：图中竖线代表标准误，不同字母代表差异显著 ($p<0.05$)。

2.1.3 壳寡糖、壳聚糖和 2,4-D 处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实可溶性固形物、可滴定酸和还原型抗坏血酸含量的影响

柑橘为呼吸非跃变型果实，乙烯单独处理对呼吸非跃变型果实风味影响不明显，所以对柑橘果实内部品质影响不显著。研究也表明，商业化的外源乙烯褪绿处理方式，在改善早熟柑橘果实外部品质（着色等）



的同时,不会引起果实内部营养价值的损失。本文研究结果也进一步表明4种褪绿处理技术对蜜橘果实可溶性固形物、还原型抗血酸和可滴定酸含量无显著影响 ($p>0.05$,图4B~4D)。

2.2 壳寡糖、壳聚糖和2,4-D处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实病害的影响

2.2.1 壳寡糖、壳聚糖和2,4-D处理对“乙烯褪绿蜜橘”果实病害指数影响

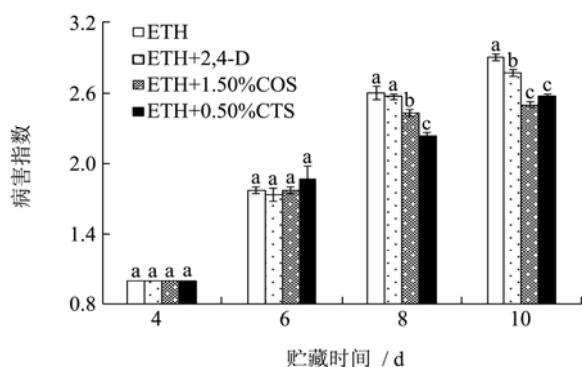


图5 壳寡糖、壳聚糖和2,4-D处理对贮藏期“乙烯褪绿蜜橘”果蒂病害指数的影响

Fig 5 Effects of oligochitosan, chitosan, and 2,4-D treatments on the disease index of ethphon-treated Wase satsuma mandarin fruits during storage at 20 °C

注:图中竖线代表标准误,不同字母代表差异显著 ($p<0.05$)。

采后乙烯褪绿处理会加快柑橘果实衰老,促进果蒂的褐变、脱落和蒂腐真菌的侵入,加快果实发病。柑橘外源乙烯褪绿过程中2,4-D等生长素类物质的使用能显著抑制果实果蒂褐变和蒂腐病的发生^[4]。壳寡糖、壳聚糖单独使用在诱导柑橘果实对青、绿霉病和炭疽病抗病性方面的研究也有报道^[10,11,21]。图5表明,果蒂病情指数随贮藏时间延长而增加。乙烯褪绿处理后,蜜橘果实在贮藏4d后开始发病,2,4-D、0.50%壳聚糖和1.50%壳寡糖处理均能降低乙烯褪绿蜜橘果实果蒂的腐烂。由图可以看出,1.50%壳寡糖和0.50%壳聚糖处理对于减缓乙烯褪绿引起的果蒂病害具有明显的控制作用,且壳聚糖和壳寡糖处理效果好于2,4-D处理。褪绿处理后第8d,2,4-D、1.50%壳寡糖和0.50%壳聚糖处理组果实发病率分别比乙烯处理组果实低1.28%、6.41%和14.10%。褪绿处理后第10d,2,4-D、1.50%壳寡糖和0.50%壳聚糖处理组果实发病率分别比乙烯处理组果实低4.60% ($p<0.05$)、13.79% ($p<0.05$)和11.49% ($p<0.05$)。表明适宜浓度壳聚糖或壳寡糖在控制乙烯褪绿引起的果蒂病害方面,具有一定的作

用。

2.2.2 壳寡糖、壳聚糖和2,4-D处理对“乙烯褪绿蜜橘”果皮总酚和类黄酮含量的影响

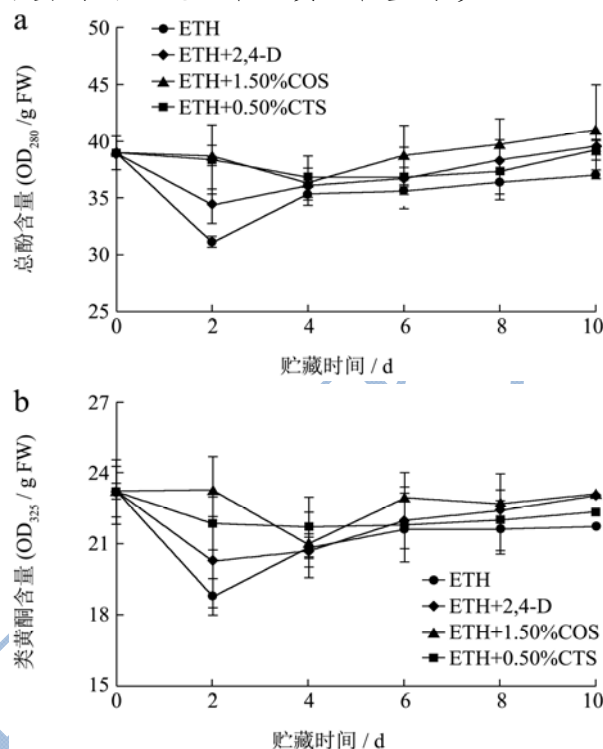


图6 壳寡糖、壳聚糖和2,4-D处理对“乙烯褪绿蜜橘”果皮总酚(a)和类黄酮(b)含量的影响

Fig.6 Effects of oligochitosan, chitosan, and 2,4-D treatments on the content of total phenols (a) and flavonoids (b) of ethphon-treated wase satsuma mandarin fruits

注:图中竖线代表标准误。

果蔬体内的酚类物质是一类具有抑菌活性的低分子量抗病化合物。由图6可知,外源乙烯褪绿处理后,蜜橘果皮总酚和类黄酮含量无显著变化。与乙烯利单独处理组相比,2,4-D复合处理能增加乙烯褪绿蜜橘果皮总酚和类黄酮的含量,0.50%壳聚糖复合处理也能促进果皮总酚和类黄酮含量的提高,其增加幅度与2,4-D复合处理组无显著差异,但1.50%壳寡糖复合处理能显著增加乙烯褪绿蜜橘果皮总酚和类黄酮的含量 ($p<0.05$)。贮藏第6d、8d和10d,1.50%壳寡糖复合处理果实总酚含量分别比乙烯单独处理组高8.75%、9.08%和10.61%,分别比2,4-D单独处理组高5.44%、3.58%和3.78%;类黄酮含量分别比乙烯单独处理组高6.56%、5.13%和6.45%。结果表明,2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理均可以提高乙烯褪绿蜜橘果实抗病相关物质总酚和类黄酮的含量,有利于控制病害的发生,且1.50%壳寡糖处理效果好于2,4-D复合处理。

2.2.3 壳寡糖、壳聚糖和2,4-D处理对“乙烯褪

绿蜜橘”果皮抗病相关酶活性的影响

在果实抗病反应中，抗病相关酶起着非常重要的作用。PAL是苯丙氨酸代谢途径的关键酶，调控次生代谢产物类黄酮植保素和木质素的合成，是植物重要的防御酶之一。如图7a所示，贮藏4 d后，2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖处理组的蜜橘果实PAL活性均高于乙烯单独处理组，且呈现持续上升的趋势，而乙烯单独处理组果实的PAL活性一直处于相对较低水平。褪绿处理后第6 d，2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理组的蜜橘果实PAL活性分别比乙烯单独处理组高17.47%、19.37%和23.16%；褪绿处理后第8 d，2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理组的蜜橘果实PAL活性分别比乙烯单独处理组高20.73%、20.43%和25.10%。贮藏6~10 d，2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理组果实PAL活性之间无显著差异 ($p < 0.05$)。

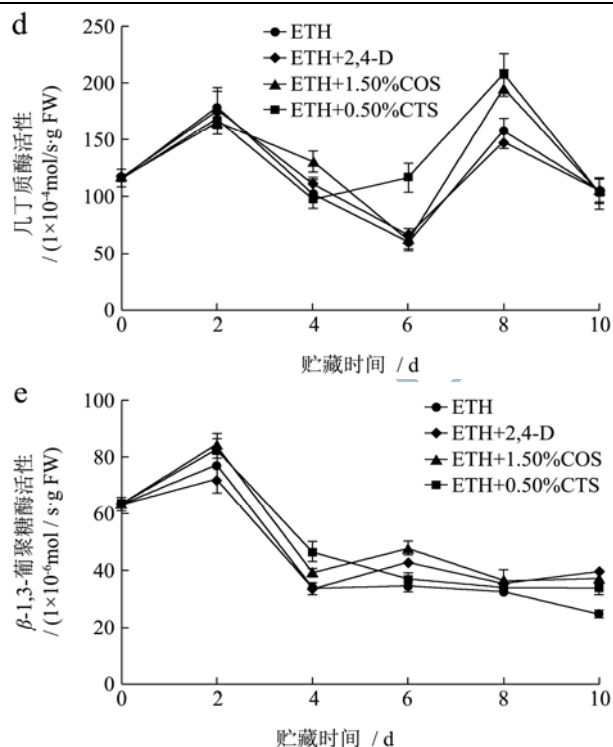
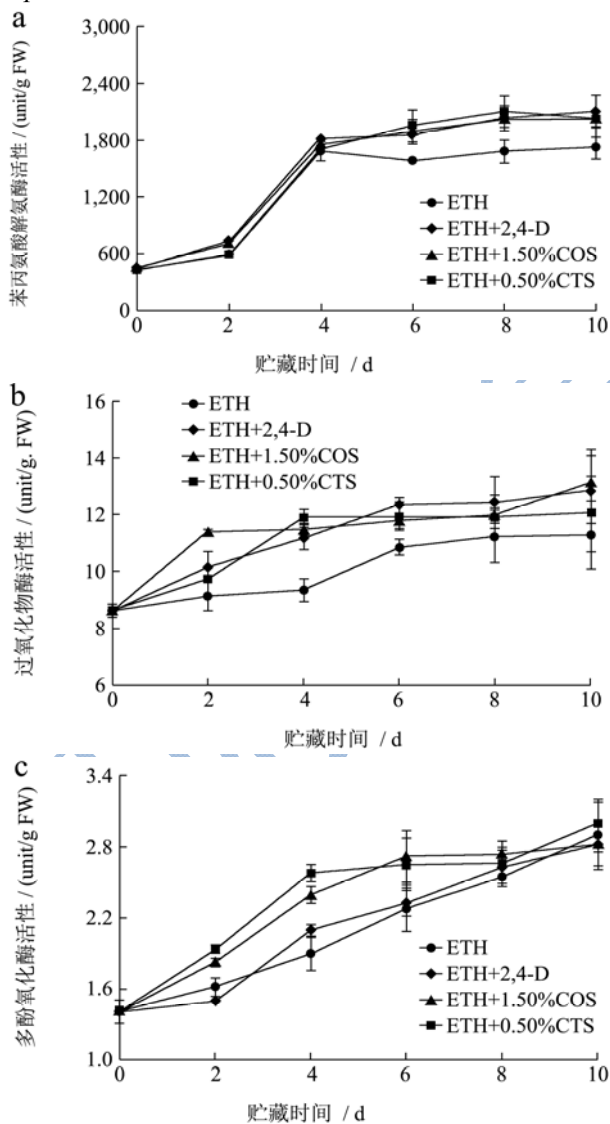


图7 壳寡糖、壳聚糖和2,4-D处理对“乙烯褪绿蜜橘”果皮PAL (a)、POD (b)、PPO (c)、CHI (d)和GLU (e)活性的影响
Fig.7 Effects of oligochitosan, chitosan, and 2,4-D treatments on the activities of PAL (a), POD (b), PPO (c), CHI (d), and GLU (e) of ethephon-treated Wase satsuma mandarin fruits during storage at 20 °C

注：图中竖线代表标准误。

PPO能将植物体内先天性抗菌物质多酚氧化成相应的氧化物，POD在植物愈伤、木质素合成及酚类物质氧化过程中起重要作用，其活性升高越快，愈伤和木质化过程完成就越快。蜜橘果实褪绿期间，果皮内POD和PPO活性的变化如图7中b和c所示。果实褪绿过程中果皮POD活性随时间延长逐渐上升，2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理均能诱导贮藏过程中乙烯褪绿果实POD活性的升高。贮藏第4 d时，2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理组果实POD活性分别比乙烯单独处理组果实高19.50%、22.80%和27.80% ($p < 0.05$)。整体上看，2,4-D、1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理组果实POD活性无显著差异。褪绿处理后，蜜橘果实PPO活性呈现明显的上升趋势，但2,4-D复合处理果实PPO活性与单独乙烯处理组果实无显著差异 ($p < 0.05$)。褪绿处理后2~6 d，1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理促进果实PPO活性的显著升高。贮藏第2 d、4 d和6 d，1.50%壳寡糖复合处理组果实PPO活性分别比单独乙烯处理组果实高13.08%、

26.07%和19.05%；0.50%壳聚糖复合处理组果实PPO活性分别比单独乙烯处理组果实高19.82%、35.91%和16.05%。PPO和POD活性的升高，可能预示着果实愈伤和木质化过程完成迅速，果实内醌类等多酚氧化产物增加，从而增强果实在贮藏期间对病原菌的抵抗能力。上述研究表明，2,4-D仅对果实POD活性有诱导作用，1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖处理除了对果实POD活性表现出与2,4-D类似的诱导作用外，两种处理对贮藏前中期果实PPO活性的诱导作用，可以进一步解释两种处理更好的抗病效果。

研究表明，2,4-D处理在延缓乙烯褪绿柑橘果果蒂脱落和萼片褐变方面的作用，与其对柑橘果实果胶、纤维素和木质素等组织结构物质代谢的调控有关，2,4-D处理抑制果皮PG和Cx活性进而延缓果实果胶物质和纤维素的降解^[22]，同时，2,4-D处理促进柑橘果皮木质素和水分的增加^[6]。PAL和POD均参与了果实木质素等结构物质的代谢和积累，是果皮结构物质形成和沉积的重要酶^[23]，本文结果也进一步说明2,4-D通过对柑橘果皮结构物质代谢途径上多个关键位点的调控实现对果皮整体结构的调控。

几丁质为病原真菌细胞壁结构成分之一，果实几丁质酶活性升高对病原菌的抗病能力增加。因此，几丁质酶是衡量果实抗病性的重要指标。果实经4种褪绿技术处理后，果实几丁质酶活性的变化如图7d所示。结果表明，2,4-D复合处理果实CHI活性与单独乙烯处理组果实无显著差异 ($p < 0.05$)。褪绿处理后，1.50%壳寡糖及0.50%壳聚糖复合处理分别在贮藏的不同时期促进果实CHI活性的显著升高。贮藏第4 d和8 d，1.50%壳寡糖复合处理组果实CHI活性分别比单独乙烯处理组果实高27.79%和23.89%；贮藏第6 d和8 d，0.50%壳聚糖复合处理组果实CHI活性分别比单独乙烯处理组果实高94.55%和32.15%。

由图7e可以看出，蜜橘果实在褪绿过程中，GLU活性先升高后降低，各处理组变化趋势基本一致，第2 d达到最大峰值。乙烯单独处理果实的GLU活性仅在贮藏的第2 d时，略高于2,4-D复合处理组果实，但无显著差异；其他时间点上，乙烯单独处理果实的GLU活性均低于其他处理组，其中以1.50%壳寡糖处理对GLU的持续诱导作用最好。贮藏第6 d和10 d，2,4-D复合处理组果实GLU活性分别比单独乙烯处理组果实高23.82%和57.77%；贮藏第2 d、4 d和10 d，0.50%壳聚糖处理果实GLU活性分别比单独乙烯处理组果实高7.36%、36.87%和36.26%；贮藏第6 d和10 d，1.50%壳寡糖复合处理组果实GLU活性分别比单独乙烯处理组果实高37.49%和48.56%。

上述研究结果表明，2,4-D对乙烯褪绿蜜橘果实抗病性的诱导作用可能不依赖于对果皮病程相关蛋白活性的诱导作用。而壳聚糖和壳寡糖对乙烯褪绿柑橘果实抗性的诱导作用，涉及对果皮病程相关蛋白活性的诱导。与Zeng等^[10]和Deng等^[11,21]在柑橘果实上的研究结果一致。且乙烯褪绿前一天处理，壳聚糖和壳寡糖诱导果实形成的抗性并未因后面乙烯的处理而减弱，表明二者对果实抗性的诱导作用具有一定的持续性。

3 结论

3.1 外源乙烯能够促进柑橘果皮褪绿转色，对果肉内部品质无显著不良影响；2,4-D、1.50%壳寡糖和0.50%壳聚糖复合处理对蜜橘果实内部品质也无显著影响。但1.50%壳寡糖和0.50%壳聚糖在改善乙烯褪绿引起的蜜橘果实失重方面的作用，显著优于2,4-D处理。

3.2 在褪绿过程中，1.50%壳寡糖和0.50%壳聚糖在控制乙烯褪绿引起的果蒂病害方面具有比2,4-D更优的效果。2,4-D、1.50%壳寡糖和0.50%壳聚糖对果实抗性的诱导作用有相似地方，也存在一定的差异。其中，1.50%壳寡糖处理可以诱导乙烯褪绿蜜橘果实PPO、POD、PAL、GLU活性以及总酚、类黄酮含量的显著增加，对CHI活性也有一定的诱导增强作用；0.50%壳聚糖处理对PPO、POD、PAL、CHI和GLU活性均表现出显著的诱导作用，对果皮总酚和类黄酮含量有一定的诱导增强作用；2,4-D复合处理仅表现出对果皮POD和PAL的显著诱导作用，对果皮PPO、GLU活性和总酚、类黄酮含量仅表现出一定的诱导作用。

3.3 壳寡糖和壳聚糖在替代商业上柑橘褪绿技术中2,4-D的使用方面具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Sdiri S, Navarro P, Ben Abda J, et al. Antioxidant activity and vitamin C are not affected by degreening treatment of Clementine mandarins [J]. *Acta Horticulturae*, 2010, 934(2): 893-900
- [2] Zhou J, Sun C D, Zhang L L, et al. Preferential accumulation of orange-colored carotenoids in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit peel following postharvest application of ethylene or ethephon [J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 126: 229-235
- [3] Sdiri S, Navarro P, Monterde A, et al. New degreening treatments to improve the quality of citrus fruit combining different periods with and without ethylene exposure [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 63(1): 25-32
- [4] Zhang J, Ritenour M. Biology and control of *Diplodia*

- stem-end rot and anthracnose on early harvested Florida citrus [J]. Packinghouse Newsletter, 2002, 196: 4-6
- [5] Brown G E, Lee H S. Interactions of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis* [J]. Phytopathology, 1993: 83(11): 1204-1208
- [6] Ma Q, Ding Y, Chang J, et al. Comprehensive insights on how 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid retards senescence in post-harvest citrus fruits using transcriptomic and proteomic approaches [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(1): 61-74
- [7] Du J, Gemma H, Iwahori S. Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1997, 66(1): 15-22
- [8] Yin H, Zhao X, Du Y. Oligochitosan: a plant diseases vaccine-a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(1): 1-8
- [9] Yan J, Cao J, Jiang W, et al. Effects of preharvest oligochitosan sprays on postharvest fungal diseases, storage quality, and defense responses in jujube (*Zizyphus jujube* Mill. cv. Dongzao) fruit [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 142: 196-204
- [10] Zeng K, Deng Y, Ming J, et al. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 126: 223-228
- [11] Deng L, Zeng K, Zhou Y, et al. Effects of postharvest oligochitosan treatment on anthracnose disease in citrus (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit [J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(4): 795-804
- [12] Deng Y, Ming J, Zeng K. Effects of chitosan coating on disease resistance and storage quality of navel orange fruit [J]. Food Science, 2008, 29(11): 656-661
- [13] 邓丽莉,黄艳,周玉翔,等.壳寡糖处理对柑桔果实贮藏品质的影响[J].食品工业科技,2009,30(7):287-290
DENG Li-li, HUANG Yan, ZHOU Yu-xiang, et al. Effect of chito-oligosaccharide treatment on storage quality of citrus fruit [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(7): 287-290
- [14] 邓雨艳.壳聚糖诱导柑桔果实抗病性机制的研究[D].重庆:西南大学,2009
- DENG Yu-yan. Effect of chitosan coating on induced disease resistance mechanism of citrus fruits [D]. Chongqing: Xinan University, 2009
- [15] 黄艳.壳寡糖对柑桔果实活性氧代谢的影响[D].重庆:西南大学,2010
HUANG Yan. Effects of chitosan coating on reactive oxygen species metabolism of citrus fruits [D]. Chongqing: Xinan University, 2010
- [16] McGuire R G Reporting of objective color measurements [J]. HortScience, 1992, 27: 1254-1255
- [17] Lim P K, Jinap S, Sanny M, et al. The influence of deep frying using various vegetable oils on acrylamide formation in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) chips [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(1): T115-21
- [18] 曹建康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007
CAO Jian-kang, JIANG Wei-bo, ZHAO Yu-mei. Experiment guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007
- [19] Knight T G, Klieber A, Sedgkey M. Structural basis of the rind disorder oleocellosis in Washington navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. Annals of Botany, 2002, 90: 765-773
- [20] E Ghaouth A, Ponnampalam R, Castaigne F, et al. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes [J]. HortScience, 1992, 27(9): 1016-1018
- [21] [21] Deng L, Zhou Y, Cui W, et al. Pre-harvest spray of oligochitosan induced the resistance of harvested navel oranges to anthracnose during ambient temperature storage [J]. Crop Protection, 2015, 70: 70-76
- [22] Greenberg J, Goren R, Riov J. The role of cellulase and polygalacturonase in abscission of young and mature Shamouti orange fruits [J]. Plant Physiology, 1975, 34(1): 1-7
- [23] 李伟,熊谨,陈晓阳.木质素代谢的生理意义及其遗传控制研究进展[J].西北植物学报,2003,23(4):675-681
LI Wei, XIONG Jin, CHEN Xiao-yang. Advances in the research of physiological significances and genetic regulation of lignin metabolism [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2003, 23(4): 675-681