

## 低溫貯藏對`新雪`梨果皮黑變與微觀結構 及抗氧化酵素變化之影響

郭純德\* 尤進欽

國立宜蘭大學園藝學系

### 摘 要

梨山地區的`新雪`梨採收後及貯藏前，其果皮完全正常。但低溫下(1、5及9℃)分別貯藏2、4及6週，果實表皮即呈現不規則形狀的黑色斑塊。其中央色澤較深，周邊較淺。果皮黑變的面積，會隨著低溫期間的延長而擴大。雪梨在1、5、9、13℃貯藏室中30週，就果皮黑變的果實數百分比及面積百分比而言，以1℃最嚴重，5℃和9℃次之，13℃更少。雪梨果皮產生黑變斑點和區塊，類似燙斑的特徵，應為低溫所造成的寒害結果。為瞭解雪梨果皮的黑變，以徒手切片顯微觀察正常果皮，顯示表皮以下數層的薄壁細胞排列整齊、形狀飽滿且顏色較透明；相反地，黑變斑塊果皮切片，則呈薄壁細胞擠壓變形，且轉為黑褐色。另以石蠟切片觀察，則顯示貯藏溫度之高低，與雪梨果皮發生黑變及黑變程度多寡有直接關係，主要是由於果實表皮以下數層的薄壁細胞對於低溫敏感所導致。然而，不管果皮是否發生黑變，都不會影響果肉組織厚角細胞之形態，顯示低溫引起的果皮黑變可能與細胞的種類有關。另本試驗亦探究雪梨果實低溫貯藏後，果皮黑變組織的超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及過氧化氫酶(catalase, CAT)的同功異構酶型態。在非變性膠片系統中，梨果皮皆有4個SOD的同功異構酶，但黑變與正常之果皮相較，具有不同型態或活性的同功異構酶。然而，在黑變與正常之果皮都只有1個CAT同功異構酶的條帶。這些結果顯示，氧化逆境可能參與採收後雪梨果實低溫所誘導的果皮傷害。而正常之果皮可能具有較有效的抗氧化酵素系統。

**關鍵詞：**寒害，`新雪`梨，果皮黑變，微觀結構，抗氧化酵素

Effects of Low Temperature Storage on Skin Blackening  
and Microscopic Structures and Antioxidant Enzymes  
Changes in Harvested Fruits of Japanese Pear 'Shinsetsu'

## (*Pyrus pyrifolia* Nak. var. Shinsetsu)

Chun-Teh Kuo\* Jinn-Chin Yiu

Department of Horticulture, National Ilan University

### Abstract

The goal of this research was to investigate the effects of low temperature on skin blackening and microscopic structures and antioxidant enzymes changes in harvested fruits of 'Shinsetsu' pear produced at Li-Shan area in central Taiwan. Skin blackening revealed clearly after 2, 4, and 6 weeks storage at 1, 5, and 9°C, and was heavily reduced the commercial value of fruits. This physiological disorder was occurred only at skin region, the flesh tissue was remained normal throughout storage period. It was found when storage temperature decreased; the blackening scald development in skin could extend to a greater extent. It could be concluded that the physiological disorder in skin blackening of 'Shinsetsu' pear was a chilling injury induced by low temperature.

To explore the physiological disorder in skin blackening disorder of 'Shinsetsu' pear, a microscopic observation on the free-hand cross-section of normal skin tissue showed regular arrangement, turgid shape, and transparent color of parenchyma cells in the cortex tissue. In contrast, the parenchyma cells in cortex tissue of the blackening scald of skin were pinched to form heteromorphism, and turned into brown, which were considered as the causes or results of the skin blackening. The results of paraffin section revealed the direct relationship between degrees of refrigerated temperature and the incidence and severity of skin blackening. Mainly, parenchyma cells of cortex tissue are extremely susceptible to chilling. Although blackening scald at the fruit skin tissue was made, it could not affect the collenchyma cells of flesh tissue. These results revealed a relationship between chilling-caused skin blackening and the kinds of cells.

The isozyme patterns of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in blackening scald development of skin were studied after low temperature storage. In a native gel system, four SOD isozymes were detected in pear peel, but there were different isozyme types and activities in skin blackening tissue compared with normal peel. However, only one CAT isozyme band was presented at all times in both skin-blackening and normal peels. The results indicated that oxidative stress may be involved in cold-induced peel damage of post-harvest pear. Normal fruit skin may have a more efficient antioxidant enzyme systems.

**Key words:** chilling injury, 'Shinsetsu' pear, skin blackening, microscopic structure, antioxidant enzyme

\*Corresponding author E-mail: ctkuo@niu.edu.tw

## 前 言

梨，是薔薇科(Rosaceae)、梨屬(*Pyrus*)植物，同屬內已知有 35 種，野生分佈在歐、亞及非洲等地(李, 1980)。梨因栽培歷史悠久超過 3000 餘年，由自然及人為所產生之品種特多，概可分為四類，即西洋梨(*Pyrus communis* L.)，秋子梨(*P. ussuriensis* Maxim.)，白梨(*P. bretschneideri* Rehd.)及砂梨(*P. serotina* Rehd.) (朱, 1966)。不過，一般栽培者，僅將梨分為東方梨(oriental pear)及西洋梨(common pear)兩大類(李, 1980)。前者又名亞洲梨(Asia pear)，果實採收時即可

食用，果肉脆而多汁甜美，不像西洋梨，需經過後熟，變軟了之後才食用(Mitcham and Mitchell, 2002)。至於日本梨(*P. pyrifolia* Nakai)，則應與中國南方之砂梨為同一系統，並經日本育成改良品種(林等, 1991)。

「新雪」('Shinsetsu')梨，係日本梨(Japanese pear)晚生品系之一，在台灣通稱為雪梨。台灣的雪梨，乃由農友數年前自行自日本引進，主要栽培在梨山地區。由於果實碩大果肉甜美多汁，並具晚熟特性(Baba *et al.*, 1990)，而適於作為農曆新年之應景水果禮品，具有極高的經濟價值，成為台灣新興且重要的溫帶梨品種(王, 1999；侯, 2002)。雪梨果實在低溫下(1~5°C)貯藏 30 週，其腐爛率低，於 5%以下(郭與

尤, 2004)。然而，採收後雪梨在低溫貯藏過程中(1℃、二週以上)，其果皮經常明顯發生不規則狀之黑色斑點及斑塊(王, 1999; Baba *et al.*, 1990)，類似蘋果及西洋梨果實的表皮燙傷 (superficial scald) 現象(Ingle, 2002)。梨果皮黑變(fruit skin blackening)應為果實表皮組織之生理障礙(physiological disorder)，而非由病原菌引起之病害(王, 1999)。由於此果皮黑變只在 0~3℃(侯, 2002)，或者 9℃以下的低溫才會發生(郭與尤, 2004)，故推測應為低溫所引起的寒害(chilling injury, CI)結果。

愈來愈多的證據指出，許多植物種類的低溫傷害程度，取決於低溫逆境下產生氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的量，與細胞保護系統間的平衡(Prasad *et al.*, 1994; Purvis *et al.*, 1995)。細胞的防禦系統包括各種抗氧化酵素，例如：超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 及過氧化氫酶(catalase, CAT)。SOD 的功能是將超氧自由基( $O_2^-$ )歧化為氧及過氧化氫( $H_2O_2$ )。胡瓜幼苗及成株葉片遭受低溫逆境，雖會誘導SOD活性增加，但亦造成CI (Lee and Lee, 2000; Kang and Saltveit, 2002)。有學者將 *sod* 基因轉殖至菸草及棉花中，使其大量表現 SOD 活性，可讓轉殖株免於低溫及強光照下的 CI 情況(Gupta *et al.*, 1993; Payton *et al.*, 2001)。上述由 SOD 轉換氧自由基成為  $H_2O_2$ ，此產物對細胞具有毒性，除非經由 CAT 的作用，將它降解成水。在耐低溫的玉米幼苗中可偵測到高活性的 CAT (Hodges *et al.*, 1997; Prasad *et al.*, 1994)。而低溫貯藏寬皮柑(mandarin)的寒害現象與低的 CAT 活性有關(Sala, 1998)。另外，轉殖反義 RNA (antisense RNA) 抑制番茄 CAT 的含量會增加對低溫的敏感性(Kerdnaimongkol and Woodson, 1999)。

由於雪梨的果皮黑變問題，嚴重影響果品外觀及消費者購買意願，進而影響果農收益，亟待產學各單位的協助解決。惟其肇因迄未確實全然明瞭，也無立即有效的解決方法。因此，本實驗的目的是希望能明白雪梨果皮於低溫貯藏下黑變的情況，了解黑變組織的微觀構造變化，並進一步偵測抗氧化酵素活性於果皮組織中的消長情形。

## 材料與方法

試驗用‘新雪’梨果實，購自梨山地區黃姓果園。係以一般成熟度，每盒 8 顆裝規格之大小的果實(平均重 650±50 公克)為材料。供試樣品於 2003 年 12 月 17 日左右採收，20 日中午以重量分級機選別分級及包裝計 36 盒，並由黃先生親以專車於夜間 9 時送達宜蘭大學園藝系第一實驗室。每一盒雪梨果實以單層保麗龍果盤 8 顆包裝，每一果實以紅色舒果網袋包裹保護。每一果實均經逐粒稱重、逐機編號入庫冷藏，並進行各項試驗。

### 一、低溫貯藏對‘新雪’梨發生果皮黑變之影響

將果實樣品貯藏於 1、5、9、13℃冷藏室內 30 週，每 2 週調查雪梨果皮發生黑變的情形，並拍照紀錄存證。果皮發生黑變的調查分二部分，其一為發生果皮黑變的果實數之百分比，另一為黑變果皮之黑變面積的百分比。每一貯藏溫度(1、5、9、13℃)處理三盒梨，計 24 個果實。

梨果皮黑變的認定，是以果皮黑變面積超過伍角硬幣大小，無法以品牌標籤遮蓋，已嚴重影響商品價值者，確認為果皮黑變之果實。梨果皮黑變之果實數百分比(%) = 果皮黑變果實數 / 供試樣品的梨果實總數 × 100% 表示之。

梨果皮黑變面積的百分比(%)，係以目測黑點或黑斑的總和面積，占整個果皮面積之百分比來表示。係以每盒 8 顆裝規格雪梨果實，其直徑以 100 cm 為平均基準。基準雪梨球形面積為  $4\pi r^2$ ，即為 314cm<sup>2</sup>。因此，梨果皮黑變面積百分比(%) = 供試樣品的雪梨果皮黑變面積 / 基準雪梨球形面積 × 100% 表示之。據此，目前通用貨幣之伍角硬幣面積(3 cm<sup>2</sup>)約為 1%、10 元硬幣面積(7 cm<sup>2</sup>)約為 2%、50 元硬幣面積(9 cm<sup>2</sup>)約為 3%。

### 二、‘新雪’梨果皮黑變組織的顯微觀察

將置放於 1、5、9、13℃貯藏室內 12 週的雪梨果實樣品，以徒手切片(free-hand cross-section)及石臘切片(paraffin section)方式，觀察正常及黑變的果皮之

形態，以及果皮組織數層細胞的變化。徒手切片之取樣，係以鋒利刀片切取自正常及黑變果實的表皮，並隨即置於解剖顯微鏡(NIKON SMZ1500 型)下觀察紀錄。石臘切片之取樣，係以鋒利刀片切取自正常及黑變果實的表皮，所得樣本以經配製的 FAA 液(formalin 5 ml + glacial acetic acid 5 ml + 70% ethyl alcohol 90 ml)固定之。接著以 T.B.A. (tert-butyl alcohol) 進行系列脫水，再經由滲透、埋蠟等程序，將供試樣本包埋在石臘中並製成小蠟塊，用迴轉式切片機(Rotary microtome, N.O.W212, Japan) 作成 12  $\mu$ m 的薄片，經系列酒精洗滌後，置 Safranin O 染色，以蒸餾水及酒精系列清洗，再以 Fast green 二次染色，滴上巴爾森液，予以封片，以備觀察與比較(蔡，1975)。

### 三、「新雪」梨果皮黑變組織內抗氧化酵素系統的變化

#### (一)植物粗蛋白質萃取

取雪梨果皮組織 1 g，以液態氮冷凍及研磨成粉末，再加入 2 ml 之萃取緩衝液(100mM potassium phosphate, pH7.5; 2mM EDTA; 1% PVP-40)，以 15,000 g 離心 20 分鐘，最後取其上清液(Anderson *et al.*, 1995)。本實驗各取 80  $\mu$ g 蛋白質進行電泳分析。而蛋白質含量測定是根據 Bradford (1976)方法，以 BSA 當標準試劑。

#### (二)蛋白質電泳分析

蛋白質電泳分析係依據 Laemmli (1970)之方法。利用 Mini-Protein II Cell (Bio-Rad)來進行此項分析工作。製備 7-10% polyacrylamide 解析凝膠(resolution gel)，緩緩注入預先組架完成之電泳玻璃中，注入少量 95%酒精或 butanol，使凝膠保持水平狀態。待凝膠凝固後，使玻璃傾斜，以吸水紙將酒精吸出，再注入 4% polyacrylamide 聚焦凝膠(stack gel)，接著在聚焦凝膠處插入齒模，約至聚焦凝膠底部 1 公分。待凝膠凝固後，取出齒模，即可進行電泳分離。

#### (三)非變性電泳(native PAGE)及活性染色分析

SOD 同功異構酶分析是根據 Laemmli (1970)之方法，將粗蛋白質萃取液置於 nondenaturing polyacrylamide gel (10%T, 4%C)中，以 40 mA 在 4°C 下

進行電泳分離 4 小時，電泳完成後膠片再參照 Rao 等(1995)方法進行染色。將膠片置於 2.5 mM nitroblue tetrazolium (NBT) 25 分鐘，再浸泡於 50mM potassium phosphate buffer (pH7.8)含 28  $\mu$ M riboflavin 及 28 mM tetramethyl ethylenediamine (TEMED) 於黑暗下處理 30 分鐘，最後膠片置於光箱上照射 2 小時以呈色。

CAT 同功異構酶分析是將粗蛋白質萃取液置於 nondenaturing polyacrylamide gels (7%T, 4%C)中，以 40 mA 在 4°C 下進行 4 小時分離(Laemmli, 1970)。膠片浸泡於 3.27 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 分鐘，再以水清洗 10 分鐘，最後置於 1% (w/v) potassium ferricyanide，1% (w/v) ferrichloride 於黑暗下呈色 10 分鐘(Woodbury *et al.*, 1971)。

## 結果與討論

通常，生理障礙是指植物生長發育或貯藏過程中，因為不良環境因子，如溫度太低、太高，或者營養要素缺乏如缺鈣等，所引起的組織崩解等現象，而非由病原菌感染或機械性傷害所導致的結果(劉, 1994; Kader, 2002)。一般來說能使熱帶性水果及蔬菜產生寒害的臨界溫度較高，10~13°C 之間即可能產生寒害。能使溫帶性產品發生寒害的臨界溫度較低，大都低於 10°C 或 5°C，甚至有些產品要到 3°C 以下才會發生寒害(劉, 1994; Kader, 2002)。

低溫可以延遲果實軟化，減少生理障礙、病害，而延長貯藏壽命。事實上，台灣的果農或販賣者，常以低溫貯藏方式來延長梨果實之市場供應期。「幸水」、「豐水」梨果實於低溫 1°C，相對濕度 85~90%，可貯藏 2 個月，「新興」梨的貯藏期可以更長(呂與李, 1996)。不過，因低溫貯藏造成生理障礙的東方梨品種也不少，例如「橫山」梨會因低溫(5°C)貯藏導致其果肉褐化呈水浸狀，而且 2%以上的二氧化碳會加重果肉褐化的程度(李, 1988)。在韓國的「新高」梨果實經低溫貯藏(0~1°C)，很快就會出現果皮黑變徵狀(Yang, 1997)，並且其果皮黑變徵狀，會隨著成熟度的增加而更加地嚴重(Choi *et al.*, 1995)。



### 一、低溫貯藏對‘新雪’梨發生果皮黑變之影響

‘新雪’梨在採收後及貯藏前，其果皮完全正常。但低溫下(1℃)貯藏 2 週後，果皮即呈現不規則形狀黑色斑點及區塊，其中央色澤較深，周邊較淺(圖 1)。供試梨果樣品在低溫(1℃)下貯藏 2 週，導致果皮產生黑變斑塊徵狀之結果，與王(1999)及侯(2002)報告中所陳述低溫導致果皮發生的黑變相同，應該都是低溫貯藏造成生理障礙，所謂寒害的結果。雖然侯(2002)的報告指出，此種果皮黑變之寒害徵狀只發生在 0~3℃ 低溫，而 5℃ 冷藏中之果實並未發生，則與下列所述本試驗之部分結果並不相同。



圖 1 ‘新雪’梨貯藏於 1℃ 下經 2 週後，果皮的異常黑變徵狀。橫線長度代表 2.5 公分。

Fig. 1 Symptoms of skin blackening disorder in harvested fruits of ‘Shinsetsu’ pear stored at 1℃ after 2 weeks. The bar represents 2.5 cm.

採收後的雪梨果實分別貯藏在不同低溫下 (1、5、9、13℃) 12 週後，就果皮發生黑變的程度言，以貯藏在 1℃ 者最為嚴重，5℃ 和 9℃ 次之，13℃ 者較輕(圖 2)。貯藏於 5℃ 及 9℃ 的梨果，在 12 週後明顯地發生果皮黑變的寒害徵狀(圖 2)。甚至置於 9℃ 下的雪梨，分別貯藏 4、8、12、16 週後，其果皮也發生黑變徵狀，而且其果皮黑變的程度，隨著貯藏期間的增加而益加嚴重，以 16 週最嚴重，12 週及 8 週次之，而 4 週者最輕微(圖 3)。上述結果初步顯示台灣梨山地區冬季生產的雪梨果實表皮組織，對 9℃ 以下的低溫極為敏感，並因此導致不規則形狀黑色斑塊的發生。

雪梨經不同低溫(1、5、9、13℃)貯藏 30 週(圖

4)期間，每經過 2 週低溫貯藏後，就果皮發生黑變的發展程度而言，不論是發生黑變果實數之百分比(圖 4A)，或者產生黑斑面積之百分比(圖 4B)，在 1℃ 者最嚴重，5℃ 及 9℃ 次之，13℃ 再次之。梨果皮黑變

(A) 1℃



(B) 5℃



(C) 9℃



(D) 13℃



圖 2 ‘新雪’梨分別置於 1、5、9、13℃ 貯藏庫內 12 週後，果皮的黑變之變化。

Fig.2 Changes in symptoms skin blackening

in harvested fruits of ‘Shinsetsu’ pear stored at 1, 5, 9, and 13°C after 12 weeks, respectively.

(A) 4 週(weeks)



(B) 8 週(weeks)



(C) 12 週(weeks)



(D) 16 週(weeks)



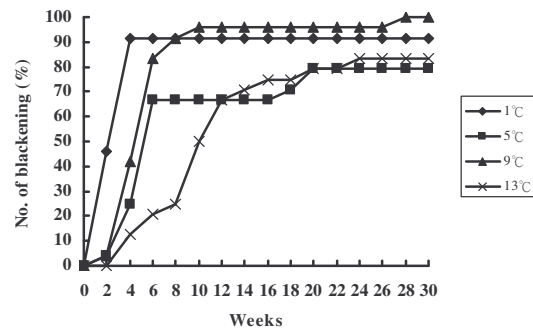
圖 3 ‘新雪’梨置於 9°C 貯藏庫內 4、8、12、16 週後，果皮的黑變之變化。

Fig.3 Changes in symptoms of skin blackening in harvested fruits of

‘Shinsetsu’ pear stored at 9°C after 4, 8, 12, 16 weeks, respectively.

程度，隨著溫度之降低而嚴重，並且果皮之黑變程度，也隨著低溫期間的增長而更加嚴重。

(A)



(B)

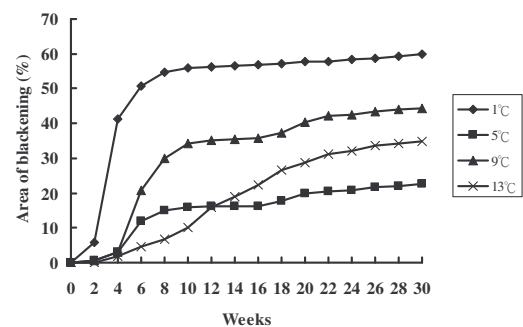


圖 4 ‘新雪’梨貯藏於 1、5、9 及 13°C 經 30 週後，其果皮黑變的果實數百分比(A)與面積百分比(B)的變化。

Fig.4 Changes in percent of number (A), and area (B) of skin blackening in harvested fruits of ‘Shinsetsu’ pear stored at 1, 5, 9, and 13°C for 30 weeks, respectively.

單就果皮黑變面積超過伍角硬幣大小(3%)的果實數之百分比而言，梨果貯藏在 1、5、9、13°C 中歷經 30 週，以貯藏在 1°C 者最明顯嚴重，5°C 和 9°C 次之，13°C 者更少(圖 4A)。貯藏在 1°C 的梨果，其果皮黑變的果實數之百分比，在第 2 週即快速達到 46%，第 4 週明顯增加至 92%。有趣的是不發生果皮黑變者，即使貯藏到 30 週也不會發生黑變。即其果皮黑變果實百分比達 92% 後不再增加。此結果和王(1999)報告極為相似：雪梨在 2°C 中冷藏 2 週即會發生果皮



黑變，且發生率即達到總發生率之一半以上；在 2 週後未發生黑變之果實在之後的貯藏期間會發生黑變的機會並不大；發生果皮黑變之果實，隨貯藏時間增加，其黑斑數目會增多而且面積會增大。

貯藏於 5 及 9℃ 梨果，第 2 週後二者之黑變果實數之百分比都是 4%。第 4 週後二者都明顯增加，分別為 25% 及 42%。置 5℃ 者，第 6 週後倍數增加到 67%，第 18 週稍增加為 71%，第 20 週達 79% 後即不再增加。而 9℃ 者也在第 6 週後倍增至 83%，第 8 週後為 92%，第 10 週後達 96%，第 28 週後高達 100%。由此結果得知，貯藏於 9℃ 者，其黑變果實數之百分比，似乎比貯藏於 5℃ 者更高(圖 4A)。較高貯藏溫度產生的寒害徵狀，比較低貯藏溫度還要嚴重，似乎違背一般常態，不過有些桃的果實也有相同的現象(劉, 1994)。溫度是所有貯藏條件要素中首先須要考慮的項目。原則上產品在不受凍傷或寒害的範圍內貯藏溫度愈低愈好。但也有例外，桃可以在 0℃ 貯藏 2 至 4 週而不產生寒害徵狀，但在 5℃ 左右貯藏不到 2 週即產生寒害，而使果實失去正常後熟能力並使果肉變色。若將它貯藏在 10℃ 以上則又無寒害徵狀(劉, 1994)。

貯藏於 13℃ 的梨果，前 2 週沒有果實發生黑變。第 4 週後果皮出現了淡褐色斑點及斑塊，其特徵明顯不同於因低溫(1、5 及 9℃)貯藏導致梨果表皮產生的深黑色之斑塊(圖 1, 圖 2) 並隨著貯藏時間增長而緩慢增加。發生淡褐色斑塊之果實數百分比，在第 4 週後為 13%，第 8 週 25%，第 10 週倍增至 50%，至第 24 週達 83% 後才不再增加。

值得注意的是，貯藏於 13℃ 的梨果，在第 4 週起即發生顏色極淡的褐斑，其褐斑面積，隨著貯藏期不斷地緩和增加。而褐斑的色澤之深淺，隨著貯藏期不斷地增長而加深。其實雪梨果皮在 13℃ 下，產生的淡褐色斑點(塊)，明顯和更低溫貯藏後所產生的黑褐斑點(塊)並不相同，但是仍然異於正常果實(圖 2)。此淡褐色斑點與斑塊是否為老化斑塊(senescence scald)，而非寒害表皮燙傷黑變斑塊。抑或是黃姓果農大量採收雪梨後(12 月 16 日至 19 日)，

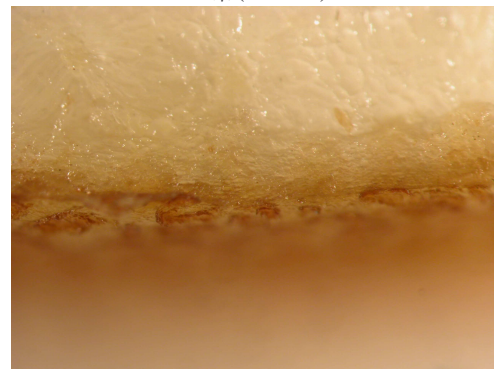
在尚未運送至宜蘭大學前(12 月 20 日)，先置放在簡易鐵皮屋工寮內二或三天期間，受到夜間約 2 至 8℃ 低溫誘導發生輕微寒害之後，再置於 13℃ 貯藏庫，而緩緩出現相對較輕微的寒害徵狀，不得而知。其確實肇因，實在有待進一步探究。

若純就果皮黑變面積的百分比而言，梨果貯藏在 1、5、9、13℃ 中歷經 30 週，以貯藏在 1℃ 者最嚴重，5℃ 和 9℃ 次之，13℃ 者最輕微(圖 4B)。這結果和發生黑變果實數的百分比之變化相當類似(圖 4A)。

## 二、‘新雪’梨果皮黑變組織的顯微觀察

為了瞭解雪梨果皮的組織情形，以新鮮材料進行徒手切片進行顯微觀察與比較。發現正常果實之表皮切片，可看到表皮下層的薄壁細胞排列整齊、形狀飽滿且顏色較透明。相反地，黑變斑塊表皮的切片，薄壁細胞則呈擠壓、塌陷，且轉為黑褐色(圖 5)。與侯(2002)以徒手切片顯微觀察的結果相同。這可能是雪梨果皮出現黑變的原因或結果之一。

正常(normal)



黑變(skin blackening)

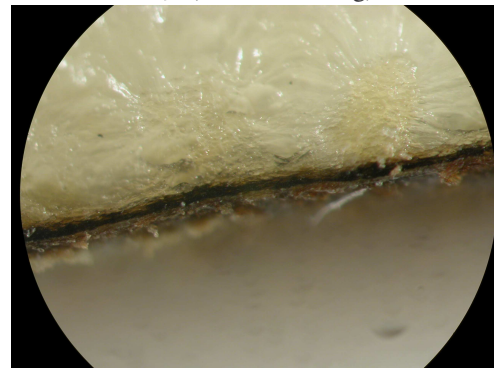


圖 5 ‘新雪’梨貯藏於 1℃ 經 12 週後，正常與黑變的果皮組織徒手切片之微觀結構

(100X)。

Fig. 5 Microscopic structures in skin tissues of normal and blackening disorder by free-hand cross-section in harvested fruits of ‘Shinsetsu’ pear stored at 1°C after 12 weeks (100X).

進一步地將這些果實表皮，進行石蠟切片進行顯微觀察與比較。圖 6 的結果顯示，貯藏於不同溫度的正常果皮，從表皮、皮層至果肉細胞均相當完整、飽滿及細密。而貯藏於 1°C 及 5°C 之黑變果皮，則發現表皮以下數層薄壁細胞發生崩解及塌陷等現象，但表皮及果肉組織的細胞與正常的果皮組織相似。貯藏於 9°C 之果皮黑變的程度較輕，則可發現皮層細胞壓扁塌陷的情況較緩和。至於 13°C 者，黑變果皮的皮層細胞變形塌陷的程度更低，反應出的果皮黑變的顏色即較不明顯(圖 2D)。由於 13°C 經過 12 週貯藏的雪梨果實，已有明顯失水情形(數據未列)，從切片上亦可看出其果肉細胞也呈扭曲皺縮變形現象。

‘新高’梨，也有因低溫(0-1°C)短期貯藏造成果皮黑變的生理障礙徵狀 (Choi *et al.*, 1995; Yang, 1997)。經 Park 與 Kwon(1999)以石蠟切片的解剖顯微觀察得知，‘新高’梨果皮的黑變徵狀，並非由於上表皮(epidermal)或下表皮(hypodermal)細胞的變異所造成，而是因為皮層(cortex)組織的薄壁細胞之塌陷和崩潰所導致的結果。

然而，不管果實表皮是否黑變，均不會影響果肉組織內的厚角細胞之形態。顯示溫度對果實表皮的黑變，可能與細胞的類別，或與細胞內的抗氧化酵素或褐化酵素有關。實驗的結果也顯示，貯藏溫度之高低，對於雪梨果實是否黑變，及黑變程度高低有直接的關係，主要是果實皮層組織的薄壁細胞對於低溫極為敏感，並造成果皮受到傷害。

### 三、‘新雪’梨果皮黑變組織內的抗氧化酵素系統的變化

從貯藏於 1°C 之雪梨黑變果皮萃取物所分析的 SOD 同功異構酶發現，有 4 條清晰的條帶呈現於膠

片上(圖 7 第 4、5、9、10 行)。而貯存於 1°C 無黑變的雪梨果皮所含的 SOD 同功異構酶亦有 4 個(圖 7 第 1、2、3、6、7、8 行)。編號 1 及 5 號的 SOD 為黑變果皮所特有，且黑變的面積愈大(第 4、9 行黑變面積 40%；第 5、10 行黑變面積 80%)，表現的活性愈高。編號 2 及 4 號為正常(無黑變)果皮所特有的 SOD，但活性似乎不高。編號 3 號的 SOD 在黑變果皮的活性有下降的趨勢，但黑變面積增加會再誘導其表現。而編號 6 號的 SOD 於黑變的果皮中大量增加。因此，由 SOD 同功異構酶的定性分析發現，在低溫所造成的黑變組織會誘導不同的 SOD，且活性或含量亦會大幅增加。CAT 同功異構酶的偵測方面，無論是否取自黑變的果皮，其染色的條帶均只有 1 條(圖 8)。但於黑變果皮所分析的 CAT 條帶表現量較無黑變者來的低。

雪梨果實採收後於低溫貯藏期間造成果皮黑變的徵狀，其黑變組織較正常果皮組織含有較高 SOD 活性或不同的同功異構酶，以及較低的 CAT 活性(圖 7、8)。這個結果顯示，氧自由基可能被歧化，但於黑變組織中去除低溫所誘導的  $H_2O_2$  能力降低。在鐵離子存在下，產生的  $H_2O_2$  及  $O_2^-$  可能會產生毒性更強的 ROS，如：氫氧自由基(hydroxyl radical,  $\cdot OH$ ) (Halliwell and Gutteridge, 1989)。因此，會增加果皮寒害的程度，造成黑變的產生。本研究的結果與 Sala (1998)的試驗結論相似，作者發現耐低溫的寬皮柑品種於低溫 2.5°C 貯藏 4 週後，較不耐低溫的品種具有較高的 CAT 活性，而不論是否耐低溫的品種，其 SOD 活性在低溫下均會增加。所以，耐低溫的關鍵在於是否能去除  $H_2O_2$ 。這個推論也在鴨梨的貯藏試驗得到印證。鴨梨置於 0°C 貯藏，產生黑心的果實較正常者的 SOD 及 CAT 活性均低，且含有較高的  $H_2O_2$  (Ju *et al.*, 1994)。然而，鳳梨果實於低溫(6、13 及 18°C)貯藏造成的黑心現象(blackheart)，其 CAT 的活性與正常溫度(25°C)貯藏的果實相比，卻無明顯的改變，暗示與 CAT 的活性無關(Zhou *et al.*, 2003)。不過，將  $H_2O_2$  轉變為  $H_2O$  的另一抗氧化酵素，抗壞血酸過氧化酶(ascorbate peroxidase, APX)，卻在黑心組織中有被顯著



抑制的情況。由以上的結果顯示，低溫造成果皮黑變可能與 CAT 活性有密切的關係。但造成組織黑變相關的褐化酵素(PAL 與 PPO)是否有影響，尙待進一步探討。

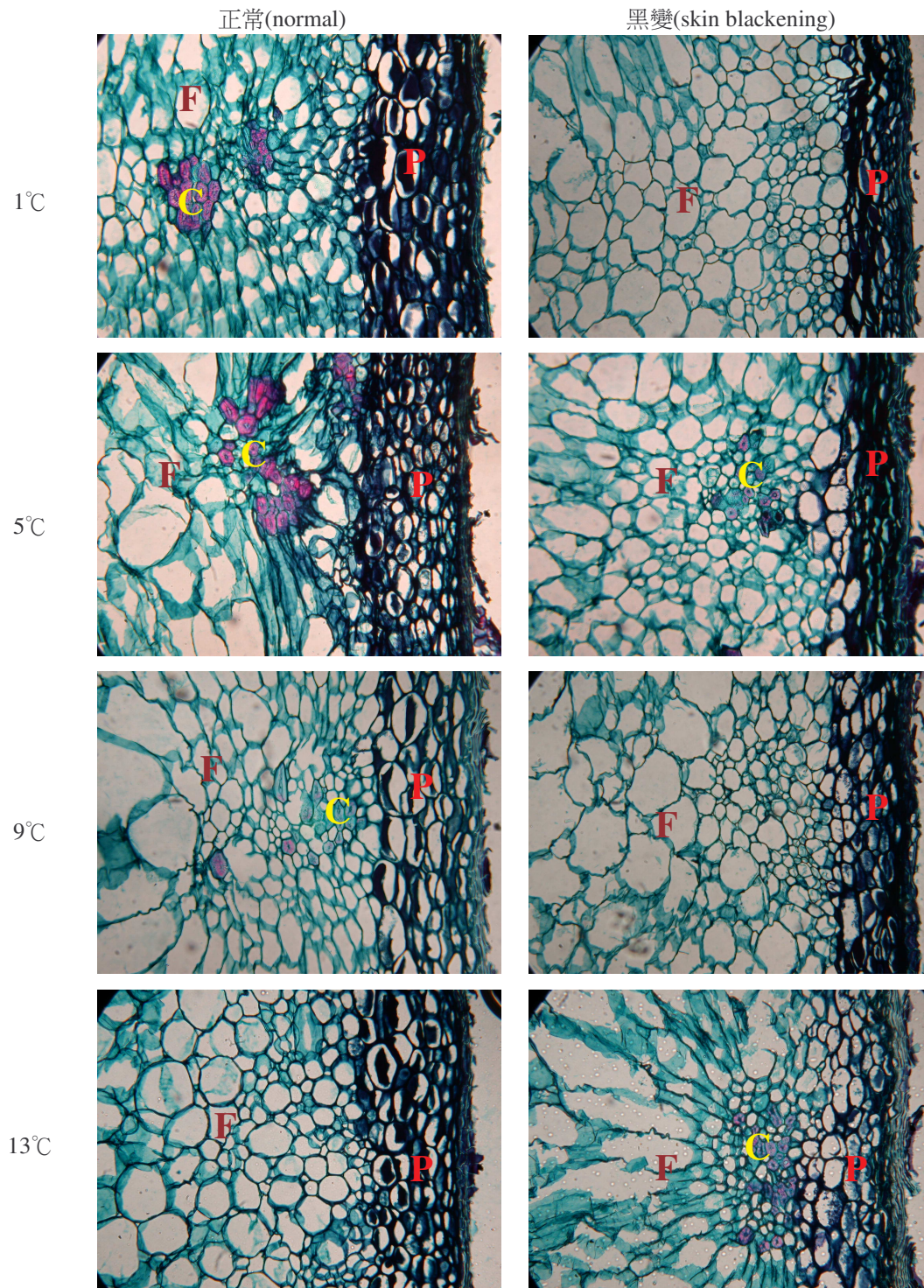


圖 6 `新雪`梨分別貯藏於 1、5、9、13℃ 經 12 週後，正常與黑變果實表皮組織的石蠟切片之微觀結構(200X)。P: 薄壁細胞；F: 果肉組織；C: 厚角細胞。

Fig. 6 Microscopic structures in skin tissues of normal and blackening disorder by paraffin section in harvested fruits of 'Shinsetsu' pear stored at 1, 5, 9, 13°C after 12 weeks, respectively (200X). P: parenchyma; F: flesh tissue; C: collenchyma.

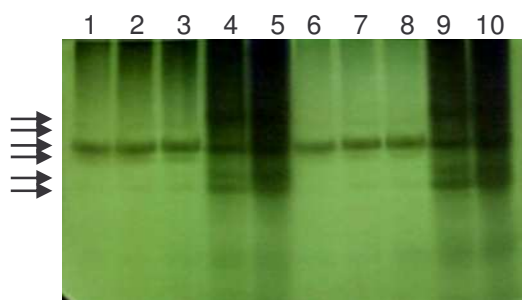


圖 7 「新雪」梨果皮之蛋白質經非變性膠體電泳分析後，進行 SOD 活性染色的情形。萃取液來自於 1℃ 貯藏 12 週後果皮組織。箭頭條帶代表各別的同功異構酶，由上至下依序為 1~6 號。膠片上每一行加入的蛋白質為 80  $\mu$ g。第 1、2、3、6、7、8 行為貯藏 1℃ 12 週後無黑變果皮者；第 4、9 行為貯藏 1℃ 12 週後果皮黑變面積 40%；第 5、10 行為貯藏 1℃ 12 週後果皮黑變面積 80%。

Fig 7 Staining of SOD activity after protein was separated by native PAGE. Extracts were obtained from skin of fruit after storage at 1℃ for 12 weeks. Arrows identify the bands representing individual isozymes. The order from up to down is number 1 to 6). Eighty microgram of total protein was loaded into each lane. Lanes 1, 2, 3, 6, 7, and 8 were normal skin of fruit after storage at 1℃ for 12 weeks; lanes 4 and 9 were 40% skin blackening area after storage at 1℃ for 12 weeks; and lanes 5 and 10 were 80% skin- blackening area after storage at 1℃ for 12 weeks.

## 結 論

貯藏溫度之高低，對於「新雪」梨果皮是否黑變，及黑變程度高低都有直接的關係，主要是果實皮層的薄壁細胞對於低溫極為敏感，並導致果皮產生黑

變的寒害徵狀。就採收後的果實而言，9℃ 以上為其安全貯藏溫度。就其在低溫貯藏發生果皮黑變寒害徵狀的嚴重程度而言，不論以其發生黑斑面積百分比或者以黑變果實數百分比作為指標，都是以在 1℃ 者最嚴重，5℃ 及 9℃ 次之，並且隨著低溫貯藏期間

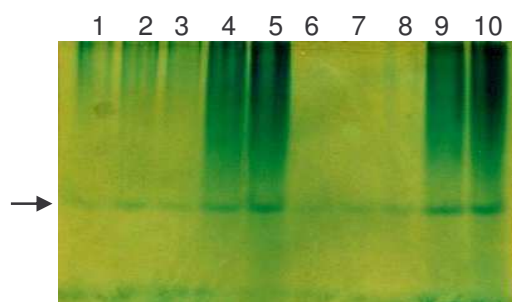


圖 8. 「新雪」梨果皮之蛋白質經非變性膠體電泳分析後，進行 CAT 活性染色的情形。萃取液來自於 1℃ 貯藏 12 週後果皮組織。箭頭條帶代表各別的同功異構酶。膠片上每一行加入的蛋白質為 80  $\mu$ g。第 1、6 行為貯藏 1℃ 12 週後果皮黑變面積 40%；第 2、3、7、8 行為貯藏 1℃ 12 週後果皮黑變面積 80%；第 4、5、9、10 行為貯藏 1℃ 12 週後無黑變果皮者。

Fig.8 Staining of CAT activity after protein was separated by native PAGE. Extracts were obtained from skin of fruit after storage at 1℃ for 12 weeks. Arrows identify the bands representing individual isozymes. Eighty microgram of total protein was loaded into each lane. Lanes 1 and 6 were 40% skin-blackening area after storage at 1℃ for 12 weeks; lanes 2, 3, 7 and 8 were 80% skin blackening area after storage at 1℃ for 12 weeks; and lanes 4, 5, 9, and 10 were normal skin of fruit after storage at 1℃ for 12 weeks.

的延長而更加嚴重。採收後果實於低溫貯藏期間造成果皮黑變的徵狀，其黑變組織較正常果皮組織含



有較高的 SOD 活性或不同型態的同功異構酶，以及較低的 CAT 活性。氧化逆境可能參與採收後果實因低溫所誘導的果皮傷害。而正常果皮較之黑變果皮，可能具有較有效的抗氧化酵素系統。

## 誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會農糧署之經費補助(93 農科-1.1.2-糧-Z 1)，特表謝忱。本系呂宗佳名譽教授提供寶貴意見，石正中教授及張允瓊講師慨借儀器，葉賢舜、賴慧真、賴虹仔同學協助試驗進行，謹此一併致謝。

## 參考文獻

- 王自存。1999。雪梨果實在低溫儲藏過程中果皮之黑色病變。國立台灣大學園藝學系園產品處理研究室研究報告。17 頁。台北。
- 朱長志。1966。梨。第八輯園藝作物第一篇果樹第三十章。“農家要覽”。pp.453-470。台灣省農林廳。
- 李信芳。1980。梨。“台灣農家要覽（上）”。pp.803-815。豐年社。台北。
- 李美蘭。1988。橫山梨果實採收後生理及低溫障礙。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。82 頁。台北。
- 呂明雄、李堂察。1996。寄接梨果實採收與貯藏。降低寄接梨生產成本推廣手冊。pp.55~57。台灣省政府農林廳。
- 林嘉興、廖萬正、林信山、張林仁。1991。梨栽培之回顧與展望。台灣果樹之生產及研究發展研討會專刊。pp.379~396。台中區農業改良場。彰化。
- 侯惠茹。2002。砂梨之低溫貯藏與生理障礙之研究。國立台灣大學園藝研究所碩士論文。122 頁。台北。
- 郭純德、尤進欽。2004。採收後新雪梨果皮黑變現象初探。國立宜蘭大學農業推廣季刊 31:1-3。
- 蔡淑華。1975。植物組織切片技術綱要。72 頁。茂昌圖書公司。台北。
- 劉富文。1994。園產品採收後處理及貯藏技術。pp.7-47。台灣省青果運銷合作社。台北。
- Anderson, M. D., T. K. Prasad, and C. R. Stewart. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 1247-1257.
- Baba, N., A. Tsuru, T. Ibaraki, and T. Hirano. 1990. Preventing black speck injury of late maturing Japanese pear (1) The cause of black speck injury of Japanese pear ‘Shinsetsu’ and the storage condition for preventing the injury. *Bull. Fukuoka. Agric. Res. Cent.* B-10: 77-80. (In Japanese; English abstract)
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Choi, S. J., Y. P. Hong, and Y. B. Kim. 1995. Prestorage treatments to prevent fruit skin blackening during cold storage of Japanese pear ‘Shingo’ (‘Niitaka’). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 36(2): 218-223.
- Gupta, A. S., J. L. Heinen, A. S. Holaday, J. J. Burke, and R. D. Allen. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(4): 1629-1633.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1989. Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trans Biochem. Sci.* 11: 375.
- Hodges, D. M., C. J. Andrews, D. A. Johnson, and R. I. Hamilton. 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *J. Exp. Bot.* 48(310): 1105 - 1113.
- Ingle, M. 2002. Physiology and biochemistry of superficial scald of apples and pears. *Hort. Rev.* 27: 227-267.
- Ju, Z. G., Y. B. Yuan, C. L. Liu, S. M. Zhan, and S. H. Xin. 1994. Effect of low temperature on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and

- brown heart of Chilli and Yali ( *Pyrus bretschneideri* R).  
Sci. Agr. Sin. 27: 77-81.
- Kader, A. A. 2002. Postharvest biology and technology:  
An overview. P.39 -47. In : A.A. Kader. (Technical  
Editor). Postharvest Technology of Horticultural Crops.  
3<sup>rd</sup> ed. Univ. of Calif., Div. of Agric. & Nat. Resources,  
Publication#3311.
- Kang, H. M. and M. E. Saltveit. 2002. Reduced chilling  
tolerance in elongating cucumber seedling radicles is  
related to their reduced antioxidant enzyme and  
DPPH-radical scavenging activity. *Physiol. Plant.*  
115(2): 244-250.
- Kerdnaimongkol, K. and W. R. Woodson. 1999. Inhibition  
of catalase by antisense RNA increases susceptibility to  
oxidative stress and chilling injury in transgenic tomato  
plants. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 124(4): 330-336.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins  
during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* 227: 680-685.
- Larsen, F. E., S. S. Higgins, M. E. Patterson, V. K.  
Jandhyala, and W. Nichols. 1993. Quality, maturity, and  
storage of Asian pears grown in central Washington. *J.*  
*Prod. Agric.* 6(2): 247-251.
- Lee, D. H. and C. B. Lee. 2000. Chilling stress-induced  
changes of antioxidant enzymes in the leaves of  
cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.*  
159(1): 75-85.
- Mitcham, E. J. and F. G. Mitchell. 2002. Postharvest  
handling systems: Pome fruits. P. 333-344. In: A. A.  
Kader. (Technical Editor). Postharvest Technology of  
Horticultural Crops. 3<sup>rd</sup> ed. Univ. of Calif., Div. of Agric.  
& Nat. Resources, Publication#3311.
- Ning, B., Y. Kubo, A. Inaba, and R. Nakamura. 1997.  
Softening characteristics of Chinese pear 'Yali' fruit  
with special relation to changes in cell wall  
polysaccharides and their degrading enzymes. *Sci. Rep.*  
*Fac. Agri.* 86: 71-78.
- Park, Y. and K. Kwon. 1999. Prevention of the incidence of  
skin blackening by postharvest curing procedures and  
related anatomical changes in 'Niitaka' pears. *J. Kor.*  
*Hort. Soc.* 40(1): 65-69.
- Payton, P., R. Webb, D. Kornyejev, R. Allen, and A. S.  
Holaday. 2001. Protecting cotton photosynthesis during  
moderate chilling at high light intensity by increasing  
chloroplastic antioxidant enzyme activity. *J. Exp. Bot.*  
52(365): 2345-2354.
- Prasad, T. K., M. D. Anderson, B. A. Martin, and C. R.  
Stewart. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative  
stress in maize seedlings and a regulatory role for  
hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6(1): 65-74.
- Purvis, A. C., R. L. Shewfelt, and J. W. Gegogine. 1995.  
Superoxide production by mitochondria isolated from  
green bell pepper fruit. *Physiol. Plant.* 94: 743-749.
- Rao, M. V., B. A. Hale, and D. P. Ormrod. 1995.  
Amelioration of ozone-induced oxidative damage in  
wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant*  
*Physiol.* 109: 421-432.
- Sala, J. M. 1998. Involvement of oxidative stress in  
chilling injury in cold-stored mandarin fruits.  
*Postharvest Biol. Technol.* 13: 255-261.
- Woodbury, W., A. K. Spencer, and M. A. Stahmann. 1971.  
An improved procedure using ferricyanide for detecting  
catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44: 301-305.
- Yang, Y. J. 1997. Inhibition of the skin blackening by  
postharvest factors in 'Niitaka' pear fruit. *J. Kor.*  
*Hort. Soc. Hort. Sci.* 38(6): 730-733.
- Zhou, Y., J. M. Dahler, S. J. R. Underhill, and R. B. H.  
Wills. 2003. Enzymes associated with blackheart  
development in pineapple fruit. *Food Chem.* 80:  
565-572.

94 年 09 月 29 日投稿

94 年 12 月 22 日接受