

许林林, 张咏琦, 庞夫花, 等. 不同草莓种质资源果实中有机酸组分与含量特征分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2226-2236.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.005

不同草莓种质资源果实中有机酸组分与含量特征分析

许林林, 张咏琦, 庞夫花, 刘婉, 袁华招, 王庆莲, 乔玉山, 赵密珍
(江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了探究草莓果实中有机酸的积累特征及其多样性, 为草莓种质资源的科学评价与精准鉴定提供重要的参考依据, 本研究优化了应用高效液相色谱法测定草莓果实中有机酸的方法, 并对来源于 8 个种的 70 份草莓种质资源的成熟果实进行有机酸测定。结果表明: 8 个种的草莓果实中总酸含量差异明显, 总酸含量由高到低依次为东北草莓、绿色草莓、森林草莓、峨眉草莓、栽培草莓、五叶草莓、黄毛草莓、西藏草莓。草莓果实中主要有机酸为柠檬酸和苹果酸。不同种质草莓成熟果实中柠檬酸含量为 3.039 6~23.787 3 mg/g, 苹果酸含量为 1.335 9~14.830 3 mg/g。柠檬酸含量最高的是东北草莓 DB3, 最低的是栽培草莓桃熏; 苹果酸含量最高的是栽培草莓石头河子, 最低的是东北草莓 DB4。相关性分析结果表明, 总酸含量与柠檬酸含量、苹果酸含量呈极显著或显著正相关, 且总酸含量与柠檬酸含量均呈偏态分布。聚类分析结果不仅揭示了不同种草莓间有机酸积累的相关性, 还反映了不同地域草莓育种者在有机酸性状筛选方面的偏好性。优化后的高效液相色谱法可快速分离、鉴定草莓果实中的有机酸组分。同时, 筛选出的有机酸含量特异的种质资源可作为草莓新品种选育的亲本材料。

关键词: 草莓; 高效液相色谱法; 有机酸; 柠檬酸; 苹果酸

中图分类号: S668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)12-2226-11

Analysis of components and contents of organic acids in fruits of different strawberry germplasm resources

XU Linlin, ZHANG Yongqi, PANG Fuhua, LIU Wan, YUAN Huazhao, WANG Qinglian, QIAO Yushan, ZHAO Mizhen

(Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: To investigate the accumulation characteristics and diversity of organic acids in strawberry fruits, and to provide a theoretical reference for the scientific evaluation and precise identification of strawberry germplasm resources, this study optimized a method for determining organic acids in strawberry fruits using high-performance liquid chromatography

(HPLC) method. Organic acid content was measured in mature fruits from 70 strawberry germplasm samples, covering eight species. The results showed that there were significant differences in total acid content among the eight species, ranked from highest to lowest as follows: *Fragaria mandshurica*, *Fragaria viridis*, *Fragaria vesca*, *Fragaria emeimensis*, cultivated strawberries (*Fragaria* × *ananassa*), *Fragaria pentaphylla*, *Fragaria nilgerrensis*, and *Fragaria nubicola*. The main organic acids in strawberry fruits were citric acid and malic acid. The citric acid content in mature fruits of different germplasm resources varied from 3.039 6

收稿日期: 2024-09-09

基金项目: 江苏省农业科学院探索性颠覆性创新计划项目[ZX(21)1207]; 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBGS(2021)083]; 农业农村部作物种质资源保护项目(19240424); 农业农村部资源精准鉴定项目(19240690); 江苏现代农业产业技术体系建设项目[JATS(2023)386]

作者简介: 许林林(1989-), 男, 江苏扬州人, 博士, 助理研究员, 研究方向为草莓果实品质形成与调控。(E-mail) 20210039@jaas.ac.cn

通讯作者: 赵密珍, (E-mail) zhaomz@jaas.ac.cn; 乔玉山, (E-mail) qiaoyushan@njau.edu.cn

mg/g to 23.787 3 mg/g, and malic acid content ranged from 1.335 9 mg/g to 14.830 3 mg/g. The highest citric acid content was found in *Fragaria mandshurica* DB3, while the lowest was found in cultivated strawberry Tokun. The highest malic acid content was found in cultivated strawberry Shitouhezi, and the lowest was found in *Fragaria mandshurica* DB4. The results of correlation analysis showed that total acid content was significantly or significantly positively correlated with both citric acid content and malic acid content, and both total acid content and citric acid content exhibited skewed distributions. The results of cluster analysis not only revealed the correlation of organic acid accumulation among different strawberry species, but also reflected the preferences of breeders from different regions in the screening of organic acid traits. The optimized HPLC method can rapidly separate and identify organic acid components in strawberry fruits. Additionally, the selected germplasm resources with specific organic acid contents can be used as parental materials for breeding new strawberry varieties.

Key words: strawberry; high-performance liquid chromatography (HPLC) method; organic acids; citric acid; malic acid

草莓(*Fragaria×ananassa*)属蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria* L.),是一种多年生草本植物,营养丰富,酸甜多汁,广受消费者的青睐^[1]。草莓果实有机酸含量是评估果实内在品质的重要指标之一,而有机酸种类及含量的差异赋予了果实在风味上的独特性^[2-3]。Milivojevic 等^[4]对野生草莓和栽培草莓的有机酸含量进行测定,发现栽培草莓中的有机酸含量明显低于野生草莓。Liu 等^[5]对4个栽培草莓品种进行有机酸组分与含量的测定,发现4个栽培草莓品种果实中均是柠檬酸含量最高,此外还含有苹果酸、草酸和琥珀酸。赵密珍等^[6]的研究结果表明,在自然五倍体野生草莓果实中,苹果酸是该种野生草莓果实中的主要有机酸,苹果酸含量占总酸含量的86%以上。然而,目前对草莓果实有机酸的研究涉及的草莓种及品种较少,尚缺乏规律性的了解。

目前,检测有机酸常用的方法主要有高效液相色谱(HPLC)法、气相色谱法、气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)、离子色谱法和毛细管电泳法等^[7-15],其中,HPLC法是进行植物有机酸分析的较为普遍的方法。梁力平等^[16]利用高效液相色谱法对99个新疆红枣品种的有机酸进行测定,发现苹果酸、奎宁酸和酒石酸是新疆红枣中的主要有机酸,还检测到了草酸、马来酸、柠檬酸和富马酸。李彩林等^[17]建立了高效、快速检测红香酥梨中有机酸的高效液相色谱检测方法,检测出红香酥梨中的6种有机酸含量。李佳秀等^[18]建立了一套利用高效液相色谱法测定草莓汁中有机酸含量的方法,虽然该方法能有效检测出草莓果实中有机酸的积累情况,但其对有机酸组分检测的灵敏度不够且分离度不高。

本研究拟以8个种的70份草莓资源的果实为

试验材料,优化适用于草莓果实有机酸测定的高效液相色谱条件,测定不同种草莓的有机酸含量和种类,揭示不同种草莓果实在有机酸组成上的差异,以期栽培草莓品质改良提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

表1显示,供试的70份草莓种质资源来自美国、加拿大、荷兰、德国、日本及中国四川省、西藏自治区、甘肃省、内蒙古自治区、吉林省、黑龙江省等,包括12份森林草莓(*Fragaria vesca*)、6份东北草莓(*Fragaria mandshurica*)、13份黄毛草莓(*Fragaria nilgerrensis*)、3份西藏草莓(*Fragaria nubicola*)、2份峨眉草莓(*Fragaria emeiensis*)、17份五叶草莓(*Fragaria pentaphylla*)、5份绿色草莓(*Fragaria viridis*)和12份栽培草莓(*Fragaria×ananassa*),均种植于江苏省农业科学院的国家桃、草莓种质资源圃。采样过程中尽量选择果型、大小一致的成熟果实,每份资源采集15个果实,采摘后每5个果实混样用液氮速冻,置于-80℃冰箱中保存备用。

本研究所用的柠檬酸、奎宁酸、苹果酸、莽草酸及富马酸标准品均购自上海源叶生物科技有限公司,抗坏血酸标准品购自北京索莱宝科技有限公司,偏磷酸(分析纯)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 准确称取2.0 g偏磷酸固体,溶于1.0 L超纯水中,并用超声波振荡,配制成0.2%的偏磷酸溶液。将0.2%的偏磷酸溶液与无水乙醇以1:4(体积比)的比例进行混合,配成有机酸提取液。将采集的野生草莓成熟果实样品置于液氮中冷冻后再进

行充分研磨,精确称取 0.8 g 装到 10.0 mL 的离心管中,并加入 8.0 mL 有机酸提取液,盖紧管盖,颠倒、摇匀。超声波萃取 10 min,随后置于 4 ℃ 冰箱中静置 24 h。静置 24 h 后,再次超声波处理 10 min,随后常温条件下 10 000 r/min 离心 10 min。移取 800.0 μL 上

清液至 2.0 mL 离心管中,用真空浓缩仪进行浓缩。浓缩完毕后,向离心管中加入 1.6 mL 超纯水,涡旋振荡 1 min,用 1.0 mL 注射器经 0.22 μm 的滤膜过滤至液相专用样品瓶中。设 3 次重复。

表 1 70 份草莓种质资源的信息

Table 1 Information of 70 strawberry germplasm resources

序号	种	样本名称	来源	序号	种	样本名称	来源
1	东北草莓(<i>Fragaria mandshurica</i>)	DB1	中国内蒙古自治区	36	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM1	中国四川省
2	东北草莓(<i>Fragaria mandshurica</i>)	DB2	中国黑龙江省	37	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM2	中国云南省
3	东北草莓(<i>Fragaria mandshurica</i>)	DB3	中国吉林省	38	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM3	中国湖北省
4	东北草莓(<i>Fragaria mandshurica</i>)	DB4	中国黑龙江省	39	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM4	中国甘肃省
5	东北草莓(<i>Fragaria mandshurica</i>)	DB5	中国黑龙江省	40	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM5	中国甘肃省
6	东北草莓(<i>Fragaria mandshurica</i>)	DB6	中国吉林省	41	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM6	中国湖北省
7	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL1	美国	42	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM7	中国湖北省
8	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL2	美国	43	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM8	中国云南省
9	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL3	美国	44	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM9	中国湖北省
10	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL4	美国	45	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM10	中国湖北省
11	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL5	中国吉林省	46	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM11	中国云南省
12	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL6	美国	47	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM12	中国四川省
13	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL7	美国	48	黄毛草莓(<i>Fragaria nilgerrensis</i>)	HM13	中国云南省
14	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL8	中国吉林省	49	绿色草莓(<i>Fragaria viridis</i>)	LS1	德国
15	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL9	中国吉林省	50	绿色草莓(<i>Fragaria viridis</i>)	LS2	中国黑龙江省
16	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL10	美国	51	绿色草莓(<i>Fragaria viridis</i>)	LS3	中国新疆维吾尔自治区
17	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL11	美国	52	绿色草莓(<i>Fragaria viridis</i>)	LS4	中国黑龙江省
18	森林草莓(<i>Fragaria vesca</i>)	SL12	美国	53	绿色草莓(<i>Fragaria viridis</i>)	LS5	德国
19	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY1	中国四川省	54	峨眉草莓(<i>Fragaria emeiensis</i>)	EM1	中国四川省
20	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY2	中国甘肃省	55	峨眉草莓(<i>Fragaria emeiensis</i>)	EM2	中国四川省
21	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY3	中国四川省	56	西藏草莓(<i>Fragaria nubicola</i>)	XZ1	中国西藏自治区
22	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY4	中国甘肃省	57	西藏草莓(<i>Fragaria nubicola</i>)	XZ2	中国西藏自治区
23	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY5	中国甘肃省	58	西藏草莓(<i>Fragaria nubicola</i>)	XZ3	中国西藏自治区
24	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY6	中国甘肃省	59	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	红颜	日本
25	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY7	中国甘肃省	60	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	桃熏	日本
26	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY8	中国四川省	61	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	火焰	中国云南省
27	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY9	中国甘肃省	62	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	川-6 红	中国四川省
28	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY10	中国甘肃省	63	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	紫金久红	中国江苏省
29	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY11	中国甘肃省	64	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	甜查理	美国
30	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY12	中国甘肃省	65	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	宁丰	中国江苏省
31	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY13	中国甘肃省	66	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	爱知 6 号	日本
32	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY14	中国甘肃省	67	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	康费吐拉	荷兰
33	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY15	中国甘肃省	68	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	里瓦	荷兰
34	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY16	中国四川省	69	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	石头河子	中国黑龙江省
35	五叶草莓(<i>Fragaria pentaphylla</i>)	WY17	中国甘肃省	70	栽培草莓(<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>)	奖赏	加拿大

1.2.2 HPLC 条件分析 HPLC 使用仪器为安捷伦公司 1260 型高效液相色谱仪。色谱柱型号:ZORB-

AX SB-Aq (4.6 mm×250.0 mm×5.0 μm)。流动相:0.012 5%的偏磷酸以 5.0 mL/min 洗脱 5 min,随

后将流速调整到 0.5 mL/min,平衡 30 min,进样量为 5.0 μ L。采用紫外检测器进行检测,设置波长为 210 nm,柱温为 25 $^{\circ}$ C,检测时间为 20 min。

分别将柠檬酸、奎宁酸、苹果酸、莽草酸及富马酸配制成标准溶液,绘制标准曲线,基于峰面积使用标准曲线法计算样品中对应有机酸的含量。

1.2.3 数据分析 采用 Microsoft Excel 2013 和 SPSS 软件进行数据处理。用 R 语言 tidyverse、ggplot2 和 RColorBrewer 包绘制柱状图,利用 gclus、vegan 和 cluster 包进行聚类分析。

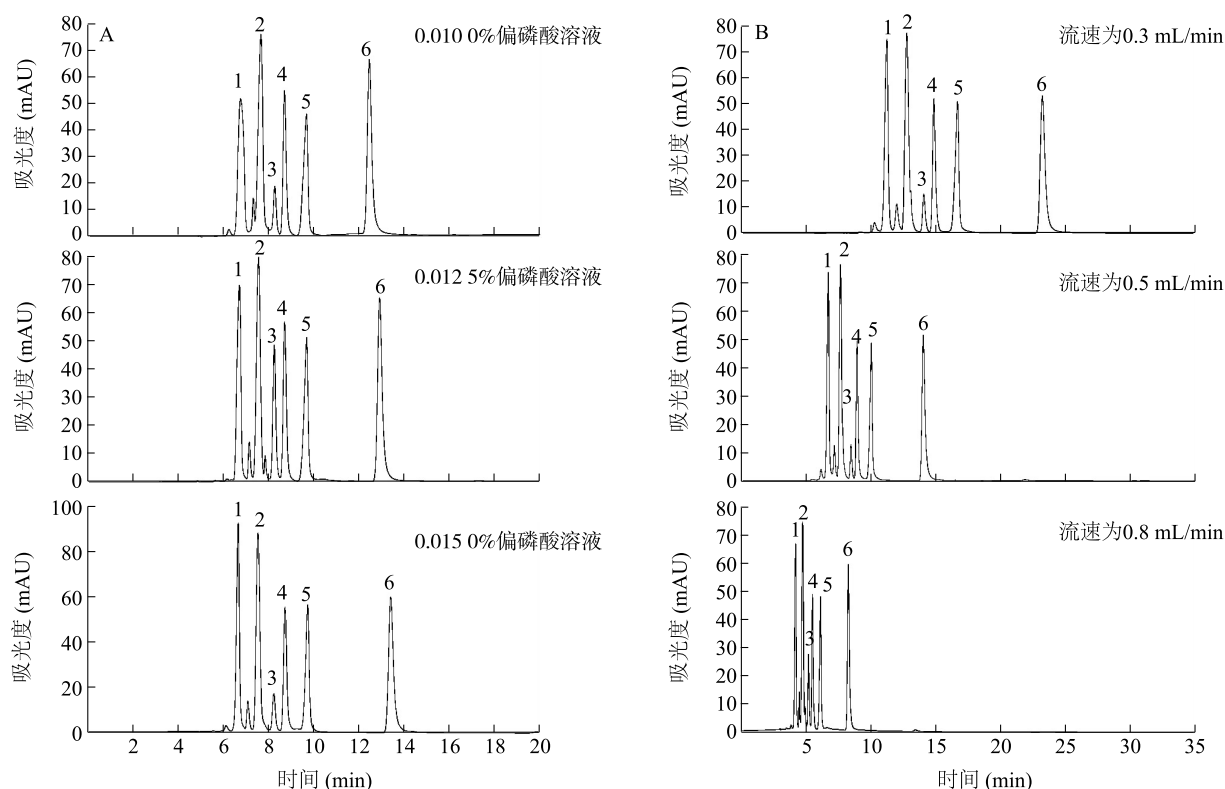
2 结果与分析

2.1 HPLC 条件优化

分别以 0.010 0%、0.012 5%和0.015 0%的偏磷酸溶液为流动相,对 6 种有机酸标准品混合液进行液相分离效果检测和出峰时间鉴定。由图 1A 可

知,流动相对 6 种有机酸的分离效果和峰型具有一定的影响,随着偏磷酸体积分数的升高,出峰时间逐渐变长。当流动相为0.010 0%的偏磷酸溶液时,1 号峰峰型较差,2 号峰和 3 号峰分离效果不太好;当流动相为0.012 5%和0.015 0%的偏磷酸溶液时,分离效果差异不大,但当0.012 5%的偏磷酸溶液作为流动相时,峰型更好,出峰时间更短。因此选择 0.012 5%的偏磷酸溶液为流动相。

流动相流速初步设定为 0.3 mL/min、0.5 mL/min和 0.8 mL/min。如图 1B 所示,当流速为 0.3 mL/min时,有机酸的出峰时间较长;当流速为 0.5 mL/min时,出峰时间适中,并且能将 6 种有机酸有效分开;当流速为 0.8 mL/min时,虽然 6 种有机酸的出峰时间短,但各个峰之间较为集中,分离效果不佳。因此选择流动相的流速为 0.5 mL/min。



1: 奎宁酸;2: 苹果酸;3: 抗坏血酸;4: 柠檬酸;5: 莽草酸;6: 富马酸。

图1 不同色谱条件下有机酸标准品混合液的高效液相色谱出峰图

Fig.1 Elution profile of organic acid mixtures under different chromatographic conditions

此外,为检验 HPLC 条件优化后该方法的精密度,将除抗坏血酸外的 5 种有机酸标准品混合液连续进样 5 次,根据峰面积分别计算奎宁酸、苹果酸、柠檬

酸、莽草酸和富马酸的相对标准偏差(*RSD*)。表 2 显示,奎宁酸、苹果酸、柠檬酸、莽草酸和富马酸的 *RSD* 分别是 0.23%、0.16%、0.49%、0.33%、0.17%,*RSD* 均

小于 0.50%,说明该方法的精密度良好。根据上述测得的各有机酸的峰面积及绘制的标准曲线,分别计算有机酸标准品混合液中各有机酸的含量,再采用添加标样法测定回收率。依据加入的标准品的含量和实

际的检出值计算该方法的回收率,表 3 显示,奎宁酸、苹果酸、柠檬酸、莽草酸和富马酸的回收率分别为 100.01%、96.36%、97.98%、100.48%和 97.03%,说明该方法的准确度较高。

表 2 有机酸组分精密度试验结果

Table 2 Organic acid component precision test results

有机酸	峰面积(mAU·s)						相对标准偏差(%)
	第 1 次进样	第 2 次进样	第 3 次进样	第 4 次进样	第 5 次进样	平均值	
奎宁酸	823.92	825.21	826.28	828.39	828.99	826.56	0.23
苹果酸	980.79	982.14	982.49	984.68	984.73	982.97	0.16
柠檬酸	642.96	646.25	648.49	651.02	651.52	648.05	0.49
莽草酸	432.70	433.05	432.08	431.22	429.06	431.62	0.33
富马酸	999.29	1 001.02	1 002.14	1 003.82	1 003.53	1 001.96	0.17

表 3 有机酸组分回收率试验结果

Table 3 Organic acid component recovery test results

有机酸	含量(mg/mL)	加标量(mg/mL)	理论值(mg/mL)	实际值(mg/mL)	回收率(%)
奎宁酸	0.070 4	0.065 2	0.135 6	0.135 6	100.01
苹果酸	0.748 3	0.652 2	1.400 4	1.349 4	96.36
柠檬酸	0.739 6	0.652 2	1.391 8	1.363 6	97.98
莽草酸	0.001 9	0.002 5	0.004 4	0.004 4	100.48
富马酸	0.002 7	0.002 3	0.005 0	0.004 8	97.03

2.2 草莓属成熟果实中有机酸的组成与含量特征

通过 HPLC 法测定了 70 份草莓种质成熟果实中 5 种有机酸的含量,由于在有机酸测定过程中抗坏血酸降解较快,为保证试验结果的准确性,本研究暂未测定抗坏血酸的含量。从图 2 可以看出,不同

种草莓果实中总酸含量存在差异。东北草莓的总酸含量最高,为 21.872 0 mg/g;绿色草莓、森林草莓和峨眉草莓的总酸含量依次降低,分别为 20.544 0 mg/g、18.816 3 mg/g 和 16.940 6 mg/g;栽培草莓的总酸含量为 14.415 4 mg/g;五叶草莓、黄毛草莓的总酸含量较低,分别为 13.705 4 mg/g 和 12.475 6 mg/g;西藏草莓的总酸含量最低,为 10.344 2 mg/g。

进一步对来源于 8 个种的草莓有机酸组成进行分析,结果表明,柠檬酸和苹果酸是草莓成熟果实中主要的有机酸组分,且柠檬酸和苹果酸的占比在不同种之间存在较大差异。除栽培草莓外,其他 7 个种的草莓中柠檬酸均是含量最高的有机酸,东北草莓是柠檬酸含量最高的种;苹果酸含量仅次于柠檬酸;奎宁酸、莽草酸和富马酸含量较低,尤其是莽草酸和富马酸,仅在少部分草莓种中被检测到(图 2)。

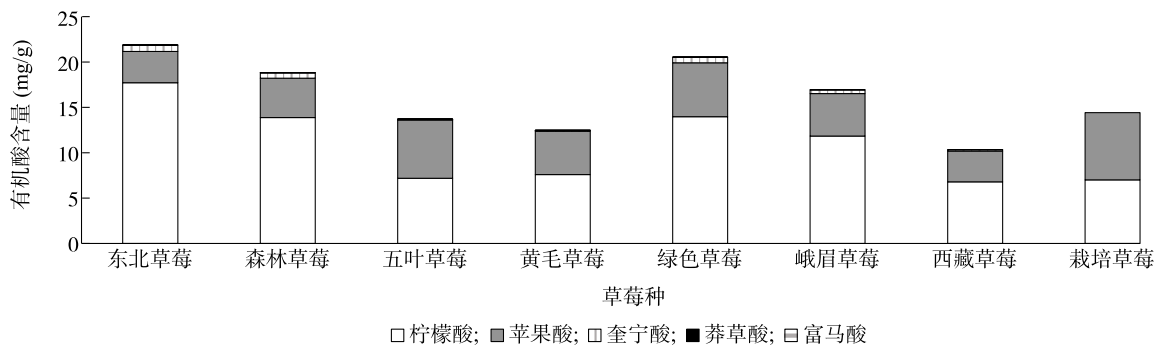


图 2 8 个草莓种成熟果实中的有机酸含量

Fig.2 Organic acid content of ripe fruits in eight strawberry species

分别统计了 5 种有机酸在每一份草莓资源中的含量,发现柠檬酸、苹果酸和奎宁酸的含量在不同草

莓种质资源间的差异非常明显。70 份种质资源中仅有 13 份是苹果酸含量高于柠檬酸含量,包括 HM12、

WY7、WY9、WY10、WY12、WY15、红颜、桃熏、石头河子、火焰、川-6红、紫金久红及里瓦,其余草莓资源成熟果实中均是柠檬酸含量占主导地位,其中柠檬酸含量最高的种质是东北草莓 DB3,达23.787 3 mg/g。苹果酸的含量变化范围为1.335 9~14.830 3 mg/g,栽培草莓石头河子中的苹果酸含量最高,而东北草莓 DB4

中的苹果酸含量最低。奎宁酸含量的变化范围为0~1.447 2 mg/g,含量最高的种质也是东北草莓 DB3,值得注意的是,在供试的 12 份栽培草莓中均未能检测到奎宁酸。莽草酸和富马酸在 8 个草莓种的果实中含量均较低,其变化范围分别为0~0.028 2 mg/g和0~0.058 0 mg/g(表 4)。

表 4 70 份草莓种质资源成熟果实中有机酸含量

Table 4 Organic acid content in ripe fruits of 70 strawberry germplasm resources

样本名称	有机酸含量(mg/g)					有机酸含量占总酸含量的比例(%)				
	柠檬酸	苹果酸	奎宁酸	莽草酸	富马酸	柠檬酸	苹果酸	奎宁酸	莽草酸	富马酸
DB1	17.470 4	4.581 8	0.383 7	0	0	77.87	20.42	1.71	0	0
DB2	18.688 4	2.509 0	0.546 6	0.004 2	0	85.93	11.54	2.51	0.02	0
DB3	23.787 3	5.830 1	1.447 2	0	0	76.57	18.77	4.66	0	0
DB4	13.009 5	1.335 9	0.554 0	0.005 1	0	87.29	8.96	3.72	0.03	0
DB5	16.211 1	1.752 3	0.568 4	0	0	87.48	9.46	3.07	0	0
DB6	17.113 6	4.711 1	0.722 5	0	0	75.90	20.89	3.20	0	0
SL1	15.600 4	4.192 7	0.566 5	0	0	76.62	20.59	2.78	0	0
SL2	14.157 0	4.621 9	0.743 3	0	0	72.52	23.68	3.81	0	0
SL3	16.798 8	2.700 5	0.539 1	0	0	83.83	13.48	2.69	0	0
SL4	18.022 2	2.488 6	0.526 1	0	0.021 3	85.58	11.82	2.50	0	0.10
SL5	9.053 1	6.624 4	0.765 9	0	0	55.06	40.29	4.66	0	0
SL6	13.892 8	2.301 1	0.479 8	0	0.021 6	83.21	13.78	2.87	0	0.13
SL7	14.039 2	2.435 7	0.903 4	0	0	80.79	14.02	5.20	0	0
SL8	15.623 2	8.932 3	0.518 7	0.005 9	0	62.29	35.62	2.07	0.02	0
SL9	9.700 4	6.564 5	0.416 5	0	0	58.15	39.35	2.50	0	0
SL10	18.251 1	6.011 1	0.670 3	0	0	73.20	24.11	2.69	0	0
SL11	12.166 1	2.822 8	0.536 7	0.004 3	0.026 4	78.21	18.15	3.45	0.03	0.17
SL12	9.215 7	2.375 1	0.458 8	0	0	76.48	19.71	3.81	0	0
WY1	10.452 0	5.345 9	0	0	0	66.16	33.84	0	0	0
WY2	7.446 0	6.262 1	0	0	0	54.32	45.68	0	0	0
WY3	9.248 6	4.746 4	0.413 1	0.005 0	0.021 7	64.07	32.88	2.86	0.03	0.15
WY4	8.989 9	8.028 9	0	0	0	52.82	47.18	0	0	0
WY5	7.166 7	5.622 0	0	0	0	56.04	43.96	0	0	0
WY6	4.414 3	4.259 6	0	0	0	50.89	49.11	0	0	0
WY7	3.464 9	5.108 5	0	0.010 6	0	40.36	59.51	0	0.12	0
WY8	8.541 6	6.307 8	0	0	0	57.52	42.48	0	0	0
WY9	6.461 7	9.742 0	0	0	0	39.88	60.12	0	0	0
WY10	6.066 3	7.068 8	0	0	0	46.18	53.82	0	0	0
WY11	7.787 2	7.431 4	0	0	0	51.17	48.83	0	0	0
WY12	8.333 4	9.714 3	0	0	0	46.17	53.83	0	0	0
WY13	6.007 8	4.911 5	0.255 9	0	0.021 5	53.66	43.87	2.29	0	0.19
WY14	7.105 3	6.201 7	0	0	0	53.40	46.60	0	0	0
WY15	6.912 2	7.514 5	0.456 8	0.006 9	0	46.42	50.47	3.07	0.05	0
WY16	8.109 5	6.288 8	0.546 6	0.008 2	0	54.23	42.06	3.66	0.05	0
WY17	5.614 8	4.568 4	0	0	0	55.14	44.86	0	0	0

续表4 Continued4

样本名称	有机酸含量(mg/g)					有机酸含量占总酸含量的比例(%)				
	柠檬酸	苹果酸	奎宁酸	莽草酸	富马酸	柠檬酸	苹果酸	奎宁酸	莽草酸	富马酸
HM1	8.250 8	2.938 1	0.549 9	0.006 6	0	70.25	25.01	4.68	0.06	0
HM2	10.967 8	7.386 7	0	0.017 2	0	59.70	40.21	0	0.09	0
HM3	7.190 1	2.983 2	0.456 7	0.006 1	0.024 1	67.45	27.98	4.28	0.06	0.23
HM4	7.454 9	7.192 9	0	0	0	50.89	49.11	0	0	0
HM5	8.935 3	7.526 9	0	0	0	54.28	45.72	0	0	0
HM6	5.953 6	3.032 5	0	0.008 3	0.021 3	66.04	33.64	0	0.09	0.24
HM7	7.299 0	3.264 0	0.435 7	0	0	63.83	28.55	3.81	0	0
HM8	9.806 9	6.157 6	0	0.011 8	0.058 0	61.16	38.40	0	0.07	0.36
HM9	10.402 2	5.439 1	0	0.028 2	0	65.55	34.27	0	0.18	0
HM10	4.510 1	2.216 9	0	0.013 8	0	66.91	32.89	0	0.20	0
HM11	4.009 2	2.448 6	0	0	0	62.08	37.92	0	0	0
HM12	6.925 2	7.374 7	0	0	0	48.43	51.57	0	0	0
HM13	6.936 8	3.942 4	0	0	0	63.76	36.24	0	0	0
LS1	16.435 4	7.622 7	0.842 3	0.018 2	0	65.96	30.59	3.38	0.07	0
LS2	9.112 8	2.709 0	0.557 9	0.004 6	0	73.58	21.87	4.50	0.04	0
LS3	16.954 9	9.330 4	0.631 3	0.013 1	0	62.96	34.65	2.34	0.05	0
LS4	15.567 2	3.900 6	0.503 8	0	0	77.95	19.53	2.52	0	0
LS5	11.800 1	6.161 7	0.554 0	0	0	63.73	33.28	2.99	0	0
EM1	11.476 7	5.338 2	0.569 8	0	0.021 9	65.93	30.67	3.27	0	0.13
EM2	12.207 6	4.020 4	0.246 5	0	0	74.10	24.40	1.50	0	0
XZ1	7.076 8	3.385 9	0	0	0	67.64	32.36	0	0	0
XZ2	7.781 5	3.672 5	0.453 2	0	0.024 2	65.22	30.78	3.80	0	0.20
XZ3	5.514 0	3.101 8	0	0	0.022 7	63.83	35.91	0	0	0.26
红颜	4.863 1	13.809 3	0	0	0	26.04	73.96	0	0	0
桃熏	3.039 6	4.776 8	0	0	0	38.89	61.11	0	0	0
火焰	3.469 2	8.167 1	0	0	0	29.81	70.19	0	0	0
川-6 红	4.545 8	4.837 3	0	0	0	48.45	51.55	0	0	0
紫金久红	4.422 0	12.237 6	0	0	0	26.54	73.46	0	0	0
甜查理	10.154 4	6.236 7	0	0	0	61.95	38.05	0	0	0
宁丰	8.882 0	2.346 3	0	0	0	79.10	20.90	0	0	0
爱知 6 号	12.665 8	7.906 2	0	0	0	61.57	38.43	0	0	0
康费吐拉	11.636 5	3.633 7	0	0	0	76.20	23.80	0	0	0
里瓦	3.656 0	6.147 8	0	0	0	37.29	62.71	0	0	0
石头河子	11.338 1	14.830 3	0	0	0	43.33	56.67	0	0	0
奖赏	5.495 7	3.887 4	0	0	0	58.57	41.43	0	0	0

样本名称表示的草莓种质资源见表 1。

2.3 草莓果实有机酸组分的相关性分析

对草莓果实中总酸含量以及不同有机酸组分的含量进行相关性分析,结果(表 5)表明,总酸含量与柠檬酸含量呈极显著正相关($P<0.01$),与苹果酸含量呈显著正相关($P<0.05$),说明总酸主要是由柠檬酸和苹果酸组成的;而奎宁酸含量与总酸含量的相关系数虽然

为0.384 039,但相关性未达到显著水平,表明奎宁酸对总酸的贡献度较小;此外,柠檬酸含量与奎宁酸含量之间的相关性较强,相关系数为0.680 628,说明这 2 种有机酸可能存在协同变化趋势。

2.4 草莓果实主要有机酸分布特征

表 5 显示,总酸含量与柠檬酸含量、苹果酸含量

呈极显著、显著正相关,但只有柠檬酸的组成分布特征与总酸相似(图3)。柠檬酸含量为7.00~9.00 mg/g的资源数量最多,而柠檬酸含量高于17.00 mg/g的资源数量较少,仅有1份资源的柠檬酸含量高于23.00 mg/g。总酸含量为11.50~19.00 mg/g

的资源数量占比较高,只有少数资源的总酸含量大于26.50 mg/g。苹果酸含量小于7.50 mg/g的资源占77.14%,而苹果酸含量大于9.00 mg/g的资源数量锐减,总体而言,苹果酸含量的分布不具有正态分布特征(图3)。

表5 有机酸组分的相关性分析

Table 5 The correlation analysis of different components of organic acids

项目	相关系数					
	柠檬酸含量	苹果酸含量	奎宁酸含量	莽草酸含量	富马酸含量	总酸含量
柠檬酸含量	1.000 000					
苹果酸含量	-0.140 440	1.000 000				
奎宁酸含量	0.680 628	-0.292 340	1.000 000			
莽草酸含量	0.079 091	0.007 233	0.088 945	1.000 000		
富马酸含量	-0.014 310	-0.205 110	0.055 805	0.125 458	1.000 000	
总酸含量	0.859 379 **	0.511 711 *	0.384 039	0.080 892	-0.115 540	1.000 000

* 表示显著相关($P<0.05$); ** 表示极显著相关($P<0.01$)。

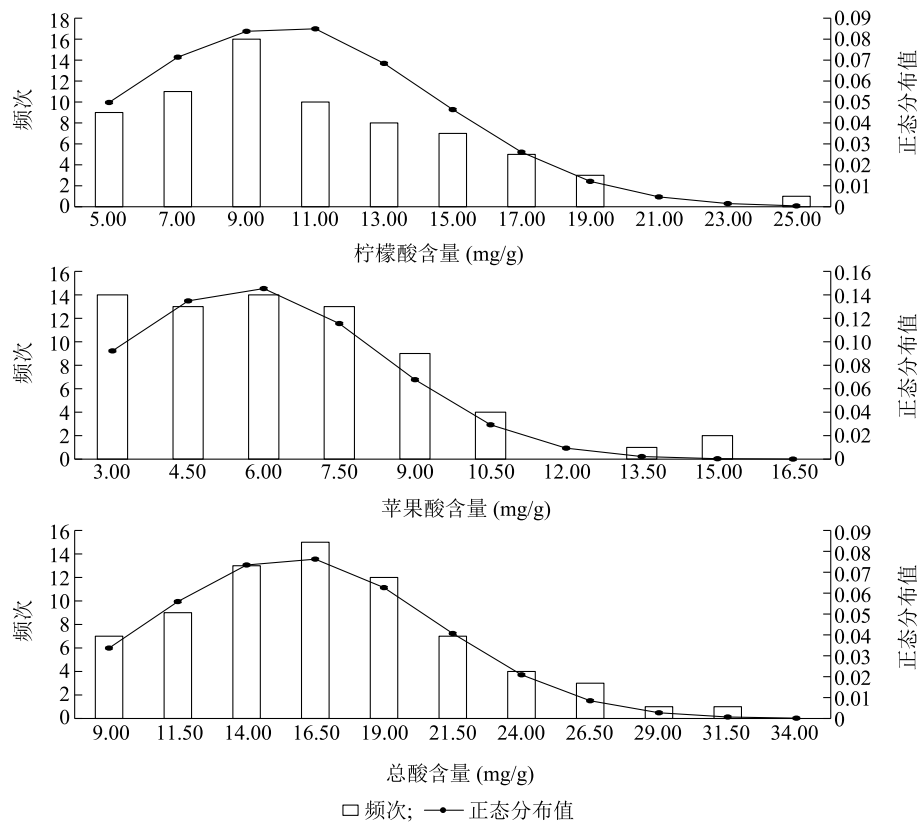


图3 草莓资源柠檬酸、苹果酸、总酸含量分布

Fig.3 The content distribution of citric acid, malic acid and total acid in strawberry resources

2.5 草莓种质资源的层级聚类分析

利用R语言对70份草莓种质进行层级聚类分析。图4显示,通过层级聚类分析,所有种质资源被

分为2类(I类和II类),每类又分别分为2个小组,I类分为A组和B组,II类分为C组和D组。I类共有47份资源,包括6份东北草莓,12份森林

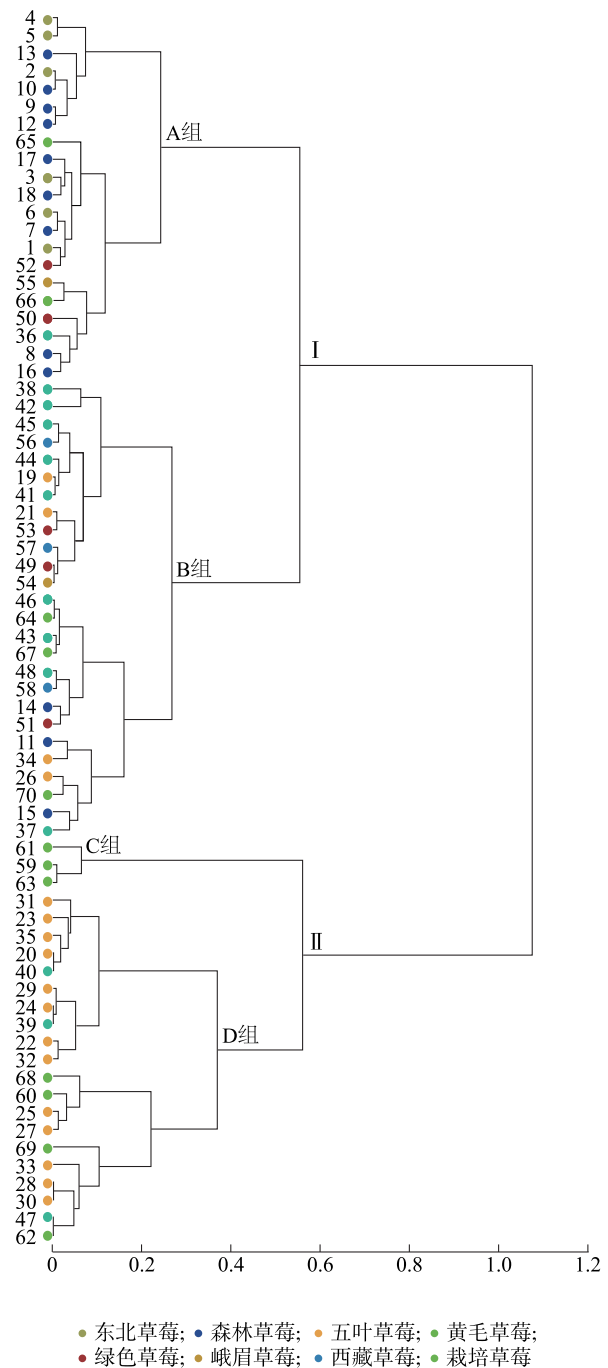
草莓,4 份五叶草莓,10 份黄毛草莓,5 份绿色草莓,3 份西藏草莓,2 份峨眉草莓和 5 份栽培草莓,涵盖了本研究所选的 8 个草莓种,且均为柠檬酸含量占比较高的种质。结合表 4 可知,A 组中大部分为柠檬酸含量占总酸含量比例高于 70.00% 的种质资源,尤其在 DB4、DB5 中柠檬酸含量占总酸含量的比例超过了 87.00%;B 组中大部分为柠檬酸含量占总酸含量的比例高于 55.00% 且苹果酸含量占总酸含量的比例低于 43.00% 的种质,这些结果进一步证实了草莓为柠檬酸型果实。此外,我们发现 B 组中的 3 份栽培草莓甜查理、康费吐拉和奖赏分别来源于美国、荷兰、加拿大,而 A 组中的 2 份栽培草莓宁丰和爱知 6 号分别来源于中国和日本。

Ⅱ类有 23 份种质资源,分别是 7 份栽培草莓、3 份黄毛草莓和 13 份五叶草莓。C 组为苹果酸含量占总酸含量比例在 70.00% 以上的种质,包括红颜、火焰和紫金久红;D 组为苹果酸含量占总酸含量比例为 43.00%~63.00% 的种质。值得注意的是,Ⅱ类中的 7 份栽培草莓的苹果酸含量均高于柠檬酸含量,而且这 7 份种质中除了里瓦外,其他 6 份种质均来自于亚洲。聚类关系不仅证实了草莓种质资源中有机酸积累的特征,也揭示了不同地区草莓育种家在草莓育种中对有机酸性状筛选方面的差异性。

3 讨论

本研究基于 HPLC 法,并在前人测定方法的基础上进行优化^[7]。对优化后的色谱条件进行检测,发现该方法精密度检验的 *RSD* 为 0.16%~0.49%,达到了分析方法的要求;对除抗坏血酸外的 5 种有机酸进行回收率测定,5 种有机酸的回收率为 96.36%~100.48%,表明本研究优化后的色谱条件可用来检测草莓果实中的有机酸。

植物果实中不同有机酸的组分和含量直接影响果实的风味特征。大部分果实中的主要有机酸为 1 种或 2 种,依据成熟果实中富集的主要有机酸种类差异,果实可大致分为苹果酸型、柠檬酸型和酒石酸型 3 类,草莓属于柠檬酸型果实^[19-20]。李荣飞等^[21]将凤梨草莓与黄毛草莓进行杂交,对其后代果实进行有机酸测定,发现果实中的主要有机酸组分为柠檬酸,柠檬酸含量占总酸含量的 75.00% 以上,其次为苹果酸以及少量的棕榈酸、琥珀酸、抗坏血酸、奎宁酸,此外,还含有富马酸、酒石酸、莽草酸等微量有



1~70 见表 1。

图 4 70 份草莓种质聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of 70 strawberry germplasm resources

机酸。不同草莓种之间果实有机酸含量存在明显差异。本研究对 8 个草莓种的种质资源进行有机酸测定,结果发现,在草莓果实中存在柠檬酸、苹果酸、莽草酸、奎宁酸和富马酸这 5 种有机酸组分,其中柠檬酸和苹果酸的含量占比较高,为主要的有机酸组分,

并且相关性分析结果表明苹果酸含量和柠檬酸含量均与总酸含量呈显著或极显著正相关。在供试的大部分草莓种质中均是柠檬酸含量高于苹果酸含量,如东北草莓、绿色草莓及森林草莓,且奎宁酸在这3种野生草莓种质中也均能被检测到,可能是由于东北草莓、绿色草莓及森林草莓亲缘关系相对较近,所以这3个草莓种的草莓果实中含有的有机酸种类较为相似^[22]。部分栽培草莓中柠檬酸含量和苹果酸含量占总酸含量的比例比较接近,也许正是因为这样,才给栽培草莓带来了优良的风味。

同一个草莓种的不同草莓品种之间,果实中的有机酸含量也有差异。董书琦等^[23]对栽培草莓中不同品种的草莓成熟果实进行有机酸的测定,发现大多数基因型一致的草莓果实中柠檬酸含量显著高于苹果酸含量。本研究发现,栽培草莓中除爱知6号、宁丰外,其他来源于中国和日本的草莓品种均是苹果酸含量高于柠檬酸含量;而来源于美国、荷兰、加拿大的品种中,除了里瓦外,其他品种果实中均是柠檬酸含量高于苹果酸含量。前人研究发现柠檬酸产生酸感较快,持续时间短,而苹果酸产生酸感较缓慢,持续时间较长,因此大部分来源于亚洲的草莓品种果实偏甜,而来源于欧美的大部分草莓果实偏酸^[24-25]。

通过层级聚类分析,70份草莓种质被分为2类,I类均为柠檬酸含量占比较高的种质,II类主要为柠檬酸含量占比较低的种质,说明草莓属不同种之间的有机酸存在差异,且这种差异主要与柠檬酸含量有关。在不同物种中也有相似的结论,李文云等^[26]通过测定3个柠檬品种和2个地方特色宽皮柑橘品种中有机酸的含量,发现柠檬酸是其主要有有机酸种类,且柠檬中柠檬酸平均含量显著高于宽皮柑橘,而总酸含量差异主要由柠檬酸含量差异所致。结合种质资源的来源,我们发现大多数来源于同一地区且属于同一个种的草莓种质都聚在同一个组内。如,来源于中国北方的6份东北草莓都聚在A组,来源于美国的9份森林草莓也均在A组中,来源于中国吉林省的3份森林草莓却在B组中,来源于中国四川省的4份五叶草莓聚在B组中,而另外13份聚在D组中的五叶草莓都来源于中国甘肃省。

4 结论

本研究以0.012 5%偏磷酸溶液为流动相,在柱

温25℃、流速0.5 mL/min、检测波长210 nm、进样量5.0 μL的色谱条件下,实现了柠檬酸、苹果酸、奎宁酸、抗坏血酸、莽草酸和富马酸的有效分离,且除抗坏血酸外的5种有机酸精密度检测的RSD值均低于0.50%,回收率为96.36%~100.48%,表明该方法检测的精密度良好,准确度较高。对分属于8个草莓种的70份资源的果实有机酸进行测定,发现苹果酸和柠檬酸是草莓果实中主要的有机酸种类,部分种质中还含有奎宁酸、莽草酸和富马酸。在这8个草莓种中,东北草莓、森林草莓、绿色草莓和峨眉草莓的总酸含量较高,而栽培草莓、五叶草莓、黄毛草莓和西藏草莓的总酸含量较低。不同种草莓中不同有机酸含量的占比不同,通过本研究可从供试的70份草莓种质中筛选出有机酸含量特异的资源,为将来开展草莓种质资源的鉴定与深入评价提供重要支撑。

参考文献:

- [1] 雷家军. 我国草莓生产现状及展望[J]. 中国果树, 2001(1): 49-51.
- [2] CORDENUNSI B R, OLIVEIRA DO NASCIMENTO J R, GENOVESE M I, et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(9): 2581-2586.
- [3] 高贤玉, 张发明, 柏天琦, 等. 蛋黄果‘云热-205’果实品质及有机酸含量分析[J]. 热带农业科学, 2019, 39(5): 70-74.
- [4] MILIVOJEVIC J, MAKSIMOVIC V, NIKOLIC M, et al. Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries[J]. Journal of Food Quality, 2011, 34(1): 1-9.
- [5] LIU L, JI M L, CHEN M, et al. The flavor and nutritional characteristic of four strawberry varieties cultured in soilless system[J]. Food Science & Nutrition, 2016, 4(6): 858-868.
- [6] 赵密珍, 生静雅, 袁 骥, 等. 自然五倍体野生草莓果实风味物质分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(4): 613-618.
- [7] 万 欣, 江 鹏, 何 苗, 等. 高效液相色谱法同时测定菌液中5种有机酸的含量[J]. 现代化工, 2023, 43(4): 227-230, 236.
- [8] 高海燕, 廖小军, 王善广, 等. 反相高效液相色谱法测定果汁中11种有机酸条件的优化[J]. 分析化学, 2004, 32(12): 1645-1648.
- [9] 刘瑞红, 潘立宁, 王晓瑜, 等. 气相色谱测定烟草中非挥发有机酸方法改进[J]. 化学分析计量, 2022, 31(12): 22-28.
- [10] PARK Y J, KIM K R, KIM J H. Gas chromatographic organic acid profiling analysis of brandies and whiskeys for pattern recognition analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(6): 2322-2326.
- [11] 王 冰, 余晶晶, 蔡君兰, 等. GC-MS/MS法同时分析烟叶中42

- 种有机酸[J]. 烟草科技, 2020, 53(11): 49-58.
- [12] MA Y H, LI M P, ZHANG S W. Simultaneous determination of organic acids in Chinese liquor by GC-MS method[J]. Asian Journal of Chemistry, 2014, 26(15): 4707-4710.
- [13] 郭柏坤, 周 垚. 离子色谱法测定水果中的有机酸[J]. 发酵科技通讯, 2018, 47(3): 170-174.
- [14] 沈宋利, 林智威, 陈梅兰. 离子色谱法测定诺丽果粉中常见有机酸和阴离子含量[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 305-308.
- [15] 唐美华, 屠春燕, 薛亚芳, 等. 毛细管电泳法测定葡萄酒中的有机酸含量[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 209-211.
- [16] 梁力平, 赵 岩, 于鑫森, 等. 新疆 99 个品种红枣有机酸测定及其多元统计分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(10): 181-188.
- [17] 李彩林, 杨志国, 王华瑞, 等. 高效液相色谱法测定红香酥梨中 6 种有机酸含量[J]. 山西农业科学, 2019, 47(12): 2103-2106, 2138.
- [18] 李佳秀, 张春岭, 刘 慧, 等. 草莓汁中糖酸组成分析及其在掺假鉴别中的应用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 268-273.
- [19] 吴昌琦, 贾璐婷, 樊进补, 等. 园艺作物果实糖酸转化研究进展[J]. 中国果菜, 2020, 40(11): 39-47.
- [20] 陈发兴, 刘星辉, 陈立松. 果实有机酸代谢研究进展[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 526-531.
- [21] 李荣飞, 王爱华, 杨仕品, 等. 2 个凤梨草莓与黄毛草莓杂交后代的果实品质分析[J]. 果树学报, 2020, 37(12): 1885-1897.
- [22] 雷家军, 望月龍也, 邓明琴. 草莓属二倍体种东北草莓(*Fragaria mandschurica* Staudt) 研究[J]. 果树学报, 2001, 18(6): 337-340.
- [23] 董书琦, 刘海婷, 段 可, 等. 不同草莓资源果实有机酸的积累动态及其多样性分析[J]. 上海农业学报, 2023, 39(1): 26-31.
- [24] 郑丽静, 聂继云, 闫 震. 糖酸组分及其对水果风味的影响研究进展[J]. 果树学报, 2015, 32(2): 304-312.
- [25] 许利平, 刘志泰, 尹 鑫, 等. 不同草莓品种果实的感观品质调查[J]. 果树资源学报, 2022, 3(2): 32-34.
- [26] 李文云, 罗 恂, 柏自琴, 等. 柠檬成熟果实可溶性糖和有机酸积累特征分析[J]. 中国南方果树, 2019, 48(4): 21-24.

(责任编辑: 王 妮)