

1-甲基环丙烯延缓青花菜衰老的效应及机理

汪俏梅 郭得平 Kyiky Win 袁 晶

(浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘 要: 研究了 1-甲基环丙烯 (1-MCP) 对青花菜衰老的影响。结果表明, 0 ~ 20 $\mu\text{L/L}$ 的 1-MCP 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下处理青花菜花球 6 h, 能延长 20 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏条件下青花菜的货架寿命, 延缓花蕾中营养成分叶绿素、类胡萝卜素和维生素 C 等的降解, 其中以 2.5 $\mu\text{L/L}$ 处理的效果最佳。进一步研究还表明 2.5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP 处理抑制花蕾的呼吸速率和乙烯释放速率, 并使贮藏期间花蕾的蛋白质含量升高; 丙二醛 (MDA) 含量下降, 使超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性升高, 过氧化物酶 (POD) 的活性下降, 同时, SDS-PAGE 分析表明, 这一处理使花球中醇溶性蛋白和水溶性蛋白的组分和含量发生明显变化。

关键词: 青花菜; 1-甲基环丙烯; 贮藏; 衰老; 蛋白质; SDS-PAGE

中图分类号: S 635 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0205-05

Effect of 1-MCP on Delaying the Senescence of Broccoli and Its Possible Physiological Mechanism

Wang Qiaomei, Guo Deping, Kyiky Win, and Yuan Jing

(Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the senescence of broccoli was studied. The results showed that the shelf life of broccoli was extended and the degradations of chlorophyll, carotenoid and vitamin C delayed by exposure to 1-MCP at concentration range of 0 – 20 $\mu\text{L/L}$ for 6 h at room temperature (20 $^{\circ}\text{C}$) followed by storage at 20 $^{\circ}\text{C}$. 1-MCP at optimal concentration of 2.5 $\mu\text{L/L}$ was used to investigate the possible mechanism of 1-MCP in delaying the senescence. The respiration rate and ethylene production of florets were inhibited, the protein content of florets, the activities of SOD and CAT increased, while the MDA content and the activity of POD decreased during storage by exposure to 2.5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP. SDS-PAGE analysis further showed that the composition and content of both the alcohol-soluble and water-soluble proteins changed after 1-MCP treatment.

Key words: Broccoli; 1-methylcyclopropene; Storage; Senescence; Protein; SDS-PAGE

1-甲基环丙烯 (1-methylcyclopropene, 简称 1-MCP) 是一种含双键的环状碳氢化合物, 以气体状态存在。1-MCP 能不可逆地作用于乙烯受体, 阻断乙烯的正常结合, 从而抑制与乙烯相关的生理生化反应^[1,2]。与传统的乙烯抑制剂 STS 等相比, 1-MCP 具有安全、无毒、对环境污染少等特点, 国外已在观赏植物上广泛应用。关于 1-MCP 在青花菜上的应用已有一些初步报道^[3-5], 认为低浓度的 1-MCP 处理可以延长青花菜的货架寿命, 但其机理还未见报道, 作者就此进行了探讨。

1 材料与方法

以青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *italica* L.) 品种 ‘优秀’ 为试材, 2002 年 2 ~ 6 月在浙江大学蔬菜研究所实验场种植。

新鲜采收的花球切成花梗长约 2 cm 的小花球后, 以 100 $\mu\text{L/L}$ 的 NaOCl 表面消毒 1 min, 清水洗净后晾干。在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 在放置青花菜样品的密闭塑料袋中分别以 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 和 20 $\mu\text{L/L}$ 的 1-MCP 处理 6 h。处理完成后将花球置于通风、保湿 (相对湿度 85% ~ 95%) 的 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱

中,测定货架寿命,并定期从小花球中剪取花蕾,混匀后用于生理生化分析,每一处理重复3~5次。

以花球30%黄化的时间作为货架寿命^[3]。叶绿素含量的测定参照李长樱等^[6]的方法;维生素C含量测定采用2,6-二氯酚酚滴定法;类胡萝卜素含量测定参照何照范等^[7]的比色法;呼吸速率的测定用红外线CO₂分析仪测定CO₂浓度;乙烯释放速率的测定,取100g样品放入密闭容器,20℃放置1h后抽取1.0mL气体用SP6800气相色谱仪测定^[8]。

蛋白质含量测定采用Folin-酚法^[9];MDA含量测定参照胡家恕等^[9]的方法,以硫代巴比妥酸比色法测定;抗氧化酶活性测定参照胡家恕等^[10]的方法,取1g青花菜样品,按1:5(W/V)加入0.05mol/L pH 7.8的磷酸缓冲液,冰浴研磨,匀浆于4℃,13 000g离心20min,上清液为酶提取液,分别测定POD、SOD和CAT活性。

蛋白质电泳分析:青花菜样品加入70%乙醇或pH 7.0磷酸缓冲液,于4℃冰浴研磨,4000g离心10min,分别取上清液备用。醇溶性或水溶性蛋白电泳采用不连续胶的SDS-PAGE,凝胶浓度8%~12%,凝胶内含0.1% SDS。电极缓冲液为Tris-甘氨酸(pH 8.3, 0.25mol/L,含0.1% SDS)。蛋白质在凝胶上的固定参照Steck等^[11]的方法,凝胶放入考马斯亮蓝G250染色液中染色,弃去染色液后,用脱色液漂洗凝胶直至背景完全脱去。

2 结果与分析

2.1 1-MCP处理对货架寿命和营养成分的影响

不经1-MCP处理的青花菜在20℃贮藏条件下货架寿命仅为2.5d。1-MCP处理可以延缓花球的黄化,延长货架寿命。在0.1~2.5μL/L浓度范围内,1-MCP处理延长货架寿命的效应随浓度增大而增强,2.5μL/L处理使货架寿命延长至5d,但更高的浓度增效不明显(表1)。贮藏5d后,对照花蕾中叶绿素、类胡萝卜素和维生素C的含量明显低于贮藏起始时,但1-MCP处理能使花蕾营养成分的降解得到不同程度的缓解(表2)。在0~20μL/L浓度范围内,以2.5μL/L 1-MCP处理延长货架寿命和延缓营养成分降解的效果最好。

2.2 1-MCP处理对呼吸和乙烯释放速率的影响

由于1-MCP 2.5μL/L处理在延缓青花菜衰老方面有最好的效果,因此我们选择这一处理浓度研究1-MCP延缓青花菜衰老的机理。从图1可以看出,对照花蕾在采后3d出现呼吸高峰和乙烯高峰,而1-MCP处理不仅能使花蕾的呼吸强度和乙烯释放速率下降,还能推迟呼吸高峰的出现。

2.3 1-MCP处理对蛋白质、MDA含量和抗氧化酶活性的影响

1-MCP处理能使花蕾的蛋白质含量较对照明显增加(图2),随着贮藏天数的增加,对照和处理MDA的含量均呈现增加的趋势,但对照在2d后急剧增加,而1-MCP处理则增加较为平缓(图3)。

表1 1-MCP处理对青花菜贮藏寿命的影响

Table 1 Effect of 1-MCP on shelf life of broccoli

1-MCP (μL/L)	贮藏寿命 Shelf life (d)	贮藏寿命增加百分率 Increase in shelf life (%)
0	2.55 ± 0.21 e	
0.1	3.00 ± 0.40 d	17.65
0.5	3.24 ± 0.23 d	27.06
1	4.05 ± 0.33 c	58.82
2.5	5.05 ± 0.27 a	98.03
5	4.65 ± 0.14 b	82.35
10	4.65 ± 0.22 b	82.35
20	5.00 ± 0.25 b	96.05

* 邓肯氏新复极差测验,不同字母表示差异达显著水平(P=0.05),下表相同。

* Mean value for replicates test; the same letter indicated no significance at the 5% level as determined by Duncan's Multiple Range Test, the same below.

表2 贮藏起始和贮藏5d时青花菜花蕾中叶绿素、类胡萝卜素和维生素C含量

Table 2 The contents of chlorophyll, carotenoid and vitamin C of broccoli florets in initial and 5 days after storage

贮藏 天数	1-MCP Storage (μL/L)	叶绿素 Chlorophyll (mg/g FM)	类胡萝卜素 Carotenoid (μg/g FM)	维生素C Vitamin C (mg/g FM)
0	0	0.50 ± 0.2	136.8 ± 6.7	0.933 ± 0.011
5	0	0.09 ± 0.012 c	63.3 ± 3.1 d	0.233 ± 0.001 e
	0.1	0.11 ± 0.017 bc	64.6 ± 5.9 d	0.261 ± 0.029 d
	0.5	0.16 ± 0.024 bc	74.7 ± 1.3 c	0.240 ± 0.006 de
	1	0.15 ± 0.028 bc	68.0 ± 3.8 d	0.302 ± 0.015 c
	2.5	0.33 ± 0.011 a	85.0 ± 3.7 ab	0.427 ± 0.005 a
	5	0.31 ± 0.036 ab	91.4 ± 1.4 a	0.420 ± 0.012 a
	10	0.31 ± 0.011 ab	76.5 ± 0.6 c	0.396 ± 0.005 b
	20	0.32 ± 0.054 a	84.9 ± 2 b	0.397 ± 0.005 b

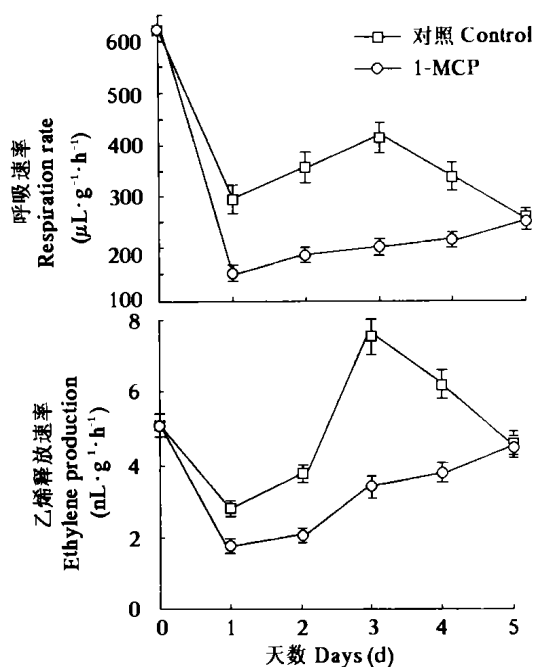


图1 1-MCP对20℃贮藏条件下青花菜花蕾的呼吸速率和乙烯释放速率的影响

图中短线为5次测量的标准差

Fig. 1 Effect of 1-MCP on the respiration rate and ethylene production of broccoli florets at 20°C

Bars are SDs from 5 measurements

在1-MCP处理中, SOD活性在0~5 d高于对照, CAT在2~5 d高于对照, 而POD则均低于同期对照(图4)。对照在贮藏2 d后, SOD和CAT活性开始迅速下降至最低, 其膜脂过氧化产物MDA含量也急剧上升, 这与对照2.5 d的货架寿命是一致的; 而同期处理无论是SOD和CAT活性的下降, 还是MDA含量的上升均不显著(图3, 图4), 从而延缓了花蕾细胞的膜脂过氧化和衰老。

2.4 1-MCP处理对花蕾中醇溶性和水溶性蛋白组分的影响

比较处理和对照在花蕾衰老进程中醇溶性和水溶性蛋白种类和含量的变化。结果表明, 醇溶性蛋白和水溶性蛋白的变化均表现出3种情况: 第一类蛋白自始至终基本保持稳定; 第二类蛋白随着花蕾的衰老逐渐减少或消失; 第三类蛋白则随花蕾的衰老而增加或新出现。其中后两类蛋白的变化可能与花蕾的衰老有关。在花蕾的衰老过程中, 醇溶蛋白的变化主要表现为: 一种110 kD的蛋白在贮藏起始时存在, 一天后即消失, 另一种66 kD的蛋白质随着花蕾的衰老逐渐减少, 4 d后消失, 1-MCP处理使这一蛋白的表达量高于对照。对照从第4天开始出现分子量为22.5 kD和25 kD的蛋白质, 而处理组则在第5天才出现这两种蛋白(图5, a)。相比之下, 花蕾中水溶性蛋白的种类较多, 变化比较复杂。其中一些蛋白如80.5 kD,

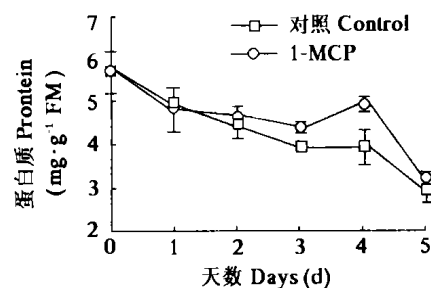


图2 1-MCP处理对20℃贮藏条件下花蕾中总蛋白质含量的影响

Fig. 2 Effect of 1-MCP on total protein content of broccoli florets at 20°C

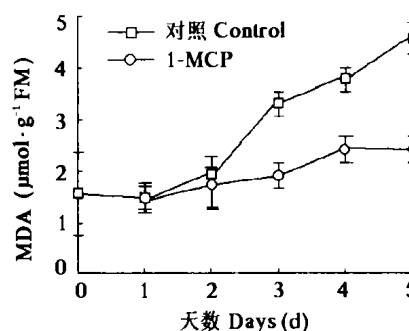


图3 1-MCP处理对20℃贮藏条件下花蕾中MDA含量的影响

Fig. 3 Effect of 1-MCP on MDA content of broccoli florets at 20°C

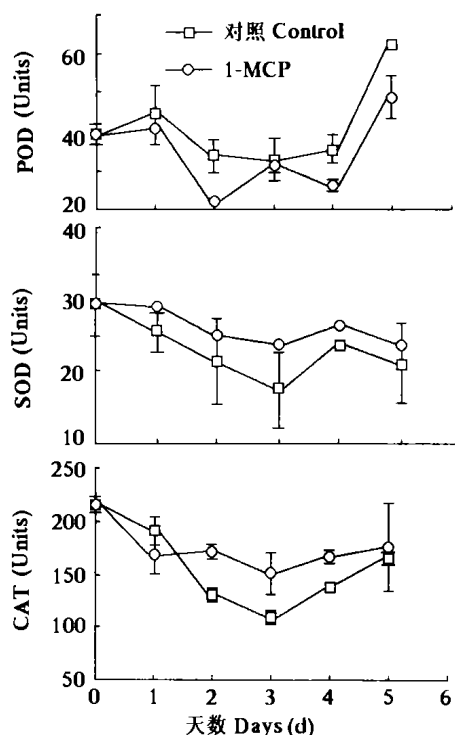


图4 1-MCP处理对花球中抗氧化酶活性的影响

Fig. 4 Effect of 1-MCP on antioxidant enzyme activities of broccoli florets

55.4 kD, 43 kD, 39 kD, 37.5 kD, 22.5 kD, 21 kD, 20 kD, 18.4 kD 和 17 kD 的蛋白质, 随着花蕾的衰老逐渐减少或消失, 1-MCP 处理往往使这些蛋白表达量增加, 并且使其存在的时期更长, 另外也有一种 33 kD 的蛋白质在贮藏后 4 d 的对照中出现, 而 1-MCP 处理的花蕾中不出现 (图 5, b)。

3 讨论

3.1 1-MCP 在青花菜保鲜中的应用效果

1-MCP 作为一种新型的乙烯抑制剂, 具有高效、安全和对环境污染小的优越性, 在作物保鲜上具有广阔的应用前景。关于 1-MCP 在青花菜上的应用, 以往报道均偏向于最佳使用浓度和方法的摸索以及使用效果^[4,5], 并且使用的品种均为国外的主栽品种。我们以国内青花菜的主栽品种之一‘优秀’为材料, 研究了较高温度 (20℃) 下 1-MCP 处理在青花菜贮藏中的效果。结果表明, 低浓度 (2.5 $\mu\text{L/L}$) 的 1-MCP 处理即有较好的延缓衰老的效果, 并且可以有效抑制花蕾中各种营养成分的降解。在冷链还不普遍的国家 and 地区, 春夏季种植的青花菜产品在采后的挑选分级、运输和销售等各个环节都可能处于较高的温度条件, 1-MCP 处理可以替代低温而保持产品较好的品质, 在青花菜的保鲜中具有较大的应用价值。

3.2 1-MCP 延缓青花菜衰老的可能机理

关于 1-MCP 延缓衰老机理的报道还不多, 这些研究主要从 1-MCP 阻断体内乙烯生物合成的反馈调节, 抑制外源乙烯对内源乙烯产生的诱导作用, 以及抑制植物组织或器官的呼吸作用的角度探讨其延缓衰老的机理^[2]。我们的研究发现, 1-MCP 处理不仅能抑制青花菜花蕾的呼吸作用、降低乙烯释放速率, 还能推迟呼吸高峰的出现。因此, 我们认为在青花菜中 1-MCP 是通过抑制呼吸作用和内源乙烯的产生来延缓衰老。

抗氧化酶系统在清除自由基, 避免氧化伤害和细胞损伤方面起到重要作用。在青花菜中, 自由基清除剂等往往通过影响抗氧化酶系统来延缓其衰老^[12,13]。我们的研究发现, 1-MCP 处理使花球在贮藏期间膜脂过氧化产物 MDA 含量下降, SOD 和 CAT 的活性升高, POD 的活性下降, 1-MCP 处理通过对抗氧化酶系统的调节起到延缓衰老的作用。

我们的研究还发现, 在青花菜花蕾的自然衰老进程中, 其蛋白质含量是不断下降的, 而 1-MCP 处理则能明显增加花蕾的总蛋白含量, 还可使大量第二类蛋白的分解得到抑制或延缓, 并抑制第三类蛋白的出现; 同时我们还发现, 青花菜花蕾中含有一般存在于谷类植物中的醇溶蛋白, 并且其中几种与衰老关系密切。进一步分离、鉴定这些衰老相关蛋白以及用差别显示等方法分离 1-MCP 处理下的特异表达基因, 将有助于揭示 1-MCP 延缓花蕾衰老的机理。

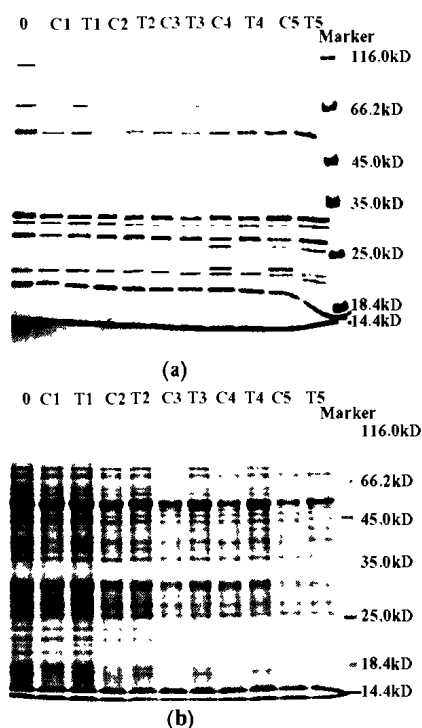


图 5 1-MCP 处理对青花菜花蕾醇溶性 (a) 和水溶性 (b) 蛋白 SDS-PAGE 图谱的影响

0: 未处理花蕾; C: 对照; T: 1-MCP 处理

Fig. 5 Effect of 1-MCP on SDS-PAGE profile of alcohol soluble protein (a) and water soluble protein (b) from broccoli florets

0: Untreated florets; C: Control; T: 1-MCP treatment

参考文献:

- 1 Sisler E C, Dupille E, Serek M. Effect of 1-methylcyclopropane and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Regul.*, 1996, 18: 79 ~ 86
- 2 Sisler E C, Serek M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level-recent developments. *Physiol. Plant*, 1997, 100: 577 ~ 582

- 3 Ku V V V, Wills R B H. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharvest Biol. Technol.*, 1999, 17: 127 ~ 132
- 4 Fan X, Mattheis J P. Yellowing of broccoli in storage is reduced by 1-methylcyclopropene. *Hortsci.*, 2000, 35: 885 ~ 887
- 5 Able A J, Wong L S, Prasad A. 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). *Postharvest Biol. Technol.*, 2002, 26: 147 ~ 155
- 6 李长樱, 简元才. 青花菜耐贮性鉴定方法和标准. *华北农学报*, 1999, 14 (4): 134 ~ 136
- 7 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 110 ~ 112
- 8 郑永华. 枇杷果实采后呼吸与乙烯释放规律的研究. *园艺学报*, 1993, 20 (2): 111 ~ 115
- 9 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265 ~ 275
- 10 胡家恕, 童富淡, 邵爱萍. 砷对大豆种子萌发的伤害. *浙江农业大学学报*, 1996, 22 (2): 121 ~ 125
- 11 Teck G, Leuthard P, Burk R R. Detection of basic proteins and low molecular weight peptides in polycrylamide gels by formaldehyde fixation. *Anal Biochem.*, 1980, 107: 21 ~ 24
- 12 叶陈亮, 柯玉琴. 自由基清除剂对延缓青花菜花蕾衰老的效应. *园艺学报*, 1996, 23 (3): 259 ~ 263
- 13 Tiivonen P M A, Sweeney Mark. Differences in chlorophyll loss at 13 °C for two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities. *J. Agri. Food Chem.*, 1998, 46: 20 ~ 24

甘蓝花粉萌发离体培养最佳蔗糖硼酸配方初探

王 超 张桂玲

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

The Preliminary Research on Cabbage Pollens Sprouting in Vitro

Wang Chao and Zhang Guiling (Department of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

关键词: 甘蓝; 花粉; 萌发; 培养

中图分类号: S 635 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2004) 02-0209-01

选用经济性状优良的甘蓝自交系 92-1023、97-1126-11-1 和 97-1126-11-2 的 12 个单株为材料。初培养的培养基为 2 因素 3 水平的 9 个配方: 蔗糖 (10%、20%、30%) 和硼酸 (10、100、200 $\mu\text{L/L}$); 在初步确立蔗糖浓度的基础上, 硼酸浓度再进一步设 6 个水平 (0、50、100、150、200、250 $\mu\text{L/L}$) 共 6 个培养基用于硼酸复选; 在复选培养确立了硼酸浓度基础上, 再设蔗糖浓度 7 个水平 (0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%) 共 7 个培养基配方用于蔗糖复选。以上各配方中琼脂浓度均为 1%, 加蒸馏水至所需浓度。在 25°C 恒温箱中培养 2 h 后开始镜检, 观察花粉的萌发情况, 并用校正的测微尺测量花粉管的长度 (取 5 个视野均值), 采用回归分析方法进行分析。选出的最佳培养基配方, 按上述步骤, 将各组合的新鲜花粉均匀播于其上, 置于 25°C 恒温箱中培养, 保持一定的湿度, 2 h 后观察花粉的萌发情况, 取 10 个视野统计萌发率。花粉活力 = 萌发花粉粒数目/花粉粒总数 $\times 100\%$ 。

试验结果: 1. 在初选培养上, 花粉萌发率和花粉管的长度随蔗糖浓度呈二次曲线变化趋势, 对二次方程进行求导得出蔗糖浓度为 19.81% 时花粉的萌发率最高。2. 用 19.81% 的蔗糖浓度进一步筛选硼酸的浓度, 如表 1 所示, 硼酸浓度为 100 和 150 $\mu\text{L/L}$ 时花粉的萌发率较高, 对二次方程进行求导得出硼酸浓度为 126.04 $\mu\text{L/L}$ 时花粉的萌发率最高。3. 再用 126.04 $\mu\text{L/L}$ 的硼酸浓度进行蔗糖复选 (表 1), 蔗糖浓度为 15% 和 20% 时花粉的萌发率较高, 对二次方程进行拟合, 得出蔗糖的最佳浓度为 16.62%。4. 本试验中就单因素而言, 蔗糖浓度为 15%, 硼酸浓度为 100 $\mu\text{L/L}$ 时花粉的萌发率是最高的, 但作者认为, 这只是蔗糖与硼酸浓度最佳处理的简单组合, 没有考虑到两者与花粉萌发率的二次互作关系。本试验的结果是蔗糖为 16.62%, 硼酸为 126.04 $\mu\text{L/L}$ 更好, 但有待今后进一步试验验证。

表 1 硼酸和蔗糖浓度对花粉萌发率的影响

Table 1 Effects of sugar and boric acid on pollen germination

(%)

培养时间 Culture time (h)	硼酸 Boric acid ($\mu\text{L/L}$)						蔗糖 Sugar (%)						
	0	50	100	150	200	250	0	5	10	15	20	25	30
1	0	9.8	15.62	8.92	5.39	4.76	0.24	9.57	6.20	15.13	13.01	11.87	11.51
2	2.55	10.02	28.63	17.01	6.41	6.05	1.38	12.83	17.04	37.80	36.10	12.59	12.50
3	4.19	17.82	56.41	21.07	13.41	12.57	2.51	13.59	28.71	59.27	45.12	25.49	26.19
4	6.97	23.94	65.71	30.64	19.85	16.73	3.70	15.67	39.60	71.96	65.59	36.98	27.80