

一氧化氮对草莓果实衰老的影响

朱树华¹ 周杰^{1,2*} 束怀瑞¹

(¹ 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018; ² 山东农业大学化学与材料科学学院, 泰安 271018)

摘要: 以硝普钠 (SNP) 为一氧化氮供体, 研究不同浓度的 SNP 对 ‘丰香’ 草莓果实软化过程相关酶活性的影响。结果表明, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 可以显著增强果实 CAT 活性, 抑制 PME、纤维素酶、PPO 和 LOX 活性, 并推迟了 PPO 和 LOX 活性高峰的出现。但对 exo-PG 酶活性作用不明显。揭示了适宜浓度的一氧化氮通过改变果实软化酶的活性, 能够抑制果实衰老的规律, 证明了一氧化氮对果实衰老的影响具有双重生物效应。

关键词: 草莓; 一氧化氮; 贮藏; 软化; 酶

中图分类号: S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 04-0589-05

Effects of Nitric Oxide on Senescence of Strawberry

Zhu Shuhua¹, Zhou Jie^{1,2*}, and Shu Huairui¹

(¹ College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ² College of Chemistry and Material Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Using sodium nitroprusside as a nitric oxide (NO) donor, the effect of different concentration of SNP treatment on the activities of the softening enzymes of the post-harvest strawberry (‘Fengxiang’) was investigated. The results showed that in the fruits treated by $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP aqueous solution, the activity of CAT could be obviously increased and those of PME, cellulase PPO and LOX could be significantly inhibited. However, exo-PG activity was hardly changed. This further opened out the mechanism that proper concentration of NO could inhibit senescence of fruits by the way of effecting the activities of softening enzymes and proved NO took on dual biological effects on senescence of fruits.

Key words: Strawberry; Nitric oxide; Storage; Softening; Enzyme

草莓是典型的非跃变果实, 经济价值较高, 但耐贮性差。最新研究表明, 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 可以显著延长室温下草莓等园艺产品的采后寿命^[1-3], 对降低贮藏成本等具有重要意义。但 NO 处理对草莓果实衰老过程的影响鲜有报道。研究 ‘丰香’ 草莓果实软化过程中 NO 对果胶甲酯酶、外切多聚半乳糖醛酸酶、过氧化氢酶、纤维素酶、多酚氧化酶和脂氧合酶活性的影响, 旨在为 NO 在园艺产品贮藏保鲜中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试草莓品种为 ‘丰香’, 采后立即运回实验室。选 3/4 果面红色、果个均匀、无病虫害无机械伤的果实, 去除果柄后进行处理。以硝普钠 (SNP, 北京双鹤药业公司) 为 NO 供体, 用无氧重蒸水分别配成 0 (对照)、1、5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液并注入容器中, 室温下浸泡 2 h。擦干后单层摆放在容器中, 开盖常温放置。每个浓度设 3 次重复, 每次重复用草莓 500 g。

收稿日期: 2004 - 08 - 25; 修回日期: 2004 - 12 - 22

基金项目: 山东省中青年奖励基金项目 (02BS019)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhoujie@sda.u.edu.cn)

1.2 指标和方法

根据草莓果实腐烂面积分级: 0级, 未腐烂; 1级, 腐烂面积小于 1/3; 2级, 1/3 ~ 2/3; 3级, 大于 2/3; 4级, 果实全烂, 有霉。以果面 1/3以上腐烂的果实为腐烂果, 计算腐烂指数和累计腐烂率。腐烂指数 = (级别 × 果实数量) / (4 × 果实总数) × 100, 累计腐烂率 = 腐烂果总数 / 果实总数 × 100%。

果胶甲酯酶 (PME) 和多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 活性测定^[4]: 取果肉 2.5 g加 15 mL 预冷的 12%聚乙二醇 (含 0.2%酸性亚硫酸钠) 后匀浆, 14 000 ×g 离心 10 min, 上清液为粗酶液。取 2 mL粗酶液 (以蒸馏水为空白) 加 10 g · L⁻¹果胶液 8 mL, NaOH调 pH 7.4并维持 10 min, 以 10 min内单位鲜质量消耗的 NaOH的量表示果胶甲酯酶活性。取 0.2 mL粗酶液加 0.2 mL 0.4%多聚半乳糖醛酸, 30 °C保温 18 h, 再加 4 mL硼砂缓冲液 (0.05 mol · L⁻¹, pH 9.0) 和 0.4 mL 1%靛乙酰胺, 沸水浴 10 min, 冷却后在 276 nm下测吸光度, 以半乳糖醛酸做标准曲线, 以单位鲜质量果实单位时间内产生的半乳糖醛酸的量表示外切 PG (exo-PG) 活性, 单位 μg · h⁻¹ · g⁻¹ FM。

羧甲基纤维素比色法测定纤维素酶活性^[5], 以每 mL酶液每 min催化纤维素生成 1 μg葡萄糖的酶量作为 1个酶活性单位。

过氧化氢酶 (CAT) 活性测定参考文献 [6]。

多酚氧化酶 (PPO) 活性测定参考文献 [7]。取 2 g果肉加 0.2 g不溶性聚乙烯吡咯酮 (PVPP) 和 0.1 mol · L⁻¹儿茶酚 1.0 mL, 30 °C恒温 1 h后加三氯乙酸终止反应, 在 416 nm下测定吸光度。以单位鲜质量在单位时间内吸光度的变化表示 PPO活性。

脂氧合酶 (LOX) 活性参考文献 [8] 测定。

2 结果与分析

2.1 SNP处理对草莓的保鲜效果

如表 1所示, 草莓果实腐烂指数与 SNP的处理浓度有关。低浓度 (1 μmol · L⁻¹) 处理的腐烂指数和腐烂率与对照差别不明显。5 μmol · L⁻¹的处理显著延缓了草莓腐烂 ($P=0.01$), 并减少了腐烂率, 其第 5天腐烂指数为对照的 48.9%, 腐烂率为对照的 38.9%。高浓度 (10 μmol · L⁻¹) 处理能够降低草莓腐烂指数, 第 5天腐烂指数为对照的 64.1%, 累计腐烂率为对照的 66.7%, 但高于 5 μmol · L⁻¹的 SNP处理, 表明 10 μmol · L⁻¹处理可能对草莓果实有部分伤害作用。

表 1 SNP处理对草莓采后腐烂指数和腐烂率的影响

Table 1 Effects of SNP on the rot index and rot rate of strawberry

SNP (μmol · L ⁻¹)	0 d			1 d			2 d			3 d			4 d			5 d		
	指数	Index	%	指数	Index	%	指数	Index	%	指数	Index	%	指数	Index	%	指数	Index	%
0	0	0	0	6.7	0	0	24.2	5.0	50.0	12.5	61.7	28.1	76.7	62.5				
1	0	0	0	4.2	0	0	19.2	11.1	43.3	30.0	54.2	56.7	65.8	60.7				
5	0	0	0	1.7	0	0	5.0	0	12.5	1.5	25.3	6.1	37.5	24.3				
10	0	0	0	2.5	0	0	8.5	0	18.3	8.3	37.5	19.4	49.2	41.7				

2.2 SNP对草莓 PME活性的影响

SNP抑制了草莓贮藏后期 PME的活性 (图 1)。处理 0 ~ 2 d内各浓度 SNP处理与对照活性变化相似。第 3天 1、5和 10 μmol · L⁻¹ SNP处理 PME活性分别是对照的 92.4%、69.3%和 82.5%, 此后 PME活性维持较低水平。SNP处理后 PME酶活性的迅速降低比对照提前 1 d。

2.3 SNP对草莓 exo-PG活性的影响

SNP对 '丰香' 草莓采后 exo-PG酶活性作用不明显 (图 2)。采后第 2天各处理 exo-PG活性剧增, 此后持续增加, SNP处理的变化趋势与对照一致, 在第 3 ~ 5天内 SNP处理略低于对照, 但差异并不显著。

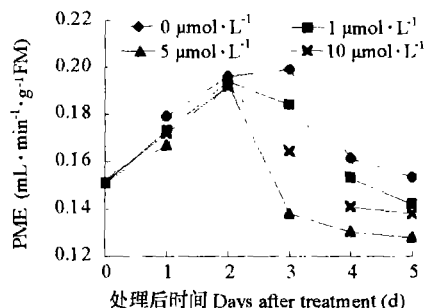


图 1 SNP对 PME活性的影响

Fig 1 Effect of SNP on PME activity

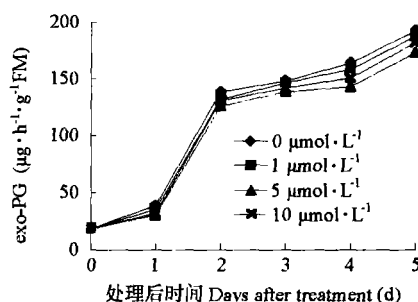


图 2 SNP对 exo-PG活性的影响

Fig 2 Effect of SNP on exo-PG activity

2.4 SNP对草莓纤维素酶活性的影响

SNP处理抑制了草莓纤维素酶活性 (图 3)。采后草莓纤维素酶活性持续升高, 第 5 天对照的活性迅速升至 $13.18 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而 1、5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP处理分别为对照的 78.93%、40% 和 54.95%。同时, 由图 3 可以看出, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP处理的纤维素酶活性与对照差别不大, 而 5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP处理能显著降低果实纤维素酶活性 ($P=0.05$), 但 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP处理效果低于 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理。

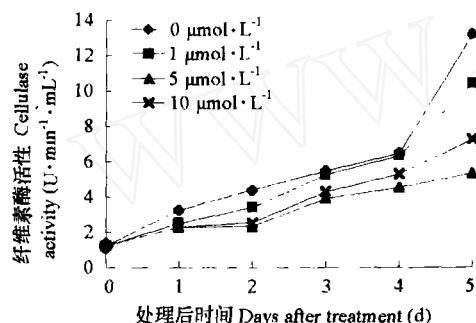


图 3 SNP对纤维素酶活性的影响

Fig 3 Effect of SNP on cellulase activity

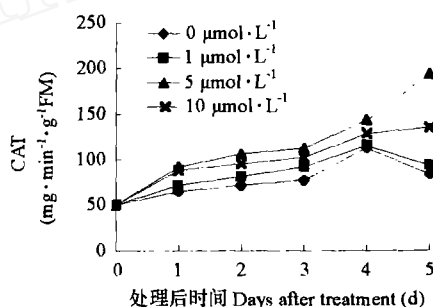


图 4 SNP对 CAT活性的影响

Fig 4 Effect of SNP on CAT activity

2.5 SNP对草莓 CAT酶活性的影响

NO处理的草莓 CAT酶活性显著高于对照 (图 4), 使体内清除过氧化氢 (H_2O_2) 的能力增强, 延缓了 H_2O_2 引起的果实衰老。处理后第 4 天开始对照和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的果实 CAT活性下降, 高峰的出现与呼吸高峰一致, 达到高峰后活性下降, 表明果实进入衰老阶段。而 5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理第 5 天 CAT活性分别为对照的 2.32 倍和 1.61 倍, 仍维持较高活力。

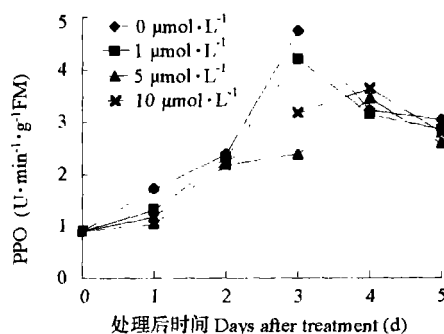


图 5 SNP对 PPO 活性的影响

Fig 5 Effect of SNP on PPO activity

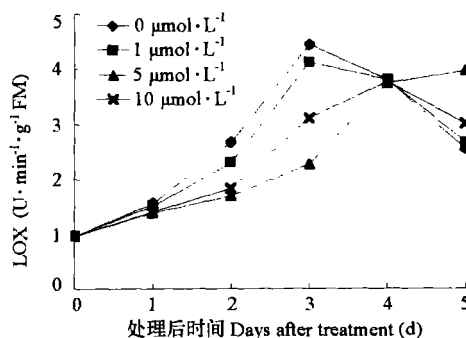


图 6 SNP对 LOX活性的影响

Fig 6 Effect of SNP on LOX activity

2.6 SNP对草莓 PPO 活性的影响

随贮藏时间的延长草莓果实中 PPO 活性逐渐升高 (图 5)。处理后第 3 天对照和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理果实 PPO 活性达到最高, 与果实腐烂情况相对应。而 5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理的草莓果实在贮藏期间 PPO 活性低于对照, 且使 PPO 活性高峰推迟 1 d。5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理使草莓果实的 PPO 活性高峰分别降低了 27.2% 和 23.2%。

2.7 SNP对草莓 LOX 活性的影响

如图 6 所示, 刚采收的草莓果实 LOX 活性较低, 随着成熟度增加其 LOX 活性逐渐上升, 对照在第 3 天的活性最高, 此后开始迅速下降。SNP 处理果实 LOX 活性变化趋势与对照相似, 但活性高峰推迟 2 d 出现, 且活性低于对照。LOX 的这一变化规律与草莓果实腐烂软化变化情况相一致。

3 讨论

本试验结果表明, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 能延缓草莓的软化衰老, 具有明显的保鲜效果, 低浓度 ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 效果不明显, 而高浓度 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 则对草莓造成伤害, 说明 NO 对草莓果实衰老的影响具有双重生物效应。SNP 处理对草莓果实外切 PG 活性作用不明显, 而纤维素酶活性被显著抑制, 延缓了果实细胞壁骨架物质纤维素的降解, 表明草莓果实软化与果实中 PG 酶活性无关, 而与纤维素酶活性有关, 与 Maurice 等^[9]报道相符。草莓果实 PME 活性变化与果肉的软化一致, 而 SNP 处理后果实 PME 活性低, 软化速度也较慢, 表明 PME 对草莓果实软化有一定的修饰作用。据文献报道^[10], PME 可作用于多聚半乳糖醛酸的半乳糖醛酸残基的 C6 羧基基团, 去掉甲酯, 催化果胶酯酸转化为果胶酸, 形成适于 PG 作用的条件。本试验中, SNP 处理降低了 PME 活性, 而果实中 PG 活性并未随之显著变化, 表明在 SNP 处理后 PME 自身对果实软化的修饰作用可能处于优势地位。

果实采收后 H_2O_2 等活性氧代谢加强, 对细胞产生毒害, 导致细胞膜结构的破坏, 从而果实软化衰老加快^[11]。 H_2O_2 可氧化金属形成高价金属氧化物等强氧化剂, 引起膜脂过氧化造成细胞损伤^[12]。SNP 可能通过两个途径来减缓这种伤害: 一方面, SNP 释放的 NO 既能直接与生物分子发生相互作用, 又能与超氧化物或氧反应生成氮氧化物 (RNOS) 来间接地发生硝化作用和氧化作用等^[13], 使采后草莓果实维持较高的 CAT 活性, 通过增强 CAT 活性来消除 H_2O_2 引起的膜功能和结构的破坏, 使之能更好地维持细胞内膜系统的区域化作用和膜结构的完整。另一方面, 植物组织膜脂过氧化作用的启动需要 LOX^[14], SNP 处理明显地抑制了 LOX 酶活性, 其原因可能是 NO 与在 LOX 活性位点上的非血红素离子发生化学反应, 把这种高价化合物还原到低价状态, 改变了 LOX 酶的部分立体结构^[15], 导致 LOX 酶的活性降低, 延迟脂质过氧化作用的启动, 保护膜结构的完整, 延缓果实软化。

本试验结果表明, NO 可以抑制纤维素酶和 LOX 活性, 提高 CAT 活性, 表现出延缓草莓果实软化衰老的生理作用。在 NO 延缓果实衰老过程中, 了解 NO 的作用方式和生理作用, 有助于揭示果实成熟衰老机理, 值得深入研究。

参考文献:

- 1 Leshem Y Y, Wills R B H. Harnessing senescence delaying gases nitric oxide and nitrous oxide: a novel approach to postharvest control of fresh horticultural produce. *Biological Plantarum*, 1998, 41 (1): 1~10
- 2 Leshem Y Y, Wills R B H, Ku V V V. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) -as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1998, 36: 825~833
- 3 Leshem Y Y, Pinchasov Y. Non-invasive photacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J. Exp. Bot*, 2000, 51: 1471~1473
- 4 Zhou H W, Sonogo L, Khalchitski A, Ben-Arie R, Lers A, Lurie S. Cell wall enzymes and cell wall changes in 'Flavortop' nectarines: mRNA abundance, enzyme activity, and changes in pectic and neutral polymers during ripening and in woolly fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 2000, 125 (5): 630~637
- 5 韩雅珊. 食品化学实验指导. 北京: 中国农业大学出版社, 1992 140~142

- Han Y S. Instruction in food chemistry experiment. Beijing: Chinese Agricultural University Press, 1992. 140 ~ 142 (in Chinese)
- 6 赵世杰, 刘华山, 董新纯. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 155 ~ 157
- Zhao S J, Liu H S, Dong X C. Experimental guide of plant physiology. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1998. 155 ~ 157 (in Chinese)
- 7 姜绍通, 罗志刚, 潘丽军. 甘薯中多酚氧化酶活性的测定及褐变控制. 食品科学, 2001, 22 (3): 19 ~ 22
- Jiang S T, Luo Z G, Pan L J. Mensuration of polyphenol oxidase in sweet potato and the control to the browning. Food Science, 2001, 22 (3): 19 ~ 22 (in Chinese)
- 8 吴敏, 陈昆松, 张上隆. 桃果实采后成熟过程中脂氧合酶活性变化. 园艺学报, 1999, 26 (4): 227 ~ 231
- Wu M, Chen K S, Zhang S L. Involvement of lipoxygenase in the postharvest ripening of peach fruit. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26 (4): 227 ~ 231 (in Chinese)
- 9 Maurice F B, Patchett J B. Cell wall degrading enzymes and the softening of senescent strawberry fruit. Journal of Food Science, 1976, 41: 1392 ~ 1395
- 10 Fischer R L. Role of cell wall hydrolase in fruit ripening. Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol., 1991, 42: 675 ~ 703
- 11 Lurie S, Klein J D, Arie R B. Prestorage heat treatment delays development of superficial scale on 'Granny Smith' apple. HortScience, 1991, 26 (2): 166 ~ 167
- 12 Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological fenton reagent? Biochem. J., 1988, 249: 185 ~ 190
- 13 Wink D A, Mitchell J B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Rad. Biol. Med., 1998, 25 (4/5): 434 ~ 456
- 14 Fobel M, Lynch D V, Thompson J E. Membrane deterioration in senescing carnation flowers. Plant Physiology, 1987, 85: 204 ~ 211
- 15 Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. Lipids, 1992, 27: 46 ~ 49

利用 RAPD 方法确认 '重阳红' 桃及其芽变

冉辛拓¹ 冯志红² 于丽辰¹ 韩继成¹ 王广鹏¹ 张新忠¹ (¹河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎 066600; ²河北科技师范学院园艺园林系, 昌黎 066600)

Determination of the Bud Mutation of 'Chongyanghong' Peach by RAPD Method

Ran Xintuo¹, Feng Zhihong², Yu Lichen¹, Han Jicheng¹, Wang Guangpeng¹, and Zhang Xinzong¹
(¹Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Changli 066600, China; ²Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, China)

关键词: 桃; 芽变; 随机扩增多态性 DNA (RAPD)

中图分类号: S 662.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 04-0593-01

'重阳红'桃为昌黎县两山乡大久保桃园中的一个自然变异株, 普遍认为是由 '大久保'桃 (*Prunus persica*) 变异而成, 但缺乏直接证据。重阳红芽变是 1998 年在昌黎两山乡重阳红桃树上发现的一个自然变异大枝。该变异基本保留了重阳红桃的优良特性, 并克服了原品种易落果和裂果的重大缺陷。历经 5 年的高接和小苗嫁接繁殖试验, 变异系所有无性繁殖后代的果实遗传性稳定。我们采用 RAPD 技术分析大久保 (6 年生)、重阳红 (6 年生) 及重阳红芽变 (4 年生) 基因组 DNA 的多态性, 以期明确其相互之间的关系。

于生长季节取植株顶部幼嫩叶片, 在液氮中磨碎样品, 按 1:5 加入细胞匀浆缓冲液抽提细胞, 离心倒掉上清液后, 去除可溶性杂质, 再加细胞核裂解缓冲液, 提取基因组 DNA。PCR 反应体系为 20 μL , 含 1 \times PCR 反应缓冲液、1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs、20 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 随机引物、50 ng 模板 DNA 和 1.25 U Taq 聚合酶。扩增反应在 MJ Research 公司的 PTC-100 型 PCR 仪上进行。反应参数为: 94 预变性 5 min 后, 92 变性 30 s, 36 退火 1 min, 72 延伸 90 s, 循环 40 次, 最后 72 延伸 10 min, PCR 结束后保持 18 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后用 UVP 公司的 M-260E 凝胶成像仪拍照。某一 DNA 片段在某样品中出现赋值 "1", 不出现赋值 "0", 以此为依据产生二态性状集, 用 RAPD distance 2.0 程序将扩增片段的二态数据转换成距离数据, 计算出的距离矩阵用 PHYLIP 3.6 程序包中的 NEIGHBOR 程序 (UPGMA 法) 进行聚类, 分析样品间亲缘关系的远近。

通过 OD_{260} 值将每个桃品种的 DNA 浓度调至 50 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 后用于 PCR 反应。经过重复 3 次以上, 400 条随机引物中筛选出 16 条引物在所试的 3 个材料间获得了清晰、重复性好的条带。16 条引物共扩增出 93 条带, 平均每个引物扩增出 5.8 条带, 绝大多数条带在 0.1 ~ 2.0 kb 之间, 其中 59 条为多态性条带, 占总带数的 63.44%。UPGMA 法聚类图显示, 重阳红与重阳红芽变聚为一类, 久保聚为一类, 重阳红芽变与重阳红的遗传距离仅为 0.062, 亲缘关系较近。通过基因组 DNA 的 RAPD 分析结果以及材料间果实性状的比较, 结合形态指标确认, 证实该芽变为重阳红芽变, 而久保与重阳红和重阳红芽变系的遗传距离分别为 0.189 和 0.195, 重阳红与久保应为关系较远的不同品种。

收稿日期: 2005-02-24; 修回日期: 2005-05-24