

黑莓果实发育过程中抗氧化系统变化规律研究

杨海燕, 张春红, 吴文龙, 李维林

(江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:以生产上表现优异的‘Arapaho’黑莓品种为试材,在花后 3 d 至成熟过程中对果实细胞中抗氧化系统的动态变化进行了观察测定。结果表明:黑莓果实发育过程中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性变化表现为先升后降的趋势,过氧化氢酶(CAT)活性变化呈下降趋势;抗坏血酸(AsA)、脯氨酸(Pro)含量呈下降趋势,还原型谷胱甘肽(GSH)含量和超氧阴离子自由基(O_2^-)产生速率呈先升后降的趋势,丙二醛(MDA)含量变化趋势并不明显。抗氧化酶 SOD、POD、CAT 和抗氧化物质 AsA、GSH、Pro 协同作用,使得果实一直处于活性氧产生和清除的平衡状态,从而保证了果实能够正常发育到完全成熟。

关键词:黑莓;果实发育;抗氧化系统

中图分类号:S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0013-05

黑莓(*Rubus* spp.)属蔷薇科悬钩子属(*Rubus* L.)灌木状浆果类果树,其果实营养价值高,含有丰富的花色苷色素、鞣花酸等多酚类物质,具有抗衰老和提高人体免疫力等功效^[1-2],是近年来国内外新兴的第三代果树之一,具有很高的经济价值。‘Arapaho’是由美国阿肯色州大学于 1992 年推出的一个黑莓品种^[3],于 2004 年引入南京,表现出直立性好、无刺、早熟等优良特性,其浆果短圆锥形,黑、亮且硬度好,品质优良,甜度比大多数有刺品种高,但适应性较差,了解其果实生长发育过程中抗氧化系统的变化,有利于弄清果实生长发育的特点,对其抗逆性研究具有较好的指导意义,并可为黑莓的现代化栽培管理和进一步的基础研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黑莓品种‘Arapaho’种植于江苏省中国科学院植物研究所溧水黑莓实验基地。

1.2 试验方法

于 2012 年 5 月开花盛期,以黑莓花蕾刚开始绽放

还未授粉开始随机挂牌标记,从花后 3 d(Days after flower, DAF)开始取样,之后于第 6、12、18、24、30、36 天各取 1 次样,以花后 3 d 的试验组为对照。

1.3 项目测定

1.3.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 取鲜重 1.0 g 的果实,加入 8 mL 浓度为 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8,含有 1%聚乙烯吡咯烷酮和 10 mmol/L 的巯基乙醇)及少量石英砂于冰浴上匀浆,4 层纱布过滤,滤液在 4℃下经 $10\,000\times g$ 离心 20 min,上清液用于酶活性分析。参照 Beyer 等^[4]的黄嘌呤氧化酶法,其活性单位定义为:以 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个单位(U)。

1.3.2 过氧化物酶(POD)活性的测定 参照 Maehly^[5]的愈创木酚法,取 1 mL 酶液,加入 3 mL 反应混合液,用 UV-754 型分光光度计测定 470 nm 处的吸光值,每隔 15 s 读数 1 次,以每分钟吸光度的变化值表示酶活大小。

1.3.3 过氧化氢酶(CAT)活性的测定 CAT 活性测定采用钼酸盐法^[6]。用南京建成生物工程研究所的 CAT 试剂盒测定,其活性单位定义为:1 g 材料 1 s 分解 $1\ \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 的 CAT 量为 1 个活力单位。

1.3.4 抗坏血酸(AsA)含量的测定 抗坏血酸(AsA)的测定参照陈建勋等^[7]的方法进行。称取 0.5 g 果实,切碎,加入 5 mL 5%三氯乙酸,研磨, $10\,000\times g$ 离心 10 min,上清液定容至 5 mL。吸取上清液 0.2 mL,分别加入 150 mmol NaH_2PO_4 (pH 7.4) 0.2 mL、 H_2O 0.2 mL、混合均匀,30 s 后再依次分别往各管中加入 10% TCA 0.4 mL、44% H_3PO_4 0.4 mL、4% 2,2-二联吡啶 0.4 mL 和 3% FeCl_3 0.2 mL,混合后在 37℃水浴中保温 60 min,

第一作者简介:杨海燕(1983-),女,博士,助理研究员,现主要从事黑莓等小果类生物技术研究。E-mail: haiyanyang_025@126.com.
责任作者:李维林(1966-),男,研究员,博士生导师,现主要从事悬钩子属植物(黑莓和树莓)等研究和应用工作。E-mail: lwlcnb@mail.cnbg.net.

基金项目:江苏省科技支撑计划资助项目(BE2013440, BE2013309);江苏省农业三新工程资助项目(SXGC[2013]347)。

收稿日期:2014-04-17

然后用 UV-754 型分光光度计测定 525 nm 处的吸光值,根据标准曲线计算 AsA 含量。

1.3.5 还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定 GSH 的测定参照 Anderson^[8]的方法,稍加修改。称取 0.2 g 果实,加入 6 mL 15% 偏磷酸溶液研磨,10 000×g 离心 10 min。取样品液 0.2 mL,加入 150 mmol/L NaH₂PO₄ 溶液(pH 7.7)2.6 mL,混合后再加入 0.2 mL DTNB 试剂,以磷酸缓冲液代替 DTNB 试剂作空白,摇匀后于 30℃ 下保温 5 min,然后用 UV-754 型分光光度计测定 412 nm 处的吸光值,根据标准曲线计算 GSH 含量。

1.3.6 超氧阴离子自由基(O₂⁻)产生速率的测定 参照罗广华等^[9]的羟胺氧化反应方法测定。0.5 mL 样品粗酶液中加入 0.5 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)和 1 mL 1 mmol/L 盐酸羟胺,摇匀后于 25℃ 下保温 1 h,再加入 1 mL 17 mmol/L 对氨基苯磺酸(以冰醋酸:水=3:1 配制)和 1 mL 7 mmol/L α-萘胺(以冰醋酸:水=3:1 配制),混匀后于 25℃ 下保温 20 min,用 UV-754 型分光光度计测定 530 nm 处的吸光值,根据公式计算 O₂⁻ 产生速率。

1.3.7 丙二醛(MDA)含量的测定 参照 Heath 等^[10]方法测定。取 1.0 g 果实,加入 10 mL 10% 三氯乙酸溶液研磨,4 000×g 离心 10 min,取上清 2 mL,加入 2 mL 0.6% 硫代巴比妥酸(TBA)溶液,混匀,沸水浴反应 15 min,迅速冷却后离心,取上清液,用 UV-754 型分光光度计分别测定 532、600、450 nm 处的吸光值,根据公式计算 MDA 含量。

1.3.8 游离态脯氨酸(Pro)含量的测定 果实中游离态 Pro 含量参照 Bates 等^[11]的方法进行测定。称取 0.5 g 果实,剪碎后加入 5 mL 3% 磺基水杨酸,于沸水浴中浸提 10 min,取出冷却至室温。吸取提取液 2 mL,加 2 mL 冰醋酸和 2 mL 2.5% 酸性茚三酮溶液(以 3:2 的冰醋酸和 6 mol/L 磷酸为溶剂配制),再置于沸水浴中显色 30 min,取出冷却至室温后加入 4 mL 甲苯,振荡 30 s,静置片刻,取上层液,3 000 r/min 离心 5 min。用吸管轻轻吸取上层 Pro 红色甲苯溶液于比色杯中,以甲苯为空白对照,用 UV-754 型分光光度计测定 520 nm 处的吸光值,根据标准曲线算 Pro 含量。

1.4 数据分析

运用 Excel 2003 软件完成试验数据汇总、统计与分析。用相关系数对各指标与处理组间进行相关性统计,其中 $P \geq 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别表示无显著、显著、极显著差异。

2 结果与分析

2.1 黑莓果实发育过程中 SOD、POD 和 CAT 活性的变化

黑莓果实在发育的不同时期,3 种保护酶表现出了不同的变化趋势。SOD 活性从花后 3 d 起开始升高,其

变化趋势表现为先升后降,第 24 天时其活性达到最大值,为对照组的 148.55%,之后缓慢降低,第 36 天时其活性仍为对照的 116.67%(图 1-A);POD 活性变化表现为先升后降的趋势,第 12 天时达到峰值,为对照的 133.33%,之后开始迅速下降,18 d 后低于对照(图 1-B);CAT 活性变化呈下降趋势,第 36 天其活性达到最小值,仅为对照的 2.39%(图 1-C)。分析结果表明,各时间组 SOD 活性差异不显著($r=0.6026$, $P \geq 0.05$),POD 活性变化与果实发育时间呈显著差异($r=-0.8116$, $P < 0.05$),CAT 活性变化与果实发育时间呈极显著差异负相关($r=-0.9387$, $P < 0.01$)。

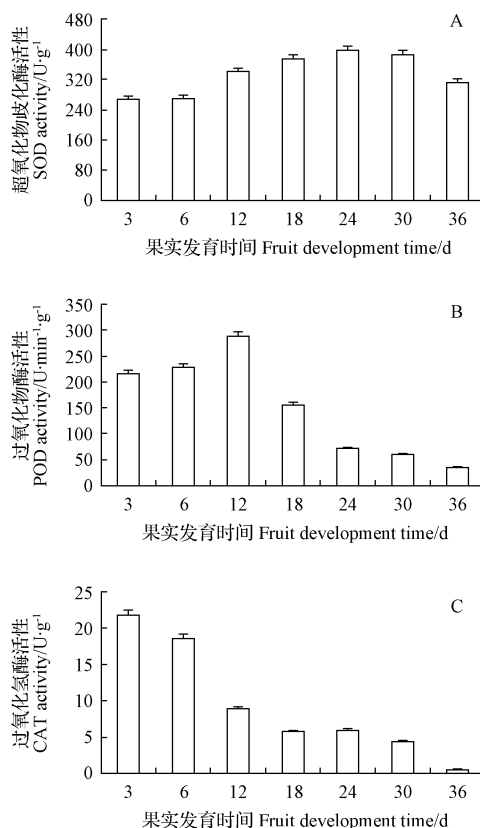


图 1 黑莓果实发育过程中 SOD、POD、CAT 活性的变化
Fig. 1 Changes of activities of SOD, POD and CAT in the process of fruit development

2.2 黑莓果实发育过程中 AsA 和 GSH 含量的变化

由图 2-A 可以看出,AsA 为果实中的小分子保护物质,其含量随着果实逐渐成熟呈下降趋势,但下降趋势较缓慢,第 36 天时仅比对照减少了 22.76%;GSH 含量随着果实逐渐成熟呈先升后降的趋势(图 2-B),在果实发育初期,GSH 含量迅速上升,在第 12 天时达到最大值,含量为对照的 129.21%,随后开始下降,18 d 后低于对照。分析结果表明,AsA 含量变化与果实发育时间呈极显著负相关($r=-0.9133$, $P < 0.01$),GSH 含量变化

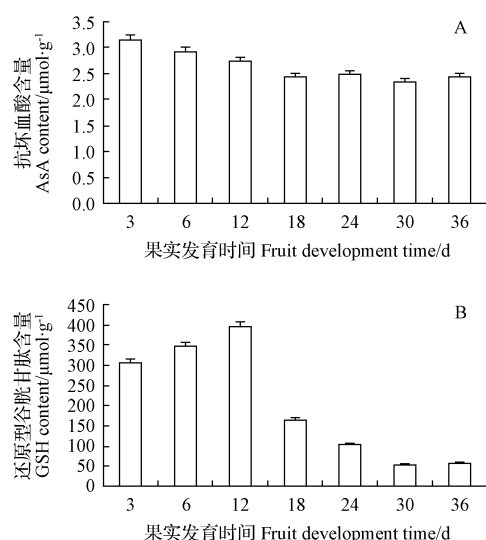


图2 黑莓果实发育过程中AsA、GSH含量的变化

Fig. 2 Changes of contents of AsA and GSH in the process of fruit development

与果实发育时间呈极显著相关($r=-0.8748, P<0.01$)。

2.3 黑莓果实发育过程中脯氨酸(Pro)含量的变化

作为重要的小分子渗透调节物质,在果实不断发育过程中Pro含量呈下降趋势(图3),第36天降为对照的5.03%。分析结果表明,Pro含量变化与果实发育时间呈极显著负相关($r=-0.9395, P<0.01$)。

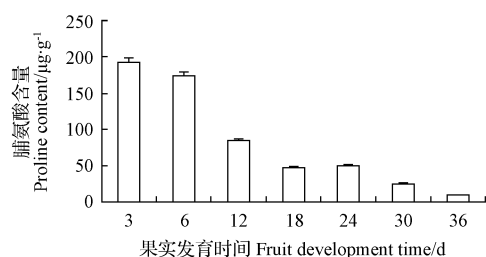


图3 黑莓果实发育过程中脯氨酸含量的变化

Fig. 3 Changes of proline content in the process of fruit development

2.4 黑莓果实发育过程中超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生速率的变化

由图4可以看出,随着果实逐渐发育成熟, $O_2^{\cdot-}$ 产生速率呈先升后降的趋势,第18天达到最大值,为对照的139.11%,之后开始下降,第36天时降为对照36.31%。表明随着果实的不断发育,其细胞内也有一定的 $O_2^{\cdot-}$ 产生,但随着果实成熟度加深, $O_2^{\cdot-}$ 产生速率反而下降,这可能与果实细胞内色素含量不断增加有关。分析结果表明, $O_2^{\cdot-}$ 产生速率的变化与果实发育时间相关性不显著($r=-0.5979, P\geq 0.05$)。

2.5 黑莓果实发育过程中MDA含量的变化

MDA是植物细胞膜脂过氧化的毒性终产物,是氧

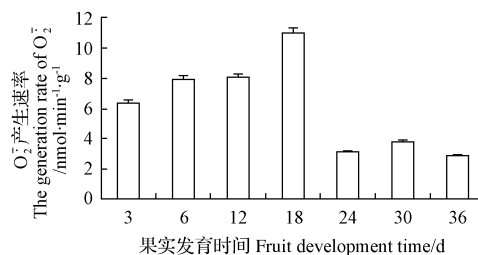
图4 黑莓果实发育过程中 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率

Fig. 4 Changes of $O_2^{\cdot-}$ generation rate in the process of fruit development

化伤害的生理指标。由图5可以看出,随着果实的不断发育,MDA含量变化趋势并不明显。分析结果表明,MDA含量变化与果实发育时间相关性不显著($r=-0.2596, P\geq 0.05$)。

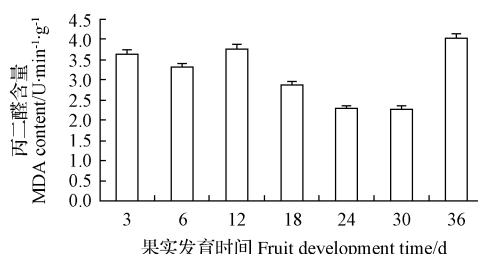


图5 黑莓果实发育过程中MDA含量的变化

Fig. 5 Changes of MDA content in the process of fruit development

3 讨论与结论

果实的发育是一个复杂的生理代谢过程,并受到很多因素的影响,如光照、温度、水分、土壤、养分等,在果实逐渐成熟的过程中必然会受到各种逆境因子的影响。活性氧(ROS)作为一种次级胁迫影响着植物的正常代谢,受到抗氧化系统的调节。机体内同时存在着2种主要的抗氧化系统,二者分别是以超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等为主的抗氧化酶系统和以谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)等小分子物质为主的非酶系统。SOD是Mehler反应产物 $O_2^{\cdot-}$ 的关键性清除酶,它催化 $O_2^{\cdot-}$ 发生歧化反应,转化成氧化性较弱的 H_2O_2 ^[12], H_2O_2 又在CAT和POD的作用下生成 H_2O ^[13],以降低活性氧对植株的毒害作用,三者的活性协调一致,维护膜系统的稳定性。但是由于酶的活性有一个阈值,SOD、POD和CAT对膜系统的保护作用是有其一定限度的^[14]。该试验结果表明,在黑莓果实的发育过程中,果实细胞内活性氧呈先升后降的趋势,较高的SOD活性在一定程度上对发育过程中的果实起到了很好的保护作用,它不断地将 $O_2^{\cdot-}$ 歧化成 H_2O_2 ,虽然在第36天时其活性开始下降,但仍为对照的116.67%,而大

量增加的 H_2O_2 对 POD 和 CAT 的活性则起到了一定的抑制作用。AsA 是植物体合成的一类含量丰富的己糖内酯化合物,是一种普遍存在于植物组织中的高丰度小分子抗氧化物质,它可以直接与活性氧作用,将其还原,并通过 AsA-GSH 循环间接清除活性氧。GSH 是植物体内还原型硫长距离运输的主要形式,它通过 AsA 的转换发挥作用去除细胞中由于环境压力诱导的自由基 -OH,将 H_2O_2 还原成水和 -OH 基团,自身则转化为氧化型谷胱甘肽(GSSH)^[15]。在该试验中,AsA 含量随着果实逐渐成熟呈下降趋势,但下降较缓慢,第 36 天仍为对照的 77.24%;GSH 含量呈先升后降的趋势,迅速下降的 GSH 可能通过 AsA 的转换维持了较高的 AsA 含量,从而发挥了其抗氧化功能。由此可见,SOD、POD、CAT、AsA 和 GSH 都是 ROS 清除系统中的重要保护剂,它们协同作用使得果实一直处于活性氧产生和清除的平衡状态,从而保证了果实的正常发育直到完全成熟。

MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一,其在生物体内的含量可用以表明生物体所受的氧化压力,间接反映细胞损伤的程度^[16]。在该试验中,MDA 含量随着果实逐渐发育成熟其变化趋势并不明显,表明细胞膜损伤并不明显,这与果实细胞中 ROS 的清除一直保持动态的平衡是一致的。

脯氨酸(Pro)是植物蛋白质的组分之一,主要以游离状态广泛存在于植物中,是水溶性最大的氨基酸,具有较强的水合能力^[17]。Pro 本身可以作为渗透调节物质,它的增多有助于降低细胞酸度,利于脱氢酶辅酶Ⅱ($NADP^+$, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)的再生以满足光合和呼吸过程所需,从而使其能顺利进行。Pro 本身也可以作为逆境修复过程中的氮素和碳架,并可以做自由基清除剂、膜的稳定剂和细胞质内酶的保护剂,从而对各种逆境胁迫起保护作用^[18]。在该研究中,Pro 含量呈迅速下降趋势,这在一定程度也反映出‘Arapaho’品种黑莓对环境的耐受性较弱。此外,黑莓果实本身蛋白质含量较低,可能也是 Pro 含量下降的原因之一。

综上所述,在黑莓果实的发育过程中并不是某一种酶或是某一种物质发挥了保护作用,而是抗氧化酶系统和非酶系统相互协同共同起作用,这种作用在果实正常发育的过程中十分重要。当然,黑莓果实内可能还存在其它更为重要的保护系统,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 吴文龙,李维林,闫连飞,等.不同品种黑莓鲜果营养成分的比较[J].植物资源与环境学报,2007,16(1):58-61.
- [2] 吴文龙,闫连飞,李维林,等.黑莓品种间杂交及与野生悬钩子种间杂交初步研究[J].东北农业大学学报,2013,44(7):123-127.
- [3] Stafne E T, Clark J R. Genetic relatedness among eastern North American blackberry cultivars based on pedigree analysis [J]. Euphytica, 2004, 139(2):95-104.
- [4] Beyer W F, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of changes in conditions [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 161(2):559-566.
- [5] Maehly A C. Plant peroxidase [J]. Methods in Enzymology, 1955(2):801-813.
- [6] Karsten U, Franklin L A, Lüning K. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta) [J]. Planta, 1998, 205(2):257-262.
- [7] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导[M].广州:华南理工大学出版社,2002:122-127.
- [8] Anderson M E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples [J]. Method Enzymol, 1985(113):545-548.
- [9] 罗广华,王爱国.植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J].植物生理学通讯,1990(6):94-95.
- [10] Heath R L, Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 125(1):189-193.
- [11] Bates L E, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water stress studies [J]. Plant and Soil, 1973, 39(1):205-207.
- [12] 王耀晶,马聪,张薇,等.干旱胁迫下硅对草莓生长及生理特性的影响[J].核农学报,2013,27(5):703-707.
- [13] Prasad M N V, Malec P, Waloszek A, et al. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation [J]. Plant Science, 2001, 161(5):881-889.
- [14] Teisseire H, Guy V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*) [J]. Plant Science, 2001, 153(1):65-72.
- [15] Foyer C H, Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context [J]. Plant Cell Environment, 2005, 28(8):1056-1071.
- [16] 段如雁,韦小丽,孟宪帅.不同光照条件下花榈木幼苗的生理生化响应及生长效应[J].中南林业科技大学学报,2013,33(5):30-34.
- [17] Delauney A J, Verma D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plant [J]. Plant Journal, 1993, 4(2):215-223.
- [18] Ashraf M, Fooland M R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance [J]. Environmental and Experimental Botany, 2007, 59(2):206-216.

Changes on Antioxidant System in Fruit of *Rubus* spp. cv ‘Arapaho’ During the Development and Ripening Stage

YANG Hai-yan, ZHANG Chun-hong, WU Wen-long, LI Wei-lin

(Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

沙拐枣幼枝解剖结构及其生态适应性

刘明珍¹, 刘秀珍², 周忠泽³, 孙伟³

(1. 皖西学院 材料与化工学院, 安徽 六安 237012; 2. 巢湖学院 体育系, 安徽 巢湖 238000;

3. 安徽大学 生命科学院, 安徽省生态工程与生物技术重点实验室, 安徽 合肥 230039)

摘要:以沙拐枣为试材, 对其幼枝和茎进行了解剖学观察和研究, 同时辅以泡果沙拐枣的茎的解剖学研究为对照, 以期探讨沙拐枣的生态适应性。结果表明: 沙拐枣的幼枝和茎的解剖结构显著不同, 沙拐枣作为新疆荒漠植被中防风固沙的优良植物, 其幼枝解剖结构已随环境发生特化, 具有 1~2 层呈栅栏组织状排列的细胞, 1 层为海绵组织状排列的细胞, 皆具叶绿体, 皮层内含有粘液细胞等, 表明沙拐枣长期对干旱、高温生境的适应, 促使其更为强烈地分化出旱生结构, 因而具有明显的生态适应性。

关键词:沙拐枣; 幼枝; 解剖结构; 生态适应性

中图分类号:S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0017-03

沙拐枣(*Calligonum mongolicum* Turcz.) 属藜科沙拐枣属灌木或半灌木^[1]。沙拐枣是速生灌木, 生长快, 枝条茂密, 有良好的防风固沙效果, 是一种先锋固沙植物, 其叶极度退化, 光合作用主要由当年生绿色嫩枝进行。沙拐枣是强旱生灌木, 非常耐干旱、耐高温, 广泛分布于干旱地区的沙漠和砾质、土质戈壁。新疆准噶尔盆地、塔里木盆地, 甘肃河西走廊, 内蒙古西部乌兰布和、巴丹吉林、腾格里沙漠中均有生长。泡果沙拐枣(*C. junceum* (Fisch. et Mey.) Endl) 也是藜科沙拐枣属的植物, 耐阴, 是优良固沙及观赏灌木, 生于砾石荒漠、沙地及固定沙丘, 产于新疆、内蒙古等地区, 蒙古和中亚有分布。

沙拐枣属植物是新疆荒漠植被中重要建群种之一, 又是防风固沙的优良植物。我国有该属植物 23 种, 主产于内蒙古、甘肃、宁夏和新疆等地, 其中以新疆最多, 约占 4/5, 其当年生干、鲜幼枝还是骆驼和羊的良好饲料, 其绿色嫩枝可进行光合作用。

Haraldson^[2]曾报道了藜科部分植物茎的解剖结构, 但只有部分藜科植物茎的手绘简图。毛祖美等^[3]利用幼枝解剖结构研究了藜科沙拐枣属内的系统发育和解剖结构特征的演化, 但未见解剖图。该试验在前人研究的基础上^[4-7], 对沙拐枣的幼枝和茎的解剖结构进行了研究, 以期对沙拐枣生态适应性及适应意义提供理论依据和结构支持, 为研究该植物的分类和演化提供解剖学资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料沙拐枣(*Calligonum mongolicum* Turcz.) 和泡果沙拐枣(*C. junceum* (Fisch. et Mey.) Endl) 均取自安徽大学生命科学学院标本室蜡叶标本(表 1)。凭证标本存于安徽大学生命科学学院标本室(AHU)。

第一作者简介:刘明珍(1974-), 安徽怀远人, 女, 硕士, 讲师, 现主要从事植物的解剖学及分子生物学等研究工作。E-mail:lmz@wxc.edu.cn.

责任作者:周忠泽(1967-), 男, 博士, 教授, 现主要从事植物学等研究工作。E-mail:zhzz@ahu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670151)。

收稿日期:2014-04-21

Abstract: Taking blackberry cultivar (*Rubus* spp. cv 'Arapaho') as material, from the stage of three days after flower (DAF) to the maturation process, fruit antioxidant system of 'Arapaho' was investigated. The results showed that superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activity first increased and then decreased, catalase (CAT) activity decreased gradually during the fruit development and ripening process; ascorbic acid (AsA) and free proline (Pro) content decreased during the fruit ripening process, glutathione (GSH) content and the generation of O₂ first increased and then decreased, MDA content showed no significant difference in the process of fruit development. The combination of antioxidants SOD, POD, CAT and antioxidant materials AsA, GSH, Pro played an important role to keep the balance of generating and scavenging of active oxygen in the process of fruit development, and ensure fruit to develop and mature.

Key words: blackberry (*Rubus* spp.); fruit development; antioxidant system