

草莓果实采后衰老过程中超微弱发光的变化及与活性氧的关系

郭金丽, 朱冠宇, 刘艳, 陈贵华, 刘欢, 李连国

(内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:以“红颜”草莓果实为试材,研究了草莓果实衰老过程中超微弱发光(ultraweak luminescence, UWL)和活性氧水平的变化及二者之间的关系。结果表明:在草莓果实采后衰老过程中,脂氧合酶(LOX)活性和 H_2O_2 含量先上升后下降,丙二醛(MDA)含量、 O_2^- 产生速率及相对电导率整体呈上升趋势;UWL 强度整体呈下降趋势。UWL 与 LOX 呈中等正相关,与 MDA 含量呈中等负相关,与 O_2^- 产生速率、相对电导率及 H_2O_2 含量无相关性。在草莓衰老过程中,活性氧水平整体上升积累,而 UWL 强度整体呈下降趋势,说明 UWL 强度并没有随着活性氧的积累而增强。

关键词:草莓果实;发育成熟;衰老;超微弱发光;活性氧

中图分类号:S 668.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)11-0001-04

生物体内专门的体系发出的光称为“功能化学发光”(如萤火虫发光),受辐射诱导的发光称为荧光,此外还有由代谢反应而引起的发光,即与生物体内代谢过程相联系的超微弱发光(ultraweak luminescence, UWL)。任何生物组织或细胞在生命活动的代谢过程中,都自发地辐射出一种极其微弱的光子流,其强度仅为在 1 s 内 1 cm^2 上几个至几千个光子($10^0 \sim 10^3\text{ hv} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$),波长范围为 $180 \sim 800\text{ nm}$ ^[1]。UWL 几乎存在于所有的生物活体中,反映生物体与生命活动过程有关的信息。研究表明,UWL 与生物机体的氧化代谢、细胞分裂和死亡、细胞内和细胞间的信息传递、光合作用以及生长过程均有内在联系^[2-3]。1923 年前苏联细胞生物学家最早在“洋葱试验”中发现了 UWL 现象^[4],一直到 20 世纪 80 年代,随着超高灵敏度的弱光图像探测器的的发展,UWL 的研究进入到一个新的阶段,开始在生命科学、医学、食品和环境科学等领域开展研究^[5-6]。

UWL 自 20 世纪 90 年代以来进入到农业领域,仅有的极少数 UWL 在农业领域中的研究主要涉及植物在不同发育阶段的 UWL 表现、UWL 与植物种子活力

的关系、UWL 与植物的抗逆性、UWL 与果实品质的关系等方面的研究^[7-12]。以上研究基本集中在 UWL 与植物生长发育的问题上,远未探清 UWL 与植物之间的关系,更未涉及深层次的研究,如 UWL 产生的生物学机制。生物化学的观点认为,UWL 有可能来自于能级跃迁、活性氧发光、DNA 发光和能量转换发光等方面,但目前并无充分的试验证实以上观点。

在农业领域中,UWL 可能是研究植物细胞的信息传递、调控、识别等基本过程的重要工具;作为生命过程的一个极其灵敏的指示器,UWL 有望在植物种子活力检测、植物抗逆性鉴定、果实品质无损检测等方面成为一种新的检测方法。目前,有关 UWL 与植物生长发育关系的研究刚刚起步,植物中 UWL 的产生机制还不清楚,有待于更多的试验来研究验证。

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)果实柔软多汁、营养价值高,果实成熟后极易衰老与腐烂。草莓是典型的非跃变型果实,有关草莓果实衰老生理的研究很多,活性氧积累是促进草莓果实衰老的一个重要因素^[13-14]。在非跃变型草莓果实成熟衰老中 UWL 表现如何,在果实成熟衰老过程中的 UWL 现象中,活性氧水平究竟起什么作用,这些问题的研究均鲜见报道。该研究拟以草莓果实为材料,研究草莓果实衰老过程中的 UWL 和活性氧的变化,了解 UWL 与草莓果实成熟衰老的关系,并进一步探讨侧重于活性氧的 UWL 产生机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试草莓“红颜”种植于呼和浩特市新城区农丰果

第一作者简介:郭金丽(1972-),女,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事园艺植物生理生态和植物超微弱发光等研究工作。E-mail:guojinli1111@163.com.

责任作者:李连国(1959-),男,博士,教授,现主要从事园艺植物生态生理及栽培等研究工作。E-mail:nmndllg@foxmail.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260455)。

收稿日期:2016-02-15

蔬种植农民专业合作社温室。

1.2 试验方法

选择全红期、大小一致、无病虫害的红颜草莓果实,采摘后立即运回实验室,洗净晾干后以保鲜袋包装,于常温(25 ± 1) °C 贮藏,之后每 1 d 取样 1 次进行测定,共测 5 d。每次取样后一部分立即进行 UWL 的测定;另一部分洗净晾干,将果肉剪碎混合均匀,用液氮速冻,于 -80 °C 保存,用于脂氧合酶(LOX)活性、超氧阴离子自由基(O_2^-)产生速率、过氧化氢(H_2O_2)含量、丙二醛(MDA)含量、相对电导率的测定。

1.3 项目测定

UWL 的测定采用北京建新力拓科技有限公司生产的超微弱发光测试系统(BPCL-SH15-TGC)。测试前先开机预热 30 min,随机选取 10 个草莓,用直径 1 cm 的打孔器取 1.5 cm 高的果肉,迅速放入仪器暗室测量杯内测定,共测 10 次,减去本底取平均值,即为草莓果肉的最终发光强度。

LOX 活性测定:取 1 g 果肉加 3 mL 提取缓冲液 [$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液,1% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT), $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟(PMSF),pH 7.2],冰浴研磨,4 °C $12\,000 \text{ g}$ 离心 20 min,上清液即为酶提取液。测定时 5 mL 磷酸缓冲液加入 200 μL 反应底物[0.25 mL Tween-20,加入 5 mL $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸缓冲液(pH 9.0)混匀,再加入 0.25 mL 亚油酸混匀,加 1.3 mL 1 N 的 NaOH 充分摇匀至澄清,后加入 45 mL 硼酸缓冲液,用 1 N HCl 调节 pH 6.6,最后定容至 100 mL],30 °C 保温 10 min,以加入 200 μL 酶提取液为反应开始,立即计时,用 T6 新世纪型紫外可见分光光度计在波长 234 nm 下进行测定。

O_2^- 产生速率的测定参考李玲^[15]、孙群等^[16]的方法; H_2O_2 含量的测定参考张治安等^[17]、陈建勋等^[18]的方法;MDA 含量、相对电导率的测定均采用李合生^[19]的方法。

1.4 数据分析

数据采用 Excel 统计软件进行处理,用 SPSS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 草莓果实采后衰老过程中活性氧的变化

草莓果实采后衰老过程中,由图 1 可以看出,随着贮藏时间的延长,LOX 活性先上升后下降,整体呈下降趋势。LOX 活性第 2 天上升最明显,为 $295 \text{ OD}_{234} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,与第 1 天相比升高了 $180 \text{ OD}_{234} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,第 3 天时达到最大值为 $308 \text{ OD}_{234} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,之后下降。草莓果实采后贮藏过程中 O_2^- 产生速率整体呈上升趋势,其中于第 3 天出现峰值为 $84.9 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (图 2)。

草莓果实采后衰老过程中 H_2O_2 含量先上升后下降,贮藏前后 2 d 变化缓慢,第 3 天迅速上升达到峰值,为 $0.575 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$,之后下降,第 5 天含量为 $0.239 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 3)。草莓果实采后衰老过程中,随着贮藏时间的延长,MDA 含量均持续上升,MDA 含量从第 2 天起开始快速上升,第 5 天时达到 $0.0333 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 4)。相应地,随着贮藏时间的延长,相对电导率亦缓慢上升,贮藏后第 1 天为 80.51%,第 5 天为 96.77%(图 5)。

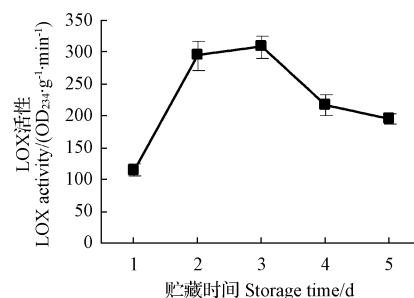


图 1 草莓果实衰老过程中 LOX 活性的变化

Fig. 1 The change of LOX activity during the process of fruit senescence in strawberry

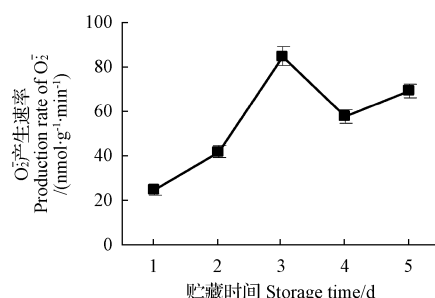


图 2 草莓果实衰老过程中 O_2^- 产生速率的变化

Fig. 2 The change of production rate of O_2^- during the process of fruit senescence in strawberry

以上活性氧系统的变化说明,在草莓果实采后贮藏过程中,活性氧不断积累,膜脂过氧化程度逐渐加剧,膜受伤导致质膜透性增大,最终导致草莓果实衰老。

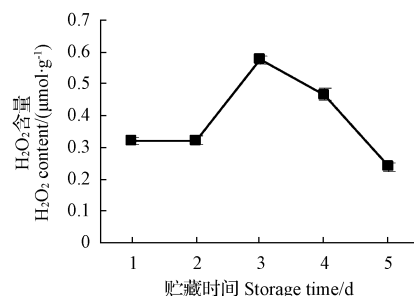


图 3 草莓果实衰老过程中 H_2O_2 含量的变化

Fig. 3 The change of H_2O_2 content during the process of fruit senescence in strawberry

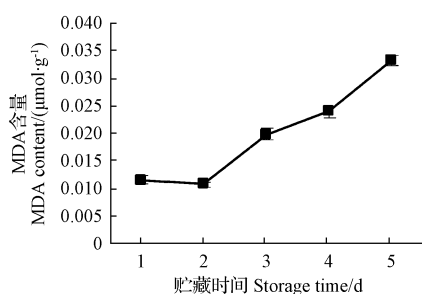


图4 草莓果实衰老过程中MDA含量的变化

Fig. 4 The change of MDA content during the process of fruit senescence in strawberry

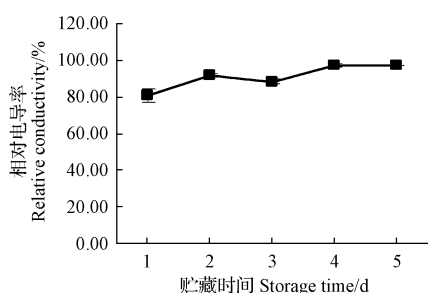


图5 草莓果实衰老过程中相对电导率的变化

Fig. 5 The change of relative conductivity during the process of fruit senescence in strawberry

2.2 草莓果实衰老过程中超微弱发光的变化

常温贮藏条件下,随着草莓果实的衰老,UWL于采后第2天有所上升,之后持续下降,整体呈下降趋势;采后第1天为46 counts·s⁻¹,第5天为29 counts·s⁻¹,下降了36.96%(图6)。

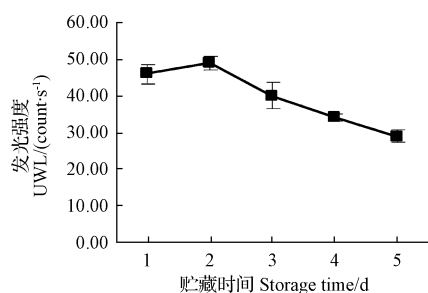


图6 草莓果实衰老过程中UWL的变化

Fig. 6 The variation of UWL during the process of fruit senescence in strawberry

2.3 草莓果实衰老过程中超弱发光与活性氧的关系

常温贮藏条件下,LOX活性和H₂O₂含量先上升后下降,MDA、O₂⁻及质膜透性整体呈上升趋势,UWL强度整体呈下降趋势;UWL与LOX呈中等正相关,与MDA呈中等负相关,与O₂⁻、相对电导率及H₂O₂无相关性。以上UWL与活性氧的相关性分析说明,UWL强度并没有随着活性氧的积累而增强(表1)。

表1 草莓果实采后衰老过程中UWL与活性氧的相关分析

Table 1 The correlation analysis of UWL and reactive oxygen system under postharvest senescence

活性氧 Reactive oxygen species	UWL 回归方程式 UWL regression equation	相关系数 R ² Correlation coefficient R ²
脂氧合酶 LOX	$y=0.041x_1+30.2238$	0.5825
丙二醛 MDA	$y=-425.144x_2+48.0349$	-0.7116
超氧阴离子自由基 O ₂ ⁻	$y=-0.062x_3+43.0550$	-0.2611
相对电导率 Relative conductivity	$y=-14.577x_4+52.8246$	-0.1766
过氧化氢 H ₂ O ₂	$y=-0.316x_5+39.7217$	-0.0076

注:y为发光强度,counts·s⁻¹;x₁~x₁₀为对应活性氧水平。

Note:y means light intensity,count·s⁻¹;x₁~x₁₀ mean corresponding active oxygen level.

3 讨论与结论

草莓是典型的非跃变型果实,其中活性氧是导致草莓果实衰老的主要方面^[20]。目前,有关植物生长发育与UWL的关系尚不清楚,植物中UWL的产生来源问题更是仅局限于猜想和假设。UWL有可能来自于活性氧发光为其中的一种推测,活性氧观点假设不饱和脂肪酸经氧化后产生的活性氧之间的相互作用,形成的各种可辐射的活化状态,可能作为UWL的来源之一^[21]。如张菊平等^[22]发现,当植物处于各种污染的环境中时,细胞或组织中的活性氧代谢增强,导致UWL增强;张新华等^[23]研究表明,活性氧与UWL产生有关。

该试验中,在草莓果实采后衰老过程中,活性氧水平的积累及膜脂过氧化程度的增加,是草莓果实衰老的显著特征。采后贮藏过程中,UWL强度整体呈下降趋势;LOX活性和H₂O₂含量先上升后下降,MDA、O₂⁻及质膜透性整体呈上升趋势;UWL与LOX呈中等正相关,与MDA呈中等负相关,与O₂⁻、相对电导率和H₂O₂无相关性。以上研究表明,在草莓果实发育成熟及衰老过程中,活性氧水平整体呈上升积累趋势,UWL强度并没有随着活性氧的累积而增强。同时,作者在研究高温胁迫下景天属植物UWL与活性氧的变化发现,高温胁迫下随着活性氧的积累,UWL强度呈增强的趋势^[24]。

综合以上情况,在草莓果实衰老过程中活性氧的积累并没有引起UWL的变化;或并不是引起UWL变化的主要来源,有可能活性氧是UWL的来源之一,但存在其它因素对UWL的影响更强,导致活性氧的变化并不能体现UWL的变化趋势。目前只有零星试验探索UWL与活性氧的关系,远不足以探清二者之间的关系,有待于进行大量的试验来研究证实。

(该文作者还有梁爽,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] POPP F A. Biophoton emission[J]. Experientia, 1988, 44(7): 543-544.
- [2] POPP F A, GUQ L. Recent advances in biophoton research and its

applications[M]. Singapore: World Scientific, 1992:1-46.

- [3] 袁佐清. 生物超微弱发光研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(8): 3092-3094.
- [4] GURVISCH A G, GRABJE S, SALKIND S. Dienatur desspezifischen erregers der zellteilung[J]. Arch Entw Mech, 1923, 100:11-40.
- [5] 邹飞, 湛学军, 章涛, 等. 肿瘤患者血清超微弱发光的研究[J]. 江西医学检验, 2001, 19(2): 90.
- [6] 舒柏华, 孙丹陵, 王胜利, 等. 肉类食品细菌污染生物发光快速分析技术研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 483-484.
- [7] 胡献明, 潘建伟, 陈虹, 等. 铝胁迫诱导大麦根尖细胞超微弱发光的变化[J]. 浙江大学学报, 2002, 28(4): 383-386.
- [8] 侯仙慧, 廖祥儒, 李颖, 等. 莧菜种子萌发过程的超微弱发光及其机理研究[J]. 种子, 2004, 23(7): 23-27.
- [9] 刘红梅, 廖祥儒, 吴立峰, 等. 热休克对小麦未成熟种子萌发、生物发光和抗氧化酶活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3): 75-78.
- [10] 林桂玉, 黄在范, 张翠华, 等. 菊花花芽分化期超微弱发光及生理代谢的变化[J]. 园艺学报, 2008, 35(12): 1819-1824.
- [11] YU Y, WANG J. Ultraweak bioluminescence and vigour of irradiated rice[J]. Int J Agric and Biol Eng, 2010, 3(1): 85-90.
- [12] 赵丹莹, 生吉萍, 丁洋, 等. 超微弱发光用于番茄果实冷害发生程度的无损监测[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2493-2495.
- [13] 樊秀彩, 关军锋, 张继澍, 等. 草莓采后微粒体膜 Ca^{2+} -ATPase 活性

与膜脂过氧化水平[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 15-18.

- [14] 陈学红, 郑永华, 杨震峰, 等. 高氧处理对草莓果实采后活性氧代谢和腐烂的影响[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(1): 99-102.
- [15] 李玲. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [16] 孙群, 胡景江. 植物生理学研究技术[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2006.
- [17] 张治安, 陈展宇. 植物生理学实验技术[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2008.
- [18] 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.
- [19] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [20] 顾采琴, 朱冬雪, 李棋. 草莓果实采后 NAD 激酶活性与 NAD(H)、NADP(H) 含量及活性氧代谢的关系[J]. 中国农业科学, 2007, 40(2): 352-357.
- [21] 张新华, 杨洪强. 植物叶绿体和线粒体的超微弱发光[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 111-114.
- [22] 张菊平, 张兴志, 巩振辉. 超微弱发光在蔬菜研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2006, 22(1): 220-222.
- [23] 张新华, 杨洪强, 李富军, 等. 杏花开放过程中超弱发光和 ATP 及活性氧含量的变化[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(1): 41-44.
- [24] 温玉龙. 逆境胁迫下景天属植物的超微弱发光及侧重于活性氧的激发机制[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.

The Dynamic Variation of UWL and Reactive Oxygen During the Ageing Process of Strawberry Fruit

GUO Jinli, ZHU Guanyu, LIU Yan, CHEN Guihua, LIU Huan, LI Lianguo, LIANG Shuang
(College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract: The dynamic variation of ultraweak luminescence (UWL) and reactive oxygen, and their relationship were studied during aging process in 'Hongyan' fruit. The results showed that, LOX activity and H_2O_2 content increased first and then decreased. MDA content, O_2^- production rate, relative conductivity increased continuously, ultraweak luminescence showed a gradual downward trend. Ultraweak luminescence showed positive medium relationship with LOX activity and negative medium correlation with MDA content, and didn't show any correlation with O_2^- production rate, relative conductivity, H_2O_2 content. Reactive oxygen increased and accumulated while Ultraweak luminescence intensity decreased in aging process of fruit, which suggested that the accumulation of reactive oxygen didn't enhance Ultraweak luminescence intensity.

Keywords: strawberry fruit; maturation; aging; ultraweak bioluminescence; reactive oxygen