

草莓果实成熟衰老与 Ca^{2+} 、CaM、 Ca^{2+} -ATPase 和活性氧代谢的关系

关军锋¹, 高敏^{1,2}, 樊秀彩^{1,2}, 顾采琴¹, 李广敏¹, 张继澍²

(¹ 河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051; ² 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100)

摘要: 研究了春星草莓果实成熟衰老过程中 Ca^{2+} 、CaM 含量、 Ca^{2+} -ATPase 活性和活性氧代谢的变化, 结果表明, 随果实成熟衰老, 可溶性 Ca^{2+} 含量和 SOD 活性呈下降趋势, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率呈升高趋势, Ca^{2+} -ATPase 活性先达到高峰后降低。CaM 含量以采前白熟期和采后明显衰老期为最高。与常温(25℃)贮藏相比, 低温(4℃)贮藏中上述生化变化较为缓慢。表明细胞内钙信使系统的活化和活性氧自由基的积累与果实成熟衰老密切相关。

关键词: 草莓; 果实; 成熟; 衰老; 钙信使系统; 活性氧自由基

Relationship Between Maturation, Senescence and Ca^{2+} , CaM Content, Ca^{2+} -ATPase Activity, and Active Oxygen Metabolism in Strawberry Fruits

GUAN Jun-feng¹, GAO Min^{1,2}, FAN Xiur-cai^{1,2}, GU Ca-qin¹, LI Guang-min¹, ZHANG Ji-shu²

(¹ Institute of Agro-Physics, Plant Physiology and Biochemistry, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051; ² College of Life Sciences, Northwestern Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)

Abstract: Changes of the content of Ca^{2+} and CaM, Ca^{2+} -ATPase activity and active oxygen metabolism during strawberry (cv. Chunxing) fruits maturation and senescence were investigated. The results showed that the soluble Ca^{2+} content and SOD activity in fruits decreased and $\text{O}_2^{\cdot -}$ production rate increased, the Ca^{2+} -ATPase activity peaked at first and then declined during fruits maturation and senescence. There were highest CaM content at white stage in preharvest fruits and at marked senescence stage in postharvest ones. The above biochemical changes in fruits stored at low temperature(4℃) were slower than those stored at normal temperature (25℃). Thus, it indicated that the stimulation of calcium messenger system and accumulation of active oxygen free radical were closely related to fruits maturation and senescence.

Key words: Strawberry; Fruit; Maturation; Senescence; Calcium messenger system; Active oxygen free radical

草莓果实生育期短, 采后极易衰老腐烂。因此在生产实践中调控果实成熟衰老意义重大。研究表明, 衰老过程与活性氧代谢失调与活性氧自由基积累的过程密切相关, 自由基启动并促进膜脂过氧化作用, 对细胞膜产生伤害作用^[1]。果实成熟衰老过

程中, 活性氧物质增多, 细胞膜脂过氧化水平增强^[2~4], 而外源钙降低细胞活性氧物质含量, 抑制采后果实的膜脂过氧化作用, 延缓衰老^[5]。与之相反, 以叶片和花的材料证明, 提高细胞质内 Ca^{2+} 浓度, 使 Ca^{2+} 与 CaM 结合, 激活磷脂酶 A_2 , 刺激活性

收稿日期: 2002-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270933)、河北省农林科学院博士资金资助项目

作者简介: 关军锋(1966-), 男, 河北藁城人, 研究员, 博士, 主要从事果品采后生理和抗逆生理研究。Tel: 0311-7813046, 7652132; Fax: 0311-7042490; E-mail: junfengguan@263.net

氧自由基生成,促进衰老^[5-8]。表明细胞内钙信使系统参与活性氧自由基代谢。本试验以草莓果实为试材,研究了果实成熟和衰老过程中 Ca^{2+} 、CaM、 Ca^{2+} -ATPase 和活性氧代谢的变化,以期了解钙信使系统参与果实成熟衰老的可能生化机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

自河北省农林科学院石家庄果树研究所采集春星草莓(*Fragaria ananassa* Duch. cv. Chunxing)果实。自同一单株(共100个单株左右)采集不同成熟度的果实,按照果实发育程度分为4期,即绿熟期(G),白熟期(W),粉红期(P)和全红期(R)。当天立即运回实验室。另取成熟度相对一致的处于粉红期的果实进行贮藏,贮藏方式为:低温4℃和常温25℃贮藏。果实在常温25℃下贮藏3d腐烂,低温4℃下贮藏7d腐烂,终止采样。取样时,去果面外表皮和种子,将剩余果肉混合,液氮速冻后,-25℃下保存。重复3次。

1.2 方 法

可溶性 Ca^{2+} 含量:将冷冻样品烘干,研磨后,采用重蒸水浸提,浸提液中 Ca^{2+} 含量用原子吸收分光光度计测定^[9];CaM 含量提取和测定:用提取液(含50 mmol·L⁻¹ Tris, 2 mmol·L⁻¹ EGTA, 0.15 mol·L⁻¹ NaCl, 0.25 mmol·L⁻¹ PMSF, 20 mmol·L⁻¹ NaHSO₃, 1 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇, pH 8.0)提取CaM,用ELISA法测定其含量^[10]; Ca^{2+} -ATPase 提取和测定:采用李扬瑞的方法^[11]; $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速率和SOD活性:用磷酸缓冲溶液(pH 7.8)制备SOD酶粗提液后,参照文献^[10]分别测定。以上所有测定均重复3次。

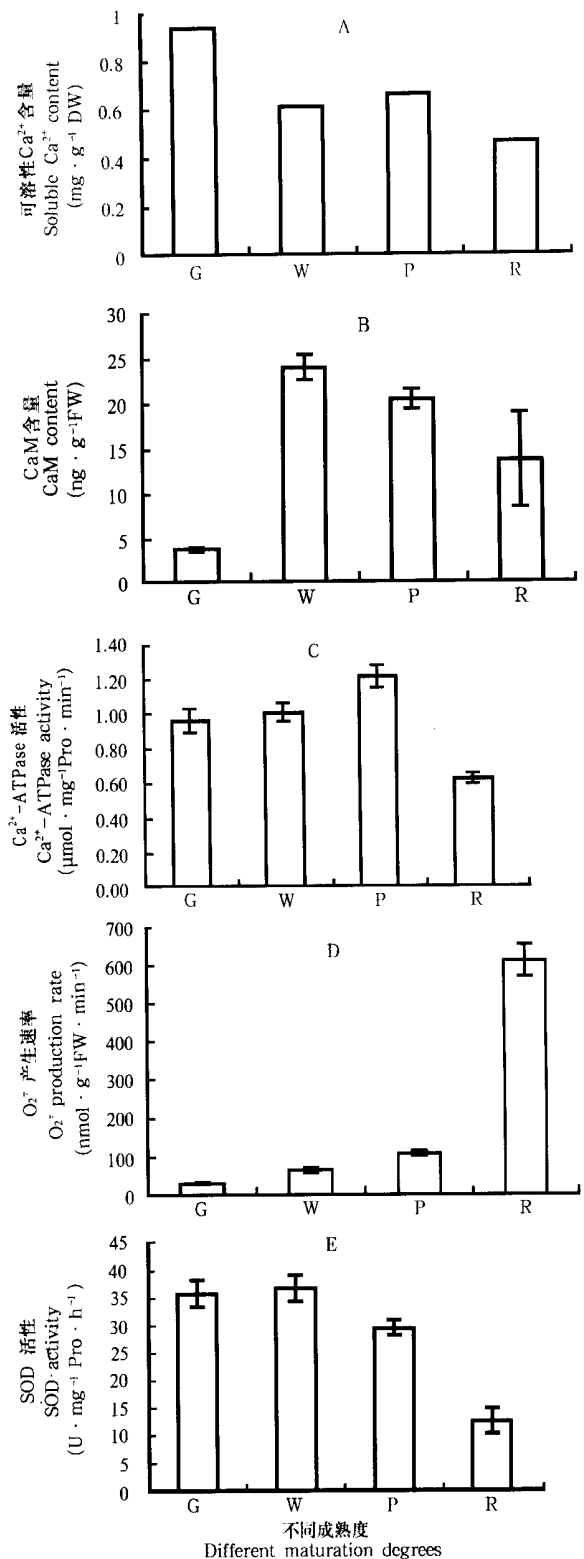
2 结果与分析

2.1 可溶性 Ca^{2+} 含量变化

果实中可溶性 Ca^{2+} 含量以绿熟期果实为最高,全红期果实最低,而白熟期和粉红期果实可溶性 Ca^{2+} 含量居中,二者差别较小(图1 A),说明随着果实成熟,可溶性 Ca^{2+} 含量减少。采后果实中可溶性 Ca^{2+} 含量呈先升高后降低趋势,并且常温贮藏果实中的可溶性 Ca^{2+} 含量较低,下降较快(图2 A)。

2.2 CaM 含量的变化

采前发育果实中 CaM 含量在绿熟期最低,白熟期显著升高,随后到全红期又下降,但其 CaM 含量仍处于较高水平,是绿熟期的2.57倍(图1 B)。显



G:绿熟期 Green stage; W:白熟期 White stage; P:粉红期 Pink stage; R:全红期 Red stage

图1 草莓果实成熟过程中可溶性 Ca^{2+} (A) 和 CaM 含量 (B)、 Ca^{2+} -ATPase 活性(C) 和 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率(D) 及 SOD 活性(E) 的变化

Fig.1 Changes of content of soluble Ca^{2+} (A) and CaM (B), Ca^{2+} -ATPase activity(C), $\text{O}_2^{\cdot -}$ production rate(D) and SOD activity(E) during maturation in strawberry fruits

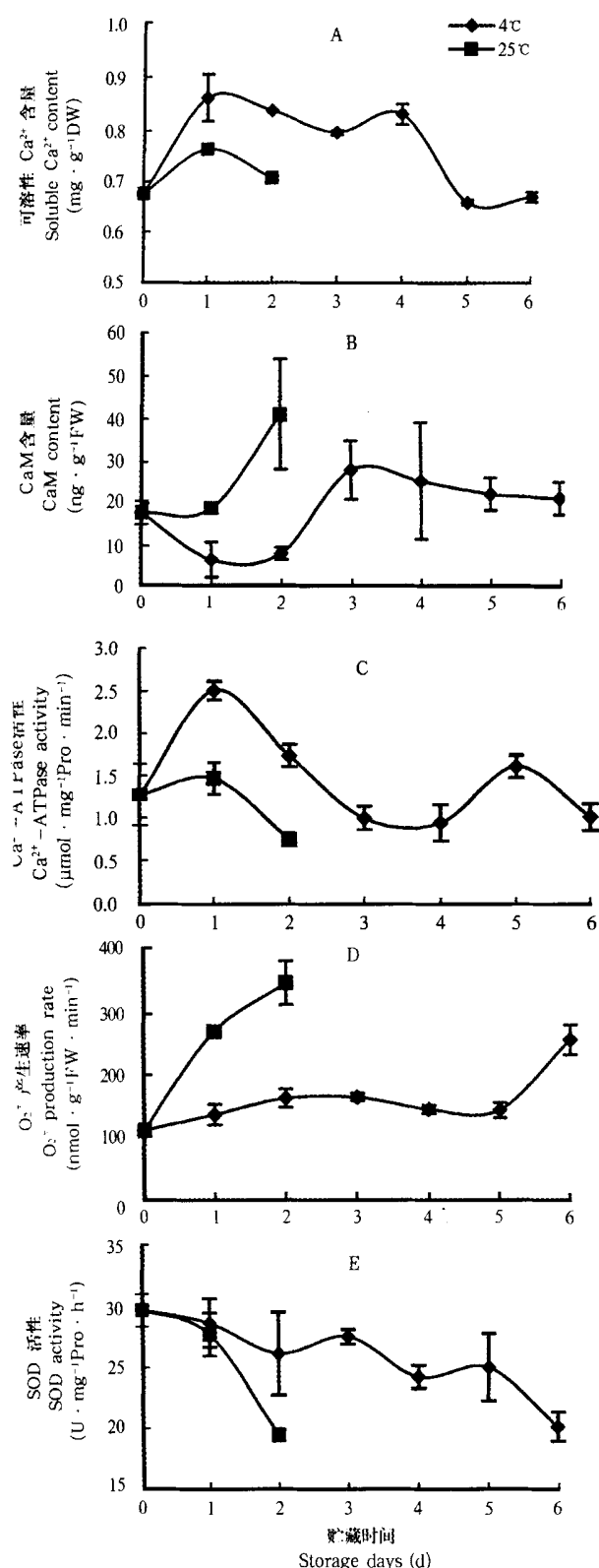


图2 采后草莓果实衰老过程中可溶性 Ca^{2+} (A) 和 CaM 含量 (B)、 Ca^{2+} -ATPase 活性 (C) 和 O_2^- 产生速率 (D) 及 SOD 活性 (E) 的变化

Fig. 2 Changes of content of soluble Ca^{2+} (A) and CaM (B), Ca^{2+} -ATPase activity (C), O_2^- production rate (D) and SOD activity (E) during senescence in postharvest strawberry fruits

然, CaM 含量高峰出现在果实成熟之前。

采后果实 CaM 含量变化因贮藏温度不同而异。常温贮藏初期 CaM 含量变化不大, 贮藏 2d 时显著升高, 是初始时的 2.19 倍。低温下的草莓 CaM 含量先降后升再降, 采后 5d 时达到高峰, 贮藏末期比初期略高(图 2B)。这表明, 草莓果实衰老与 CaM 含量增加密切相关。

2.3 Ca^{2+} -ATPase 活性变化

草莓果实细胞中 Ca^{2+} -ATPase 活性在绿熟期和白熟期较低, 且差别不大, 到粉红色期 Ca^{2+} -ATPase 活性达到最高, 随后到全红期时又降低(图 1C)。

采后果实 Ca^{2+} -ATPase 活性因贮藏温度不同而异。与低温贮藏的果实相比, 常温贮藏果实 Ca^{2+} -ATPase 活性较低, 并迅速呈现高峰后降低; 而低温贮藏的果实, Ca^{2+} -ATPase 活性分别在采后第 2 天和第 6 天出现 2 次高峰, 末期呈下降趋势(图 2C)。

2.4 O_2^- 生成速率变化

随草莓果实成熟度的提高, O_2^- 生成速率明显升高, 全红期是绿熟期的 19.03 倍(图 1D)。显然, 果实成熟与 O_2^- 积累有密切关系。

常温贮藏草莓 O_2^- 生成速率迅速升高, 而低温贮藏的果实中 O_2^- 生成速率则缓慢升高, 末期最高, 比初始时增加了 1.36 倍(图 2D)。与同期相比, 室温贮藏的果实 O_2^- 生成速率较高于低温贮藏果实。

2.5 SOD 活性变化

随草莓果实成熟度提高, 前期 SOD 活性变化较小, 粉红色果实 SOD 活性开始下降, 全红期果实 SOD 活性明显降低(图 1E)。

常温贮藏果实的 SOD 活性迅速下降, 但低温贮藏的 SOD 活性下降较为缓慢。4°C 和 25°C 贮藏最末期比最初时分别下降了 32.32% 和 34.34%(图 2E)。

3 讨论

果实成熟是果实发育的重要组成部分, 与采收品质密切相关。以不同成熟度果实的测定结果表明, 随果实成熟, O_2^- 产生速率升高, SOD 活性呈下降趋势, 特别是田间发育后期的全红期果实与绿熟期果实的差别最为明显; 采后果实衰老过程中的变化趋势与上述变化趋势基本相似, 这体现出在田间发育成熟乃至衰老的过程与采后衰老的趋势是一致

的;并且,与低温贮藏果实相比,常温贮藏果实的变化较为迅速。相关分析表明,草莓果实中的 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率与 SOD 活性呈极显著负相关($r = -0.9346$, $r_{0.01} = 0.684$)。说明果实成熟衰老进程与 $O_2^{\cdot -}$ 积累以及 SOD 清除超氧自由基能力的下降,也即活性氧产生与清除平衡的破坏密切相关。 $O_2^{\cdot -}$ 积累会促进细胞膜脂过氧化,对细胞膜产生伤害^[1]。这与果实成熟衰老过程中细胞膜脂过氧化水平增强的趋势^[2,4]是吻合的。

在果实成熟衰老过程中,可溶性 Ca^{2+} 含量呈下降趋势,与苹果贮藏衰老时的变化趋势^[12]类似。这一变化与钙溶性发生变化有关,其详细原因有待研究。在果实成熟衰老之前, Ca^{2+} -ATPase 活性先达到高峰,这可能是钙信使系统对细胞质 Ca^{2+} 浓度升高的一种反馈调控机制^[13],反映出此时细胞维持 Ca^{2+} 稳态的能力较强,此后 Ca^{2+} -ATPase 活性的下降反映出维持 Ca^{2+} 稳态的能力下降,这与苹果贮藏期间果肉细胞溶质内 Ca^{2+} -ATPase 活性下降的趋势是一致的^[14],这种变化将导致 Ca^{2+} 跨膜运输能力的降低,致使细胞质内 Ca^{2+} 累积,进一步刺激 $O_2^{\cdot -}$ 产生^[15];同时, Ca^{2+} -ATPase 活性下降,阻断 Ca^{2+} 跨膜运输可降低氧自由基的清除系统—SOD 活性^[7],这可能是果实衰老时,细胞内 Ca^{2+} 稳态破坏, Ca^{2+} 信使系统紊乱,进而 $O_2^{\cdot -}$ 大量产生的重要原因。与同期常温贮藏相比,低温贮藏果实具有较高的 Ca^{2+} -ATPase 活性、可溶性 Ca^{2+} 含量和较低的 CaM 含量,暗示着低温贮藏的果实具有较好的维持细胞内 Ca^{2+} 稳态的能力,延缓了 Ca^{2+} 与 CaM 结合的机会,因而延缓衰老。果实成熟之前,CaM 含量达到高峰,并出现在 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率的高峰之前,而在常温贮藏的果实衰老过程中,CaM 含量增加缓慢, $O_2^{\cdot -}$ 产生速率却迅速升高,因此,此时 CaM 含量的增加不可能是促进果实 $O_2^{\cdot -}$ 大量生成的单一诱导因素,也不是诱导衰老的启动因素;低温贮藏的果实也表现出类似规律。一方面, Ca^{2+} 与 CaM 结合促进活性氧自由基大量生成^[6],另一方面,活性氧自由基也会诱导细胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[15]。因此,上述结果表明的可能机制是,随果实成熟衰老,细胞质内 Ca^{2+} 浓度增加,使 Ca^{2+} 与 CaM 结合,细胞维持 Ca^{2+} 稳态的能力下降,活性氧自由基大量生成,加速衰老。

References

- [1] Wang A G. Oxygen metabolism in plants. In: Yu S W, Tang Z C, *Plant Physiology and Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 1998. (in Chinese)
- 王爱国. 植物的氧代谢. 见: 余叔文, 汤章城主编, 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] Guan J F, Shu H R. Relationship between senescence and active oxygen metabolism in apple fruits. *Acta Hort. Sinica*, 1996, 23 (4): 326 - 328. (in Chinese)
- 关军锋, 束怀瑞. 采后苹果衰老与活性氧代谢的关系. 园艺学报, 1996, 23 (4): 326 - 328.
- [3] Ke D S, Wang A G, Luo G H. The relationship between active oxygen and the activity of ethylene-forming enzyme in ripening banana fruit. *Acta Plant Physiol. Sinica*, 1998, 24(4): 313 - 319. (in Chinese)
- 柯德森, 王爱国, 罗广华. 成熟香蕉果实活性氧与乙烯形成酶活性的关系. 植物生理学报, 1998, 24(4): 313 - 319.
- [4] Peraz A G, Sanz C, Olias J. Lipoxygenase and hydroperoxidylase activities in ripening strawberry fruits. *J. Agri. Food Chem.* 1999, 47: 249 - 253.
- [5] Guan J F. Calcium and senescence in plant. In: Shen C G. *Plant Senescence Physiology and Molecular Biology*. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2001. (in Chinese)
- 关军锋. 钙与植物衰老. 见: 沈成国. 植物衰老生理与分子生物学. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [6] Leshem Y Y. Membrane phospholipid catabolism and Ca activity in control of senescence. *Physiol. Plant*, 1987, 69: 551 - 559.
- [7] He P, Jin J Y. Relationships among hormone changes, transmembrane Ca^{2+} flux and lipid peroxidation during leaf senescence in spring maize. *Acta Bota Sinica*, 1999, 41 (11): 1 221 - 1 225. (in Chinese)
- 何 萍, 金继运. 春玉米叶片衰老中激素变化、 Ca^{2+} 跨膜运输和膜脂过氧化三者之间的关系. 植物学报, 1999, 41 (11): 1 221 - 1 225.
- [8] Huang F Y, Phiosophr Hadas S, Shimon M. Increase in cytosolic Ca^{2+} in parsley mesophyll cells correlate with leaf senescence. *Plant Physiol.* 1997, 115: 51 - 60.
- [9] Tienan D M, Handa A K. Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. *Plant Physiol.* 1994, 106: 429 - 436.
- [10] Tang Z C. *Experiment Guide For Modern Plant Physiology*. Beijing: Science Press, 1999. (in Chinese)
- 汤章城. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] Li Y R. Activities of Mg^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase in various organelles of sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves. *Plant Physiological. Bulletin*. 1987(6): 20 - 21. (in Chinese)
- 李扬瑞. 甘蔗叶片细胞器的 Mg^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性. 植物生理学通讯, 1987(6): 20 - 21.
- [12] Guan J F, Ma Z H. Apple fruit softening in relation to pectin content, permeability of cell membrane and calcium form. *J. Fruit Sci.* 2001, 18(1): 11 - 14. (in Chinese)
- 关军锋, 马智宏. 苹果果实软化与果胶含量、质膜透性和钙溶

- 性的关系. 果树学报, 2001, 18(1): 11 - 14.
- [13] Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 1995, 46: 95 - 122.
- [14] Zong H, Hu W Y. Changes of calcium messenger component during storage of apple with sodium alginate coating. *Acta Hort. Sinica*, 1998, 25 (2): 187 - 188. (in Chinese)
- 宗会, 胡文玉. 涂膜苹果在贮藏期间钙信使组分的变化. 园艺学报, 1998, 25(2): 187 - 188.
- [15] Bowler C, Fluhr R. The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Sci.* 2000, 5 (6): 241 - 246.

异粒变速控释技术及异粒变速控释肥(AgroBuBlen)的研制简介

一、研究背景

初步研究结果表明,生产和施用质优高效的控释肥是提高肥料利用率的有效措施。有效地提高肥料利用率对发展我国农业生产,提高农业生产力尤为重要。它也是减少肥料投入,减轻农民负担和增加农民收入的有效措施之一。优质高效的控释肥料指可以控制养分供应速度和数量与作物需求基本吻合,肥料对环境无污染,肥料成本较低的控释肥料。

然而当前的控释肥料供肥速度和供肥量尚不能和作物需求同步,此外还有包膜材料(大多为非生物降解材料)污染环境、肥料昂贵等缺陷。为此,笔者自1999年以来,在国家高技术研究发展计划(“863”计划)、国家自然科学基金、国家教育部、广东省科技厅国际合作处等单位的资助下,进行了速度复合控释即异粒变速控释技术的研究,研制出了价格比国外同类产品低2~3倍,效果与其相当的可降解包膜型异粒变速控释肥料(AgroBuBlen)系列产品。

二、控释肥料和异粒变速控释肥的概念及其研究内容

控释肥料是采用物理、化学和生物化学等方法生产的,能依据作物营养特性而调控氮磷钾及必要的中微量元素养分供应速度和供应量的植物营养复合体。

异粒变速控释肥料实际上就是一种速度复合体型控释肥料。即把养分释放速度与数量不等的几种控释肥料按照作物的营养特性、需肥规律有机地配伍,形成一种在作物各个生长期供肥速度、供肥数量和供应氮磷钾比例不同,能保障作物全生育期有足量、适量养分供应的新型控释肥料。

异粒变速控释技术和异粒变速控释肥的研究内容和要求是:(1)产品成本和价格低;(2)包膜材料可生物降解;(3)肥料供应养分的速度、数量和氮磷钾比例与作物需求基本吻合。

三、产品的性能和效果

异粒变速控释肥是在特殊氮磷钾配比及必要的中微量元素化成复合肥基础上,根据果树、花卉等植物营养特性和需肥规律,采用流化包膜技术和异粒变速控释技术即速度复合技术,用可降解高分子膜材生产的包膜厚度不等的包膜型控释肥料(controlled release fertilizer)。

肥料呈圆球颗粒状,颜色因品种而异,不易稀释结块,便于储藏运输。

AgroBuBlen的养分氮磷钾(SOP复合肥)比例和养分供应速度、数量与作物各个主要生育期的需求基本吻合,满足了一次施肥可保障作物全生育期有足量、适量养分的要求,从而可实现既节约劳动力,又减少肥料损失,提高肥料利用率,降低生产成本的目的。经过与国外同类产品在花等作物上的对比试验,表明AgroBuBlen与国外同类产品的效果一致,但成本仅为其1/2左右。另外,AgroBuBlen包膜材料为水溶性材料,最终可完全降解,对环境无污染。

AgroBuBlen的研发过程考虑到了不同地区、不同类型作物的营养特性和需肥规律,产品已经系列化,使产品具有普遍适用性和易用性。AgroBuBlen的系列产品可广泛用于果树、花卉、草坪等作物。(有关产品介绍见本期封二图版)

樊小林,李放敏,梁林洲

(华南农业大学资源与环境学院肥料与平衡施肥研究室,广州五山 510642)