

外源甜菜碱处理对黄瓜冷藏期间活性氧代谢的影响

王富贵, 韩 涛, 张海英*, 许 丽
(北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206)

摘 要: 目的: 研究不同浓度的外源甜菜碱(GB)处理对低温胁迫下黄瓜抗氧化作用的影响, 探讨甜菜碱对黄瓜抗冷性作用的机理。方法: 以“中农8号”黄瓜为试材, 分别用浓度0、5、10、15mmol/L的甜菜碱浸泡黄瓜15min, 置于4℃条件贮藏。结果: 外源甜菜碱处理提高了黄瓜甜菜碱含量, 降低果实中脂氧合酶(LOX)活性、增强过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性并有效清除过氧化氢(H₂O₂)、减少丙二醛(MDA)积累。结论: 以10mmol/L甜菜碱处理黄瓜效果最为明显。

关键词: 黄瓜; 甜菜碱; 抗冷性; 氧化代谢

Effect of Exogenous Glycine Betaine on Oxidative Metabolism in Cucumber during Low-Temperature Storage

WANG Fu-gui, HAN Tao, ZHANG Hai-ying*, XU Li
(College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The aim of this work was to investigate the effect and possible mechanism of glycine betaine (GB) treatment on the antioxidant properties of cucumber during low-temperature storage. ‘Zhongnong 8’ cucumbers were immersed in GB solutions at 0, 5, 10 mmol/L and 15 mmol/L and stored at 4 °C. Changes in parameters related to oxidative metabolism were observed. The results showed that increasing GB concentration resulted in a decrease in lipoyxygenase (LOX) activity. The activities of peroxidase (POD) and catalase (CAT) were enhanced by exogenous GB treatment. Meanwhile, the accumulation of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were restrained. GB at a dose of 10 mmol/L revealed the most obvious effect.

Key words: cucumber; glycine betaine (GB); low-temperature resistance; oxidation metabolism

中图分类号: TS255.36

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)08-0313-04

甜菜碱(glycine betaine, GB)属于季胺类化合物, 已被证实是最重要的一类渗透保护物质^[1]。植物在正常环境条件下, 体内的甜菜碱的含量并不高, 但当植物受到低温、干旱、盐等环境胁迫时, 会在细胞内大量地积累甜菜碱^[2]。甜菜碱作为一种无毒细胞质渗透剂和保护剂可以提高植物的抗胁迫性^[3], 在细胞中积累能够提高细胞的渗透调节能力和稳定细胞内大分子蛋白和生物膜的结构和功能。目前对植物中甜菜碱的生物合成及其渗透调节作用有较多研究, 已证实甜菜碱的积累可以提高作物的抗旱性、抗盐碱性和抗寒性^[4-6]。用外源甜菜碱处理的蚕豆植株在水分胁迫期间比未处理的植株维持了更好的水分状况^[7]。黄瓜幼苗在低温胁迫下通过积累甜菜碱, 适应低温, 提高植物对低温的忍受力, 外源甜菜碱可削弱

冷胁迫对超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的抑制、膜的伤害、胞内物质的外渗和丙二醛MDA(malondialdehyde)的产生, 从而提高黄瓜幼苗的抗冷性^[8]。

甜菜碱对植物逆境胁迫的研究大多针对的是植物幼苗, 对采后冷敏感果实的研究很少。张海英等^[9]用外源甜菜碱处理采后黄瓜, 能减轻果实低温条件下的冷害, 增加渗透物质脯氨酸的含量, 提高组织SOD活性, 增强组织的抗冷性, 并引起关注^[10-11]。本研究在此基础上, 进一步探讨外源甜菜碱处理对冷藏黄瓜氧化代谢相关生理指标的影响, 以期对冷敏感果蔬产品在低温贮藏下提高抗冷性提供理论依据。

收稿日期: 2012-02-24

基金项目: 农产品加工及贮藏工程北京市重点建设学科项目(PXM2009-014207-078172);

北京市委组织部优秀人才培养项目(2009D005021000005)

作者简介: 王富贵(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工及贮藏。E-mail: wangfugui09ky@126.com

*通信作者: 张海英(1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为农产品加工及贮藏。E-mail: zhanghaiying8079@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料黄瓜(*Cucumis sativus* Linn)品种为“中农8号”,购自北京昌平北郊市场。选择瓜条饱满、顺直、长短粗细均匀、无机械损伤的黄瓜,带1cm果柄,立即送往实验室进行处理。

过氧化氢酶活性试剂盒、过氧化氢试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机 上海赛特湘仪离心机仪器有限公司;紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司。

1.3 材料处理

在预试验的基础上,上述黄瓜分别用0、5、10、15mmol/L的GB溶液浸泡15min,室温下自然晾干,分别放入聚乙烯薄膜袋中,口系上后,置于4℃冷藏。每个处理用黄瓜50根,做3个重复。

1.4 指标测定

贮藏期间,每隔1d随机取样,测定生理指标。

1.4.1 甜菜碱含量的测定^[12]

试样制备:采用水萃取法,先用液氮将黄瓜速冻后,研磨粉末。称取40g于三角瓶中,加水40mL,过夜,次日将样品抽滤,调pH值至1.0,将滤液定容至100mL容量瓶,作为试样制备液,冰箱冷藏备用。

标准曲线绘制:吸取0、1、2、3、4、5mL甜菜碱标准溶液(1mg/mL),分别置于15mL离心管中,依次加入5、4、3、2、1、0mL蒸馏水,冰浴15min后,滴加15g/L雷氏盐溶液(现配)5mL,振荡,0~4℃保藏至少3h,取出离心管,轻微摇动,使结晶悬浮。8000r/min离心10min,弃上清液,加入乙醚5mL,充分摇匀洗涤结晶,离心同上,自然挥发至干。分别加入70%丙酮5mL,摇匀,充分溶解甜菜碱雷氏盐结晶。离心同上,在525nm波长处测定其吸光度,绘制标准曲线。移取试样制备液5mL,冷却15min,再用浓盐酸调pH值至1.0,以下操作同标准曲线,重复3次,代入标准曲线,计算试样中的甜菜碱含量。

1.4.2 脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)活性的测定^[13]

取2.75mL 0.1mol/L、pH5.5乙酸-乙酸钠缓冲液,加入50μL 0.1mol/L亚油酸钠溶液,在30℃保温10min,加入200μL粗酶液,混匀。以蒸馏水为参比调零,在反应15s时开始记录反应体系在波长234nm处吸光度,为初始值,染后每隔30s记录一次,连续测量6个点。重复3次。按下式计算:

$$\text{LOX酶活性}/(\Delta\text{OD}_{234}/(\text{min} \cdot \text{mg})) = \frac{\Delta\text{OD}_{234} \times V_t}{m} \times V_s \times 0.01 \times t \times 100$$

式中: ΔOD_{234} 为反应时间内OD变化值; V_t 提取酶液

总体积/mL; m 为植物鲜质量; V_s 为测定时取用酶液体积/mL; t 为反应时间。

1.4.3 过氧化物酶活性测定

采用愈创木酚法^[14]测定。取0.2mol/L磷酸缓冲液37.5mL加入1.5%愈创木酚8.93mL于磁力搅拌器上加热搅拌,直至愈创木酚溶解,待溶液冷却后,加入0.5% H_2O_2 3.57mL,混合均匀,保存于冰箱中。测定时每个浓度反应液混合液为2.1mL磷酸缓冲液加0.5mL愈创木酚加0.2mL H_2O_2 。在1个比色杯中加入磷酸缓冲液(pH6.0),作为校零对照,另一个比色杯中加入0.2mL上清酶液,再加入反应混合液2.8mL,准确计时,在紫外分光光度计上,测量反应5min的 OD_{470} 的值,每隔1min读数一次,以每分钟每克果蔬 OD_{470} 的光密度变化表示酶活性大小,即 $\Delta\text{OD}_{470}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 表示。重复3次。结果按照下式计算:

$$\text{POD酶活性}/(\Delta\text{OD}_{470}/(\text{min} \cdot \text{mg})) = \frac{\Delta\text{OD}_{470} \times V_t}{m} \times V_s \times 0.01 \times t \times 1000$$

式中: ΔOD_{470} 为反应时间内OD变化值; V_t 为提取酶液总体积/mL; m 为植物鲜质量; V_s 为测定时取用酶液体积/mL; t 为反应时间。

1.4.4 CAT活性的测定

过氧化氢酶活性的测定参考试剂盒说明书进行,试剂盒包括试剂1、试剂2、试剂3、试剂4。根据样本的数量,每个浓度各取3个测定管,1个对照管。首先在各个测定管中加入0.05mL的组织匀浆,继而在对照管和测定管中加入1.0mL的试剂1和0.1mL的试剂2,混匀,37℃反应1min,取出再分别加入1.0mL的试剂3和0.1mL的试剂4,最后在对照管中加入0.05mL的组织匀浆。混匀,0.5cm光径,于405nm波长处测定各管吸光度。重复3次。结果按照下式计算:

$$\text{组织匀浆中CAT活力}/(\text{U}/\text{mg}) = \frac{(\text{对照管OD} - \text{测定管OD}) \times 271}{60 \times \text{取样量} \times \text{匀浆蛋白含量}/(\text{mg}/\text{mL})}$$

式中: 271为斜率的倒数。

1.4.5 H_2O_2 含量的测定

过氧化氢的测定参考试剂盒说明书进行。试剂盒包括试剂1、试剂2、5%标准品应用液。根据样本的数量取相应的试管作测定管,另取1个空白管和1个标准管,各管中各加入1mL试剂1,再分别在空白管、标准管、测定管中分别加入0.1mL蒸馏水、0.1mL 0.5%标准品应用液、0.1mL样本,混匀,37℃水浴反应1min,再分别加入1mL的试剂2,混匀,于405nm波长处测定各管吸光度。重复3次。结果按照下式计算:

$$\text{样品}\text{H}_2\text{O}_2\text{的含量}/(\text{mmol}/\text{L}) = \frac{\text{测定管OD} - \text{空白管OD}}{\text{标准管OD} - \text{空白管OD}} \times \text{标准品浓度}(163\text{mmol}/\text{L}) \times \text{样品稀释倍数}$$

1.4.6 丙二醛(MDA)含量测定^[15]

称取黄瓜5g,加入2.5mL 5% TCA和少量石英砂,研

磨至匀浆,再加2.5mL TCA进一步研磨,匀浆在8000r/min离心10min,上清液为样品提取液。吸取离心的上清液2mL(对照加2mL蒸馏水),加入2mL 0.6% TBA溶液,摇匀。将试管放入沸水浴中煮沸10min(自试管内溶液中出现小气泡开始计时),取出试管并冷却,8000r/min离心15min,取上清液并量其体积。以0.6% TBA溶液为空白测定532、600nm波长处的吸光度。重复3次。结果按照下式计算:

$$\text{丙二醛含量}/(\text{nmol/g}) = \frac{\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}}{0.155} \times R \times \frac{V}{v} \times \frac{1}{m}$$

式中: V/v 为提取液总量/测定液总量; R 为反应液总量; m 为植物组织鲜质量/g; 0.155为丙二醛的摩尔浓度消光系数。

1.4.7 数据分析

数据处理均使用SPSS软件进行分析,并做差异显著性分析。图中标识为平均值 \pm SE。

2 结果与分析

2.1 外源甜菜碱处理对黄瓜甜菜碱含量的影响

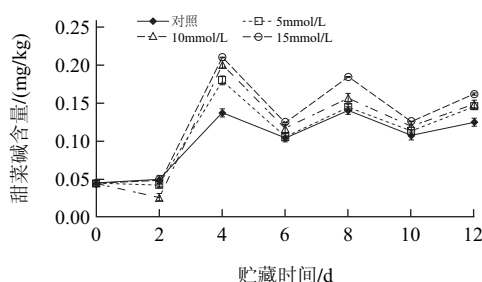


图1 甜菜碱处理后4℃条件下黄瓜甜菜碱含量的变化

Fig.1 Changes of GB content in cucumber with GB treatments at 4℃

黄瓜在贮藏期间甜菜碱含量呈平缓上升趋势(图1);不同浓度甜菜碱处理的黄瓜甜菜碱含量的变化趋势与对照相似,有随甜菜碱处理浓度的增加而甜菜碱含量也增加的趋势,其中5mmol/L处理与对照最接近;10mmol/L和15mmol/L处理明显高于对照($P < 0.05$)。表明外源甜菜碱处理有助于组织甜菜碱的积累。

2.2 外源甜菜碱处理对黄瓜脂氧合酶活性的影响

黄瓜在冷藏前期(前4d)LOX活性呈缓慢上升的趋势(图2),随后大幅增加,在冷藏第8天达最高值,增加了1倍,至12d时又略有下降;不同浓度GB处理的LOX活性变化趋势与对照基本相似,但不同浓度GB处理的几乎一直低于对照,且在12d时达到对照在第8天的水平;各处理浓度间差异不显著。这表明GB处理可降低冷藏胁迫下黄瓜的LOX活性。

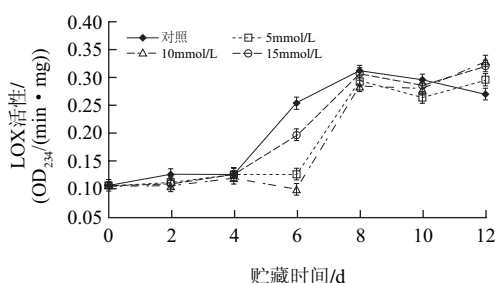


图2 甜菜碱处理后4℃条件下对黄瓜LOX活性的变化

Fig.2 Changes of LOX activity in cucumber with GB treatments at 4℃

2.3 外源甜菜碱处理对冷藏黄瓜过氧化物酶活性的影响

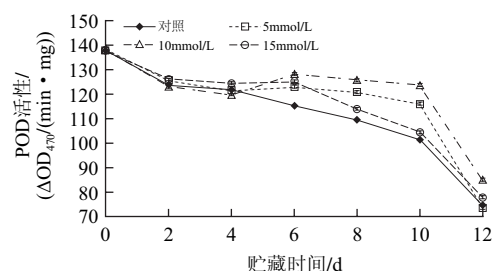


图3 甜菜碱处理后4℃条件下黄瓜POD活性的变化

Fig.3 Changes of POD activity in cucumber with GB treatments at 4℃

冷藏期间黄瓜的POD活性呈缓慢下降的趋势(图3),在贮藏第10天后下降迅速(CAT活性单位,见1.4.3节);不同浓度GB处理的黄瓜POD活性变化趋势与对照基本一致,贮藏第6天后表现出高于对照的态势,其中以10mmol/L GB处理表现最为明显($P < 0.05$),较对照高15%~25%。这表明,适宜浓度GB处理能有效提高低温胁迫条件下黄瓜POD活性。

2.4 外源甜菜碱处理对冷藏黄瓜果实过氧化氢酶活性的影响

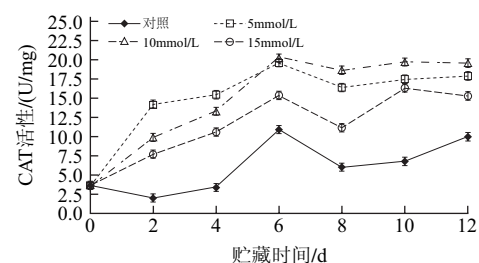
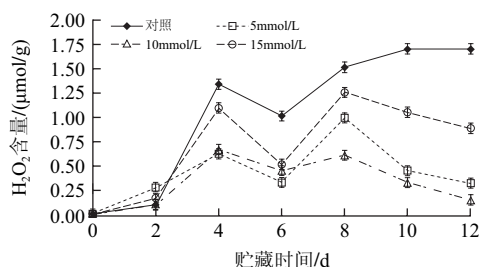


图4 甜菜碱处理后4℃条件下黄瓜CAT活性的变化

Fig.4 Changes of CAT activity in cucumber with GB treatments at 4℃

冷藏期间黄瓜CAT活性呈小幅平缓上升(图4);不同浓度GB处理的CAT活性变化趋势与对照相近,均明显高于对照($P < 0.05$),其中10mmol/L处理的明显高于15mmol/L处理($P < 0.05$)。而5mmol/L处理在前4d明显高于10mmol/L和15mmol/L处理($P < 0.05$),8d后明显低于10mmol/L但高于15mmol/L处理($P < 0.05$)。总之,甜菜碱处理能有效提高低温胁迫条件下黄瓜CAT活性。

2.5 外源甜菜碱处理对黄瓜过氧化氢含量的影响

图5 甜菜碱处理后4℃条件下黄瓜H₂O₂含量的变化Fig.5 Changes of H₂O₂ content in cucumber with GB treatments at 4 °C

冷藏期间黄瓜H₂O₂含量整体呈现逐渐积累的态势(图5);不同浓度GB处理的H₂O₂含量变化趋势与对照相似,4d后均明显低于对照($P<0.05$);8d后10mmol/L处理最低。表明适当浓度的外源甜菜碱处理能有效降低H₂O₂含量的积累。

2.6 外源甜菜碱处理对黄瓜丙二醛(MDA)含量的影响

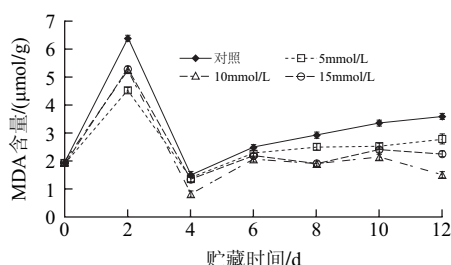


图6 甜菜碱处理后4℃条件下黄瓜MDA含量的变化

Fig.6 Changes of MDA content in cucumber with GB treatments at 4 °C

冷藏期间黄瓜的MDA含量总体上呈小幅积累趋势(图6);不同浓度GB处理的黄瓜MDA含量的变化趋势与对照相同,但明显低于对照($P<0.05$),其中以10mmol/L GB处理MDA积累量最少。表明适宜浓度GB处理能有效减少低温胁迫下黄瓜中MDA的积累。

3 讨论

冷害是由低温造成细胞膜改变,从正常的液态晶体转变成固态凝胶结构,使得细胞膜的类脂物凝固,增加了膜的透性,细胞分子作用破坏,细胞膜内外离子平衡丧失,致使离子渗漏而引起新陈代谢的异常变化^[16]。脂氧合酶(LOX)是脂肪酸氧化途径中的关键酶,通过催化游离的不饱和脂肪酸产生脂质过氧化自由基,导致膜磷脂双分子层的破坏,使质膜的透性增加,引起代谢紊乱和机体衰老^[17-18]。本研究发现,GB处理可降低冷藏黄瓜脂氧合酶(LOX)活性,预示着GB可通过降低LOX活性而减少自由基和过氧化物等的产生。POD是植物体内的一种保护酶,它能清除生物体内不断产生的自由基,维持代谢平衡,并对各种不良环境十分敏感,POD活性的大小能够在一定程度上反映植物抗冷性的强弱;在植物受到冷害胁迫时,POD能够与超氧化物歧化酶(SOD)、CAT协同配合,清除细胞体内产生的自由基,从而提高植物体抗逆境胁迫能

力,保护膜结构的完整性^[19]。本研究观察到,GB处理可明显提高POD活性,与前期试验观察到的GB可通过提高SOD活性而加强对超氧阴离子自由基的清除作用^[9]协同配合,这与张士功等^[20]在小麦抗盐碱性试验中得出的结果相近;H₂O₂不是自由基,但由于其具有强氧化性,也是会造成氧毒害的活性氧之一。H₂O₂由CAT催化分解,减轻膜脂过氧化。低温胁迫降低了植物体内CAT活性,使各种活性氧大量积累,引起膜脂过氧化。本研究发现,GB处理可有效保持CAT活性,减少了H₂O₂的积累,其中以10mmol/L GB处理的黄瓜CAT活性最高,H₂O₂含量最低。膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)是脂质过氧化的最终结果,其含量的高低可在一定程度上反映植物抗逆性的强弱^[21]。本研究发现,GB处理能有效地抑制冷藏黄瓜体内过氧化产物丙二醛(MDA)的产生和积累,增强细胞膜的稳定性。这与陈少裕^[22]报道的外源甜菜碱有减少低温胁迫下玉米幼苗丙二醛(MDA)含量、以及张士功等^[20]在小麦中观察到的作用机理相似,最终结果反映在GB处理能有效稳定细胞膜透性^[9],与本研究观察到的GB处理提高冷害胁迫下黄瓜的甜菜碱含量可能不无关系。

参考文献:

- [1] 李永华, 邹琦. 植物体内甜菜碱合成相关酶的基因工程[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(5): 500-504.
- [2] 梁峙, 骆爱玲. 甜菜碱和甜菜碱合成酶[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 1-8.
- [3] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 714.
- [4] SAKAMUTU A, MLBATA N. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plant: current status and implications for enhancement of stress tolerance[J]. Exp Bot. 2000, 51(342): 81-88.
- [5] 张艳敏. 甜菜碱与植物抗逆性[J]. 河北农业科学, 2004, 8(2): 87-93.
- [6] XING Weibing, RAJASHEKAR C B. Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. Environmental and Experimental Biochem Biophys, 2001, 46: 21-28.
- [7] ZHAO Yan, ASPINALL D, PALEG L G. Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycine betaine against the effects of freezing [J]. Plant Physiol, 1992, 140: 541-543.
- [8] 李芸瑛, 梁广坚, 李永华, 等. 外源甜菜碱对黄瓜幼苗抗冷性的影响[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(6): 673-678.
- [9] 张海英, 王有年, 韩涛, 等. 外源甜菜碱对黄瓜果实冷藏期间延缓冷害的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2407-2412.
- [10] 李军祥, 朱秀苗. 曼陀罗栽培前后的抗性生理变化[J]. 江西农业学报, 2010, 22(5): 38-40.
- [11] 孙玉洁, 王国槐. 外源生长调节剂对植物抗寒性的影响[J]. 作物研究, 2011, 25(3): 287-291.
- [12] 黄丽贞. 海产品中呈味成份甜菜碱的测定[J]. 上海水产大学学报, 1994, 3(3): 160-163.
- [13] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 105-107.
- [14] 马志良. 植物生理学指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1991: 154-155.
- [15] 张永峰, 殷波. 混合盐碱胁迫对苗期紫花苜蓿抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 草业学报, 2009, 18(2): 46-50.
- [16] WANG C Y. Physiological and biochemical response of plant to chilling stress[J]. Hortscience, 1982, 17(2): 173-187.
- [17] 李彩凤, 赵丽影, 陈业婷, 等. 高等植物脂氧合酶研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(10): 143-149.
- [18] CHEN W P, LI P H, CHEN P H H. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L.[J]. Plant Cell Environ, 2000, 23(6): 609-618.
- [19] 江行玉, 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 92-99.
- [20] 张士功, 高吉寅, 宋景芝. 甜菜碱对NaCl胁迫下小麦细胞保护酶活性的影响[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 429-432.
- [21] 徐心诚. 低温弱光对黄瓜幼苗过氧化物酶同工酶和丙二醛含量的影响[J]. 河南农业科学, 2012, 41(1): 113-116.
- [22] 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 84-90.