

黄瓜果实 成熟衰老特性

王志坤 孟凡立 编著



中国农业科学技术出版社

黄瓜果实 成熟衰老特性

王志坤 孟凡立 编著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

黄瓜果实成熟衰老特性/王志坤, 孟凡立编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2010. 6

ISBN 978-7-5116-0156-8

I. ①黄… II. ①王…②孟… III. ①黄瓜-果实-成熟-研究②黄瓜-果实-衰老-研究 IV. ①S642. 21

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 068530 号

责任编辑 邬震坤

责任校对 贾晓红

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109704 (发行部) (010) 82106626 (编辑室)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82109698

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 新华书店北京发行所

印刷者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 850mm × 1168mm 1/32

印 张 6.375 插页 1

字 数 180 千字

版 次 2010 年 6 月第 1 版 2010 年 6 月第 1 次印刷

定 价 40.00 元

版权所有 · 翻印必究

《黄瓜果实成熟衰老特性》

王志坤 孟凡立 编 著
秦智伟 李文滨 主 审



作者简介:

王志坤 (1978—), 女, 黑龙江省克东县人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物生物技术研究。2007 年至今工作于东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室/农学院。在植物衰老、基因克隆、生物信息学、大豆抗逆分子机理及抗逆转基因大豆新品种培育等研究方面有一定涉猎。

PREFACE 前言

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是葫芦科黄瓜属中一类重要的蔬菜作物,在我国有两千多年的栽培历史。自 1970 年,我国已成为世界上黄瓜生产面积最大、总产量最高的国家。黄瓜幼果清脆爽口,营养丰富,还有医疗用途。黄瓜果实衰老后,果皮颜色变黄,许多营养物质降解,含水量降低,风味品质和营养品质均下降,失去原来的商品性。因此,研究黄瓜果实衰老机理,对黄瓜果实的衰老进行调控,提高果实的商品价值和货架期,是很具有实际意义的。

果蔬的成熟、衰老是一个复杂的生理生化过程,也是采后生理研究的热点。多年来,众多专家从植物化学、植物生理生化、遗传学、分子生物学等领域进行了深入细致的研究,提出了多种假说,如营养竞争假说、DNA 损伤假说、自由基损伤假说、植物激素调节假说、程序性细胞死亡理论等。

以往对果蔬的成熟衰老研究大多只停留在果蔬采摘后贮藏过程中的各项生理生化指标的变化上,而果蔬的成熟衰老在植株上已经开始启动。由于离体器官已停止与整体植株进行物质交换,因而,活体果实的衰老与离体果实的衰老过程不尽相同。这已在叶片上得到证实,而黄瓜活体果实成熟衰老的研究还未有报道。因此,研究黄瓜活体果实衰老不仅可以认清黄瓜果实自然衰老进程而且对黄瓜果实衰老的早期调控也具有重要

2 黄瓜果实成熟衰老特性

意义。无论是研究果实衰老的机理还是选育耐贮藏抗衰老的黄瓜品种，都需要一种对衰老进程的鉴定方法。研究果实成熟衰老过程的生理生化指标很多，可至今尚未筛选出简单、快速、准确、方便并适合遗传育种和栽培学家应用的生理生化指标用于果实成熟衰老的鉴定。因此，筛选鉴定黄瓜果实衰老的生理生化指标将为黄瓜果实衰老特性和遗传变异的研究提供了方便的工具，是一个具有实际意义的工作。前人对衰老进程的划分进行了较多研究，但主要集中在叶片衰老进程的划分上。而果蔬成熟衰老进程研究较多的是番茄，对黄瓜成熟衰老进程的划分还未有报道。研究黄瓜成熟衰老进程的划分，明确其衰老过程不同时期的变化，对认清其衰老进程，有效延缓衰老、提高黄瓜果实商品性具有重要意义。

脂氧合酶（Lipoxygenase, LOX）在果蔬的成熟和衰老过程中起着非常重要的生理作用，是一类与成熟衰老有关的重要的酶。LOX 及其氧化产物——氢过氧化物可能直接参与了组织的衰老进程。植物组织膜质过氧化作用的启动需要 LOX，LOX 过氧化产物（脂肪酸氢过氧化物）可导致组织衰老，其主要机制包括促进合成蛋白质酶类的失活，抑制叶绿体的光化学活性以及加速细胞膜的降解；LOX 催化多聚不饱和脂肪酸氧化过程产生的自由基也可加剧细胞组分的降解，促进组织衰老。利用分子生物学方法研究 LOX 基因在果蔬的成熟衰老过程中作用，为调控果蔬衰老进程奠定基础。

本书以易衰老 D0313 和耐衰老 649 两个黄瓜品种的活体果实为材料，从外部形态、内部生理生化、超微观结构和分子生

物学四个方面入手,对活体黄瓜果实衰老特性进行研究,目的是筛选出鉴定黄瓜果实衰老的生理生化指标,确定活体黄瓜果实衰老的进程划分,明确同一植株不同节位和同一果实不同部位的黄瓜果实衰老顺序,并从分子生物学角度探讨黄瓜果实成熟衰老表现。从而,找出黄瓜果实成熟衰老过程中的一些基本规律,以期为黄瓜果实抗衰老育种工作和果实成熟衰老机理的研究及调控奠定一定的基础。

“黄瓜果实成熟衰老特性”来源于作者攻读博士学位期间的主要研究内容。该书研究结果的取得是与导师秦智伟教授的悉心指导和辛勤培养分不开的。谨借此书出版的机会向导师致以最诚挚的谢意!

本书共分七章,第一章、第二章、第四章、第五章、第七章由王志坤编著,第三章、第六章由孟凡立编著,由秦智伟教授和李文滨教授审稿。

本书的出版承蒙“国家自然科学基金(30800625)”,“第四十四批博士后科学基金面上项目(20090451120)”,“黑龙江省博士后科学基金(LBH-Z07247)”,“哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目”、“东北农业大学博士启动基金项目”共同资助,在此表示由衷的感谢。

限于水平、才识有限,本书难免有叙述未清、表意未明等疏漏之处,敬请有关专家、同仁和广大读者批评指正。

王志坤

2009年4月

CONTENTS 目 录

第一章 绪论 \ 1

- 一、植物衰老研究历史 \ 1
- 二、植物衰老的概念 \ 1

第二章 植物衰老研究现状 \ 5

- 一、植物衰老过程中的生理生化变化 \ 5
- 二、植物衰老机制假说 \ 10
- 三、植物衰老的分子生物学 \ 17
- 四、衰老的调控 \ 21
- 五、小结 \ 23

第三章 果实衰老研究现状 \ 25

- 一、活性氧代谢与果实成熟衰老的关系 \ 26
- 二、植物激素调控果实成熟衰老 \ 33
- 三、果实成熟衰老过程中的脂类代谢 \ 39
- 四、果实成熟衰老过程中细胞壁的变化 \ 40

第四章 脂氧合酶与果实成熟衰老的研究现状 \ 44

- 一、脂氧合酶途径 \ 44
- 二、脂氧合酶的生化特性 \ 47
- 三、LOX 在植物体内的时空分布 \ 48
- 四、LOX 与成熟衰老之间的关系 \ 49

2 黄瓜果实成熟衰老特性

五、结语 \ 57

第五章 黄瓜果实成熟衰老过程中细胞微观结构变化 \ 59

一、材料与方法 \ 59

二、结果与分析 \ 59

三、讨论 \ 64

四、结论 \ 66

第六章 黄瓜果实成熟衰老过程中生理生化特性 \ 67

第一节 黄瓜果实衰老进程的划分及衰老鉴定指标的筛选 \ 67

一、材料与方法 \ 67

二、结果与分析 \ 73

三、讨论 \ 95

四、结论 \ 102

第二节 黄瓜果实不同部位不同节位衰老特性 \ 103

一、材料与方法 \ 103

二、结果与分析 \ 106

三、讨论 \ 114

四、结论 \ 116

第七章 黄瓜果实脂氧合酶基因的克隆与表达分析 \ 117

第一节 LOX 基因 cDNA 克隆 \ 117

一、材料与方法 \ 117

二、结果与分析 \ 129

三、讨论 \ 145

第二节 CSLOX 基因 Southern blotting 检测 \ 147

一、材料与方法 \ 147

二、结果与分析 \ 155

第三节 CSLOX 基因的转录表达检测 \ 157

一、材料与方法 \ 157

二、结果与分析 \ 159

三、讨论 \ 162

四、结论 \ 163

参考文献 \ 164

附录 A 英文缩略表 \ 189

附录 B 黄瓜果实外观图片

一、植物衰老研究历史

衰老是生物界的一个重要现象。长期以来，人们对动物衰老的研究较多，尤其是对人体衰老的深入研究，为揭示人类长寿奥秘和延缓衰老提供了丰富的资料；对植物衰老现象的认识与探索，由于涉足相对较晚，与之相比差距较大。近 20 多年来，随着 DNA 重组技术、分子生物学、分子遗传学、结构和信息生物学、基因组学等学科新理论与新技术的不断发展及其在该领域的交叉渗透，动物与人体衰老研究变得异常活跃，新成果层出不穷，衰老相关基因与衰老分子机理的研究结果，为人类延年益寿提供了新的技术与途径。受动物与人体衰老研究的影响，以及迫切需要解决农业生产上早衰的问题，如与之密切相关的大田作物优质抗逆高产、果蔬切花保鲜等，人们对植物衰老现象和本质问题的研究日益受到广泛重视，植物衰老研究也从过去侧重于器官与组织水平逐渐深入到细胞、亚细胞和分子水平，特别是 20 世纪 90 年代以来，从细胞与分子水平上进行植物衰老的研究技术得到了迅速发展。

二、植物衰老的概念

植物衰老的研究虽可追溯到 20 世纪初，但以往对生物学上衰老、老化与死亡的概念认识不一。如在区分自然死亡和猝

2 黄瓜果实成熟衰老特性

发死亡时，认为生物体自然死亡是由于生物体抗病力下降的内部因素所致，衰老与某些导致死亡可能性增加的内部因素有关，这个观点仍强调某些外部因子如病是死亡的最终原因（王亚琴，2003；Robertson，1994）。1957 年 Medawar 提出衰老是导致自然死亡的一系列恶化过程，而老化是随着时间的增加，逐渐成熟的过程，不指与死亡有关的自然变化。Thimann（1978）提出，衰老是导致植物自然死亡的一系列衰退过程，是成熟细胞有序降解最终导致死亡。1993 年 Roach 补充，衰老是随着年龄的增长，生存与生殖能力降低的过程（1993）。虽然衰老确实是随着年龄增长而进行的，但它却不是一个简单的被动过程，而是由内部和外部信号进行调节的，也能通过改变这些信号而得到延缓或促进（Nooden，1988）。Strehler（1997）认为衰老的概念为：①原发性：老化是随发育而出现的变化，是原发性改变；②障碍性：衰老是机体异常状态，必须伴有某种机能障碍；③渐进性：衰老是随着机体发育而出现的进行性较为明显变化，具有积累的性质，是一种不可逆的变化；④普遍性：衰老是生命发展的普遍规律，是任何生物也都逃脱不了的变化。因此衰老是普遍出现于机体、组织、细胞内部的代谢变化。也是直线的，缓慢进行的个体和组织功能低下，而导致机体内环境稳定性减退。2000 年 Dangl 总结为衰老是植物组织在其生命尽头发生的一种相对缓慢的细胞死亡、它包括衰老组织中细胞内组分有序的解体，以及在存活部位最大限度的回收和利用衰老组织中的营养成分。

衰老是一种器官或组织逐步走向功能衰退和死亡的变化过程（王树凤，2000；种康，1992）。它除了代表器官或组织生

命周期的终结之外，在发育生物学上也有着重要意义。在这段时期内，植物在成熟叶中积累的物质，包括大量的氮、碳有机化合物和矿物质，被分解并运送至植物其他生长旺盛的部位；对于绝大多数农作物来说，衰老会限制产量且造成采后损失。因此研究植物衰老不仅有助于认识其发育过程，而且可能建立操纵植物衰老的方法。目前植物衰老的主要内容包括：①在自然死亡前生理上的一系列衰退过程；②长期进化和自然选择的结果，可以在细胞、组织、器官及个体水平上发生；③发育的组成部分，主要受遗传基因控制，在生态适应以及营养物质再利用上都具有积极的意义，是一个主动的过程。

鉴于植物自身的特点，植物衰老可以分为两种基本类型：①一年生植物衰老：一年中只进行一次生殖生长，开花结实后衰老、死亡；②多年生植物衰老：一年中营养生长与生殖生长交替，叶片和/或茎秆衰老、死亡，但地上茎秆和地下部分或仅地下部分仍然活着。也可以将衰老分为四种类型：①整体衰老型：一年生或两年生一次结实植物，开花结实后随即全株衰老死亡；②地上部衰老型：指多年生草本植物；③落叶衰老型：指多年生落叶木本植物；④渐进衰老型：指多年生常绿木本植物（Leopold, 1975）。实际上，这两种分类并无本质区别，但却从某种程度上暗示了衰老调控途径的多样性与复杂性。由于田间条件下大田作物衰老生理生化代谢复杂性、环境与遗传因子多样和多变性等，给生产上田间作物衰老程度、衰老时间早晚鉴定带来许多困难，育种与栽培学家往往将生育后期形态、色相（熟相）的直观变化来简单描述作物品种间衰老症状差异，但对其内部衰老差异了解相对较少。沈成国与余

4 黄瓜果实成熟衰老特性

松烈连续 4 年在高产条件下对 28 个适宜于北方冬麦区种植的冬小麦衰老过程中形态色相及 9 个与衰老密切相关的生理生化指标观察与测定，将上述品种从 4 种熟相（绿熟型、黄熟型、灰白熟型及猝发早衰型）划分为：正常衰老、严重早衰、轻度早衰和贪青四种衰老类。

一、植物衰老过程中的生理生化变化

植物衰老是一个受高度调节的过程，细胞组分的降解也是有序进行的。叶绿素降解是衰老过程中第一个可以观察到的症状，但当发现叶子变黄时，衰老过程中的多数事件都已经发生，如蛋白质和 RNA 的降解使光合作用能力降低；氮、磷、金属元素和矿物质元素等营养物质也已转移到其他生长旺盛的部位。

1. 叶绿素降解

叶绿素的逐渐消失是植物衰老的最明显的表征之一。过去几年，叶绿素降解途径已经被阐明 (Matile, 1999)。叶绿素降解共分为四个连续的步骤，其中第三步脱镁叶绿酸 a 加氧酶 (PaO) 降解脱镁叶绿酸 a 被认为可能是衰老叶片黄化关键的一步。脱镁叶绿酸 a 加氧酶 (PaO) 是以脱镁叶绿酸 a 为底物切开卟啉环生成 RCC，只存在于衰老的叶片中，它的活性与叶绿素丢失的速率成正相关，因而它可能是叶绿素降解的一个关键酶 (Buchanan-Wollaston, 2003)。叶绿素降解成为无光化学特性的 FCC，然后被修饰后转运到液泡中以 NCC 形势贮藏，因此在某种程度上讲，叶绿素降解是衰老叶肉细胞的一种解毒方式，它对于衰老叶肉细胞活力的保持和亚细胞区域内各种大分子物质降解或合成代谢的顺利进行具有重要意义 (Buchanan-Wollaston, 2003)。

陆定志等 (1997) 认为，叶片衰老进程中 Chla 分解速度

比 Chlb 快, Chla/Chlb 比值的变化作为衰老的一个指标更能直观准确的反映出植物叶片衰老的进程。叶绿素的丧失可导致体内超氧化物自由基产量升高, 但是这种伴随黄化的叶绿素丧失是否就触及衰老的机理呢? 现已知在一些情况下, 叶绿素含量和衰老之间存在着明显的负相关, 如白化叶片或花瓣等缺乏叶绿素的组织, 在诱导叶片衰老的同样条件下也一样衰老。另外也发现叶片的黄化是可逆的。细胞分裂素 (CK) 处理黄化和衰老叶片时, 可诱导再绿, 这不仅反映这种向青绿幼嫩的转化, 同时膜相也从凝胶态转向液晶态。叶绿体衰老的顶峰是双层膜中外膜脱落, 这时细胞器内的结构已全部解体, 而经 CK 处理衰老的叶绿体可被修复。由再绿和叶绿体修复现象, 引申出衰老概念的一个基本问题——如果一个明显的衰老现象, 如叶绿体降解, 是可逆的话, 这是否为真正的衰老呢?

2. 蛋白质降解

植物衰老期间蛋白质的降解是最重要的降解过程, 因为氨基酸的再动员对植物其他发育着的器官是非常重要的。蛋白质丧失是叶片衰老过程中的早期事件, 蛋白质控制衰老有两方面的含义: 一方面降低蛋白质周转, 它是蛋白质合成机制丧失的结果; 另一方面蛋白质含量通过蛋白质水解而降低。

植物衰老中的一个难题是叶片中 75% 以上定位在叶绿体内的蛋白质是如何降解和移动的, 而且, 是什么信号来激发这一过程的开始? 沈成国 (2001) 认为蛋白质含量降低可能仅靠蛋白质合成速率降低就能启动, 而无须改变蛋白质降解活动本身。许多蛋白酶基因在衰老过程中诱导表达, 但这些基因所编码的酶定位在液泡内, 因此直至液泡膜破裂这些酶才能与叶绿体内蛋白作用。据报道, 在叶绿体内发现氨肽酶和金属内切