

· 研究报告 ·

采前喷施草酸对芒果果实细胞钙含量和分布的影响

朱竹^{1,2}, 孟祥红¹, 田世平^{1*}

¹中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093

²中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要 利用焦锑酸钾沉淀-透射电子显微镜观察的方法, 观测了采前喷施草酸或钙后采收期芒果(*Mangifera indica*)果实细胞钙含量和分布情况, 探讨钙含量和分布变化对果实成熟和衰老的影响。结果表明, 与对照相比, 采前经草酸或钙处理的果实果皮和果肉细胞排列较规则且致密, 淀粉粒分布较多。采前草酸或钙处理均能显著提高芒果果皮和外果肉组织的钙含量; 疏松结合态钙均匀分布在果皮和果肉细胞的细胞壁、细胞膜、液泡膜和质体中, 并在液泡内堆积; 而对照果实的液泡膜模糊, 钙颗粒较少。实验证明采前喷施草酸或钙能维持果实细胞的形态, 提高果实细胞的钙含量, 影响钙的分布, 有利于保持果实的硬度并可增加果实营养。

关键词 钙含量, 钙分布, 芒果, 草酸

朱竹, 孟祥红, 田世平 (2010). 采前喷施草酸对芒果果实细胞钙含量和分布的影响. 植物学报 45, 23–28.

一般认为钙在生物体内有3种存在方式: 结构钙、疏松结合态钙和游离钙。结构钙指与生物体内无机盐或其它成分形成的化学性质比较稳定的难溶性的结构组分, 对维持细胞形态结构具有重要作用。游离态钙在细胞内以离子状态存在, 含量相对较低, 与细胞的信号转导和生理代谢调节密切相关。疏松结合态钙在生物体内以化合态的形式存在, 可以分解释放出游离态钙离子, 也可以与游离态钙结合, 在一定程度上可以调节钙离子浓度(Marschner, 1991)。芒果(*Mangifera indica*)是典型的呼吸跃变型水果, 采后呼吸代谢旺盛, 极不耐贮藏。钙离子作为一种重要的外源调节物质在采后贮藏方面有许多报道。采前喷钙或渗钙提高采后果实内源钙含量可以降低呼吸强度, 抑制乙烯生成, 调节果实软化相关酶的活性, 稳定生物膜结构, 保持果实硬度, 延缓果实衰老, 同时可降低采后病害的发生(Joyce et al., 2001; Manganaris et al., 2005)。但采前喷钙或采后浸钙对芒果采后贮藏保鲜效果无明显影响, 这可能与芒果果实本身细胞内钙离子含量较高, 外源钙离子对内源钙离子含量无明显影响有关(Joyce et al., 2001)。植物代谢过程中产生的

草酸根离子可以与钙离子结合形成草酸钙, 具有调节植物细胞钙离子浓度和诱导植物抗病性等功能(Mucharromah and Kuc, 1991; Webb, 1999)。外源草酸处理影响内源钙的分布从而调节植物生理代谢反应已有相关报道(张宗申等, 2003)。本课题组前期研究表明, 外源草酸处理芒果果实能够减缓果实的软化速率, 降低乙烯释放量, 有效地提高果实采后品质和贮藏效果(郑小林, 2007), 但对其调节机理未进行深入研究。基于上述结果和草酸在植物细胞中的作用, 本研究通过观测采前喷施草酸或钙溶液对采收期芒果果实内源钙含量和分布的影响, 探讨内源钙含量和分布在芒果果实成熟和衰老过程中的可能作用, 为提高芒果贮藏保鲜技术提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

实验材料为中晚熟优质芒果栽培种圣心(*Mangifera indica* Linn. cv. Zill), 又名红芒六号, 采于四川省攀枝花市仁和区金沙镇农业部芒果绿色生产示范

收稿日期: 2009-03-27; 接受日期: 2009-09-29

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目(No.2006BAD22B02)和国家自然科学基金(No.30671473)

* 通讯作者。E-mail: tsp@ibcas.ac.cn

基地。芒果果实采前25–30天分别喷施 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草酸和3%的氯化钙,以喷水为对照(Zheng et al., 2007)。采收约八成熟且大小和着色基本一致的无病果实,及时转运到位于北京的中国科学院植物研究所实验室。果实在通风房间放置3小时后,置于 20°C ,并立即用单面刀片取下芒果的果皮和果肉(果皮下1 cm附近)组织,每种处理取6个果实。

1.2 实验方法

1.2.1 制作石蜡切片并观察

芒果果皮和果肉材料经FAA(福尔马林-醋酸-乙醇混合液)固定、梯度乙醇脱水及石蜡包埋,制成切片,切片厚度为 $10 \mu\text{m}$ 。切片经脱水、复水后用Schiff试剂染色,再经脱水、二甲苯透明、加拿大树脂封片,烘干后备用。将染色后的切片置于光学显微镜(ZEISS Axioskop 40, Germany)下进行观察,拍照。

1.2.2 果实总钙含量测定

实验材料(芒果)经蒸馏水清洗、晾干后分别切取果皮和果肉组织(果皮下1 cm), 65°C 下烘干备用。样品的消煮参照Manganaris等(2005)的方法,分别称取烘干的果皮和果肉样品各50 mg,置于消煮管

中, $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ 混合消化,用原子分光光度计测定消化液的钙含量。

1.2.3 制作超薄切片并观察果实中内源钙分布

参照Tian等(1998)的方法,采用焦锑酸钾沉淀法进行钙离子细胞化学定位。具体过程为:先进行丙酮系列脱水,Spurr树脂渗透、包埋,再用超薄切片机(LEICA, Germany)切片,切片厚度为 70 nm ,切片不经染色,在透射电镜(JEOL 1210, Japan)下观察、拍照。对照处理过程为:将在电镜下已确定有焦锑酸钾沉淀的切片铜网漂浮在 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA溶液(pH 8.0)中, 60°C 下保温4小时,以去除切片上的钙沉淀,然后置于电镜下观察,有钙沉淀颗粒的部位为白色空洞。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 草酸或钙处理对芒果果皮和外果肉细胞结构的影响

采收期芒果果实表皮下的数层细胞虽然排列规则,但是在细胞间隙已经出现分离(图1A)。而采前喷施草酸或钙的果实细胞体积却较小,且排列紧凑致密

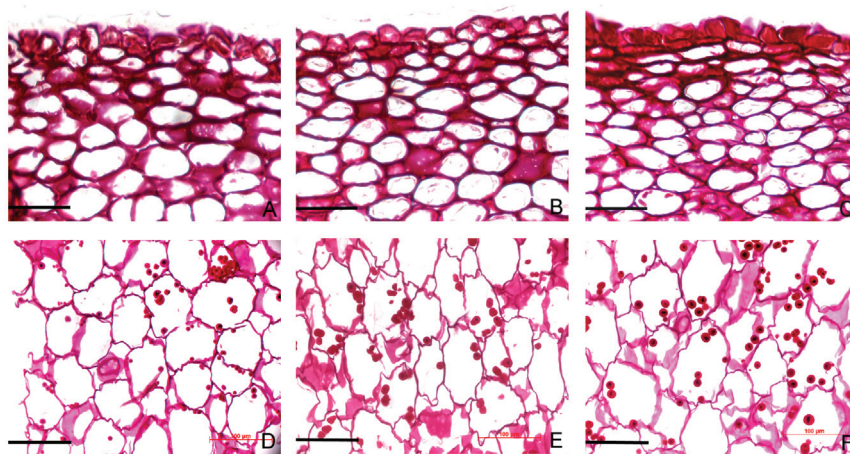


图1 采前草酸或钙处理对芒果果皮和外果肉细胞结构的影响

(A) 对照的果皮细胞; (B) 经草酸处理的果皮细胞; (C) 经钙处理的果皮细胞; (D) 对照的果肉细胞; (E) 经草酸处理的果肉细胞; (F) 经钙处理的果肉细胞。(A)–(C) Bar=50 μm ; (D)–(F) Bar=100 μm

Figure 1 Effects of calcium (Ca) or oxalic acid (OA) on structure of mango pericarp and outer flesh cells

(A) Pericarp cells of control; (B) Pericarp cells after OA treatment; (C) Pericarp cells after Ca^{2+} treatment; (D) Outer flesh cells of control; (E) Outer flesh cells after OA treatment; (F) Outer flesh cells after Ca^{2+} treatment. (A)–(C) Bar=50 μm ; (D)–(F) Bar=100 μm

(图1B,C)。果肉细胞中红色的颗粒为淀粉粒, 对照果实果肉细胞中淀粉颗粒较少(图1D), 而采前喷施草酸或钙的果实细胞中淀粉颗粒却较多, 且体积较大(图1E,F)。

2.1.2 草酸或钙处理对芒果果皮和外果肉细胞钙含量的影响

如图2所示, 采前喷施草酸或钙均显著提高了果皮总钙含量, 分别为对照的1.60和2.08倍。采前草酸或钙处理也增加了果肉总钙含量, 分别为对照的1.50和1.71倍。不论处理与否, 芒果果肉钙含量均明显低于果皮钙含量, 只接近其值的1/3。

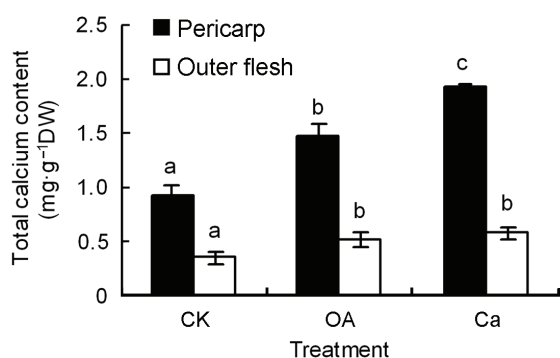


图2 采前草酸或钙处理芒果对其果皮和外果肉总钙含量的影响

数值为3次重复的平均值±标准误, 处理之间的不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$)

Figure 2 Effects of preharvest oxalic acid (OA) or calcium (Ca) on total calcium content of pericarp and outer flesh in mango fruit

Data are means ±SE. Different letters represent significant difference between treatments ($P < 0.05$)

2.1.3 草酸和钙处理对芒果果实细胞钙离子分布的影响

对照芒果果皮的细胞壁、细胞膜、液泡膜以及质体周围可以观察到明显的黑色颗粒(图3G)。经专性螯合提取剂EGTA处理后, 上述部位留下相应空白区域(图3g), 说明这些黑色的颗粒为焦磷酸钙沉淀。而在果肉细胞中, 焦磷酸钙颗粒却较少, 仅分布在果肉细胞壁上。因此我们重点观察了芒果果皮细胞中钙的分布。

对照芒果果皮细胞液泡膜较完整(图3A), 钙颗粒主要分布在细胞膜、液泡膜(图3A)、细胞壁(图3D)以及质体周围(图3G), 并在液泡内堆积(图3A)。

采前草酸或钙处理的芒果果皮细胞细胞膜完整, 质体清晰可见, 钙颗粒较多, 且均匀密布于细胞间隙、细胞膜、液泡膜(图3B,C)、细胞壁中层(图3E,F)及质体周围(图3H,I)。

2.2 讨论

本研究采用原子吸收方法测定总钙含量并结合电镜观察疏松结合态钙的分布, 结果表明, 芒果果实钙含量较高, 且果皮钙含量明显高于果肉, 这与Joyce等(2001)的研究结果一致。采前喷施钙显著提高了芒果果皮和外果肉钙含量, 增加的钙可能是游离态钙和疏松结合态的果胶钙, 电镜观察发现疏松结合态钙大量积累于细胞壁中, 并在液泡内堆积。Marschner(1976)研究发现钙充足时果胶钙可转化为草酸钙, 且草酸钙沉淀在液泡中以维持稳定的胞质钙浓度。采前草酸处理也导致果皮和外果肉总钙含量上升, 这可能是由于草酸与钙离子生成了疏松结合态的草酸钙晶体。草酸钙晶体作为一个局部钙库(Webb, 1999), 其生成可以降低胞内游离态钙离子含量(Franceschi and Nakata, 2005)。因此, 当胞内可溶性钙含量降低时, 内果肉中的游离态钙就向外果肉和果皮转移(Saure, 2005), 其中一部分可能与细胞壁的果胶酸盐结合形成了果胶钙。综上所述, 虽然采前喷施草酸和钙都能显著提高芒果果皮和外果肉钙含量, 但增加的钙形态不一。氯化钙处理增加了果实细胞内游离态钙和可溶性的果胶钙含量, 由于果胶钙可转化为草酸钙, 因而也伴随着难溶性的草酸钙的增加。而采前草酸处理增加了果实细胞内草酸的含量, 草酸和游离钙离子的结合使得细胞内生成了大量的草酸钙, 并导致果实细胞内钙离子的重新分配。

郑小林等(2007)早期的研究发现, 随贮藏时间的延长, 草酸处理的芒果果实硬度比对照下降缓慢, 果实的可溶性固形物含量(soluble solid content, SSC)也低于对照水平。Finley(1999)在研究草酸钙晶体形成与植物硬度的关系时发现, 晶体形成可以作为提高植物硬度的一种补充。因此草酸钙在细胞膨压减小以及果胶物质水解时可能会减缓细胞壁物质溶解, 从而减缓果实硬度的下降。通过石

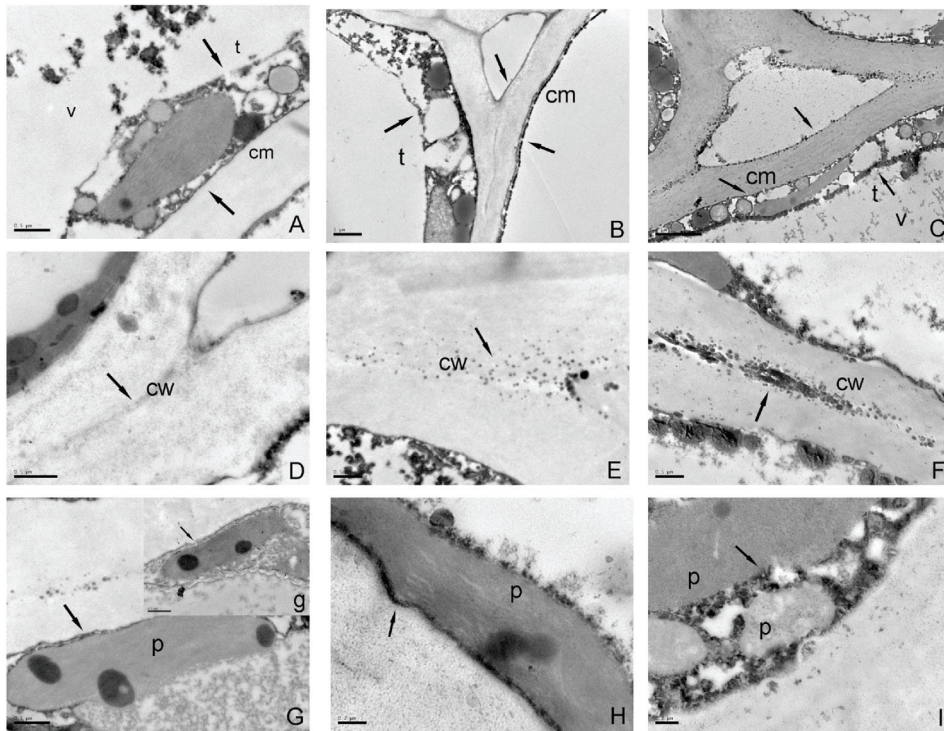


图3 草酸或钙处理芒果对其果皮细胞钙离子分布的影响

(A), (D), (G) 对照的芒果果皮细胞切片; (B), (E), (H) 草酸处理的芒果果皮细胞切片; (C), (F), (I) 钙处理的芒果果皮细胞切片; (g) 经EGTA整合后的芒果果皮细胞。焦锑酸钙颗粒主要分布在细胞壁、细胞膜、液泡膜及质体中,并在液泡内堆积。箭头表示钙沉淀颗粒。cw: 细胞壁; cm: 细胞膜; t: 液泡膜; p: 质体; v: 液泡。(A), (D)–(G), (g) Bar=0.5 μm; (B) Bar=1 μm; (C) Bar=2 μm; (H), (I) Bar=0.2 μm

Figure 3 Effects of oxalic acid (OA) or calcium (Ca) treatment on calcium distribution of mango pericarp cells

(A), (D), (G) Cell sections of control; (B), (E), (H) Cell sections after OA treatment; (C), (F), (I) Cell sections after Ca^{2+} treatment; (g) Mango pericarp cells after EGTA treatment. Ca containing antimonite precipitates (CaAP) was mainly distributed in cell wall, cell membrane, tonoplast and plastid, much more CaAP deposited in vacuole. The arrows indicated CaAP. cw: Cell wall; cm: Cell membrane; t: Tonoplast; p: Plastid; v: Vacuole. (A), (D)–(G), (g) Bar=0.5 μm; (B) Bar=1 μm; (C) Bar=2 μm; (H), (I) Bar=0.2 μm

蜡切片光学显微镜观察发现,草酸或钙处理的果实表皮细胞排列较致密,未出现细胞间隙分离的现象,且果肉细胞淀粉粒含量较高。淀粉作为细胞内容物对细胞起着支撑作用,此外,淀粉也是果实初期呼吸作用的底物,在淀粉酶的作用下逐渐被水解。所以经草酸和钙处理的果实果肉细胞中较多的淀粉粒可能是高含量的钙抑制果实呼吸作用的结果。电镜观察亦发现,采前经草酸或钙处理的芒果果皮细胞细胞膜完整,质体清晰;钙颗粒数量较多,且均匀分布在细胞壁中层、细胞间隙、液泡膜、质体等部位。而对照组的果皮细胞中钙颗粒数量少,

且液泡膜模糊。钙与细胞壁的果胶酸形成果胶酸钙,保护细胞果胶层结构,钙还与生物膜表面的磷酸盐、磷酸酯和蛋白质的羧基桥接起来,维持细胞膜结构的完整性与稳定性,防止胞内底物与酶接触而导致生理代谢紊乱(Siddiqui and Bangerth, 1995),进而抑制果实的呼吸强度。因此,钙在芒果果皮和果肉细胞壁、细胞间隙和液泡膜等区域积累并与有机大分子和无机小分子结合成为结合态钙,可能有利于维持细胞壁强度及维护膜的完整性。此外,钙还是重要的矿物质营养素,可作为保健食品和营养强化食品的补充剂(Hernández-Munoz et al.,

2008)。因此, 提高果实的钙含量不仅能够改善果实的质地, 还能够提高果实的营养价值, 有益于人体健康。

综上所述, 外源草酸或钙能抑制果皮细胞的解离, 显著提高芒果果皮和外果肉的钙含量, 增加果皮细胞壁、细胞间隙、细胞膜、液泡膜和质体等部位疏松结合态钙的分布和含量。内源钙含量的提高有利于维持细胞壁的强度和膜的完整性, 提高果实品质。

参考文献

- 张宗申, 利容千, 王建波 (2001). 草酸处理对热胁迫下辣椒叶片膜透性和钙分布的影响. *植物生理学报* **27**, 109–113.
- 郑小林, 田世平, 李博强 (2007). 外源草酸延缓采后芒果成熟及其生理基础的研究. *中国农业科学* **40**, 1767–1773.
- Marschner H (曹一平等译) (1991). 高等植物的矿质营养. 北京: 北京农业大学出版社. pp. 148–154.
- Finley DS (1999). Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Rev Biol Trop* **47**, 27–31.
- Franceschi VR, Nakata PA (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 41–71.
- Hernández-Munoz P, Almenar E, del Valle V, Velez D, Gavara R (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria×ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chem* **110**, 428–435.
- Joyce DC, Shorter AJ, Hockings PD (2001). Mango fruit calcium levels and effect of postharvest calcium infiltration at different maturities. *Sci Hortic* **91**, 81–99.
- Manganaris GA, Vasilakakis M, Mignani I, Diamantidis G, Tzavella-Klonari K (2005). The effect of preharvest calcium sprays on quality attributes, physicochemical aspects of cell wall components and susceptibility to brown rot of peach fruits (*Prunus persica* L. 'Andross'). *Sci Hortic* **107**, 43–50.
- Marschner H (1976). Redistribution of calcium in bean fruits during seed development. *Z Pflanzenphysiol* **80**, 354–366.
- Mucharromah E, Kuc J (1991). Oxalate and phosphates induce systemic resistance against diseases caused by fungi, bacteria and viruses in cucumber. *Crop Prot* **10**, 265–270.
- Saure MC (2005). Calcium translocation to fleshy fruit: its mechanism and endogenous control. *Sci Hortic* **105**, 65–89.
- Siddiqui S, Bangerth F (1995). Effect of preharvest application of calcium on flesh firmness and cell wall composition of apple influence of fruit size. *J Hortic Sci* **70**, 263–269.
- Tian HQ, Kuang AX, Musgrave ME, Russell SD (1998). Calcium distribution in fertile and sterile anthers of photoperiod-sensitive genie male-sterile rice. *Planta* **204**, 183–192.
- Webb MA (1999). Cell mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* **11**, 751–761.
- Zheng XL, Tian SP, Yue H, Xu Y (2007). Effects of oxalic acid treatment on mango fruit during storage. *Acta Hortic Sin* **34**, 579–584.

Effect of Preharvest Oxalic Acid Sprays on Calcium Content and Distribution in Mango Fruit Cells

Zhu Zhu^{1,2}, Xianghong Meng¹, Shiping Tian^{1*}

¹Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract We observed cell structure and analyzed total calcium content and distribution in mango fruits treated with oxalic acid (OA) or calcium (Ca) spray before harvest by transmission electron microscopy combined with *in situ* precipitation of calcium with an improved technique of potassium pyroantimonate. Compared with controls, the pericarp and outer flesh of OA-and Ca-treated fruits showed a regular, tight cell structure with an increase in starch grains and Ca content. Loose, bound Ca was mainly distributed in the cell wall, cell membrane, tonoplast and plastid, and more Ca was deposited in vacuoles. In contrast, the membrane structures of vacuoles in control fruit cells became obscure. Preharvest OA or Ca sprays may maintain cell structure and increase Ca content of the pericarp and outer flesh of mango, which is beneficial for maintaining fruit firmness and improving Ca nutrition.

Key words calcium content, calcium distribution, mango, oxalic acid

Zhu Z, Meng XH, Tian SP (2010). Effect of preharvest oxalic acid sprays on calcium content and distribution in mango fruit cells. *Chin Bull Bot* **45**, 23–28.

* Author for correspondence. E-mail: tsp@ibcas.ac.cn