

桑椹高花色苷及抗氧化能力种质资源的筛选与评价

王振江¹, 唐翠明¹, 刘学铭¹, 肖更生², 戴凡炜¹, 罗国庆¹

(¹广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610; ²广东省农业科学院, 广州 510610)

摘要:以国家桑树种质资源圃华南分圃中保存的 160 份果桑种质资源为材料, 对桑椹高花色苷及抗氧化能力种质资源进行了筛选与评价。结果表明, 其总花色苷含量、总抗氧化能力和 DPPH 清除能力的变幅分别为 106.5 ~ 1472.0 mg/L、5.4 ~ 32.3 mmol/mL 和 33.7% ~ 87.8%, 表现出明显的品种间差异。113 份二倍体和 47 份四倍体果桑种质资源桑椹中的花色苷含量、总抗氧化能力和 DPPH 清除率差异较大, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。聚类分析表明, 160 份果桑种质资源可分为 6 大类群, 分别由 13、11、56、44、10 和 26 份种质构成。桑椹的总抗氧化能力、DPPH 清除率和总花色苷含量呈极显著 ($P < 0.01$) 正相关, 表明桑椹的抗氧化能力与其所含的总花色苷类物质密切相关。本研究筛选出了一批高花色苷和抗氧化能力的果桑种质资源, 可用于高花色苷和高抗氧化能力果桑新品种的培育。

关键词: 桑椹; 花色苷; 抗氧化; 种质资源

Screening and Evaluation for High Anthocyanin Content and Antioxidant Activity of Fruit Mulberry Germplasm Resources

WANG Zhen-jiang¹, TANG Cui-ming¹, LIU Xue-ming¹, XIAO Geng-sheng², DAI Fan-wei¹, LUO Guo-qing¹

(¹The Sericulture & Farm Produce Processing Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610;

²Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610)

Abstract: Germplasms with high anthocyanin content and antioxidant activity in mulberry are important for fruit mulberry breeding. 160 fruit mulberry germplasm resources were screened for evaluation of anthocyanin content and antioxidant activity in this study. The results were summarized as follows, the ranges of anthocyanin content, total antioxidant capacity (TAC), 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging ability in 160 fruit mulberry accessions were 106.5-1472.0 mg/L, 5.4-32.3 mmol/mL, and 33.7%-87.8%, respectively, displaying significant varieties differences. The differences among accessions with ploidies were not significant at 0.05 levels. 160 fruit mulberry accessions could be clustered into 6 clusters which consisted of 13, 11, 56, 44, 10, and 26 accessions, respectively. There were significantly positive correlations between the anthocyanin content and TAC, anthocyanin contents and DPPH. The results showed that total anthocyanin in mulberry were the important antioxidant substances. The accessions with high contents of anthocyanin and antioxidant activity would be expected to be used in further quality breeding of fruit mulberry cultivars.

Key words: mulberry; anthocyanin; antioxidation; germplasm resources

桑椹为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的成熟果穗, 属浆果类。新鲜桑椹以其独特的口味、丰富的营养和多种保健作用正日益受到人们的喜爱, 已经成为第 3 代水果的代表, 此外桑椹还是开发功能性食品的优质原料, 国家已将其列入食药兼用物品名

单^[1-2]。桑椹中富含花色苷, 是提取天然花色苷类色素的优良原料, 桑椹花色苷以其含量高、性质比较稳定、受光照和温度影响较小等优点, 正成为天然色素研究开发的热点, 在食品、化妆品及医药行业有着广阔的应用前景^[3-4]。我国是世界蚕丝业的发源

收稿日期: 2013-07-26 修回日期: 2013-10-11 网络出版日期: 2014-04-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140408.0844.012.html>

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (蚕桑); 科技部政策引导类计划项目 (2013GA7800021); 广东省财政资金 2013 年项目

第一作者研究方向为桑树遗传育种与桑资源利用。E-mail: wzhjiang@126.com

通信作者: 罗国庆, 研究方向为桑树遗传育种。E-mail: guoqingl@sina.com

地,也是世界上桑树种质资源拥有及保存量最多的国家^[5],以桑椹为原料开发天然色素有较大的优势。长期以来对桑椹花色苷的研究多集中在提取纯化工艺及理化性质等方面^[3,6-7],对其生理活性方面研究虽有报道^[8-9],但由于所采用桑树种质较单一,尚难全面体现不同桑树种质桑椹的花色苷含量和抗氧化活性的差异性,从而筛选出高花色苷及抗氧化能力的种质资源用于育种,也难以揭示花色苷含量和抗氧化活性之间的内在关系。本研究在对国家桑树种质资源圃华南分圃中保存的果桑种质资源进行初步农艺性状筛选的基础上,对筛选出的 160 份农艺性状优良的果桑种质资源桑椹的花色苷含量和体外总抗氧化能力及清除 DPPH 自由基能力的差异进行了分析,试图从中筛选出花色苷含量高、抗氧化效应强的果桑育种材料,同时分析了其花色苷含量与体外抗氧化活性的关系,以期为揭示桑椹中抗氧化作用的相关物质基础,并为我国富含花色苷和高抗氧化能力果桑新品种的选育和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

1.1.1 供试材料 160 份果桑种质资源均为广东桑种,包括二倍体种质资源 113 份,四倍体种质资源 47 份。各种质资源均保存于国家桑树种质资源圃华南分圃,为 5 年生植株,树体生长、立地条件和栽培管理水平基本一致。

1.1.2 试剂 三吡啶三吡嗪(TPTZ, tripyridyl-triazine),购自 Fluka 公司;1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl),购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 在盛熟期采取各果桑种质资源成熟桑椹,采后立即用 100 目双层纱布过滤榨取桑果汁,冷冻备测。

1.2.2 桑果汁中花色苷含量测定 花色苷含量测定用 pH 示差法^[10]。计算公式为:花色苷含量(mg/L,以 C3G 计) = $(OD \times M \times DF \times 1000) / \varepsilon \times 1$,式中 OD 为吸光度,DF 为稀释倍数,M 为分子量 449.2,ε 为花色苷的摩尔吸光系数(C3G 的 ε 为 26900),测定 3 次取其平均值。

1.2.3 桑果汁总抗氧化能力测定(TAC) 总抗氧化能力测定采用 FRAP 法^[11-12]。将 3 mL FRAP 工作液(10 mmol/L TPTZ、20 mmol/L 三氯化铁、0.3 mmol/L pH 3.6 的醋酸钠缓冲液以 1:1:10 的

比例混合)预温到 37 ℃,加入 0.1 mL 样品和 0.3 mL 蒸馏水,摇匀后放置 4 min,于 593 nm 下测定吸光度;以 0.1 ~ 1.0 mmol/L FeSO₄ 的标准溶液代替样品作标准曲线,得到回归方程 $y = 0.7258x - 0.0025$ ($r = 0.9998$)。样品的总抗氧化能力以毫摩尔 FeSO₄/每毫升桑果汁表示,单位 mmol/mL。

1.2.4 桑椹 DPPH 清除率测定^[13] DPPH 的浓度为 2×10^{-4} mol/L,取 0.1 mL 桑果汁稀释 100 倍,在最大波长(517 nm)下,加样后测定各吸光度(OD),每一吸光度平行测定 3 次,取其平均值。清除率计算公式为:清除率 = $[1 - (A_1 - A_0) / A_0] \times 100$,式中 A₀为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 无水乙醇,A₁为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 样品溶液,A₁为 2 mL 无水乙醇 + 2 mL 样品溶液。

1.2.5 统计分析 160 份果桑种质资源的桑椹花色苷含量、TAC 及 DPPH 清除能力在种质间的分布按(最大值-最小值)/N 为分布间距,做直方图,并计算各分布间距中种质数占总样本数的百分率;不同染色体倍数桑树种质间的总花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力的差异显著性分析采用平均数的 t 检验;160 份供试种质以总花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力为变量,采用快速聚类法进行聚类分析;DPPH 清除率、TAC 与总花色苷含量之间的相关分析采用相关系数法。数据处理采用 SPSS 11.5 软件包建立数据库,并进行统计分析数据。

2 结果与分析

2.1 果桑种质资源花色苷含量及抗氧化能力差异

160 份果桑种质资源之间桑椹中花色苷含量及其 TAC 和 DPPH 清除能力的变幅和变异系数均较大(表 1),表明果桑种质资源的花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力存在明显的品种间差异。进一步分析各种质分布表明,果桑种质资源桑椹中的花色苷含量呈现近似正态分布,在 486.5 ~ 979.5 mg/L 之间的种质数占总种质数的 61.3% (图 1);TAC 呈现偏正态分布,分布在 8.6 ~ 19.4 mmol/mL 范围内果桑种质资源最多,占总种质数的 81.3% (图 2);DPPH 清除能力呈现类似偏态的单峰分布,72.5% 的果桑种质资源的 DPPH 清除能力集中在 62.1% ~ 82.8% 之间(图 3)。160 份果桑种质资源桑椹中花色苷含量最高及 DPPH 清除能力最强的种质均是果桑资源 JP1,总抗氧化能力最强的种质是果桑资源崖 1,其花色苷含量仅次于资源 JP1(表 2)。

表 1 果桑种质花色苷含量及抗氧化能力的变幅和变异系数

Table 1 Variations of anthocyanin contents and antioxidant activities in 160 fruit mulberry accessions

成分 Component	变幅 Range	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变异系数(%) CV
花色苷 (mg/L) Anthocyanin	106.5 ~ 1472.0	687.9 ± 316.9	46.1
总抗氧化能力 (mmol/mL) TAC	5.4 ~ 32.3	15.2 ± 4.5	29.6
DPPH 清除能力 (%) DPPH scavenging ability	33.7 ~ 87.8	71.6 ± 10.4	14.5

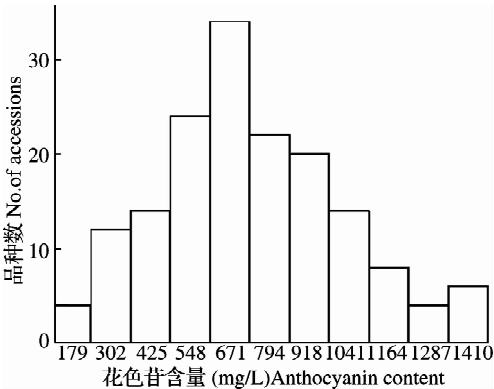


图 1 桑椹花色苷含量的种质分布

Fig. 1 Distribution of anthocyanin content in fruit mulberry accessions

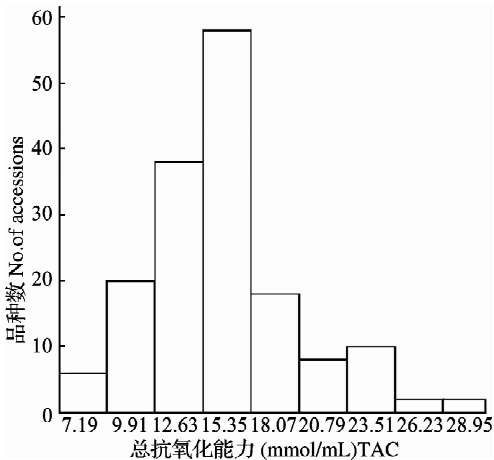


图 2 桑椹总抗氧化能力的种质分布

Fig. 2 Distribution of TAC in fruit mulberry accessions

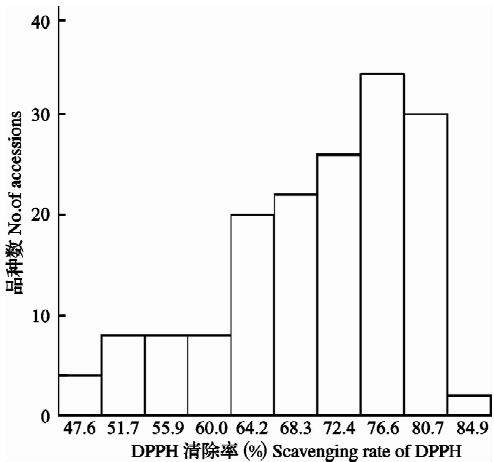


图 3 桑椹 DPPH 清除能力的种质分布

Fig. 3 Distribution of DPPH scavenging ability in fruit mulberry accessions

2.2 不同倍性果桑种质资源的花色苷含量及其抗氧化能力

由表 3 可知,113 份二倍体和 47 份四倍体果桑种质资源之间的花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力的变幅和变异系数均较大,113 份二倍体果桑种质资源中花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力的变异系数均大于 47 份四倍体果桑种质资源。进一步比较不同倍性之间的差异,结果表明 113 份二倍体和 47 份四倍体之间花色苷含量及其 TAC 和 DPPH 清除能力差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 果桑种质资源的花色苷含量及其抗氧化能力的聚类分析

160 份果桑种质资源采用快速聚类法聚为 6 大类群,各类群种质数见表 4。聚类结果中第 3 类群种质数最多,占总种质数的 35.0%;第 4 类群种质数次之,占总种质数的 27.5%;第 1 类群、第 2 类群和第 5 类群的种质数较少,分别为 13、11 和 10 个,聚类结果与果桑种质的倍性无必然联系。分析各类群的花色苷含量及其 TAC 和 DPPH 清除能力最终聚类中心变量的标准化均数发现,第 1 类群种质的花色苷含量最高,其 TAC 和 DPPH 清除能力也最高;第 2 类群种质的花色苷含量最低,其 TAC 和 DPPH 清除能力也最低;第 3 类群种质的花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力均较高,仅次于第 1 类群;第 4 类群种质的花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力均为中等;第 5 类群种质的 TAC 中等,花色苷含量和 DPPH 清除能力较低;第 6 类群种质的花色苷含量、TAC 和 DPPH 清除能力均较低。综合比较看,6 大类群的优劣顺序:第 1 类 > 第 3 类 > 第 4 类 > 第 5 类 > 第 6 类 > 第 2 类。

从类群的间距可以看出,第 1 类与第 2 类间距最大,第 1 类与第 5 类、第 2 类与第 3 类、第 1 类与第 6 类次之,第 1 类与第 4 类、第 2 类与第 4 类、第 3 类与第 5 类再次之,第 4 类与第 6 类最小(表 5)。

2.4 果桑种质资源的花色苷含量及其抗氧化能力的相关性分析

分别分析果桑种质资源桑椹花色苷含量与其 TAC、DPPH 清除能力相互之间的关系,结果见图 4 和图 5,由图可知果桑种质资源桑椹花色苷含量

表 2 部分供试果桑种质资源及其花色苷含量、抗氧化能力和 DPPH 清除能力

Table 2 Part of fruit mulberry accessions and their anthocyanin contents, antioxidant activities, and DPPH scavenging ability

品种名称 Name of cultivar	花色苷含量 (mg/L) Anthocyanin	总抗氧化能力 (mmol/mL) TAC	DPPH 清除能力 (%) DPPH scavenging ability	品种名称 Name of cultivar	花色苷含量 (mg/L) Anthocyanin	总抗氧化能力 (mmol/mL) TAC	DPPH 清除能力 (%) DPPH scavenging ability
JP1	1472.0	30.2	87.8	连州 4	1158.8	22.8	81.4
崖 1	1416.0	32.3	84.4	粤诱 34	1154.7	22.1	80.6
果选 04-104	1387.7	29.8	82.9	高州糠桑	1135.9	22.4	79.8
果选 04-120	1383.6	28.3	82.4	98-12	1149.7	20.9	81.4
97-103	1380.2	24.6	83.7	湛 02	1126.8	20.5	81.8
红选 3	1338.2	23.9	81.5	桂诱 2120	1089.6	20.3	81.9
7403	1322.6	22.5	82.5	湛 12	1056.9	19.7	80.6
果选 04-132	1297.6	22.3	82.4	试 11	1048.7	18.5	77.9
北-2-8	1316.7	20.4	81.1	兴宁	1027.9	19.2	79.8
长旧 3-2	1290.2	20.0	80.9	德新 2	1026.1	20.2	80.8
果选 04-55	1226.5	19.8	80.5	州桥 2	1005.6	19.8	80.4
前山 1	1201.4	19.3	80.4	粤榭大 10	1000.3	16.9	78.7
鱼珠	1182.3	23.3	82.9				

表 3 不同倍性果桑种质资源的花色苷含量、总抗氧化能力和 DPPH 清除率的差异比较

Table 3 Variations of anthocyanin contents, antioxidant activities, and scavenging rate of DPPH in mulberry from different ploidy

倍性 Ploidy	种质数 Variety number	花色苷 Anthocyanin			总抗氧化能力 TAC			DPPH 清除率 (%)		
		Scavenging rate of DPPH								
		变幅 Range	均值 Mean ± SD	变异系数 (%) CV	变幅 Range	均值 Mean ± SD	变异系数 (%) CV	变幅 Range	均值 Mean ± SD	变异系数 (%) CV
二倍体	113	106.5 ~ 1416.1	691.0 ± 328.5	48.3	5.4 ~ 32.3	15.5 ± 4.9	32.3	33.7 ~ 84.4	71.0 ± 11.0	15.2
四倍体	47	170.3 ~ 1472.0	673.0 ± 301.6	45.0	7.2 ~ 24.6	14.5 ± 3.4	24.2	45.5 ~ 87.8	72.2 ± 10.1	14.0

表 4 160 份果桑种质的聚类结果及最终聚类中心

Table 4 Cluster analysis of 160 fruit mulberry accessions and final cluster centers

类群 Cluster	种质数 No. of accessions	花色苷 Anthocyanin	总抗氧化 能力 TAC	DPPH 清除 能力 DPPH scavenging ability
1	13	1.61	2.25	1.18
2	11	-1.63	-1.53	-2.14
3	56	0.69	0.39	0.71
4	44	-0.27	-0.27	0.02
5	10	-0.87	0.24	-1.53
6	26	-0.80	-0.98	-0.64

表 5 各类群中心之间距离

Table 5 Distances between foci of cluster

类群 Cluster	1	2	3	4	5
2	5.99				
3	2.13	4.15			
4	3.35	2.85	1.35		
5	4.19	2.02	2.74	1.74	
6	4.42	1.80	2.43	1.11	1.52

与其 TAC、DPPH 清除能力之间存在显著的正相关, 相关系数均达到了极显著水平 ($P < 0.01$), 表明果桑种质资源桑榭中的抗氧化作用与其所含的花色苷类物质有关, 花色苷类物质是桑榭抗氧化作用的物质基础。

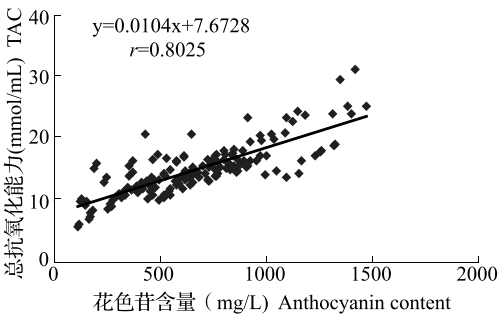


图 4 桑榭花色苷含量与总抗氧化能力之间的关系
Fig. 4 The correlation between anthocyanin contents and TAC in fruit mulberry

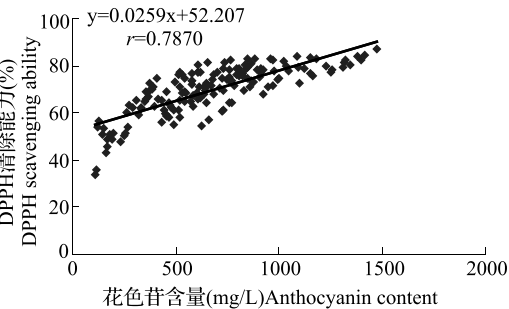


图 5 桑榭花色苷含量与 DPPH 清除能力之间的关系
Fig. 5 The correlation between anthocyanin contents and DPPH scavenging ability in fruit mulberry

3 讨论

3.1 不同果桑种质资源桑椹中花色苷的含量及其抗氧化能力

果桑种质资源桑椹中花色苷含量与其 TAC 及 DPPH 清除能力在种质间存在显著差异,具有遗传多样性,这种差异是遗传基因差异控制的,同时也受到栽培条件和生态环境的影响^[14-15]。不同果桑种质资源间由于控制花色苷类物质合成调控基因的不同,导致种质间桑椹中花色苷类物质的起始合成日期、合成时间长短或合成速率的不同,势必会导致果桑种质资源间花色苷类物质含量的差异。本研究对 160 份果桑种质资源桑椹中的花色苷含量及抗氧化能力评价研究表明,果桑种质资源桑椹中花色苷含量与其 TAC 及 DPPH 清除能力的变幅和变异系数都较大,存在显著的品种间差异。

染色体是遗传物质的载体,自然界存在的桑树多为二倍体($2n=28$),染色体数目的变化会导致形态、生理、生化等诸多表现型的变化^[16-17]。本研究对 113 份二倍体和 47 份四倍体果桑种质资源之间桑椹中花色苷含量及其 TAC 和 DPPH 清除能力的差异进行了比较,结果表明 113 份二倍体和 47 份四倍体之间花色苷含量及其 TAC 和 DPPH 清除能力差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 高花色苷及抗氧化能力果桑新种质的选育

传统桑树品种是以采叶养蚕为目的培育而成,不结桑果或果粒很少且小,难以规模开发,果桑品种的选育研究起步较晚,目前育成的品种较单一,阻碍了果桑产业的发展^[18-19]。广东桑种果桑种质资源坐果率高,单芽坐果数多,单粒果大,经济性状佳,具有良好的丰产潜能,是选育优良果用新品种的良好基础材料^[20]。本研究表明,160 份广东桑种果桑种质资源桑椹中花色苷含量与其 TAC 及 DPPH 清除能力在种质间分布呈现正态或偏正态分布。160 份果桑种质资源通过快速聚类可聚成 6 大类群,各类群的花色苷含量及其 TAC、DPPH 清除能力各有特点,在育种实践中可以根据这一聚类结果选择遗传距离较大或中等的种质进行单交或复交,创制新的种质。

桑椹中具有较强的抗氧化活性,本研究结果表明桑椹中的花色苷含量与其抗氧化活性之间存在极显著正相关,桑椹中的抗氧化作用与其所含的花色苷类物质有关。这为高抗氧化果桑新种质的选育提供了有益信息,在育种实践中可采用复交甚至轮回选择的育种方法,以果色作为主要目标,连续多代定

向选择高花色苷类物质的个体,以达到积累更多的与花色苷类物质含量和抗氧化作用有关的累加基因,从而选育出高花色苷类物质含量与高抗氧化能力的新的果桑种质。从 160 份广东桑种果桑种质资源桑椹中筛选高花色苷及抗氧化能力种质资源 JP1 和崖 1,可作为高花色苷及抗氧化能力果桑新品种的选育材料。

参考文献

- [1] 肖更生,徐玉娟,刘学铭,等.桑椹的营养、保健功能及其加工利用[J].中药材,2001,24(1):70-71
- [2] Song W, Wang H J, Bucheli P, et al. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(10): 9133-9140
- [3] Liu X M, Xiao G S, Chen W D, et al. Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins[J]. J Biomed Biotechnol, 2004(5): 326-331
- [4] 王振江,肖更生,刘学铭,等.桑椹花青素的研究进展[J].蚕业科学,2006,32(1):90-93
- [5] 刘利,张林,赵卫国,等.桑树种质资源的国内外现状比较[J].植物遗传资源学报,2004,5(3):285-289
- [6] Pornanong A, Nipaporn B, Teerapol S. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits[J]. Food Res Int, 2010, 43: 1093-1097
- [7] Zou T B, Wang D L, Guo H G, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS[J]. J Food Sci, 2012, 77(1): 46-50
- [8] Du Q, Zheng J, Xu Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity[J]. J Food Compos Anal, 2008, 21(5): 1093-1097
- [9] Luchai B, Wannee S, Supachai S. Phenolic composition and antioxidant activity of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits[J]. Int J Food Sci Tech, 2013, 48: 934-940
- [10] Wrolstad R E, Durst R W, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products[J]. Trends Food Sci Tech, 2005, 16: 423-428
- [11] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239(1): 70-76
- [12] Griffin S, Bhagooli R, Sean P G, et al. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2004, 302: 201-211
- [13] 许中鸿,杭瑚.一种筛选自由基清除剂的简便方法[J].中草药,2000,31(2):96-97
- [14] Peterson D M, Wesenberg D M, Burrup D E, et al. Relationships among agronomic traits and grain composition in oat genotypes grown in different environments[J]. Crop Sci, 2005, 45: 1249-1255
- [15] Emmons C L, Peterson D M. Antioxidant activity and phenolic content of oat as affected by cultivar and location[J]. Crop Sci, 2001, 41: 1676-1681
- [16] 杨新华,杨今后,骆承军.桑树多倍体育种的回顾与展望[J].浙江农业科学,2000(6):304-308
- [17] 刘峻池,徐立,伍春,等.四倍体果桑新品种嘉陵 30 号桑椹中的氨基酸组成及其含量分析[J].蚕业科学,2011,37(1): 112-115
- [18] 唐翠明,罗国庆,吴福泉,等.关于果桑品种选育的思考[J].果树学报,2007,24(6):826-829
- [19] 唐翠明,吴继军,罗国庆,等.不同果桑品种的桑椹酿酒试验[J].蚕业科学,2008,34(1):24-27
- [20] 唐翠明,罗国庆,刘学铭,等.广东桑种果桑资源的桑椹性状初步研究[J].蚕业科学,2003,29(3):295-298