

万继锋, 李娟, 杨为海, 等. 柑橘果实响应高温、强光胁迫的活性氧代谢研究 [J]. 福建农业学报, 2019, 34 (8): 920—924.
WAN J F, LI J, YANG W H, et al. ROS Metabolism of Citrus Fruits in Response to High-temperature-intense-light Stress [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 34 (8): 920—924.

柑橘果实响应高温、强光胁迫的活性氧代谢研究

万继锋^{1,2}, 李娟³, 杨为海¹, 曾辉¹, 张汉周¹, 陈杰忠^{2*}

(1. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/农业农村部热带果树生物学重点实验室, 广东 湛江 524091;
2. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642;
3. 仲恺农业工程学院园艺园林学院, 广东 广州 510225)

摘要:【目的】研究柑橘果实响应高温、强光胁迫的活性氧代谢, 为预防柑橘果实发生日灼以及果品优质生产提供依据。【方法】在环境调控生长室中模拟高温、强光诱导柑橘果实发生灼伤, 并从果实灼伤病程的不同阶段入手, 分析了果实灼伤病程中果皮活性氧代谢的变化规律。【结果】高温、强光胁迫使果皮中 O_2^- 大量积累, LOX 活性增强, 脂质过氧化产物 MDA 含量显著上升。灼伤初期果皮呈现深黄色小斑点, SOD、POD 和 PPO 活性均显著上升; 随着灼伤病程的加剧, 果皮变褐, POD 活性仍增强, SOD 活性显著下降且显著低于正常果, 而 PPO 活性显著下降, 但仍显著高于正常果; AsA 和 GSH 含量在整个灼伤病程中均逐步下降。【结论】在高温、强光胁迫初期果皮呈现深黄色小斑点, 柑橘果实果皮组织维持较高的活性氧清除能力, 减缓了高温、强光对细胞膜的损伤。果皮呈现深黄色小斑点是预防柑橘果实果皮褐变的重要时间节点。

关键词: 柑橘果实; 高温胁迫; 强光胁迫; 活性氧代谢

中图分类号: S 666

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2019) 08—920—05

ROS Metabolism of Citrus Fruits in Response to High-temperature-intense-light Stress

WAN Ji-feng^{1,2}, LI Juan³, YANG Wei-hai¹, ZENG Hui¹, ZHANG Han-zhou¹, CHEN Jie-zhong^{2*}

(1. Key Laboratory of Ministry of Agriculture and Rural Affairs for Tropical Fruit's Biology, South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 3. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

Abstract:【Objective】The reactive oxygen species (ROS) metabolism of citrus fruits under high temperature and intense light was studied in search for means to mitigate sunburn damage on the fruits. 【Method】Sweet oranges, An-liu (*Citrus sinensis* Osbeck), grown in pots in an environmentally controlled chamber were exposed to artificial high-temperature-intense-light to create simulated burns on the fruits. Change on the ROS metabolism of the fruits as burn symptoms developed in normality and stages with appearance of dark yellow spots, slight browning, and seriously burnt coloration on the peel were monitored. 【Result】Under the imposed stress, the O_2^- and MDA contents and LOX activity in pericarp significantly increased. The activities of SOD, POD, and PPO were significantly raised with the appearance of dark yellow spots on the peels. As the browning intensified, SOD significantly fell below the normal level, POD continued to increase, and PPO significantly decreased but remained to be higher than normal. Under the stress, AsA and GSH in the fruits decreased continuously. 【Conclusion】In the early stages, the high-temperature-intense-light stress began generating dark yellow spots on the orange pericarp. However, the fruit was able to sufficiently remove ROS diminishing or preventing damage on the cell membrane.

收稿日期: 2019—06—24 初稿; 2019—07—15 修改稿

作者简介: 万继锋 (1983—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 果树种质资源与栽培育种 (E-mail: wanjifeng2002@163.com)

* 通讯作者: 陈杰忠 (1958—), 男, 教授, 研究方向: 南方果树的栽培生理研究与教学 (E-mail: cjzlx@scau.edu.cn)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372008); 广东省现代农业产业体系岗位项目; 广东省科技计划项目 (2014A020209081、2014A020208085、2015A020209110)

Hence, it was the crucial time for implementation of measures to avoid sunburns on the fruits.

Key words: citrus fruit; high-temperature-intense-light stress; reactive oxygen species

0 引言

【研究意义】自然条件下高温、强光胁迫会引起柑橘果实向光面果皮发生灼伤,受害部位初呈灰青色或深黄色小斑点,后扩大为黄褐色斑块,凹陷呈深褐色,轻者仅灼伤果皮,重者伤及汁胞,果汁极少且味淡,果肉呈海绵状,完全失去食用价值,每年均给柑橘果品优质生产带来了一定损失^[1-3]。高温、强光胁迫引起的果实向光面果皮灼伤属于氧化胁迫的结果^[4],果实灼伤的发生与果实响应高温、强光胁迫的活性氧代谢密切相关。因此,研究柑橘果实响应高温、强光胁迫的活性氧代谢,对预防高温、强光胁迫引起柑橘果实灼伤以及果品优质生产具有重要意义。**【前人研究进展】**高温、强光是引起柑橘果实灼伤的主要原因,果实灼伤也与果实着生方位、相对湿度有关,着生在树冠西南面的果实易被灼伤,在高温和20%相对湿度下的果实易被灼伤^[1-2,5],可通过果实贴白纸及喷白、树盘覆盖、合理施肥、适当密植、合理修剪、适时灌溉等措施防治柑橘果实灼伤^[1-2]。万继锋等^[6]通过分析柑橘正常果和日灼褐变果果皮抗氧化代谢,发现褐变果皮组织中超氧阴离子自由基(O_2^-)大量积累,脂氧合酶(LOX)活性显著增强,脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量显著上升,而超氧化物歧化酶(SOD)活性、抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量均显著下降,过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性均显著增强。**【本研究切入点】**目前对自然条件下高温、强光胁迫引起柑橘果实灼伤的研究主要涉及发生原因、防治措施以及褐变果皮抗氧化代谢,尚未从柑橘果实灼伤病程上系统研究其活性氧代谢。**【拟解决的关键问题】**通过高温、强光胁迫诱导柑橘果实灼伤,并从果实灼伤病程的不同阶段入手,研究果实灼伤病程中果皮活性氧代谢的变化规律,有助于探讨高温、强光胁迫引起柑橘果实灼伤的作用机制,也从侧面进一步验证和完善自然条件下高温、强光胁迫引起柑橘果实灼伤作用机制的理论,从而为预防柑橘果实发生日灼以及果品优质生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为3年生生长较为一致、挂果适量的盆栽暗柳橙 *Citrus sinensis* Osbeck,其砧木为红橘

Citrus tangerine Hort ex Tanaka。

1.2 试验方法

1.2.1 试验处理 试验在华南农业大学园艺学院环境调控生长室进行,于晴天11:00~15:00采用高温(35℃)、氙气灯强光(20 000~30 000 lx)处理试验树外围裸露果实,诱导向光面果皮出现深黄色小斑点,随后逐渐发展为黄褐色斑块。高温强光处理5~7 d后,向光面果皮呈现深黄色小斑点,随后2~3 d向光面果皮显现轻度黄褐色斑块,随后7~10 d向光面果皮显现重度黄褐色斑块。根据灼伤病程选取正常果、深黄色小斑点果(斑点果)、轻度黄褐色斑块果(轻度褐变果)、重度黄褐色斑块果(重度褐变果),削取相应的果皮,用液氮固定后带回实验室,置于-80℃低温冰箱备用。高温、强光处理期间每天傍晚给予盆栽植株缓慢灌水至水从盆底溢出,以消除水分胁迫。1株树为1个重复,试验设3次重复。

1.2.2 指标测定 O_2^- 含量的测定采用羟胺氧化法,AsA含量的测定采用高效液相色谱法,GSH含量的测定采用DTNB显色法^[6],LOX活性的测定参照Mao等^[7]的方法,MDA含量的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法,SOD活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法,POD活性的测定采用愈创木酚比色法^[8],PPO活性的测定参照张建光等^[9]的方法。

1.3 数据分析

所有数据经Microsoft Office Excel统计分析,采用Duncan新复极差作显著性测验。

2 结果与分析

2.1 高温、强光诱导果实灼伤病程中果皮细胞的膜脂过氧化

灼伤初期斑点果的 O_2^- 含量显著增加,约为正常果的2.4倍;当果皮变褐时, O_2^- 含量先下降后上升,显著高于正常果,但与斑点果无显著差异(图1-A)。灼伤初期果皮呈深黄色小斑点时,膜脂过氧化作用产生的MDA含量显著增加;果皮变褐时,MDA含量仍显著增加(图1-B)。随着灼伤病程的加剧,LOX活性呈上升趋势,斑点果的LOX活性与正常果无显著差异,轻度褐变果和重度褐变果的LOX活性显著高于正常果(图1-C)。说明果实发生灼伤后,细胞膜系统过氧化加剧。

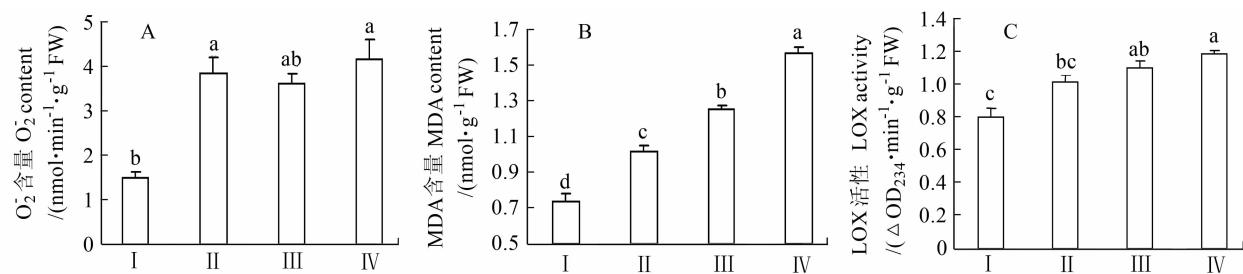


图 1 诱导柑橘果实灼伤病程中果皮细胞的膜脂过氧化

Fig. 1 Changes in cell membrane lipid peroxidation of Citrus Fruits under high-temperature-intense-light stress

注: I 为正常果, II 为斑点果, III 为轻度褐变果, IV 为重度褐变果。图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 2~3 同。

Note: I. normal fruit, II. dark yellow spots fruit, III. slight browning fruit, IV. serious browning fruit. Different lowercase letters in the figure indicated significant differences ($P < 0.05$). The same as Fig. 2~3.

2.2 高温、强光诱导果实灼伤病程中果皮抗氧化酶活性的变化

在果实灼伤初期果皮呈深黄色小斑点, SOD、POD 和 PPO 活性均显著增强, 分别比正常果的增

加 14.7%、36.3%、52.1%。果皮变褐时, SOD 活性显著下降, 最终显著低于正常果; POD 活性仍有所增强, 但无显著增加; PPO 活性显著下降, 仍显著高于正常果 (图 2)。

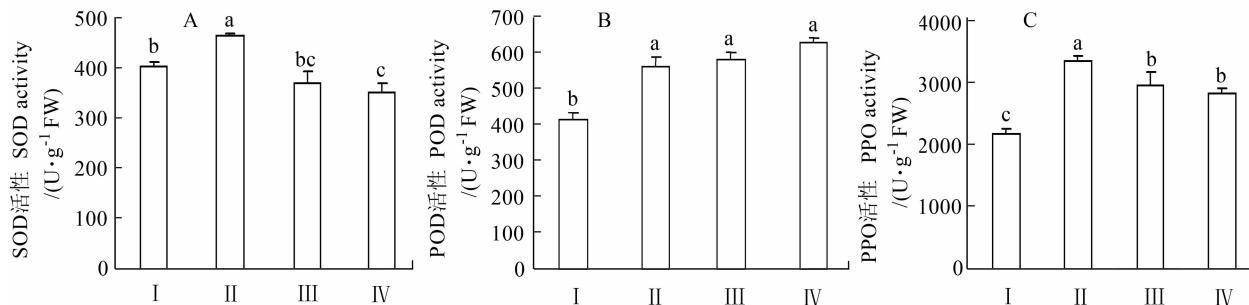


图 2 诱导柑橘果实灼伤病程中果实抗氧化酶变化

Fig. 2 Changes in antioxidant enzymes of Citrus Fruits under high-temperature-intense-light stress

2.3 高温、强光诱导果实灼伤病程中果皮抗氧化剂的变化

在果实灼伤初期果皮呈深黄色小斑点, AsA 和 GSH 含量均显著下降, 分别比正常果下降 21.5%、30.2%; 随着灼伤病情的加剧, AsA 含

量继续下降, 轻度褐变果的 AsA 含量与斑点果无显著差异, 重度褐变果的 AsA 含量显著低于斑点果; GSH 含量显著下降, 轻度褐变果与重度褐变果间无显著差异 (图 3)。

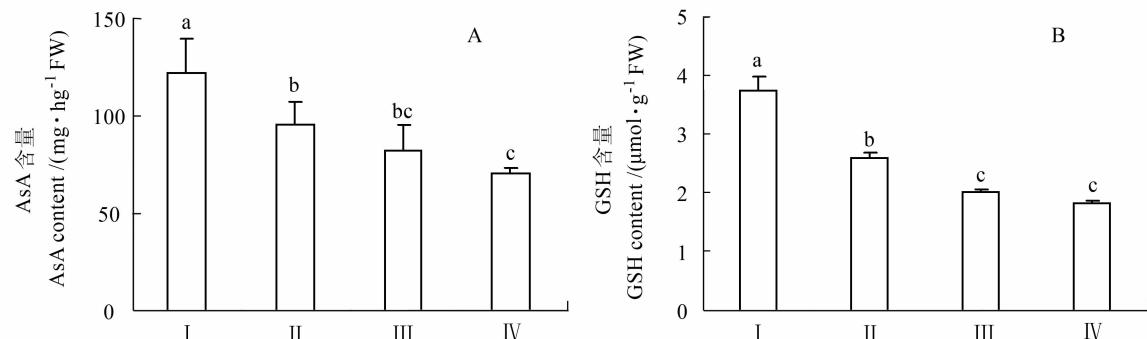


图 3 诱导柑橘果实灼伤病程中果皮抗氧化剂的变化

Fig. 3 Changes in antioxidants of Citrus Fruits under high-temperature-intense-light stress

3 讨论与结论

超氧阴离子自由基(O_2^-)是活性氧的主要成员,可启动膜脂过氧化^[10]。LOX在植物组织细胞膜脂产生过氧化损伤中发挥主要作用^[11]。MDA是膜脂过氧化分解的主要产物,其积累能对细胞膜造成进一步伤害,可作为细胞膜受损程度的衡量指标^[12]。本试验研究表明,灼伤初期果皮呈现深黄色小斑点, O_2^- 大量积累,而 O_2^- 的积累可反馈激活LOX活性^[13],使LOX活性增强,脂质过氧化产物MDA含量显著上升,这与郝燕燕等^[14]在苹果上的研究结果相似。随着苹果果皮变褐, O_2^- 含量迅速下降,LOX活性和MDA含量仍有所上升^[14]。但在本试验中,随着柑橘果皮变褐, O_2^- 含量没有显著增加,而LOX活性仍明显增强,MDA含量仍显著增加,说明高温、强光胁迫下由活性氧积累引发的细胞膜脂过氧化加剧。

SOD为植物抗氧化系统的第一道防线,催化 O_2^- 发生歧化反应而生成 O_2 和 H_2O_2 ,清除细胞中多余的 O_2^- ^[15-16]。本试验研究表明,灼伤初期果皮呈深黄色小斑点,SOD活性显著上升,这与郝燕燕等^[14]在苹果上的研究结果相似;随着柑橘果皮变褐,SOD活性显著下降且最终显著低于正常果,这与张建光等^[17]在苹果上的研究结果相似,与郝燕燕等^[14]在苹果上的研究结果不同。SOD活性在胁迫期间呈现“先升后降”的变化趋势,这说明高温、强光胁迫初期果实机体产生大量的 O_2^- ,显著激活SOD的清除能力,是果实应对高温、强光胁迫的积极保护机制。随着胁迫的加重,SOD活性明显下降,而 O_2^- 、MDA含量和LOX活性仍维持较高水平,这意味着SOD清除 O_2^- 的能力下降,致使膜脂过氧化作用加剧。原因可能是随着果实灼伤程度的加重,SOD受到破坏,活性下降^[6,17]。

H_2O_2 的过量累积加剧对细胞的伤害,POD是植物细胞中清除 H_2O_2 的主要酶类^[16,18]。本试验研究表明,灼伤初期果皮呈现深黄色小斑点,POD活性显著增强;随着果皮变褐,POD活性仍有所增强且显著高于正常果。这与张建光等^[17]及郝燕燕等^[14]在苹果上的研究结果相似。原因可能是POD抗氧化胁迫的能力相对较强,或随着果实灼伤程度的加重,细胞组织被分解,过氧化物底物继续增多,在底物的诱导下POD活性继续增强^[17]。

多酚氧化酶(PPO)是引起褐变的主要酶。果实灼伤褐变与高温、强光胁迫下果皮细胞PPO活

性大幅度提高有密切关系^[9]。本试验研究表明,灼伤初期果皮呈现深黄色小斑点,PPO活性显著增强;随着果皮变褐,PPO活性显著下降,仍显著高于正常果。这与郝燕燕等^[14]在苹果上的研究结果相似。原因可能是随着褐变症状出现,反应底物逐渐减少,或者与PPO“自杀抑制”作用有关^[19]。高温、强光诱导柑橘果实发生灼伤,最初症状是向光面果皮呈现深黄色小斑点,随后呈现褐变斑块。由此可推断,在向光面果皮呈深黄色小斑点阶段,PPO活性受到高温、强光胁迫诱导而显著增强,参与了酚类物质转化为醌类物质的过程,最终导致果皮褐变而呈现黄褐色症状。

抗坏血酸和谷胱甘肽通过GSH-AsA循环清除活性氧,在活性氧的清除过程中起重要作用^[16,20]。本试验研究表明,灼伤初期果皮呈现深黄色小斑点,AsA和GSH含量显著下降;随着果皮变褐,AsA和GSH含量仍明显下降,这与Andrews等^[21]在苹果上的研究结果相似。原因可能是高温、强光胁迫降低了AsA和GSH的合成速率;AsA和GSH参与了自由基的猝灭^[3,6]。

总之,在高温、强光胁迫下柑橘果实初期果皮呈现深黄色小斑点,果皮组织维持较高的活性氧清除能力,减缓了高温、强光对细胞膜的损伤。果皮呈现深黄色小斑点是预防柑橘果实果皮褐变的重要时间节点。

参考文献:

- [1] 张格成, 郑重禄. 柑橘日烧病的发生与十大综合治理措施 [J]. 四川农业科技, 1996, 1 (6): 38.
ZHANG G C, ZHENG C L. Occurrence of citrus sunburn and ten comprehensive treatment measures [J]. *Sichuan Agricultural Science and Technology*, 1996, 1 (6): 38. (in Chinese)
- [2] 唐明丽. 柑橘日灼果的防治 [J]. 广西园艺, 2003, (4): 8.
TANG M L. The prevention and control of the sunburn fruit in citrus [J]. *Guangxi Horticulture*, 2003 (4): 8. (in Chinese)
- [3] 万继锋, 李娟, 杨为海, 等. 外源调节物质对柑橘果实高温胁迫的抗氧化效应 [J]. 热带作物学报, 2018, 39 (8): 1548-1552.
WAN J F, LI J, YANG W H, et al. The Effect of Exogenous Regulators on Antioxidant Capacity of Citrus Fruits under the Stress of High Temperature [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39 (8): 1548-1552. (in Chinese)
- [4] 郝燕燕, 李文来, 常月梅. 果实日烧发生机理及防止措施 [J]. 山西农业大学学报, 2006, 26 (3): 296-299.
HAO Y Y, LI W L, CHANG Y M. Summary on the mechanism of fruit sunburn development and protective methods

- [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 2006, 26 (3): 296—299. (in Chinese)
- [5] KETCHIE D O, BALLARD A L. Environments which cause heat injury to "Valencia" oranges [J]. *Proceedings of American Society for Horticultural Science*, 1968, 93: 166—172.
- [6] 万继锋, 李娟, 陈杰忠. 柑橘日灼病果皮抗氧化代谢的变化 [J]. 园艺学报, 2012, 39 (10): 2009—2014.
- WAN J F, LI J, CHEN J Z. Changes in Antioxidant Metabolism in the Fruit Pericarps of Citrus During Sunburn Development [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39 (10): 2009—2014. (in Chinese)
- [7] MAO L C, WANG G Z, ZHU C G, et al. Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to the chilling stress in postharvest cucumber fruits [J]. *Plant Science*, 2007, 172 (2): 400—405.
- [8] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- LI H S. *Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiment* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. (in Chinese)
- [9] 张建光, 陈少春, 李英丽, 等. 高温强光胁迫对苹果果皮PPO活性的影响 [J]. 生态学报, 2008, 28 (10): 4645—4651.
- ZHANG J G, CHEN S C, LI Y L, et al. Effect of high temperature and excessive light stresses on PPO activity in apple peel [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 (10): 4645—4651. (in Chinese)
- [10] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidant, oxidative stress and biology of ageing [J]. *Nature*, 2000, 408 (6809): 239—247.
- [11] LEE S H, AHN S J, IM Y J, et al. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in fig leaf gourd and cucumber roots [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330 (4): 1194—1198.
- [12] HAMEED A, GOHER M, IQBAL N. Drought induced programmed cell death and associated changes in antioxidants, proteases and lipid peroxidation in wheat leaves [J]. *Biologia Plantarum*, 2013, 57 (2): 370—374.
- [13] 张玉, 陈昆松, 张上隆. 乙酰水杨酸处理对猕猴桃果实成熟衰老的影响及其作用机理 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28 (6): 425—432.
- ZHANG Y, CHEN K S, ZHANG S L. Effects of aspirin treatment on Kiwifruit ripening and senescence and its mechanism [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28 (6): 425—432. (in Chinese)
- [14] 郝燕燕, 黄卫东. 苹果日烧病程中果皮抗氧化系统在细胞超微结构的变化 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30 (1): 19—26.
- HAO Y Y, HUANG W D. Changes in Antioxidative System and Cell Ultrastructure in the Fruit Peels of Apple During Sunburn Development [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30 (1): 19—26. (in Chinese)
- [15] 李秀, 巩彪, 徐坤. 外源NO对高温胁迫下姜叶片活性氧代谢的影响 [J]. 园艺学报, 2014, 41 (12): 277—284.
- LI X, GONG B, XU K. Effects of Exogenous Nitric Oxide on Reactive Oxygen Metabolism in Ginger Leaves Under Heat Stress [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41 (12): 277—284. (in Chinese)
- [16] 付晴晴, 谭雅中, 翟衡, 等. NaCl胁迫对耐盐性不同葡萄株系叶片活性氧代谢及清除系统的影响 [J]. 园艺学报, 2018, 45 (1): 30—40.
- FU Q Q, TAN Y Z, ZHAI H, et al. Effects of Salt Stress on the Generation and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Leaves of Grape Strains with Different Salt Tolerance [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45 (1): 30—40. (in Chinese)
- [17] 张建光, 李英丽, 刘玉芳, 等. 高温、强光对苹果树冠不同方位果皮的氧化胁迫研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37 (12): 1976—1980.
- ZHANG J G, LI Y L, LIU Y F, et al. Effect of high temperature and strong light on oxidative stress of apple fruit peel on different exposures of tree crown [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37 (12): 1976—1980. (in Chinese)
- [18] PYNGROPE S, BHOOMIKA K, DUBEY R S. Oxidative stress, protein carbonylation, proteolysis and antioxidative defense system as a model for depicting water deficit tolerance in Indica rice seedling [J]. *Plant Growth Regul*, 2013, 69: 149—165.
- [19] 雷东锋, 冯怡, 蒋大宗. 植物中多酚氧化酶的特征 [J]. 自然科学进展, 2004, 14 (6): 606—614.
- LEI D F, FENG Y, JIANG D Z. Characteristics of polyphenol oxidase in plants [J]. *Progress in Natural Science*, 2004, 14 (6): 606—614. (in Chinese)
- [20] 孙军利, 赵宝龙, 郁松林. SA对高温胁迫下葡萄幼苗AsA-GSH循环的影响 [J]. 核农学报, 2015, 29 (4): 799—804.
- SUN J L, ZHAO B L, YU S L. Effects of Exogenous Salicylic Acid on Ascorbate Glutathione Cycle Circulation Metabolism in Grape Seedlings Under High Temperature Stress [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29 (4): 799—804. (in Chinese)
- [21] ANDREWS P K, JOHNSON J R. Anatomical changes and antioxidant levels in the peel of sunscald damaged apple fruit [J]. *Plant Physiology*, 1997, 114 (3): 103.

(责任编辑: 黄爱萍)