

DOI: 10.11929/j.swfu.201904029

引文格式: 王小玲, 幸学俊, 高柱, 等. 赣南脐橙生长发育期果实和叶片抗氧化酶生理调控机制 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2019, 39(6): 19–23.

## 赣南脐橙生长发育期果实和叶片抗氧化酶生理调控机制

王小玲<sup>1</sup> 幸学俊<sup>1</sup> 高柱<sup>1,2</sup> 杜建华<sup>3</sup>

(1. 江西省科学院生物资源研究所, 江西 南昌 330096; 2. 江西农业大学园林与艺术学院, 江西 南昌 330045;

3. 南昌工学院, 江西 南昌 330108)

**摘要:** 以赣南 10 年生纽荷尔脐橙为试验材料, 探讨不同生长发育期果实和叶片中 5 种抗氧化酶 (SOD、POD、CAT、APX 和 GR) 活性变化对高温环境的适应性。结果表明: 生长发育期 5 种抗氧化酶活性大小差异性显著, 不同抗氧化酶之间存在着协作机制, 其中 SOD 活性最大, CAT 和 POD 次之; 果实中 5 种抗氧化酶活性大小都低于叶片, 果实 SOD 活性呈现“降低—升高”的趋势, 与 POD、CAT、APX 和 GR 活性变化趋势“升高—降低”相反, 其中 POD、CAT、APX 活性峰值和 SOD 活性谷值都出现在 9 月份; 叶片中抗氧化酶活性都有一个活性峰值, SOD、CAT、APX 和 GR 活性高峰都出现在 9 月份。因此, 脐橙果实抗高温胁迫能力大于叶片, 且 7—9 月份果实抗高温胁迫能力大于 10—11 月份; SOD、CAT 和 POD 共同组成脐橙植物体抗高温胁迫的关键酶系统。

**关键词:** 脐橙; 果实; 叶片; 抗氧化酶; 生理调控

中图分类号: S666.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2019)06-0019-05

## Physiological Regulation Mechanism of Antioxidant Enzymes in Fruits and Leaves During Growth and Development of Navel Orange in Gannan Region

Wang Xiaoling<sup>1</sup>, Xing Xuejun<sup>1</sup>, Gao Zhu<sup>1,2</sup>, Du Jianhua<sup>3</sup>

(1. Institute of Biological Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang Jiangxi 330096, China; 2. College of Landscape Architecture and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang Jiangxi 330045, China; 3. Nanchang Institute of Science & Technology, Nanchang Jiangxi 330108, China)

**Abstract:** The navel orange of 10-year-old mature was used as the experimental material to detect the adaptability to high-temperature environment of 5 antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT, APX and GR) in fruits and leaves at different growth and development stages. The results showed that the activity of the 5 antioxidant enzymes varied significantly, and there was a coordination mechanism among different antioxidant enzymes. SOD activity was the largest, followed by CAT and POD. The activity of the antioxidant enzymes in fruits was lower than that in leaves. The activity of SOD in fruits showed a 'decreased-increased' trend, contrary to the 'increased-decreased' trends of the activity of POD, CAT, APX and GR, among which the peaks of POD, CAT, APX activity and the valley of SOD activity all appeared in September. In leaves, there were peaks of activity of all antioxidant enzymes, with the peaks of SOD, CAT, APX and GR activity appearing in September. Therefore, the resist-

收稿日期: 2019-04-11; 修回日期: 2019-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760551) 资助; 江西省重大自然科学基金项目 (20152ACB21002) 资助。

第 1 作者: 王小玲 (1979—), 女, 博士, 研究员。研究方向: 园艺植物高值利用。Email: wangxiaoling1979@126.com。

通信作者: 高柱 (1981—), 男, 博士, 研究员。研究方向: 园艺植物高值利用。Email: jxaugz2008@126.com。

ance to high temperature stress in fruits of navel orange was greater than that in leaves, and the resistance to high temperature stress in fruits from July to September was greater than that from October to November. SOD, CAT and POD constitute the key enzyme system against high temperature stress in navel orange.

**Key words:** navel orange; fruit; leaf; antioxidant enzyme; physiological regulation

脐橙属于耐阴性较强的果树，对温度的要求较高，适宜的生长温度为 23~33℃<sup>[1]</sup>。赣南是我国重要的脐橙生产基地，纽荷尔脐橙（*Citrus sinensis* ‘Newhall’）闻名遐迩<sup>[2]</sup>。赣南属典型的亚热带湿润气候，平均气温高于国内外脐橙产区，7—9月，受西太平洋副热带高压或大陆高压控制，多为连续晴热天气，降水分配不均，气温高，蒸发大，因此每年都有不同程度的干旱发生，使脐橙生产受到严重危害。

正常情况下，植物通过抗氧化酶和抗氧化剂系统维持细胞内活性氧（ROS）产生与清除的动态平衡<sup>[3-4]</sup>。逆境（干旱、水淹、高温、低温等）条件下会产生超氧阴离子自由基（O<sub>2</sub><sup>-</sup>）、羟自由基（<sup>•</sup>OH）、单线态氧（<sup>1</sup>O<sub>2</sub>）、过氧化氢（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）及脂类过氧化物等具有活泼化学性质的 ROS，当细胞内 ROS 的产生和积累速度大于抗氧化系统的清除速度时，细胞内 ROS 大量积累，破

坏膜系统的完整性和流动性，影响植物生长发育<sup>[5]</sup>。Foyer 等<sup>[6]</sup>研究也证明，植物是通过提高自身高效的抗氧化酶和抗氧化剂系统来维持体内 ROS 的动态平衡。可见，要提高高温引起的赣南脐橙的抗干旱能力，就需要提高其抗氧化能力。为此，本试验以纽荷尔脐橙为材料，研究不同生长时期，果实和叶片超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）、抗坏血酸过氧化物酶（APX）和谷胱甘肽还原酶（GR）5种抗氧化酶活性的变化情况，探讨脐橙抗氧化酶系统的氧化保护作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

试验在江西省赣州市信丰县龙舌村（东经 115°00′27″，北纬 25°23′44″，海拔 181.7 m）脐橙园进行，脐橙园土壤营养元素见表 1。

表 1 脐橙园土壤营养元素  
Table 1 Soil nutrients in navel orange orchard

土层深度/cm	N	P	K	Ca	Mg	B	Fe	Mn	Cu	Zn
0~20	8 929	7 505	329	0.668	7.3	289	189	325	236	988
20~40	6 138	6 169	297	0.867	7.7	185	155	388	211	1 022

### 1.2 试材取样及处理

选取 10 年生生长健康、结果稳定的纽荷尔脐橙 30 株为试材，按照完全随机区组设计每小区 10 株，3 次重复。分别于 7—11 月每月 20 日 9:00 晴天采样（如遇阴雨天气提前或延后 1~2 d），自样株树冠外围结果枝中上部的 4 个方向采取健康果（外观颜色和果实大小相当）8~10 个，自植株树冠外围中上部新梢中部的 4 个方向采取健康叶片 15~20 片。采后立即洗净擦干，然后将果肉切碎混匀，叶片去除主叶脉和 1 cm 叶缘后剪碎混匀，液氮中迅速冷冻，贮藏于 -80℃ 超低温冰箱，用于抗氧化酶系统（SOD、POD、CAT、APX 和 GR）活性测定。

### 1.3 试验方法

SOD 活性采用氮蓝四唑（NBT）光还原法测定，560 nm 波长测定其 OD 值，以抑制 NBT 光化

学还原 50% 为 1 个酶活性单位<sup>[7]</sup>。POD 活性采用愈创木酚染色法测定，以愈创木酚为底物，470 nm 波长测定其 OD 值，以每分钟 OD<sub>470</sub> 变化（升高）0.01 为 1 个酶活性单位<sup>[8]</sup>。CAT 活性采用紫外吸收法测定，240 nm 波长测定其 OD 值，以每分钟 OD<sub>240</sub> 减少 0.1 为 1 个酶活性单位<sup>[9]</sup>。APX 活性采用紫外吸收法测定，290 nm 波长测定其 OD 值，根据每分钟 OD<sub>290</sub> 值变化 0.01 定义为一个酶活性单位<sup>[10]</sup>。GR 活性采用紫外吸收法测定，340 nm 波长测定其 OD 值，以每分钟 OD<sub>340</sub> 值变化 0.01 定义为 1 个酶活性单位<sup>[11]</sup>。SOD、POD、CAT、APX 和 GR 活性采用南京建成生物工程研究所研制的酶活性测定试剂盒进行测定，测定的结果均以 U/g 表示。

### 1.4 数据分析

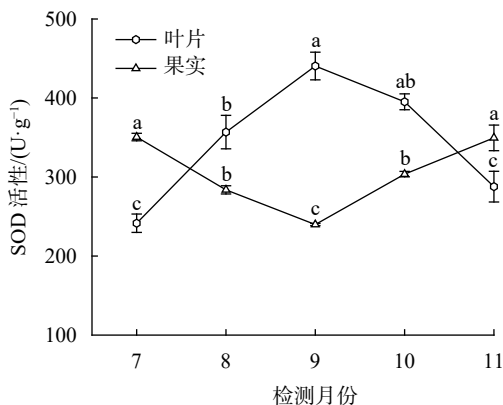
试验数据用 Excel 统计整理、SPSS 16.0 软件

进行统计分析, 采用 SigmaPlot 10.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 脐橙生长发育期果实和叶片 SOD 活性分析

SOD 是植物体内清除  $O_2^-$  的重要物质, 对保护细胞免遭氧化伤害起重要作用。由图 1 可知, 脐橙生长发育期果实和叶片 SOD 活性变化趋势相反, 果实 SOD 平均活性比叶片低 11.29%。果实 SOD 活性先降低后升高, 9 月降到活性谷值, 降幅为 31.59%; 叶片 SOD 活性先升高, 后降低, 9 月出现活性峰值, 升幅为 82.34%, 显著高于其他月份; 11 月份, 果实 SOD 活性高达 349.51 U/g, 高于叶片 17.66%。产生以上结果与 7—9 月份赣南气温升高, 脐橙叶片 SOD 酶消除细胞中产生的  $O_2^-$  作用增强, 减轻了  $O_2^-$  引起的膜伤害, 控制膜过氧化水平, 从而保护叶片不受高温胁迫的伤害。整个生长发育期, 果实和叶片 SOD 活性变化相反, 表明 SOD 酶在脐橙不同组织和不同发育时期起着不同的作用, 果实和叶片清除活性氧的机制存在差异。



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

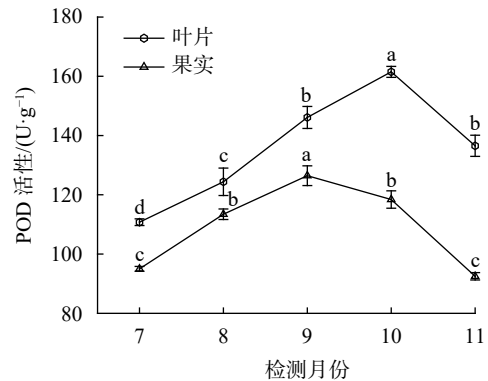
图 1 脐橙果实和叶片 SOD 活性变化

Fig. 1 Change of SOD activity in fruits and leaves of navel orange

### 2.2 脐橙生长发育期果实和叶片 POD 活性分析

脐橙生长发育期果实和叶片 POD 活性均表现为“升高—降低”的趋势 (图 2), 不同时期 POD 活性差异性显著。果实 POD 活性不仅始终低于叶片, 而且果实 POD 活性峰值出现的时间早于叶片 30 d。9 月份果实 POD 活性出现峰值 126.45 U/g, 增幅为 33.09%; 10 月份叶片 POD 活性出现峰值 161.49 U/g, 增幅为 45.80%。POD 也是植物体内重要的  $O_2^-$  清除酶, 与 SOD 协同清除植物体内产生的  $O_2^-$ , 且 POD 是在 SOD 之后发挥对自由基的清除作用<sup>[12]</sup>。因此, 脐橙生长发育期, 果实和叶片 POD 总活性小于 SOD 活性, 果

实 POD 活性变化趋势不仅与 SOD 活性相反, 而且活性峰值比叶片提前了 30 d, 表明 POD 酶是清除果实体内  $O_2^-$  的主要抗氧化酶。



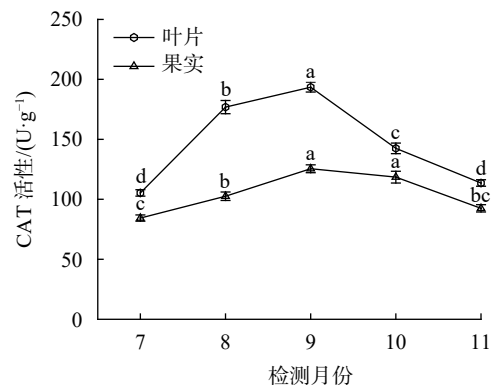
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 2 脐橙果实和叶片 POD 活性变化

Fig. 2 Change of POD activity in fruits and leaves of navel orange

### 2.3 脐橙生长发育期果实和叶片 CAT 活性分析

CAT 是存在于细胞的过氧化体中以  $H_2O_2$  为底物的酶, 将细胞内过多的  $H_2O_2$  催化为  $O_2$  和  $H_2O$ , 避免细胞受到  $H_2O_2$  毒害, 以此发挥其抗氧化作用。脐橙生长发育期果实和叶片 CAT 活性是“先升高, 后降低” (图 3), 与 POD 活性变化趋势一致。叶片 CAT 活性始终高于果实, 其平均活性高于果实 39.81%。9 月份, 果实和叶片 CAT 活性同时达到峰值 125.46 U/g 和 193.47 U/g, 增幅分别为 48.72% 和 83.75%; 9—11 月, 果实 CAT 活性下降缓慢, 降幅为 26.30%, 叶片 CAT 活性迅速下降, 降幅为 41.28%。这与细胞承受的逆境能力有关, 7—9 月赣南气温上升, 脐橙果实和叶片体内  $H_2O_2$  积累量增加, CAT 活性被活化, 进而加速了体内  $H_2O_2$  的分解, 降低了  $O_2^-$  的积累, 提高抗氧化能力, 缓解高温胁迫。



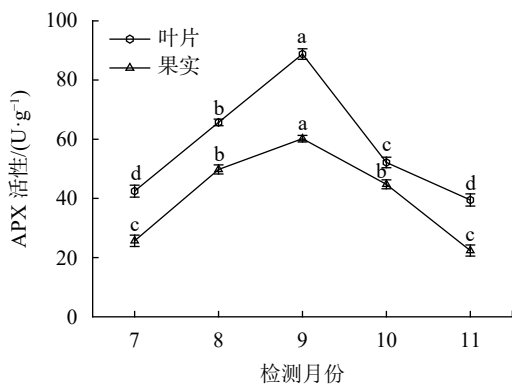
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 3 脐橙果实和叶片 CAT 活性变化

Fig. 3 Change of CAT activity in fruits and leaves of navel orange

#### 2.4 脐橙生长发育期果实和叶片 APX 活性分析

APX 主要存在于植物叶绿体和细胞质中,是叶绿体中清除  $H_2O_2$  的关键酶,其活性升高, $O_2$  产生速率下降,脂质过氧化作用减弱<sup>[13-14]</sup>。由图 4 可知,叶片 APX 活性始终高于果实,其平均活性高于果实 42.29%。7—9 月,果实和叶片 CAT 活性逐渐升高,9 月份同时达到峰值 60.18 U/g 和 88.79 U/g,分别增加了 134.35% 和 109.16%;9—11 月,果实和叶片 APX 活性逐渐降低,分别降低了 62.81% 和 55.54%。对比结果发现,生长发育期果实和叶片 APX 活性变化趋势与 CAT 活性相同,但是果实和叶片 APX 活性极显著高于 CAT 活性,分别是其活性的 2.58 倍和 2.54 倍。因此,APX 在脐橙植物体抗氧化中发挥着重要作用,这与其参与叶绿体和细胞质的  $H_2O_2$  代谢有关。



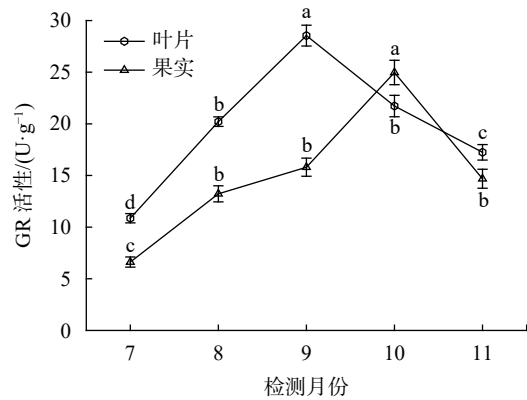
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 4 脐橙果实和叶片 APX 活性变化

Fig. 4 Change of APX activity in fruits and leaves of navel orange

#### 2.5 脐橙生长发育期果实和叶片 GR 活性分析

GR 是一种利用还原型 NADP 将氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 催化成还原型谷胱甘肽 (GSH) 的酶,为  $H_2O_2$  的清除提供还原力<sup>[15]</sup>。生长发育期果实 GR 活性从 7 月的 6.62 U/g 逐渐升高,10 月达到峰值 24.97 U/g,增幅为 277.03%,10—11 月逐渐降低了 41.21%;叶片 GR 活性从 7 月份的 10.86 U/g FW 逐渐升高,9 月达到峰值 28.54 U/g,增幅为 162.88%,9—11 月逐渐降低了 39.59%。GR 活性的变化与 POD 活性存在一定的差异性,POD 活性果实峰值早于叶片 30 d,而 GR 活性果实峰值晚于叶片 30 d。该研究结果与 2 种酶在参与植物抗氧化过程中所起的作用有关。



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 5 脐橙果实和叶片 GR 活性变化

Fig. 5 Change of GR activity in fruits and leaves of navel orange

### 3 结论与讨论

植物经过长期的进化形成了抵御逆境胁迫的抗氧化系统,维持植物体内 ROS 代谢的动态平衡,这是植物抵御逆境胁迫伤害的重要机制<sup>[16]</sup>。SOD 是 ROS 清除机制中第 1 个发挥作用的抗氧化酶<sup>[17]</sup>,被称为保护机制的中心<sup>[18]</sup>。POD 是广泛存在于植物体内的氧化还原酶,以  $H_2O_2$  作为氧化剂生成  $H_2O$ 。CAT 则是以专一性底物  $H_2O_2$  反应生成  $H_2O$  和  $O_2$  的氧化酶,主要存在于叶绿体和细胞的过氧化物内<sup>[19]</sup>。SOD 能使超氧化物发生歧化反应生成  $O_2$  和  $H_2O_2$ ,生成的  $O_2$  和  $H_2O_2$  再经 POD 和 CAT 催化生成水,由此降低或解除了  $O_2^-$  对细胞内物质的直接伤害<sup>[20-21]</sup>。APX 是一类参与植物细胞 AsA-GSH 循环的重要酶类<sup>[22]</sup>,以抗坏血酸为电子供体,快速催化细胞中产生的过量  $H_2O_2$  分解生成  $H_2O$  和  $O_2$ ,保护叶绿体和其他细胞组分免受活性氧毒害,从而提高植物对氧化胁迫的耐受性<sup>[23]</sup>。而 GR 又是一种利用还原型 NADP 将氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 催化成还原型谷胱甘肽 (GSH) 的酶,可提高 GSH 含量,为 ROS 的清除提供还原力<sup>[15]</sup>。

本研究通过分析脐橙生长发育过程中 SOD、POD、CAT、APX 和 GR 活性变化可知,不同发育时期,果实和叶片 5 种抗氧化酶活性差异性显著,不同抗氧化酶之间存在着协作机制,其中 SOD 活性最大,CAT 和 POD 次之,APX 和 GR 活性最小。叶片 5 种抗氧化酶活性均高于果实,叶片抗氧化酶活性均呈现“升高—降低”的趋势,表明发育期末,叶片抗氧化酶活性的降低将导致内部氧化—抗氧化平衡的打破和叶片的衰老

加速, 这与华安明等<sup>[24]</sup>的研究结果一致。同时, 随着7—9月份赣南气温逐渐升高, 果实4种抗氧化酶(CAT、POD、APX、GR)和叶片5种抗氧化酶活性都是逐渐升高, 表明高活性的SOD酶会导致植物体内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的大量积累, 为降低过氧化物对植物细胞功能的损坏, 需要依赖CAT和POD 2种酶的共同作用来催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成水, 以达到清除高温胁迫下脐橙植物体积积累的ROS目的, 因此SOD、CAT和POD共同组成脐橙植物体关键的保护酶系统。APX和GR酶则协助脐橙关键酶系统清除体内积累的过量ROS。可见, SOD、POD、CAT、APX和GR在脐橙植物体ROS的清除中相互调节, 共同参与调控ROS代谢和细胞脂过氧化程度, 是脐橙植物体抗高温胁迫的一种响应机制, 为赣南脐橙的抗高温栽培和品种选育提供了参考。

#### [参 考 文 献]

- [1] 朱科焰, 李洪珍. 典型亚热带丘陵山区脐橙种植气候区划研究[J]. *江西农业学报*, 2010, 22(4): 90–92.
- [2] 卢占军, 钟八莲, 郭慧. 赣南脐橙产业可持续发展的探讨[J]. *企业经济*, 2015, 34(4): 149–152.
- [3] 耶兴元. 高温胁迫对猕猴桃的生理效应及耐热性诱导研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [4] 郭慧, 李树杏, 孙平勇, 等. 不同基因型水稻苗期抗氧化系统对低温胁迫的响应[J]. *植物科学学报*, 2019, 37(1): 63–69.
- [5] Noctor G, Lelarge-Trouverie C, Mhamdi A. The metabolomics of oxidative stress[J]. *Phytochemistry*, 2015, 112: 33–53.
- [6] Foyer C H, Ruban A V, Noctor G. Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage[J]. *Biochemical Journal*, 2017, 474(6): 877–883.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [8] 王小玲, 高柱, 余发新, 等. 观赏羽扇豆离体培养生根关联酶活性及可溶性蛋白含量变化规律研究[J]. *云南农业大学学报*, 2010, 25(6): 835–839.
- [9] Tan W, Liu J, Dai T, et al. Alterations in photosynthesis and antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post-anthesis water-logging[J]. *Photosynthetica*, 2008, 46(1): 21–27.
- [10] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant and cell physiology*, 1981, 22(5): 868.
- [11] 李忠光, 李江鸿, 杜朝昆, 等. 在单一提取系统中同时测定五种植物抗氧化酶[J]. *云南师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 22(6): 44–48.
- [12] 吴雪辉, 黄永芳, 高强, 等. 肉桂精油的抗氧化作用研究[J]. *食品科技*, 2007, 32(4): 85–88.
- [13] 张涵彤, 何巧, 倪妍霞, 等. 锌对水稻幼苗镉积累及抗氧化系统的影响研究[J]. *农产品质量与安全*, 2019(1): 55–61.
- [14] 战伟龔, 张学杰, 杨德翠, 等. NaCl和等渗PEG对荞麦SOD及APX活性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2009, 37(5): 101–102.
- [15] Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, et al. Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to activation of salicylic acid accumulation and signaling[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(16): 2106–2121.
- [16] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909–930.
- [17] 时丽冉, 刘志华. 干旱胁迫对苜蓿菜抗氧化酶和渗透调节物质的影响[J]. *草地学报*, 2010, 18(5): 673–677.
- [18] Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1331–1341.
- [19] Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, et al. Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(1): 2–11.
- [20] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(5): 53–58.
- [21] 马伟荣, 童军茂, 单春会. 超氧化物歧化酶(SOD)的特征及在植物抗逆性方面的研究进展[J]. *食品工业*, 2013, 34(9): 154–158.
- [22] 李娜, 陆海. 植物抗坏血酸过氧化物酶基因家族研究进展[J]. *成都大学学报(自然科学版)*, 2011, 30(2): 97–101.
- [23] 韩瑞丽. 番茄抗坏血酸过氧化物酶研究进展[J]. *山西农业科学*, 2013, 41(6): 650–652.
- [24] 安华明, 樊卫国, 刘庆林, 等. 刺梨果实和叶片发育过程中抗坏血酸和抗氧化酶的协同变化[J]. *园艺学报*, 2007, 34(5): 1293–1296.

(责任编辑 张 坤)

