

钙与 IAA 对易裂果蜜广橘果皮活性氧代谢 和相关抗氧化基因表达的影响

张蓓¹, 刘林婷¹, 刘若南¹, 高志键¹, 葛聪¹,
周秋蓉¹, 李江波², 李延^{3*}, 王平^{1*}

(¹福建农林大学园艺学院·园艺植物遗传育种研究所, 福州 350002; ²抚州市南丰柑桔
研究所, 江西抚州 344100; ³福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002)

摘要:【目的】探讨蜜广橘果皮在裂果发生期间活性氧代谢和相关抗氧化基因的变化, 为蜜广橘合理减缓裂果发生提供理论依据。【方法】以易裂果的蜜广橘果皮作为试验材料, 设置3个试验处理: 清水处理、0.14 g·L⁻¹ Ca (Ca)、0.14 g·L⁻¹ Ca+2×10⁻⁵ 吲哚乙酸(3-Indoleacetic acid, IAA)(Ca+IAA), 在5、6月进行叶面喷施, 通过测定O₂⁻、H₂O₂和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 相关基因 *CsSOD*、*CsCAT*、*CsPOD*、*CsAPX* 和 *CsGPX* 等表达及其酶活性的变化, 分析不同钙(Ca、Ca+IAA)处理对其裂果率的影响。【结果】裂果果皮中O₂⁻、H₂O₂和MDA含量始终高于正常果, 钙处理降低了O₂⁻、H₂O₂、MDA含量和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性, 提高了超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)活性, 减轻了细胞损伤, 从而有效预防了裂果的发生, 其中Ca+IAA处理的效果更好。相关抗氧化基因在正常果中相对表达量均高于裂果, 但*CsPOD*基因的相对表达量低于裂果, 这与相关抗氧化酶活性的变化保持一致。【结论】在裂果爆发期的8、9月份, 果皮活性氧含量最高, 通过钙处理可显著提高果皮抗氧化相关基因的表达, 提高其抗氧化酶活性并清除活性氧, 维持植物细胞活性氧代谢平衡, 减轻蜜广橘裂果率, 为生产上预防裂果提供理论依据。

关键词: 蜜广橘; 裂果; 钙处理; 活性氧; 抗氧化酶

中图分类号: S666.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)12-2034-11

Effects of calcium and IAA treatments on active oxygen metabolism and related antioxidant gene expressions in the peel of cracking sensitive fruit of Miguang tangerine

ZHANG Bei¹, LIU Linting¹, LIU Ruonan¹, GAO Zhijian¹, GE Cong¹, ZHOU Qiuqiong¹, LI Jiangbo², LI Yan^{3*}, WANG Ping^{1*}

(¹College of Horticulture, Institute of Genetics and Breeding in Horticultural Plants, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; ²Fuzhou Nanfeng Citrus Research Institute, Fuzhou 344100, Jiangxi, China; ³College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: 【Objective】Miguang tangerine is world-famous for its golden color, juice, sweetness, sour and aroma. However, the fruits are prone to cracking in the middle and late stage of ripening stage and easy to abscise and rot, affecting the fruit quality and causing great economic losses and restricting the further development of citrus industry in Jiangxi province, China. Imbalanced metabolism of reactive oxygen species (ROS) can lead to cell membrane damage, which increases the sensitivity of the peel to environmental changes, affecting fruit dehiscence. Antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX, GPX, POD) can scavenge ROS and reduce or prevent the formation of hydroxyl radicals. The plant ROS scavenging

收稿日期: 2021-06-01 接受日期: 2021-09-05

基金项目: 国家农业(柑橘)产业技术体系专项(CARS-26); 校级科技创新专项基金项目(KFA17111A、KFA17359A)

作者简介: 张蓓, 女, 硕士, 主要从事果树遗传育种研究。Tel: 18332575516, E-mail: zhangbei2020@outlook.com

*通信作者 Author for Correspondence. Tel: 13950315879, E-mail: fauliyan@163.com; Tel: 13950203256, E-mail: 745433249@qq.com

system is coordinated to keep ROS content in a relatively stable state and maintain the stability of biological membrane system. Application of mineral elements such as calcium can promote the peel growth, enhance its protection ability, and reduce fruit cracking. The mechanism of calcium reducing fruit cracking of Miguang tangerine will provide theoretical basis for effective prevention and mitigation of the fruit cracking in production. **【Methods】** Miguang tangerine fruit peels were used as the experimental materials. In the late of May and June, the whole plants were sprayed with tap water (control), $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}$ (Ca), and $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca} + 20 \times 10^{-6} \text{ IAA}$ (Ca+IAA) until the leaves and fruits wetted. Each treatment was repeated six times. Fruit samples were collected on 30th day of each month from June to November during fruit development period and taken back to the laboratory to determine the contents of $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and MDA, the expressions levels of related genes *CsSOD*, *CsCAT*, *CsPOD*, *CsAPX* and *CsGPX*, as well as the changes of relative enzyme activities. In order to analyze the effects of different calcium treatments (Ca, Ca+IAA) on fruit cracking rate, Excel was used to sort out the experimental data and was used to plot, IBM SPSS Statistics 25.0 and DPS was applied to analyze the significance differences. **【Results】** In this study, the contents of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 were at a high level in June, which activated antioxidant enzymes to decompose them in time, resulting in a decrease the content of ROS in July. The oxidative stress increased after July, especially in August and September when fruit cracking broke out, which was the key period for ROS accumulation. However, the insufficient scavenging capacity of antioxidant enzymes would destroy the balance of antioxidant system, leading to the continuous membrane lipid peroxidation, resulting in fruit cracking. This cracking could damage peel cell membrane, leading to ROS accumulation and MDA generation, thus causing damage to peel cells and reducing fruit resistance. This might be the reason why the contents of $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and MDA in the peel of cracked fruits were always higher than those in the normal fruits. The calcium treatment could significantly reduce ROS and MDA accumulation in the peel, and alleviate the cellular toxicity. Meanwhile, calcium ion improved antioxidant capacity, significantly enhanced the expression levels of antioxidant enzymes related genes *CsSOD*, *CsCAT*, *CsAPX* and *CsGPX*, and reduced the expression levels of *CsPOD*. Furthermore, the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX, GPX) increased and POD activity decreased to improve the ductility of cell wall, which slowed down the occurrence of fruit cracking, and kept the whole antioxidant system in dynamic balance. **【Conclusion】** The above results showed that the fruit cracking of Miguang tangerine was a serious physiological disease. It is closely related to ROS and antioxidant enzyme metabolism. Dehiscent fruits often occur in August and September, which is a critical period of the highest content of ROS in Miguang peel. The calcium treatments could significantly enhance the peel antioxidant related gene expression, increasing the activities of antioxidant enzymes in order to scavenge ROS. Therefore, maintaining the balance of active oxygen metabolism would play a vital role in the peel cells for reducing the dehiscent fruit rate. This study would provide theoretical basis for preventing fruit cracking in production.

Key words: Miguang tangerine; Dehiscent fruit; Ca treatments; ROS; Antioxidant enzymes

蜜广橘属于早熟大果系,因其色泽金黄、鲜嫩多汁、风味浓甜、果香四溢而蜚声中外,深受消费者喜爱。然而,柑橘在成熟中后期易发生裂果,果实开裂易脱落腐烂,影响果实品质,造成重大经济损失^[1]。有研究表明,果皮与柑橘裂果之间关系密切^[2]。施用矿质元素如钙肥等可以促进果皮生长,加强其保

护能力,减轻果实裂果,这在桃^[3]、脐橙^[4]等品种上已得到证实,说明钙对降低裂果有显著作用。

在非生物胁迫下,活性氧(reactive oxygen species, ROS)代谢失衡会导致膜损伤,从而增加果皮对环境变化的敏感性,进而导致果实开裂。前人大量研究均证实,钙可以降低丙二醛(malondialdehyde,

MDA)和 H_2O_2 含量以及 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率,减少细胞损害,通过降低脂质过氧化水平来减轻逆境对植物的伤害,减少活性氧的积累,从而增强植物的抗性^[5-7]。因此,开展活性氧代谢研究是探究裂果发生机制不可缺少的一环。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)以及过氧化物酶(peroxidase, POD)是植物应对外界胁迫的关键酶,其活性变化是表征植株应对逆境胁迫的重要指标。当这些酶的活性水平较低时,植物正常代谢受到干扰,加速活性氧的产生,破坏了植物细胞的保护系统,从而加速了植物的膜脂过氧化反应,积累过多的有害物质,导致细胞膜系统受到破坏,最后导致裂果发生。较高活性的抗氧化酶可以清除ROS,减少或阻止羟基自由基形成,随后增强抗氧化和氧化修复能力,保证生命活动正常进行^[8]。前人在对苹果^[9]的研究中发现,施用外源钙能提高抗氧化酶的活性,显著降低MDA含量,降低裂果率。Wang等^[10]在对梨的研究中发现,与抗氧化能力相关的基因和酶(CAT、SOD、POD、APX、GPX)的诱导作用可以有效抑制ROS的产生,最终减轻氧化损伤。整个ROS清除机制相互协调,使活性氧处于相对稳定状态,维持膜系统的稳定性。

笔者在本研究中通过探讨Ca处理和Ca+吲哚乙酸(3-Indoleacetic acid, IAA)处理对柑橘果实完熟过程中裂果率和果皮活性氧、抗氧化酶活性及相关基因表达的影响,进一步研究钙对柑橘裂果的影响机制,并且在生产上为有效预防和减缓裂果发生提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与处理

以南丰明诚果场20年生早熟蜜广橘结果树为试验材料。在同一果园选择营养条件相对一致的蜜广橘树体,单株处理,6次重复,常规管理。

设置3个处理,清水处理(对照)、 $0.14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca(Ca)、 $0.14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Ca+ 2×10^{-5} 吲哚乙酸(3-Indoleacetic acid, IAA)(Ca+IAA)。于5月30日和6月30日17点后对蜜广橘树体进行叶面喷施处理,以叶面和果面滴水为度。在6—11月每月30日采样1次,共计6个月,每次每株随机采120个正常果(normal

fruit, NF)与全部裂果(cracked fruit, CF)。在还未发生裂果的6月,取材为陷痕果,表现为从果顶向果蒂的纵向规则陷痕(在幼果期出现,随后加深甚至开裂)。正常果表现为外表皮光滑,形状饱满。其中,陷痕果取陷痕处(沿果顶到果蒂方向)两边宽各0.5 cm果皮,长度2 cm,正常果取相同部位同等大小果皮,混样后用锡箔纸分装,液氮速冻, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 试验方法

裂果率测定:裂果率/%=每月的裂果数/总果数 $\times 100$;清点完本月裂果数后,将其全部摘除。

总裂果率/%=每月裂果率之和。

酶液提取:从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出已经混合均匀的1 g果皮,放于研钵中,加入8 mL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)(含有 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH值7.8)、 $700\text{ }\mu\text{L}$ 2%(φ)聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)、1 g石英砂,冰上研磨至匀浆状,将混合物全部转移至15 mL离心管中, $12\ 000\text{ g}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心15 min,吸取上清液, $12\ 000\text{ g}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,取上清液于冰上待测。

$O_2^{\cdot-}$ 含量的测定参照王爱国等^[11]的羟胺氧化法; H_2O_2 含量采用 H_2O_2 含量检测试剂盒(Solarbio公司)进行测定;MDA含量测定根据Wang等^[12]的方法;POD活性测定参照Jiang等^[13]的方法;CAT活性、SOD活性测定参照Wang等^[14]的方法;APX活性测定参考Jimenez等^[15]的方法;GPX活性测定参考于娟等^[16]的方法。

参照Biospin多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(无DNA残留型)进行RNA提取;cDNA参照Hiscript II Q RT SuperMix for qPCR(Vazyme公司)方法合成。

基因表达分析采用实时荧光定量PCR方法,在罗氏480荧光定量分析仪上完成。笔者在本研究中选择了柑橘Actin基因作为内参基因,根据citrus HarvEST database(<http://harvest.ucr.edu/>)已知EST序列分别设计了内参基因Actin、CsSOD、CsPOD、CsCAT、CsAPX、CsGPX特异性引物(表1)。

基因扩增体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$ $2\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, $0.8\text{ }\mu\text{L}$ 上下游引物, $2\text{ }\mu\text{L}$ cDNA、 $6.4\text{ }\mu\text{L}$ ddH₂O。基因扩增体系总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR反应程序如下:①预变性: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s;②循环反应: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s(45个循环);③溶解曲线: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s。3次重

复,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算出基因的相对表达量。

表1 荧光定量PCR引物

Table 1 Primers used for quantitative PCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	碱基数 The number of bases
SOD-F	GTGATGCTTCTTCGCTGTTGG	22
SOD-R	GCTAGGGAGATTTTCAGCCAGG	22
POD-F	TCTCACAGGCACTGCTGGAC	20
POD-R	AGAATACAAATGCAGGGCCAGT	22
CAT-F	TGACGAGTGCAGTTGCTTCC	20
CAT-R	AGGACAGGACCTCTACTTCCAA	22
APX-F	TCCGCGCTCTTATCGCTTAC	20
APX-R	GGTCCACCACTTTCGTGTT	20
GPX-F	AGGGGAATGTTGTTGAGCGT	20
GPX-R	CAGCGTTAAGCAGTCTCCA	20
Actin-F	ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG	20
Actin-R	CCAAGCAGCATGAAGATCAA	20

1.3 数据分析

数据应用 Office Excel 进行整理,应用 IBM SPSS Statistics 25、DPS 进行显著性和相关性分析,用Excel绘图,不同小写字母表示差异达到显著水平($p < 0.05$)。

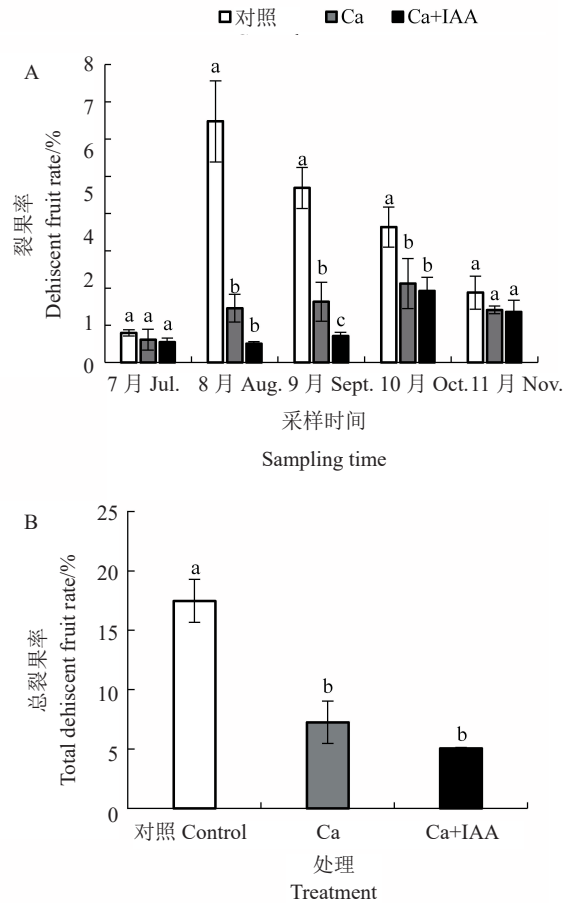
2 结果与分析

2.1 不同钙处理对蜜广橘裂果率的影响

蜜广橘裂果率表现为对照>Ca>Ca+IAA,对照处理在8月达到了峰值(6.48%),此时分别是Ca、Ca+IAA处理的4.44、12.88倍;Ca与Ca+IAA处理裂果率均在10月达到峰值,分别为2.12%和1.92%(图1-A)。对照的总裂果率高达19.04%,分别是Ca、Ca+IAA处理的2.63、3.78倍(图1-B)。钙处理均显著降低了蜜广橘的裂果率,其中以Ca+IAA处理效果最佳。

2.2 不同钙处理对蜜广橘果皮活性氧与MDA含量的影响

蜜广橘裂果果皮 O_2^- 含量显著高于正常果,7月下降至谷值,此时差异最为显著,裂果果皮中 O_2^- 含量分别是正常果的1.37、2.16、1.96倍,随后 O_2^- 含量在8月达到峰值;钙处理均可以显著降低蜜广橘果皮 O_2^- 含量,其中Ca+IAA处理效果最佳(图2-A)。H₂O₂含量表现为裂果高于正常果,总体达到显著性差异水平,在7月下降至谷值,此时差异最为显著,裂果果皮中H₂O₂含量分别是正常果的1.71、1.66、1.84倍。钙处理均可以显著降低果皮H₂O₂的含量,其中Ca+



不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 差异显著。下同。

Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

The same below.

图1 蜜广橘不同发育时期果实裂果率、总裂果率的变化
Fig. 1 Changes in dehiscence fruit rate, total dehiscence fruit rate at different developmental stages of Miguang tangerine

IAA处理效果最佳(图2-B)。蜜广橘裂果果皮的MDA含量显著高于正常果,在8月达到峰值,此时差异最为显著,裂果分别是正常果的1.4、1.4、1.3倍;钙处理均可以降低蜜广橘果皮MDA的含量,其中以Ca+IAA处理效果最佳(图2-C)。

以上结果表明,裂果率最高的8—9月为活性氧爆发的关键时期,裂果的 O_2^- 、H₂O₂、MDA含量均大于正常果,且Ca处理可以降低蜜广橘果皮的 O_2^- 、H₂O₂、MDA含量,其中Ca+IAA效果更佳。

2.3 不同钙处理对蜜广橘果皮抗氧化酶活性的影响

在6月,正常果与陷痕果果皮SOD活性相差较小,从7月发生裂果开始到11月果实完熟,正常果的SOD活性均显著大于裂果,在8月达到峰值,此时正常果是裂果的1.44、1.38、1.43倍(图3-A)。在蜜广

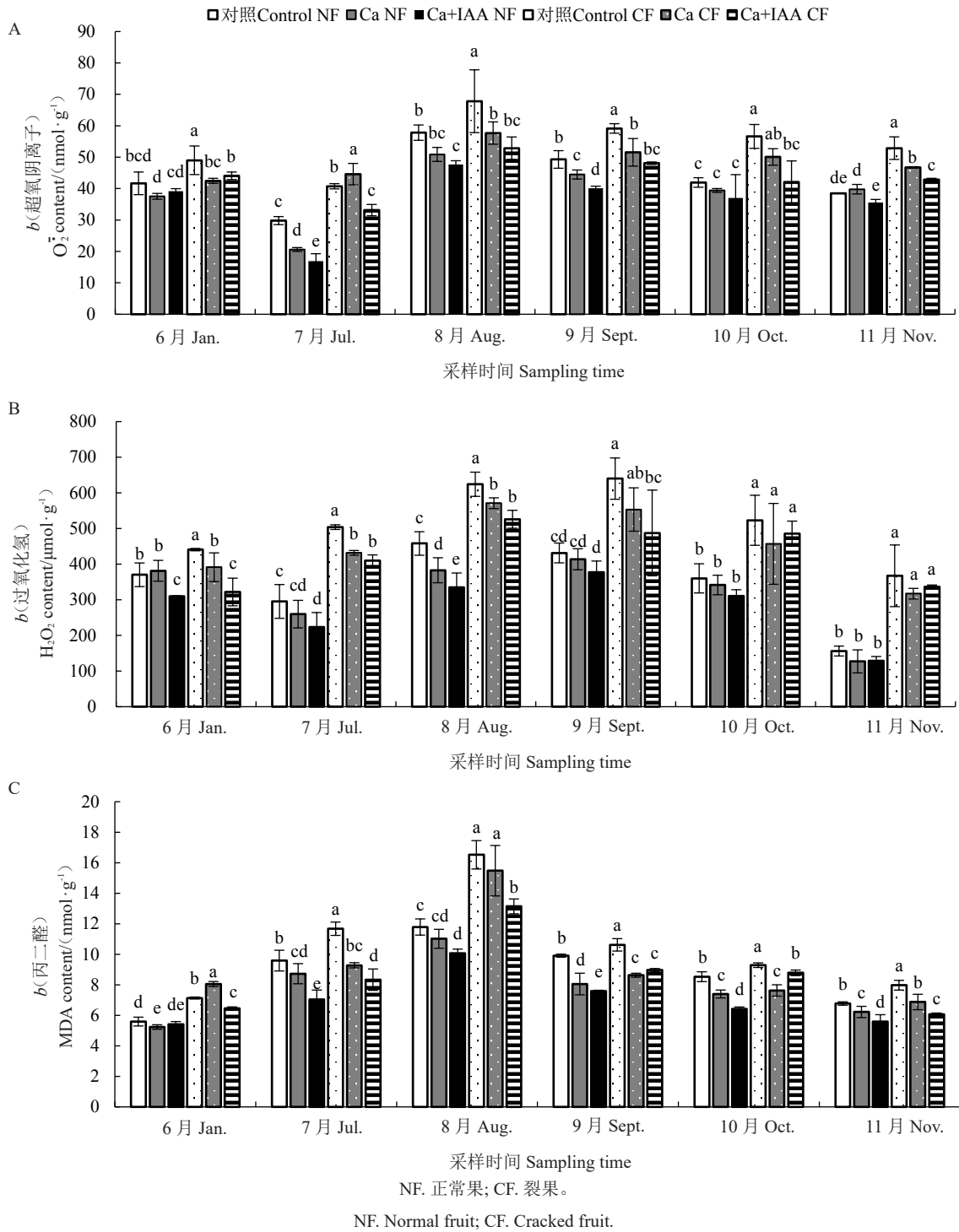


图 2 不同发育时期蜜广橘果皮 O_2^- 、 H_2O_2 和 MDA 含量的变化

Fig. 2 Changes of O_2^- , H_2O_2 and MDA contents in peel at different development stages of Miguang tangerine

橘整个生长发育期间,正常果的CAT活性始终大于裂果,总体达到了显著性差异水平,于8—9月达到峰值,其中8月差异最为显著,此时正常果的CAT活性分别为裂果的3.88、4.5、5.28倍(图3-B)。在蜜广橘整个生长发育期间,裂果的POD活性显著大于同期正常果,9月差距最为显著,此时裂果的POD活性

分别是正常果的3.09、3.58、3.19倍;在6月,钙处理提升了蜜广橘果皮POD活性,从7月发生裂果开始到11月果实完熟,对照处理的POD活性显著高于钙剂处理果实(图3-C)。在蜜广橘整个生长发育期间,正常果的APX活性均显著大于裂果,在8月达到峰值,此时正常果分别是裂果的1.52、1.49、1.23倍

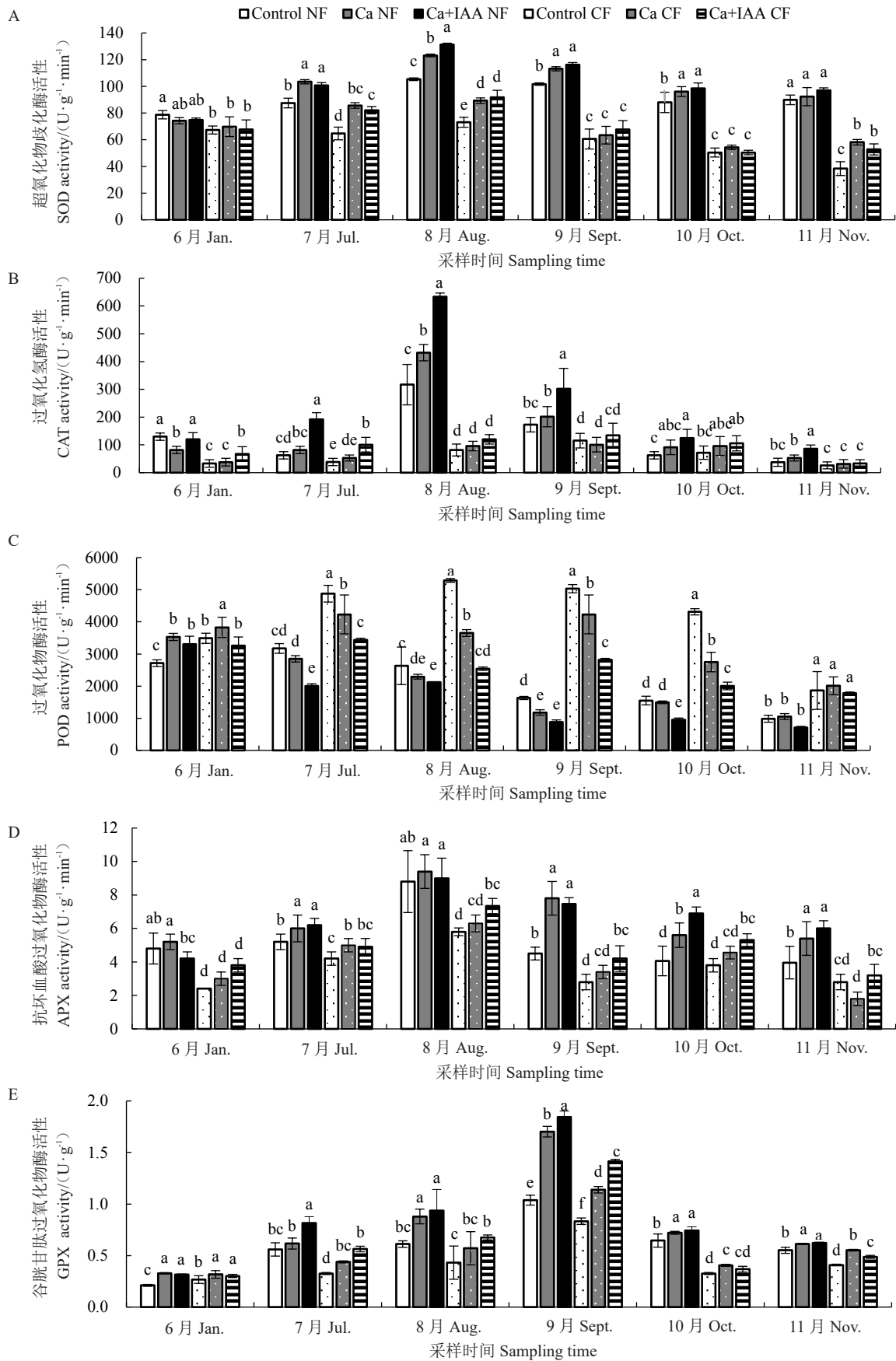


图 3 不同发育时期蜜广橘果皮 SOD、CAT、POD、APX 和 GPX 活性的变化

Fig. 3 Changes of SOD, CAT, POD, APX and GPX activities in peel at different development stages of Miguang tangerine

(图3-D)。在6月,正常果与陷痕果之间的GPX活性含量相差较小,从7月发生裂果开始到11月果实完熟,正常果的GPX活性显著大于裂果,在9月达到峰值,此时正常果是裂果的1.24、1.49、1.3倍(图3-E)。

以上结果表明,Ca和Ca+IAA均可以提升蜜广橘果皮的SOD、CAT、APX、GPX活性,降低POD活性,其中以Ca+IAA效果更佳。裂果的SOD、CAT、APX、GPX活性均低于正常果,POD活性高于正常果,而钙处理对提升SOD、CAT、APX、GPX活性,降低POD活性均有效果,Ca+IAA处理效果最好。

2.4 钙处理对蜜广橘果皮相关基因表达的影响

各时期果实的相关抗氧化基因相对表达量结果显示,6月正常果和陷痕果的CsSOD基因相对表达量均处于较低水平,从7月发生裂果开始至11月果实完熟,正常果的CsSOD基因的相对表达量显著大于裂果,在7—8月升至峰值,尤其是8月差异显著,此时正常果的CsSOD基因相对表达量分别是裂果的5.81、5.6、6.03倍;Ca和Ca+IAA处理均可以提升CsSOD基因的相对表达量,在8—10月达到了显著性差异水平,以Ca+IAA处理效果更好(图4-A)。整体而言,在蜜广橘的整个生长发育期,正常果的CsCAT基因相对表达量均显著大于裂果,在7—8月达到峰值,尤其是Ca+IAA处理;Ca和Ca+IAA处理均可以显著提高蜜广橘果皮中后期的CsCAT基因相对表达量,其中以Ca+IAA处理效果更好(图4-B)。

在蜜广橘的整个生长发育期,裂果的CsPOD基因相对表达量显著大于正常果,在7—9月达到峰值,9月差距最为显著,裂果分别是正常果的7.64、15.09、6.45倍;在幼果期钙剂处理可以提升CsPOD基因的相对表达量,在裂果率最高的8—10月,钙处理则抑制了CsPOD基因的表达(图4-C)。这说明钙剂处理在蜜广橘生长发育前期可以提高CsPOD基因的相对表达量,后期则是反作用,Ca+IAA处理效果更为显著。

从7月裂果发生至11月果实完熟,正常果的CsAPX基因相对表达量总体显著高于裂果,在8—9月达到峰值;Ca和Ca+IAA处理显著提升了蜜广橘果皮CsAPX基因的相对表达量(图4-D)。在裂果高发的7—10月,正常果的CsGPX基因相对表达量总体上显著大于裂果,在7月达到谷值后上升,在8—9月达到峰值,其中8月差异最为显著,此时正常果分别是裂果的2.2、2.08和4倍;在钙离子刺激下,Cs-

GPX基因相对表达量均显著升高,其中Ca+IAA处理效果更佳(图4-E)。以上结果表明,钙处理通过促进各时期的相关抗氧化基因的表达(抑制CsPOD基因表达),从而提升抗氧化酶活性,减缓蜜广橘裂果,以Ca+IAA处理效果最好。

3 讨 论

前人在对樱桃^[17]的研究中发现,外源钙处理可以提高果实钙含量,对降低裂果率效果显著。本研究结果表明,蜜广橘果实幼果期会出现纵向规则陷痕,这可能是裂果发生的前奏。陷痕是蜜广橘的一个特性,会导致陷痕处果皮厚度不均,从而更易从陷痕处裂果。对照处理果实的裂果率在8月爆发到峰值,而钙处理果实的裂果率在10月达到最大值,这说明钙处理可以有效降低果实裂果率,并且延缓裂果爆发的时间,起到调节果实生长发育的作用。外源IAA通过减轻膜脂过氧化来缓解非生物胁迫对植物的伤害,提高植株在胁迫环境下的适应能力^[18],添加外源IAA可以有效地缓解细胞膜系统受伤程度,降低细胞膜透性,提高膜系统稳定性^[19],因此Ca和IAA协同作用减缓裂果效果更佳。

3.1 钙处理对易裂果蜜广橘果皮活性氧含量的影响

在本试验中,6月O₂⁻和H₂O₂含量较高,激活了抗氧化酶的及时分解,使得7月活性氧含量下降至谷值。在裂果爆发期氧化胁迫加强,活性氧含量达到了峰值,且超过了抗氧化系统的清除能力,造成活性氧不断积累,导致膜脂过氧化程度不断加深,从而引起裂果的大量发生。裂果使植物细胞膜受到损伤,导致ROS积累,生成产物MDA对细胞膜产生破坏,从而对植物造成伤害,降低植物抗性。

姜倩倩等^[20]研究发现低质量浓度的外源Ca²⁺抑制了H₂O₂和O₂⁻的产生。在本研究中,钙处理后,O₂⁻、H₂O₂和MDA含量均显著下降,减轻了对细胞的伤害,维持细胞膜的稳定性,达到了有效预防裂果的作用,其中Ca+IAA处理效果更好,这和王兴翠等^[21]、李婷婷等^[22]的结论一致。

3.2 钙处理对易裂果蜜广橘果皮抗氧化酶活性的影响

钙参与调节膜脂过氧化和抗氧化酶等生理生化反应,显著降低对膜的伤害并减少MDA的积累,从而增强植物的抗逆性。在本试验中,钙处理显著降

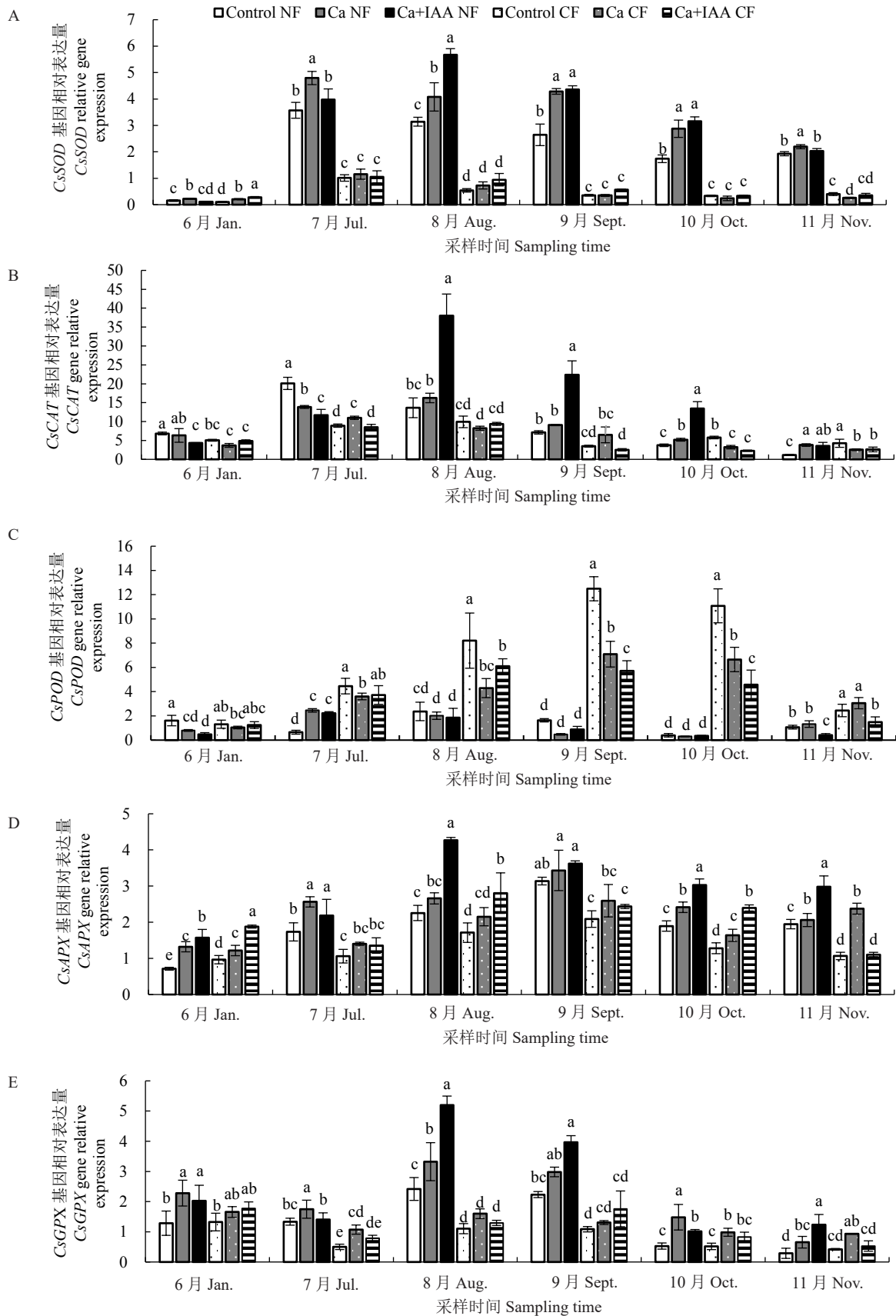


图 4 不同发育时期蜜广橘果皮 *CsSOD*、*CsCAT*、*CsPOD*、*CsAPX*、*CsGPX* 基因的表达
 Fig. 4 Expression of *CsSOD*, *CsCAT*, *CsPOD*, *CsAPX* and *CsGPX* genes in peel at different development stages of Miguang tangerine

低了蜜广橘果皮的 O_2^- 、 H_2O_2 和MDA含量,降低了POD活性,提高了SOD、CAT、APX、GPX活性,有效减少了裂果的发生,说明钙通过清除活性氧、提升抗氧化系统酶活性来降低果实的裂果率,与刘亚林等^[23]的研究结果一致。

本试验中,在6月陷痕果发生时产生大量的 O_2^- ,激活第一道防线SOD的清除能力,使其活性迅速增强,清除过量的活性氧,维持细胞活性氧代谢平衡,这是果实应对胁迫的积极保护机制。随着裂果加重,SOD的清除能力下降,致使膜脂过氧化作用加剧,细胞伤害加深,这与王保明等^[24]的研究结果一致。另外,正常果的SOD活性显著高于裂果,类似的结论在番茄^[25]、脐橙^[26]等品种的裂果上也曾得出,进一步说明SOD在预防裂果中具有一定作用。同时,笔者在本研究中发现钙处理可以增加SOD活性,这与熊博等^[27]的研究结果相一致,其中以Ca+IAA效果更好。

在本研究中,正常果的CAT、APX和GPX活性始终高于裂果,这些高水平的抗氧化酶活性共同作用,清除8月达到峰值的 H_2O_2 ,保证植物细胞内抗氧化系统处于稳定状态;8月后, H_2O_2 含量继续升高,抗氧化酶活性开始下降,裂果程度继续加深。POD则表现为裂果率更高,原因可能是POD与细胞壁不可逆的结合,降低了细胞壁的延伸性,从而加大了裂果的发生概率,这与王建宇等^[28]的研究结果一致,且类似的结果在荔枝^[29]、枣^[30]等果实抗裂研究上均有发现。刘丽莉等^[31]发现, Ca^{2+} 可以显著降低油菜叶片的MDA和 H_2O_2 含量,提高SOD、CAT和GPX的活性,从而增加植物的耐受性。本研究结果表明,钙处理果实的CAT、APX和GPX活性均高于对照处理,与在脐橙^[32]上的研究一致;同时钙可以抑制POD活性,与在番茄^[25]上的研究结果一致,其中以Ca+IAA处理的效果最好。

3.3 钙处理对易裂果蜜广橘果皮相关基因的影响

前人研究表明,钙调蛋白(CAM)对SOD、CAT和POD活性有激活作用,且SOD、CAT和POD可能是 Ca^{2+} -CAM的靶酶^[33]。在本试验中,*CsSOD*、*CsCAT*、*CsAPX*、*CsGPX*基因在正常果的表达较高,在裂果果皮中表达下调,导致活性氧自由基积累,抗氧化能力减弱,果皮细胞受到损伤,这可能也是裂果发生的原因之一。钙通过显著上调抗氧化基因的表达来提高抗氧化酶活性,从而维护植物细胞活性氧代

谢平衡,其中*CsSOD*基因的相对表达量在7月迅速达到高位,原因可能是7月裂果发生,活性氧开始增加并积累,*CsSOD*基因的高表达调控SOD酶活性升高。SOD酶是抗氧化系统的第一道防线,能特异性清除 O_2^- ,维持活性氧代谢平衡,其产生的副产物 H_2O_2 继续被CAT、POD、APX、GPX清除。此时,调控这些酶的基因表达开始增加,在8—9月达到峰值,与抗氧化酶活性的变化相一致,意味着8—9月是清除活性氧的关键时期。另外,在果实生长发育初期,钙处理果实的果皮*CsPOD*基因相对表达量较高,可能是前期该基因激活POD酶活性,主要作用于清除活性氧;在8月后裂果爆发,钙处理果实的*CsPOD*基因表达下调,木质素含量降低与其关系密切,原因可能是外源钙影响了蜜广橘的木质素聚合,从而提高了果皮细胞壁的延展性,这与Weng等^[34]的结果一致。

4 结 论

柑橘裂果是一种严重的生理性病害,其发生原因十分复杂,但与活性氧和抗氧化酶之间紧密相关。蜜广橘在8—9月份裂果爆发,而这2个月正是活性氧爆发的关键时期,启动了响应裂果的积极保护相关机制,而钙处理可以显著减缓裂果引起的果皮活性氧爆发(O_2^- 、 H_2O_2)和MDA的积累,减轻了细胞毒害作用,同时钙离子刺激了氧化胁迫响应,显著提高了抗氧化酶相关基因*CsSOD*、*CsCAT*、*CsAPX*和*CsGPX*的相对表达量,降低了*CsPOD*的相对表达量,*CsSOD*基因首先应答,调控响应抗氧化酶(SOD、CAT、APX、GPX)活性升高,抵抗逆境环境胁迫,降低了POD活性,提高细胞壁的延展性,减缓裂果的发生,保持整个抗氧化系统处于动态平衡之中。

参考文献 References:

- [1] 马雯彦,庞晓明,续九如,李颖岳.果实裂果影响因子研究进展[J].华中农业大学学报,2010,29(6):798-804.
MA Wenyan, PANG Xiaoming, XU Jiuru, LI Yingyue. Advances in research on the factors influencing fruit cracking[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(6): 798-804.
- [2] 李永杰,金国强,淳长品,朱潇婷,邱晓莹.柑橘果皮的发育特征及GA₃的防裂效果[J].果树学报,2021,38(7):1092-1101.
LI Yongjie, JIN Guoqiang, CHUN Changpin, ZHU Xiaoting, QIU Xiaoying. Developmental characteristics of citrus peel and the effect of gibberellic acid on fruit cracking[J]. Journal of Fruit Science, 2021, 38(7): 1092-1101.

- [3] 李靖,陈栋,孙淑霞,谢红江,涂美艳,江国良. 外源钙对桃果实品质相关指标及裂核的影响[J]. 西南农业学报, 2014, 27(2):896-898.
LI Jing, CHEN Dong, SUN Shuxia, XIE Hongjiang, TU Meiyang, JIANG Guoliang. Effects of foliage application of calcium on fruit quality related indexes and split-pit of peach[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(2): 896-898.
- [4] 陈继群,刘丽贞,陈杰忠,张海岚. 不同钙处理对脐橙裂果及其细胞壁酶活性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(6): 29-32.
CHEN Jiqun, LIU Lizhen, CHEN Jiezhong, ZHANG Hailan. Effects of various calcium treatments on fruit cracking and cell wall enzyme activities in navel orange[J]. Journal of South China Agricultural University, 2014, 35(6):29-32.
- [5] 王芳,杨莎,郭峰,孟静静,孟庆伟,万书波,李新国. 钙对花生幼苗生长、活性氧积累和光抑制程度的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(5):1496-1504.
WANG Fang, YANG Sha, MENG Jingjing, MENG Qingwei, WAN Shubo, LI Xinguo. Effects of calcium on peanut seedling growth, accumulation of reactive oxygen species and photoinhibition[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5):1496-1504.
- [6] 曹慧,潘利,姜倩倩,邹岩梅,束怀瑞. 外源钙和硫化氢对镉胁迫下平邑甜茶幼苗根系活性氧代谢和线粒体特性的影响[J]. 华北农学报, 2018, 33(2):163-168.
CAO Hui, PAN Li, JIANG Qianqian, ZOU Yanmei, SHU Huairui. Effects of exogenous calcium and hydrogen sulfide on reactive oxygen species metabolism and mitochondrial properties in roots of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings under cadmium stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2018, 33(2): 163-168.
- [7] 万继锋,李娟,杨为海,曾辉,张汉周,陈杰忠. 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 Jifeng, LI Juan, YANG Weihai, ZENG Hui, ZHANG Hanzhou, CHEN Jiezhong. ROS metabolism of *Citrus* fruits in response to high-temperature-intense-light stress[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2019, 34(8):920-924.
- [8] LIU J, LIANG L, JIANG Y M, CHEN J J. Changes in metabolisms of antioxidant and cell wall in three pummelo cultivars during postharvest storage[J]. Biomolecules(Basel, Switzerland), 2019, 9(8):319.
- [9] 杨兰兰,卢凯政,齐国辉,张雪梅,李寒,郭素萍. 提高苹果品质并抑制苦痘病发生的钙肥最佳施用量和次数[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(4):765-772.
YANG Lanlan, LU Kaizheng, QI Guohui, ZHANG Xuemei, LI Han, GUO Suping. Optimum application amount and times of calcium nitrate for better fruit quality and lower incidence of apple bitter pit[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2020, 26(4):765-772.
- [10] WANG D, LI W X, LI D, LI L, LUO Z S. Effect of high carbon dioxide treatment on reactive oxygen species accumulation and antioxidant capacity in fresh-cut pear fruit during storage[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 281: 109925.
- [11] 王爱国,罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990(6):55-57.
WANG Aiguo, LUO Guanghua. Quantitative relationship between the reactions of superoxide free radicals and light amine in plants[J]. Plant Physiology Journal, 1990(6):55-57.
- [12] WANG Y S, TIAN S P. Interaction between *Cryptococcus laurentii*, *Monilinia fructicola*, and sweet cherry fruit at different temperatures[J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(1): 48-57.
- [13] JIANG A L, TIAN S P, XU Y. Effect of controlled atmospheres with high O₂ or high-CO₂ concentrations on postharvest physiology and storability of 'Napoleon' sweet cherry[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(8):925-930.
- [14] WANG Y S, TIAN S P, XU Y, QIN G Z, YAO H J. Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated with *Cryptococcus laurentii* or *Penicillium expansum* at 0 or 20 °C[J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 34(1):21-28.
- [15] JIMENEZ A, HERNANDEZ J A, RIO L, SEVILLA F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves.[J]. Plant Physiology, 1997, 114(1):275-284.
- [16] 于娟,唐学玺,张培玉,田继远,蔡恒江. CO₂ 富集对 UV-B 辐射胁迫下亚心形扁藻光合作用和膜脂过氧化以及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物学报, 2004, 46(6):682-690.
YU Juan, TANG Xuexi, ZHANG Peiyu, TIAN Jiyuan, CAI Hengjiang. Effects of CO₂ enrichment on photosynthesis, lipid peroxidation and activities of antioxidative enzymes of platyomonas subcordiformis subjected to UV-B radiation stress[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(6):682-690.
- [17] 张阔,朱国英,刘成连,原永兵,李志军,王永章. 甜樱桃果实果肉 Ca²⁺ 质量浓度变化规律及其与裂果的关系[J]. 果树学报, 2008, 25(5):646-649.
ZHANG Ge, ZHU Guoying, LIU Chenglian, YUAN Yongbing, LI Zhijun, WANG Yongzhang. Change of Ca²⁺ concentration in sweet cherry fruit and its relationship with fruit cracking[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(5):646-649.
- [18] QIANG L, KIYOSHI K, HISASHI O. Effects of exogenous auxin on the regulation of elongation growth of excised segments of *Vigna hypocotyls* under osmotic stress[J]. Plant Cell Physiology, 1992, 33(7):915-919
- [19] 刘娟,马小乐,尚勋武,王化俊. 外源 IAA 对小麦‘西旱 2 号’幼苗水分胁迫和 NaCl 胁迫的缓解响应[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(2):47-51.
LIU Juan, MA Xiaole, SHANG Xunwu, WANG Huajun. Regulation of exogenous auxin IAA on drought and salt stress during seedling stage of spring wheat[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2009, 44(2):47-51.
- [20] 姜倩倩,林家燕,杨槟瑜. 钙对镉胁迫下平邑甜茶根系活性氧生成和细胞损伤的影响[J]. 潍坊学院学报, 2019, 19(6):23-28.
JIANG Qianqian, LIN Jiayan, YANG Binyu. The role of calcium in the generation of reactive oxygen species and cell damage

- in roots of *Malus hupehensis* rehd under cadmium stress[J]. Journal of Weifang University, 2019, 19(6):23-28.
- [21] 王兴翠,张忠义,彭佃亮,张敬敏,杨文霞. 外源钙对高温胁迫下苗期生姜生长及活性氧代谢的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(5):851-855.
WANG Xingcui, ZHANG Zhongyi, PENG Dianliang, ZHANG Jingmin, YANG Wenxia. Effect of exogenous calcium on ginger growth and active oxygen metabolism at seedling stage under high temperature stress[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(5):851-855.
- [22] 李婷婷,陈彦云,沈文娟,陈陆祺,陈银花,曹君迈. 钙对贮藏期马铃薯块茎渗透调节物质及SOD的影响[J]. 西南农业学报, 2019, 32(5):1011-1015.
LI Tingting, CHEN Yanyun, SHEN Wenjuan, CHEN Luqi, CHEN Yinhua, CAO Junmai. Effects of calcium on osmotic adjustment substances and SOD in potato tubers during storage[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(5):1011-1015.
- [23] 刘亚林,闫磊,曾钰,姜存仓. 缺钙下根根抗氧化系统及细胞壁果胶的变化[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(1):61-66.
LIU Yalin, YAN Lei, ZENG Yu, JIANG Cuncang. Changes of antioxidant system and cell wall pectin in *Poncirus trifoliata* L. under calcium deficiency[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(1):61-66.
- [24] 王保明,丁改秀,王小原,付春宝,秦国杰,杨俊强,仓国营,温鹏飞. 枣果实裂果的组织结构及水势变化的原因[J]. 中国农业科学, 2013, 46(21):4558-4568.
WANG Baoming, DING Gaixiu, WANG Xiaoyuan, FU Chunbao, QIN Guojie, YANG Junqiang, CANG Guoying, WEN Pengfei. Changes of histological structure and water potential of huping Jujube fruit cracking[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(21):4558-4568.
- [25] 张川,王亚晨,崔守尧,杨泽恩,吴震,蒋芳玲. 耐裂果与易裂果番茄果实发育过程中果实组织衰老与裂果的关系[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(4):534-542.
ZHANG Chuan, WANG Yachen, CUI Shouyao, YANG Zeen, WU Zhen, JIANG Fangling. The relationship between fruit tissue senescence and fruit cracking in cracking-resistant and susceptible tomato during fruit ripening[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(4):534-542.
- [26] 温明霞,石孝均. 锦橙裂果的钙素营养生理及施钙效果研究[J]. 中国农业科学, 2012, 45(6):1127-1134.
WEN Mingxia, SHI Xiaojun. Influence of calcium on fruit cracking of Jincheng orange and its physiological mechanism[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(6):1127-1134.
- [27] 熊博,汪志辉,廖凤玲,范茜茜,李立佼,王晓晓. 钙对黄果柑果实3种抗氧化酶活性的影响[J]. 植物科学学报, 2014, 32(2):168-173.
XIONG Bo, WANG Zhihui, LIAO Fengling, FAN Qianqian, LI Lijiao, WANG Xiaoxiao. Effects of calcium on the activities of three antioxidant enzymes in Huangguogan fruit[J]. Plant Science Journal, 2014, 32(2):168-173.
- [28] 王建宇,高秋玲,王振磊,林敏娟. 细胞代谢酶活性、碳水化合物及内源激素与枣裂果关系[J]. 新疆农业科学, 2020, 57(9):1689-1696.
WANG Jianyu, GAO Qiuling, WANG Zhenlei, LIN Minjuan. Relationship between cell metabolism enzyme activity, carbohydrate, endogenous hormones and fruit cracking[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2020, 57(9):1689-1696.
- [29] 李建国,黄旭明,黄辉白. 裂果易发性不同的荔枝品种果皮中细胞壁代谢酶活性的比较[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(2):141-146.
LI Jianguo, HUANG Xuming, HUANG Huibai. Comparison of the activities of enzymes related to cell-wall metabolism in peel between Litchi cultivars susceptible and resistant to fruit cracking[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2003, 29(2):141-146.
- [30] 曹一博,李长江,孙帆,张凌云. 抗裂与易裂枣内源激素含量和细胞壁代谢相关酶活性比较[J]. 园艺学报, 2014, 41(1):139-148.
CAO Yibo, LI Changjiang, SUN Fan, ZHANG Lingyun. Comparison of the endogenous hormones content and the activities of enzymes related to cell-wall metabolism between Jujube cultivars susceptible and resistant to fruit cracking[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(1):139-148.
- [31] 刘丽莉,冯涛,向言词,肖璐,严明理. 外源钙对镉胁迫下芥菜型油菜幼苗生长和生理特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(5):978-983.
LIU Lili, FENG Tao, XIANG Yanci, XIAO Lu, YAN Mingli. Effect of exogenous calcium on seedling growth and physiological characteristics of *Brassica juncea* under cadmium stress[J]. Journal of Agro-environment Science, 2009, 28(5):978-983.
- [32] 胡佳羽,刘亚敏,李鹏霞,王伟,尹克林. 次氯酸钙对贮藏脐橙膜脂过氧化和保护酶活性的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(14):292-295.
HU Jiayu, LIU Yamin, LI Pengxia, WANG Wei, YIN Kelin. Effects of calcium hypochlorite on membrane lipid peroxidation and activity of defensive enzymes of 'Newhall' navel oranges during storage[J]. Food Science, 2009, 30(14):292-295.
- [33] DU L Q, POOVAIAH B W. A novel family of Ca²⁺/calmodulin-binding proteins involved in transcriptional regulation: interaction with fsh/Ring3 class transcription activators[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(4):549-569.
- [34] WENG J K, CHAPPLE C. The origin and evolution of lignin biosynthesis[J]. New Phytologist, 2010, 187(2):273-285.