

‘黄金梨’果顶“硬化症”发生与活性氧代谢的关系

李志军, 杨绍兰, 王 然

(青岛农业大学 园艺学院, 青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘 要:近年来,‘黄金梨’果实的果顶呈现细胞硬化,俗称‘铁头’‘硬头’‘黄头’‘绿头’,为生理病害。发病果实果肉失去应有的酥脆、多汁的口感。该研究分析了连续多年生长期易发生果顶“硬化症”的树与从未发生果顶“硬化症”的正常树的叶片和果实水势变化的差异,比较了2种类型果实中木质素含量、活性氧清除酶(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))活性变化以及 H_2O_2 、丙二醛(MDA)含量等方面的差异。结果表明:与正常的‘黄金梨’树相比,易发病树的叶、果水势低,果实中的 H_2O_2 、MDA和木质素含量显著高于不发病树;易发病树的叶片水势与 H_2O_2 含量呈极显著负相关($r=-0.828\ 3$, $P<0.01$), H_2O_2 含量与MDA含量呈显著正相关($r=0.764\ 2$, $P<0.05$);SOD活性显著低于不发病树;POD、CAT、APX的活性极显著高于不发病树。因此认为,发生果顶“硬化症”的树体或者结果部位可能由于存在一定程度的水分胁迫,导致了体内的活性氧产生与清除的动态平衡状态的变化,使 H_2O_2 、MDA过量生成和POD活性增加,从而促进了木质素的合成,这可能是导致近表皮薄壁细胞木质化的原因之一。

关键词:‘黄金梨’;果顶“硬化症”;水分胁迫;木质化

中图分类号:S 661.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0001-06

‘黄金梨’(*P. pyrifolia*, cv. ‘Whangkeumbae’)属砂梨系统,系韩国园艺实验场罗川支场采用“新高×二十世纪”杂交培育的品种,于1997年引入我国。该品种果形、外观、品质俱佳。但近年来在有些地区的梨园,出现了果实萼洼端顶部果肉细胞组织硬化的现象,类似西洋梨上常见的‘铁头病’,发病严重的果实硬化可达果实胴部。出现果顶硬化症状的果实,果肉细胞没有充分膨大,使果顶部突出,不圆整,果皮变的粗糙不光滑,并与果实其它部位色泽不同,常呈现绿色或黄色,严重的呈铜褐色,故也被称为‘绿头’或‘黄头’。发生了硬化的果肉组织,质地

坚硬,失去了‘黄金梨’应有的酥脆、多汁的口感,严重影响了果实品质。初步调查表明,发病严重的果园,发病率高达90%以上。这不仅影响了该品种的发展,甚至导致大面积的品种更换或砍伐。果顶组织发生硬化是一种生理性病害,有调查表明,与砧木、土壤理化性质、肥水管理、树龄、树体生长状况等有关^[1]。细胞学观察发现,发生硬化的果肉细胞发育异常,不仅性状发生了改变,而且细胞壁物质大量沉淀,胞壁次生加厚增加^[2],石细胞团变大,果肉细胞硬度增强^[3]。有研究认为树体钙和硼等营养不足是引起果肉硬化的主要原因之一,也与叶和果的水分可利用状况有关^[4]。水分胁迫引起了植物体内矿质营养、水平与分配和叶片碳同化规律的变化。研究表明,植物组织受到干旱、高温、损伤、病原体等生物及非生物胁迫时能产生大量活性氧,引起膜脂过氧化作用,细胞壁木质化,产生抗逆反应^[5-7]。有报道认为,梨果顶“硬化症”的发生即木质素的积累过程^[8],木质素形成与活性氧代谢有密切关系^[9]。

课题组前期研究认为发病重的梨树叶片和果实水势低,水势差大,与果实发病有相关性^[4]。为了探讨树体水分可利用状况与梨果肉硬化的关系,在多

第一作者简介:李志军(1961-),男,本科,农艺师,研究方向为果树栽培生理。E-mail:qd8316@163.com.

责任作者:王然(1960-),女,硕士,教授,研究方向为果树育种。E-mail:qauwr@126.com.

基金项目:国家现代农业(梨)产业技术体系建设专项资助项目(nycytx-29-06);国家自然科学基金资助项目(31201608, 31572109);山东省良种工程资助项目(2014-2017);青岛市民生科技计划资助项目(14-2-3-38-nsh;12-1-4-5-8-jch)。

收稿日期:2016-09-26

年连续观察的基础上,以历年来发病较重的植株为试材,以发病较轻或不发病的植株为对照,进行了2种类型树生长期叶和果实水势、果肉组织解剖结构、木质素含量、活性氧清除酶(SOD、POD、CAT、APX)活性和 H_2O_2 、MDA含量变化的比较测定分析,旨在为揭示‘黄金梨’果顶“硬化症”发病机理及调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于2012—2013年在山东省莱阳市优丰果树所7年生的黄金梨园进行。果园地势平坦,南北行向,株行距为 $6\text{ m} \times 5\text{ m}$,水平网架式整形,树势偏旺。土壤为沙土,有机质含量0.92%,pH 6.2。管理水平较高。于6月上旬套小袋,7月上旬套大袋。

1.2 试验材料

果实样品是自花后35~98 d,每隔7 d采样1次,冰盒保存运至实验室。每次每个处理各取果实15个,取果顶部(含果皮、果肉),切成小块,液氮速冻,−70℃保存备用。每个处理6株,重复3次。

1.3 试验方法

以近3年来果顶“硬化症”平均发病率<10%的树为对照,以平均发病率>82%的树为易发病树。

1.4 项目测定

1.4.1 叶片、果实水势(Ψ_w , bar)的测定 采用压力室法^[10],以植物水势仪(美国产,3000型)直接测定。自花后28~98 d,每隔7 d测定1次。选取测试植株

相同部位的、同一果台枝上的果实和果台副梢上的第4~5片叶进行测定,每处理6株,重复3次。

1.4.2 石蜡切片的制作 参照李正理^[11]的方法。

1.4.3 活性氧清除酶活性的测定 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照DHINDSA等^[12]的方法;过氧化物酶(POD)活性测定参照MURR等^[13]的方法;过氧化氢酶(CAT)活性测定参照CAKMAK等^[14]的方法;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参照NAKANO等^[15]的方法。

1.4.4 H_2O_2 和丙二醛(MDA)含量的测定 H_2O_2 含量测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒。MDA含量测定参照赵世杰等^[16]的方法。

1.4.5 木质素含量测定 木质素含量测定参照SANCHO等^[17]的方法。

2 结果与分析

2.1 发病果实细胞形态及组织染色的变化

由图1A可以看出,随着梨果实的发育,正常果的细胞已逐渐膨大。至77 d时,果肉细胞排列整齐,间隙较小,呈比较透明状。而发生果顶“硬化症”的‘黄金梨’果实,如图1B所示,其发病部位的表皮细胞及1~9层果肉薄壁细胞发生了细胞壁的次生加厚。至77 d时,细胞排列疏松、间隙较大、染色较深,呈比较不透明状,从细胞木质素染色情况看,发病果实细胞内含有较多的木质素,石细胞明显多于正常果实。

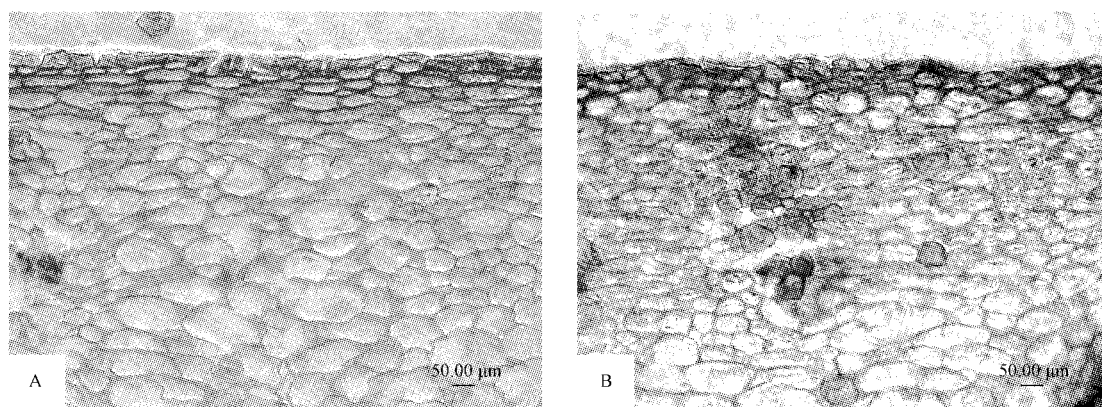


图1 花后77 d正常果实(A)和果顶“硬化症”果实(B)的组织解剖结构比较

Fig. 1 The electron microscopy detection of normal fruit(A) and 'hard end' fruit(B) on 77 days after anthesis

2.2 发病果实和叶片的水势与过氧化产物及木质素含量变化

对2种类型树的叶和果实水势变化进行测定。由图2可知,与果实的水势比较,不管是易发病树还

是正常树,整个生长期均是叶片水势相对较低,变异幅度较大,如正常树的叶片水势变化范围为−19.7~−7.9 bar,而果实为−14.4~−10.3 bar。同为叶片或果实,易发病树则表现了更低的水势和更大的变异

幅度,如易发病树生长期叶片水势变化范围为 $-28.4\sim-9.3$ bar、果实为 $-14.9\sim-8.4$ bar。并且,除生长后期个别观察点外,易发病树在同期果叶之间的水势差也是明显大于正常树。叶、果水势最低时期出现在果实膨大前期,后期有所上升。易发病树与正常树的果实水势主要是前期前者的变化幅度更大,而花后 70 d 之后比正常树变化更平稳。这说明如果发病与水势有关,可能与前期的水势关系更密切,并且叶片的水势大小及变化幅度更能反映这种相关性。从易发病树与正常树叶片水势测定比较的结果,认为易发病树存在一定程度的水分胁迫。由于植物在遭受胁迫时,细胞和组织常会产生过氧化反应,为此,对过氧化反应的产物 H_2O_2 含量进行

了测定。由图 2 可以看出,果实中 H_2O_2 含量变化与叶片水势变化有一定的相关性,叶片水势上升,随后是果实中 H_2O_2 含量下降;反之,叶片水势下降,随后是果实中 H_2O_2 含量上升。说明树体受到水分胁迫,使叶片水势低,从而诱发病实 H_2O_2 含量升高,二者呈极显著负相关($r=-0.828\ 3, P<0.01$)。正常树果实的 H_2O_2 含量始终低于易发病树果,变化幅度也明显低于后者。如花后 49 d 和 63 d 发病果的 H_2O_2 含量分别是正常果的 2.42 倍和 2.69 倍。这可能反映了果实膨大前期,果实中存在有一定程度的水分胁迫,也可能是由于叶片中的 H_2O_2 随光合产物运输到果实中所导致。

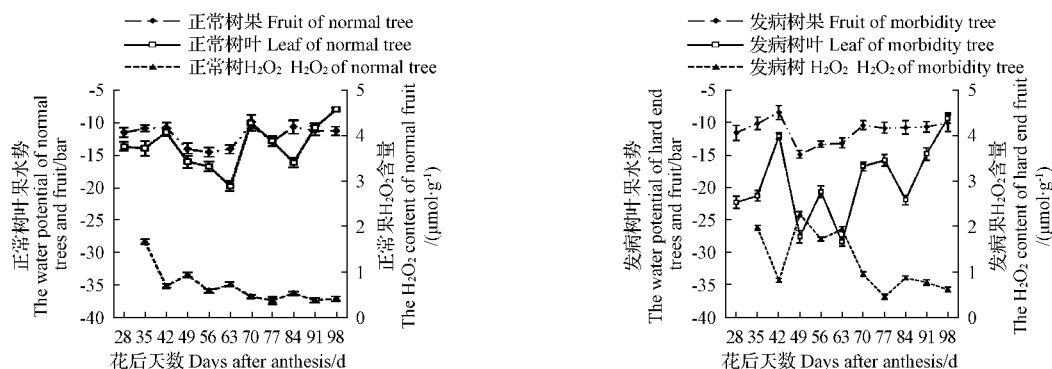


图 2 生长期正常树与发病树叶、果水势及果实中 H_2O_2 含量的变化

Fig. 2 The water potential and H_2O_2 contents of leaves and fruit in 'hard end' morbidity fruit trees and normal fruit trees

MDA 是膜脂过氧化作用生成的初级产物,其含量的多少反映膜脂过氧化作用的程度。由图 3 可以看出,病果 MDA 含量始终高于正常果,且变化幅度较大。自 42 d 开始病果和正常果之间一直呈显著差异($P<0.05$)。说明病果的膜脂过氧化程度显著高于正常果。相关性分析表明,35~70 d 果实发育过程中,发病果的 H_2O_2 含量与 MDA 含量呈显著正相关($r=0.764\ 2, P<0.05$)。表明发病果在发育中

MDA 含量增加与 H_2O_2 含量的增加显著相关。

木质素是重要的构成细胞壁、增加细胞硬度的物质之一。由图 3 还可知,花后 77 d 之前,随着果实的细胞膨大,正常果和发病果中的木质素含量均呈快速下降趋势,发病果木质素含量始终高于正常果。花后 77 d,正常果的木质素含量下降速度开始变缓,而发病果的木质素含量开始稍有回升,从而表明发病果木质化程度在增加,这与图 1B 切片显示的结果

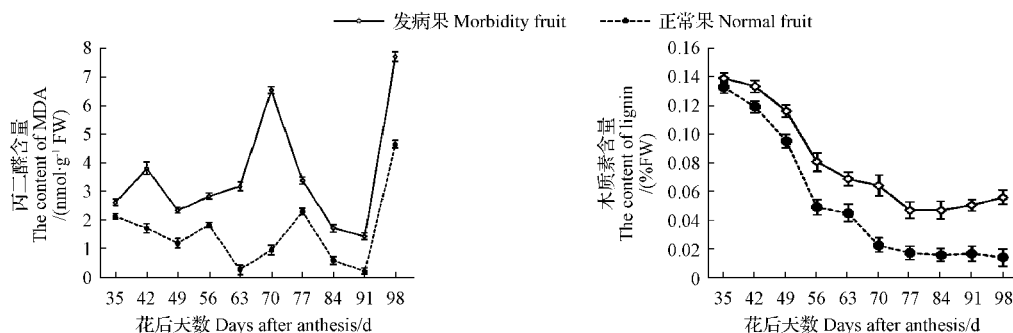


图 3 正常果与发病果 MDA 和木质素含量的变化趋势

Fig. 3 The changes of MDA content and lignin content in 'hard end' morbidity fruit and normal fruit

相吻合。发病果花后 70 d 和 98 d 的木质素含量分别是正常果的 2.82 倍和 4.0 倍,极显著高于正常果 ($P<0.01$)。

2.3 活性氧清除酶系统 SOD、POD、CAT、APX 活性变化

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)作用底物是生物体内产生的超氧阴离子自由基,将其催化形成 H_2O_2 。对发病果实中 SOD 活性测定结果如图 4 所示,生长期 SOD 活性变化动态与正常果相似,花后 36~49 d 虽然不稳定,但保持在一个较高水平上变化,花后 56 d 时则活性急剧下降。之后在较低的水平上变化。在多数观测点上,正常果实的

SOD 活性高于发病果 ($P<0.05$)。说明正常果具有更强的清除超氧阴离子的能力。

过氧化物酶(POD)是一种酚特异性过氧化物酶,不仅是细胞内活性氧的清除剂,也能在 H_2O_2 存在下参与合成木质素。由图 4 可以看出,正常树和易发病树的果实发育期的 POD 活性变化相似,总体呈下降趋势,花后 56 d 之前活性较高,56 d 时开始快速下降,之后维持在较低水平。在花后 70 d 之前的所有观测点,易发病树果实的 POD 活性均显著高于正常树 ($P<0.01$)。表现了一定程度上与其 H_2O_2 含量变化的一致,说明 H_2O_2 含量的升高可能诱导了 POD 活性增加。

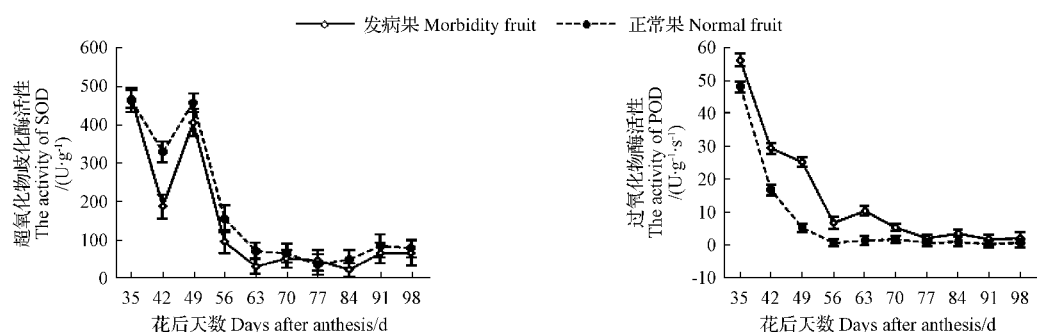


图 4 正常果与发病果 SOD 和 POD 活性的变化趋势

Fig. 4 The changes of SOD and POD activities in 'hard end' morbidity fruit and normal fruit

CAT 在植物体内是以 H_2O_2 为底物,对 H_2O_2 的分解有重要的作用。由图 5 可知,果实发育期间, CAT 活性变化较大,总体上是前期较后期高,除花后 98 d 时的观测点,易发病树果实中的 CAT 活性均显著高于正常树的果实 ($P<0.01$)。

APX 是以抗坏血酸为电子供体,有效地清除细

胞代谢产生的 H_2O_2 [18]。由图 5 可以看出,正常树和易发病树果实发育过程中 APX 活性具有相似的变化动态,总体呈下降趋势。但是易发病树果实的 APX 活性变化范围较正常数更大,其中 35~70 d 是显著高于正常树果的 APX ($P<0.01$)。

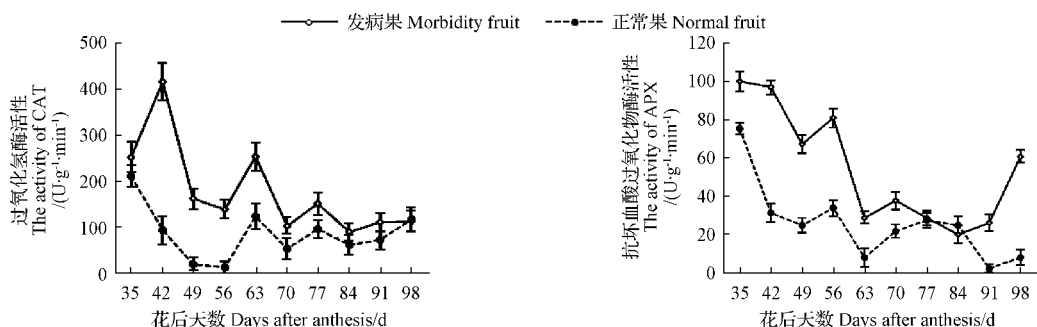


图 5 正常果与发病果 CAT 和 APX 活性的变化趋势

Fig. 5 The changes of CAT and APX activities in 'hard end' morbidity fruit and normal fruit

3 讨论

植物在生命过程中会产生活性氧(包括 H_2O_2 、超氧阴离子、羟自由基和单线态氧等),在正常条件下细胞内存在酶促和非酶促两大活性氧清除系统,

使活性氧处于较低水平。李惠华等 [19]、ASADA [20] 认为,逆境条件下活性氧清除酶间的活性变化不同步,从而导致活性氧大量产生。该试验中,发病果较正常果叶片水势低,叶果水势差大,说明树体受到水

分胁迫,破坏了活性氧清除系统的动态平衡,果实中 H_2O_2 含量随叶片水势的降低而增加,可能同时存在叶片的 H_2O_2 随光合产物传输到果实中。正常树果的 H_2O_2 含量从花后 35 d 最高值呈下降趋势,叶果水势差小,受叶片水势影响较少,活性氧清除系统保持着动态平衡, H_2O_2 含量处于较低水平。发病果的 H_2O_2 含量出现 2 次峰值,分别为 49、63 d,与叶片水势 2 次低值时间一致,说明低水势造成了 H_2O_2 含量的增加。陈立松等^[21] 研究表明,水分胁迫下 H_2O_2 的过量生成超过了防御系统的清除能力(包括保护性反应可能提高的活性氧清除能力),部分来不及清除的 H_2O_2 发生累积,引起膜脂过氧化加剧,导致膜系统的损伤。该试验中发病果 MDA 含量始终高于正常果,说明发病果细胞膜脂化较正常果严重。 H_2O_2 含量峰值的出现时间早于 MDA 含量的峰值,说明 H_2O_2 含量增加引发 MDA 含量增加,加重了细胞膜脂过氧化作用。发病果的 H_2O_2 含量与 MDA 含量相关分析表明,二者呈显著相关($P < 0.05$)。

植物生命活动中,超氧阴离子在 SOD 的催化下形成 H_2O_2 ,再经 CAT 或 POD 或 APX 的催化形成 H_2O 和 O_2 ^[22-23]。该试验中,发病果 SOD 活性低于正常果,表明清除活性氧能力低于正常果,而果实的高 H_2O_2 含量可能有部分来自叶片的传输,二者 SOD 活性差异显著($P < 0.05$)。发病果的 CAT、APX、POD 活性均显著的高于正常果,特别是 CAT、APX 活性在花后 70 d 前的大幅度波动,与 H_2O_2 含量的大量存在有密切关系,说明水分胁迫过量产生的 H_2O_2 超过了防御系统的清除能力。

有研究表明,POD 是细胞内的一个重要防御酶,它不仅是细胞内活性氧的清除剂,也能在 H_2O_2 参与下催化木质素前体(香豆酸等)的交联、聚合反应,从而提高了组织木质化程度,活性氧参与植物组织木质化进程,提高 POD 活性可显著增加植物组织木质素含量^[24];MILOSEVIC 等^[25] 发现,由于赤豆中活性氧清除酶系统的不协调而导致的 H_2O_2 积累和 POD 活性的上升,使木质素含量显著增加。该试验中,木质素含量随着果实细胞的膨大呈下降趋势,发病果的木质素含量始终高于正常果,花后 77 d 后,正常果木质素含量缓慢下降而发病果则缓慢上升,说明发病果发育后期细胞木质化程度在加速。发病果 POD 活性和 H_2O_2 含量都极显著的高于正常果,发病果 POD 活性 49、63 d 的 2 次上升都与 H_2O_2 含量的增加时间一致,说明 POD 活性与 H_2O_2 含量是正相关关系。水分胁迫下活性氧清除酶活性变化的不

同步,高活性的 POD 在分解高含量的 H_2O_2 同时,与 H_2O_2 共同催化木质素前体(香豆酸等)生成木质素,使细胞发生木质化^[26]。因此,发病果果顶“硬化症”是细胞内木质素积累的结果,是由高 H_2O_2 含量和 POD 活性上升引起的。

“黄金梨”果顶“硬化症”发生于果实顶部花萼周围,表现为近表皮的薄壁细胞 1~9 层发生木质化,起因是梨树树体缺水,使叶片、果实水势过低,产生水分胁迫,破坏了植物体内的活性氧产生与清除的动态平衡状态,使 H_2O_2 、MDA 过量生成。发病果的 SOD 活性低,清除超氧阴离子能力弱,而 POD、CAT、APX 是重要的保护酶之一,其表达与活性受 H_2O_2 介导,对植物内过剩的 H_2O_2 的清除作用加强。水分胁迫下活性氧清除酶活性变化的不同步,高活性的 POD 在分解高含量的 H_2O_2 同时,与 H_2O_2 共同催化木质素前体(香豆酸等)生成木质素,使细胞发生木质化。

参考文献

- [1] 宫美英. 黄金梨铁头病成因研究初报[J]. 中国果树, 2013(4): 33-36.
- [2] 马春晖, 李鼎立, 王然. 黄金梨“铁头病”果肉组织切片观察[J]. 北方园艺, 2014(13): 109-113.
- [3] 于立娜, 王然, 原永兵, 等. “黄金梨”果肉硬化症的果实显微结构观察[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(8): 783-786.
- [4] 李志军, 王然. 叶、果水势和叶片光合指标对黄金梨黄顶病发病的影响[J]. 北方园艺, 2011(4): 29-32.
- [5] LALOI C, APEL K, DANON A. Reactive oxygen signaling: The latest news[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004(7): 323-328.
- [6] KWAK J M, NGUYEN V, SCHROEDER J I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses[J]. Plant Physiology, 2006, 141: 323-329.
- [7] NEILL S, DESIKAN R, HANCOCK J. Hydrogen peroxide signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002(5): 388-395.
- [8] LU G L, LI Z J, ZHANG X F, et al. Expression analysis of lignin-associated genes in hard end pear (*Pyrus pyrifolia* Whangkeumbae) and its response to calcium chloride treatment conditions[J]. J Plant Growth Regul, 2015, 34: 251-262.
- [9] 王爱国. 植物的氧化代谢[M]//余叔文, 汤章诚. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1998: 366-389.
- [10] 王万里. 压力室在植物水分状况研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 1984(3): 52-57.
- [11] 李正理. 植物制片技术[M]. 2 版. 北京: 中国农业技术出版社, 1987: 8-78.
- [12] DHINDSA R S, DHINDSA P P, THROPE T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipidperoxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. Exp Bot, 1981(3): 93-101.
- [13] MURR D P, MORRIS L L. Influence of O_2 and CO_2 on odiphenol oxidase activity in mushrooms[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1974, 99: 155-158.

- [14] ÇAKMAK I, STRBOE D, MARSCHNER H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds[J]. Exp Bot, 1993, 44: 127-132.
- [15] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant Cell Physiol, 1989(22): 867-880.
- [16] 赵世杰, 李德全. 植物生理学实验手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 305.
- [17] SANCHEZ M A, FORCHETTI S M, PLIEGO A, et al. Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cell[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1996, 44: 161-167.
- [18] 陈鸿鹏, 谭晓风. 超氧化物歧化酶(SOD)研究综述[J]. 经济林研究, 2007, 25(1): 59-65.
- [19] 李惠华, 赖钟雄. 植物抗坏血酸过氧化物酶研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2006, 35(2): 66-69.
- [20] ASADA K C. Formation of active oxygen and its scavenging[J]. Methods Enzymology, 1954, 205: 422-429.
- [21] 陈立松, 刘星辉. 水分胁迫对荔枝叶片活性氧代谢的影响[J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 241-246.
- [22] CAMPBELL M M, RONALD R S. Variation in lignin content and composition[J]. Plant Physiology, 1996, 110: 3-13.
- [23] 吴岳轩, 曾富华, 王荣臣. 杂交水稻对白叶枯病的诱导抗性与细胞内防御酶系统关系的初步研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 32-36.
- [24] 刘尊英, 姜微波. 常温下 GA₃ 处理对绿芦笋采后木质化的影响[J]. 中国农业科学, 2005, 38(2): 383-387.
- [25] MILOSEVIC N, SLUSARENKO A J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean[J]. Physiology and Molecular Plant Pathology, 1996, 49: 143-158.
- [26] 芮怀瑾, 尚海涛, 汪开拓, 等. 热处理对冷藏枇杷果实活性氧代谢和木质化的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 304-308.

Relationship Between ‘Hard End’ and Active Oxygen Metabolism in ‘Whangkeumbae’ Pear Fruit

LI Zhijun, YANG Shaolan, WANG Ran

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University/Qingdao Key Laboratory of Genetic Improvement and Breeding of Horticultural Plants, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: ‘Whangkeumbae’ pear trees often bear fruits with ‘hard end’ cells in fruit top in recently years, commonly known as the ‘iron head’ ‘green head’, which is a kind of physiological disorder. When the disorder happened, the flesh got ‘hard end’ and lost its crisp, juicy taste. Based on many years of investigation, the differences of water potential changes of leaves and fruits, the contents of H₂O₂, MDA, lignin and the activities of scavenger enzymes (SOD, POD, CAT, APX) were analyzed during the fruit development between the normal and abnormal trees. The results showed that comparing with the normal trees, the water potential of leaves and fruits was lower, and the content of H₂O₂, MDA and lignin were higher in disorder happened ‘Whangkeumbae’ trees. There was a significant negative correlation ($r = -0.828\ 3, P < 0.01$) between water potential and H₂O₂ content, and a significant positive correlation ($r = 0.764\ 2, P < 0.05$) between H₂O₂ content and MDA content in disorder happened trees. The SOD activity were significant lower, and the POD, CAT, APX activities were markedly higher in disorder happened trees than those in the normal trees. It was believed that there might be some extend of water stress in the disorder happened trees or fruiting positions of the tree, which excited the changes of the dynamic equilibrium of active oxygen production and scavenge status and caused the excessive production of H₂O₂, MDA and increases of POD activity. Thus the lignin synthesis was promoted and the parenchymal cells near epidermal were lignified.

Keywords: ‘Whangkeumbae’; ‘hard end’ disorder; water stress; lignification