

梁社坚, 梁锦堂, 蒋宁雄, 等. 柑橘果实分泌囊发育与挥发油积累关系研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 61-65.

柑橘果实分泌囊发育与挥发油积累关系研究

梁社坚¹, 梁锦堂¹, 蒋宁雄¹, 刘培卫², 吴 鸿¹

(1 华南农业大学, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642;

2 中国科学院 华南植物园, 广东 广州 510650)

摘要:【目的】揭示柑橘果实分泌囊发育与挥发油的积累关系, 为陈皮的适时采收提供科学的形态学和植物化学依据。【方法】运用石蜡切片、半薄切片法研究了陈皮果实及其分泌囊的发育过程; 利用挥发油含量测定方法对果实发育过程中挥发油含量的变化进行了分析。【结果和结论】柑橘果实从5月开始发育到翌年1月成熟, 由硬变软。果皮颜色从深绿色变成金黄色或橙黄色, 从不易剥离到极易剥离。分泌囊在外果皮中呈一轮排列且深浅不一, 其发育过程分为4个阶段。成熟的分泌囊具有帽区和球区。后者中央有被2~5层上皮细胞包围着的大的空腔, 挥发油由上皮细胞分泌出来并贮存在空腔中。随着果实的发育, 挥发油的积累呈现“S”型的变化趋势。挥发油含油率在5—8月是一个平缓上升的时期, 9—11月是一个快速增长期, 11月中旬到达顶峰, 12月初开始略微地下降。陈皮应以柑橘果实的外果皮为最佳入药部位。陈皮的最佳采收时期应为11月末到12月初, 此时果实颜色为浅黄色或金黄色, 分泌囊空腔平均直径最大(200 μm左右), 挥发油含油率最高(8.2%~8.5%)。

关键词: 陈皮; 柑橘; 分泌囊; 挥发油

中图分类号: Q944.59

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)02-0061-05

The relationship between secretory cavity development and accumulation of essential oils in fruit of *Citrus reticulata*

LIANG Shejian¹, LIANG Jintang¹, JIANG Ningxiong¹, LIU Peiwei², WU Hong¹

(1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract:【Objective】The study of secretory cavity development and essential oil in the fruit of *Citrus reticulata* may provide scientific basis of morphology and phytochemistry for timely harvest of Chenpi. 【Method】The developmental processes of fruit and secretory cavity were studied by paraffin section and semi-thin section method. The change of essential oil during fruit development was quantitatively analyzed. 【Result and conclusion】From May to January, the fruit of *C. reticulata* developed from hard and dark green to soft and golden yellow or orange. In the epicarp, the secretory cavities were distributed in a ring with different depths. The developmental processes of secretory cavity were divided into four stages. The secretory cavity was shown to be composed of two areas: a cap area and a circular area. In the center of the latter, one big cavity was surrounded by 2–5 layers of epithelial cells. Essential oil secreting from the epithelial cells was stored in this cavity. With the fruit development, the accumulation of essential oil followed a “S” trend. The ratio of essential oil displayed a gentle rise during the period from May to August, a rapid growth from September to November, reaching a peak in the middle of Novem-

收稿日期: 2013-03-20 优先出版时间: 2014-01-03

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0831.029.html>

作者简介: 梁社坚(1978—), 男, 讲师, 博士, E-mail: liangshejian@scau.edu.cn; 通信作者: 吴 鸿(1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: wh@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(31100240, 31070159, 31171919)

ber, and a slight decline in early December. It is suggested that the medically effective fraction of Chenpi is the epicarp. The best time for harvest should be from late November to early December. In this period, the fruit color is light yellow or golden yellow. The average diameter of secretory cavities reaches the maximum (200 μm), and the ratio of essential oils is also the highest (8.2% – 8.5%).

Key words:Chenpi; *Citrus reticulata*; secretory cavity; essential oil

陈皮是芸香科 (Rutaceae) 柑橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮. 柑橘果实扁球形,果皮薄易剥离. 果皮中有较大的点状油室,对光照视,透明清晰^[1],此即为果皮中分泌囊. 分泌囊是芸香科植物普遍具有的结构特征,也是其挥发油产生的主要部位^[2]. 分泌囊分泌的挥发油能驱虫、抗病菌^[3-4],具有化学防御的作用^[5]. 另外,陈皮挥发油具有平喘、镇咳和抗炎等功效^[6],也具有抗肿瘤的活性^[7]. 关于柑橘属分泌囊的起源、发育方面的研究已有不少报道. Heinrich^[8-9]认为柑橘属分泌囊的起源、发育是溶生型,而 Turner 等^[10]认为是裂生型;近年来,我们利用酶细胞化学和细胞程序化死亡研究方法证明柑橘属几种植物的分泌囊空腔的发育方式均为裂溶生型^[11-13]. 另外,我们在广佛手 *Citrus medica* 果实发育研究中发现,分泌囊的结构发育与果实发育密切相关,且直接影响着挥发油的产量^[14]. 陈皮是柑橘的干燥成熟果皮,也是有效成分挥发油积累部位. 因此,研究其果实发育过程中挥发油含量的积累和变化规律与果实分泌囊发育的关系,可为柑橘的适时采收提供科学的形态学指标和植物化学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年 5 月—2010 年 1 月和 2010 年 5 月—2011 年 1 月,分别在每个月定期取华南农业大学苗圃栽种的柑橘果实,经华南农业大学宁熙平副教授鉴定为柑橘 *Citrus reticulata* Blanco. 每次取样 50 个,并及时取皮阴干,小果不剥皮直接阴干. 干燥后测得平均含水量约为 10%,在 -10 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下密封保存.

1.2 方法

1.2.1 挥发油含量测定法 称取不同时期的柑橘干片约 30 g,粉碎,置于蒸馏装置的烧瓶中,加入 300 mL 蒸馏水和 1.5 g NaCl 加热至沸,并保持微沸 5 h,记录挥发油量. 每试验重复 3 次,取平均值.

1.2.2 石蜡切片法 取幼小的柑橘果实,用 FAA 固定,乙醇系列脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,美国 AO 切片机切片,切片厚 8 ~ 10 μm ,番红 - 固绿对染,中性树胶封片,Leica DMLB 显微镜观察并照相.

1.2.3 半薄切片法 取不同时期的柑橘果皮,分割成 0.5 mm $\times$ 0.5 mm $\times$ 1.0 mm 的小块,固定于体积分数为 5% 的戊二醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制, pH7.2) 中,低温 (4 $^{\circ}\text{C}$) 固定 4 h,缓冲液冲洗,用质量浓度为 10 g/L 的锇酸室温后固定 2 h,蒸馏水冲洗,系列乙醇脱水,环氧丙烷过渡,Epon812 包埋,奥地利 Reichert Jung 超薄切片机切片,切片厚 1 ~ 2 μm ,甲苯胺蓝 TBO 染色,Leica DMLB 显微镜观察并照相.

2 结果与分析

2.1 柑橘果实发育及挥发油积累规律

不同月份柑橘果实发育形态特征变化情况见表 1、图 1. 柑橘春季开花,5 月份花瓣凋落,果实很小,扁球形. 果皮呈深绿色,不容易剥离. 6—8 月果实逐渐增大,果皮仍为深绿色,多条棱明显可见. 9—10 月份柑橘生长速度最快,果皮渐渐变得光滑,颜色呈浅绿色. 11—12 月份果实生长缓慢,但果皮的黄色越来越多,逐渐取代绿色. 到翌年 1 月份果实变成金黄色或橙黄色,果皮薄极易剥离,明显可见透明的腺点.

表 1 不同月份柑橘果实发育形态特征变化
Tab.1 Changes in morphological features during *Citrus reticulata* fruit development in different months

月份	采样日期	颜色	性状
5	06-09	墨绿色	硬
6	06-29	墨绿色	硬
7	08-03	深绿色	硬
8	08-29	青色	微软
9	09-27	青色	微软
10	10-27	青色带黄	软
11	11-30	浅黄色	软
12	12-31	金黄色	软
1	01-10	橙黄色	松软

对每月定期采集的果实进行挥发油含量测定结果 (图 2) 表明,柑橘挥发油的含油率随着果实生长时间呈“S”型的变化趋势,具体可以分为 3 个时期: 1) 5—8 月为挥发油含量缓慢增长期,此阶段挥发油含油率很低,说明果实主要进行生长发育,只积累少量挥发油;2) 9—12 月初是挥发油含量的快速增长



图 1 柑橘果实发育过程

Fig. 1 The development of fruit of *Citrus reticulata*

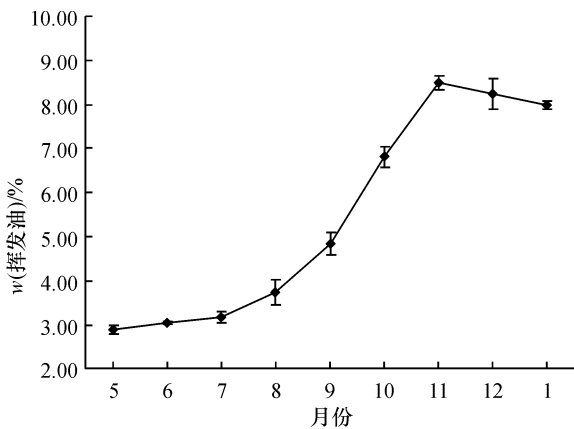


图 2 不同月份柑橘果实挥发油含量的变化规律

Fig. 2 The change of essential oil during *Citrus reticulata* fruit development in different months

期,特别是 10—11 月,增长速度尤为突出,到 11 月中旬时达到顶峰,说明此阶段果实主要积累挥发油; 3) 12 月初至翌年 1 月为挥发油缓慢下降期,此时柑橘果实慢慢成熟,到 1 月底完全成熟,挥发油的含量有所下降。

2.2 果实发育过程中的内部结构变化

从早期子房的纵切面可见,每个子房室里有 1 ~ 2 个胚珠发育(图 3a)。子房的横切面呈圆形,子房壁较厚(图 3b)。开花后,花萼和花冠枯萎脱落,雄蕊和

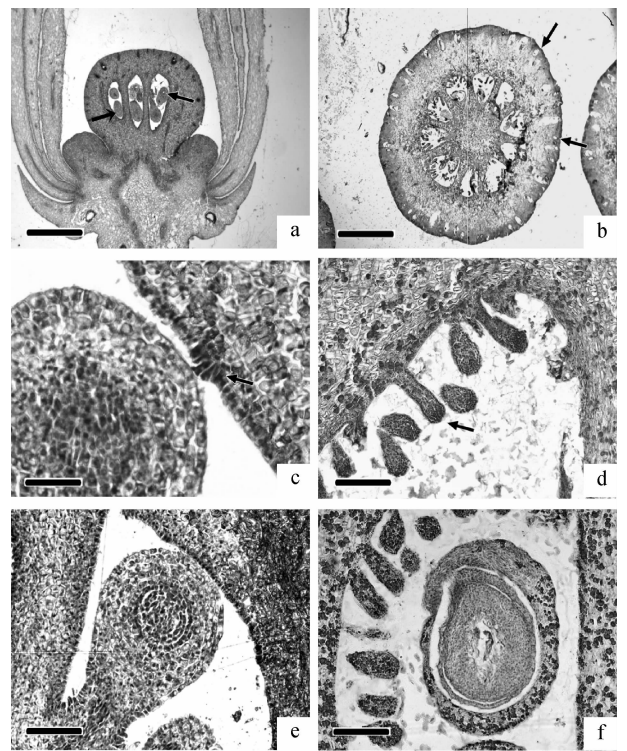
雌蕊的柱头也凋谢,子房壁发育成果皮。随着柑橘果实的发育,子房内壁的部分表皮细胞快速垂周分裂,形成几个紧挨着的窄长细胞群,此处的表皮细胞与周围其他表皮细胞区别较大,细胞体积增大,细胞质浓厚,染色较深,此为汁囊原基(图 3c)。这些细胞群和其下面的表皮细胞一起,进行平周分裂和垂周分裂,产生一个个向子房室内的柱状突起(图 3d)。随后汁囊原基细胞进一步发育为绒毛状的肉瓢,汁囊不断伸长膨大,最终发育成柑橘的可食用部位。

柑橘的胚珠是由胎座表皮下层细胞多次分裂,形成一团突出的细胞,形成胚珠原基,胚珠原基逐步发育分化出内、外 2 层珠被及发达的珠心组织(图 3e)。大多数的胚珠败育(图 3f),只有少数胚珠最终形成种子(图 3e)。

2.3 果皮分泌囊的发育过程

分泌囊是挥发油产生的主要部位。从柑橘果皮表面上肉眼可看到很多呈疣状突起的亮点(图 1),其内部即为分泌囊。成熟果实横切面上分泌囊排列为一圈,其大小不等(直径为 100 ~ 300 μm),分布的部位深浅不一(图 4b)。根据分泌囊发育过程中细胞形态的变化特点判断,可将分泌囊的发育过程分为 4 个阶段,

即分泌囊原始细胞阶段、分泌囊胞间隙形成阶段、分泌囊空腔扩大阶段和分泌囊成熟阶段。



a: 柑橘早期子房的纵切面, 每个子房室里有 1~2 个胚珠(箭头); b: 幼果的横切面呈圆形, 分泌囊(箭头)分布在外果皮, 大小、深浅不一; c: 内果皮表面突起形成汁囊原基(箭头), 其细胞染色较深; d: 汁囊形成柱状突起(箭头); e: 可育的胚珠; f: 胚珠败育。a、b 标尺 = 1 mm; c 标尺 = 100 μm; d、e、f 标尺 = 200 μm。

图 3 柑橘果实的石蜡切片

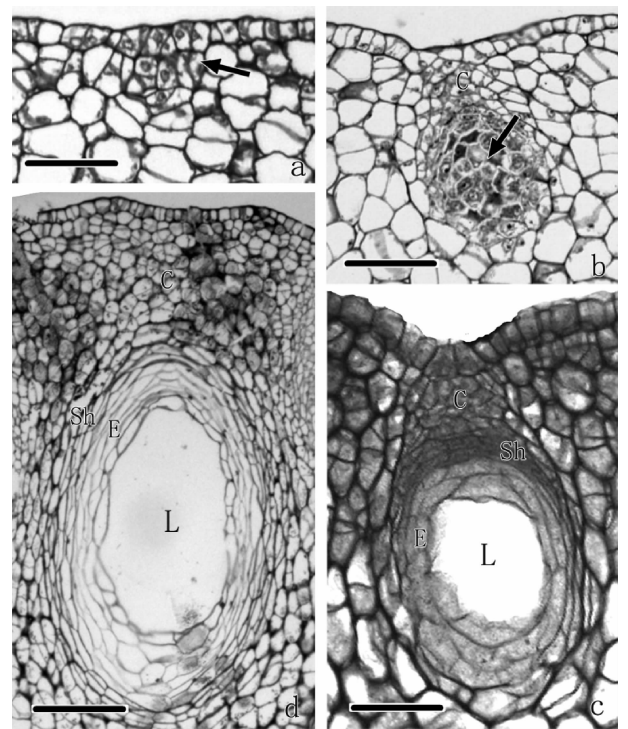
Fig. 3 Paraffin sections of *Citrus reticulata* fruit

分泌囊原始细胞阶段: 由于细胞分裂不均匀, 形成多个由大小不等的数十个细胞组成的细胞团, 其形态呈圆形或椭圆形, 细胞彼此镶嵌。与周围细胞相比, 分泌囊原始细胞体积较小, 但细胞核大, 细胞质浓厚(图 4a)。

分泌囊胞间隙形成阶段: 随着分泌囊发育, 原始细胞团逐渐形成 2 个区, 即圆锥状的帽区和圆球形的球区。在球区 2~3 个中央细胞之间的细胞壁局部膨胀, 细胞的角隅处出现裂缝, 此时, 中央细胞的细胞质依然浓厚, 但细胞核逐渐移到细胞边缘。之后, 裂缝沿着细胞壁扩展, 在中央细胞间形成由 4~5 个细胞围绕的小腔隙(图 4b)。

分泌囊空腔扩大阶段: 此期, 上皮细胞的细胞质逐渐变淡, 出现液泡化。部分上皮细胞与相邻细胞间发生分离, 细胞逐渐破毁。上皮细胞的溶解可逐渐由内向外进行, 最终仅仅 1~2 层上皮细胞保存。通过这一系列变化, 导致了腔隙进一步扩大。帽区呈圆锥状, 由薄壁细胞构成, 与表皮细胞相连, 果皮往往在此处发生内陷(图 4c)。

分泌囊成熟阶段: 随着果实的生长, 分泌腔继续增大, 一般当直径达 200 μm 左右时, 分泌囊即达成成熟阶段, 明显分为球区和帽区。其中球区含有由 3~6 层扁平切向延长的上皮细胞包围的分泌腔, 其中还可见到破毁的上皮细胞。上皮细胞外围又由 5~8 层更为扁平的鞘细胞包围, 液泡化程度较上皮细胞的高(图 4d)。



a: 原始细胞阶段, 形成细胞团; b: 胞间隙形成阶段, 分成帽区(C)和球区, 后者细胞群中形成胞间隙(箭头); c: 空腔扩大阶段, 上皮细胞(E)和鞘细胞(Sh)切向延长, 靠近空腔(L)的上皮细胞破毁; d: 成熟阶段, 空腔(L)进一步扩大, 上皮细胞(E)恢复完整, 外围由 5~8 层更为扁平的鞘细胞(Sh)包围。a、b、c 中, 标尺 = 40 μm; d 中, 标尺 = 100 μm。

图 4 分泌囊的发育过程

Fig. 4 Developmental process of secretory cavity

3 讨论与结论

陈皮是柑橘的干燥成熟果皮^[1], 有效成分挥发油主要产生和储藏于果皮的分泌囊中^[14]。通过对柑橘的果皮结构组成进行详细观察, 发现柑橘果皮中分泌囊通常分布在外果皮中, 成一轮排列且深浅不一。中果皮由大型的薄壁细胞组成, 间有维管束分布。内果皮形成 8~12 个果瓣, 内有汁囊和 1~2 个种子。从古代开始, 陈皮的净选就有“去瓢、去赤脉、去白”, 但也有“留白”之说^[15]。如今, 人们在制作陈皮的时候, 往往把果瓣丢弃, 保留整个果皮晒干后密封保存^[16]。我们研究发现柑橘的中果皮主要由薄壁细胞组成, 含水量较多, 容易发霉, 且无分泌囊形成, 因此不宜作为陈皮的原料。而外果皮分布有丰富的分泌囊, 其内含有大量的挥发油和其他有效成分, 应该是陈皮的最

佳原料部位,将其单独晒干,不仅容易干透,又有利于陈皮的保存和提高陈皮的药效。

在生产实践中,由于果农在采收时节,不论果实大小和颜色,一律采下剥皮晒干,直接出售到药材市场。这样就导致了中药陈皮的质量参差不齐,药效降低。因此,制定科学的柑橘果实采收的形态和结构指标十分重要。对每月定期采集的果实进行挥发油含量测定分析,结果表明,柑橘果实挥发油的含油率随着果实发育呈“S”型的变化趋势:先缓慢增加,再快速增长到顶峰,最后缓慢下降。这结果与先前研究广佛手挥发油随果实发育变化趋势^[14]一致。说明具有分泌囊的柑橘属植物的果实一开始先进行多糖的积累,果实迅速增大,果皮中挥发油积累很少。在成熟的过程中,果实中的物质开始转化成挥发油,果皮中含油率不断增高,最终到达顶峰。因此,提取柑橘挥发油的最佳时机是挥发油含量最高的时期——柑橘将要成熟的11月末,此时柑橘果实的颜色是浅黄色。但是柑橘成熟之后挥发油含量的下降并不十分明显,考虑到综合的经济效益,柑橘完全成熟时果皮最重,果皮颜色为金黄色,此时采收也是较佳时期。柑橘成熟以后,果皮颜色慢慢变成暗黄色,其含油率再次下降。究其原因此时果实分泌囊已进入衰老阶段,不再进行挥发油的积累,反而逐渐向空气中散发挥发油。由此可见,果实颜色为浅黄色和金黄色时,挥发油含量最高,此外部形态特征可做为陈皮采收时期的外部特征依据。然而,由于果实的外部形态特征容易受外界环境的影响,而挥发油的变化规律与分泌囊空腔的发育程度和结构特征密切相关^[14]。本研究发现,柑橘的分泌囊发育过程分为4个阶段:原始细胞阶段、胞间隙形成阶段、空腔扩大阶段和成熟阶段,其发育方式为裂溶生,为证明柑橘属植物的分泌囊空腔的发生方式均为裂溶生型^[11-13]提供新的细胞学资料。随着分泌囊发育,空腔逐渐扩大,挥发油含量也越来越高。当分泌囊发育成熟,其空腔直径平均达到200 μm 左右时,空腔几乎达到最大直径,挥发油含量也达到顶峰,此期,果实颜色正好为浅黄色或金黄色。因此,分泌囊空腔的发育程度和结构特征同样可作为果实适时采收的内部结构指标。

结合果实发育的颜色变化、挥发油含油率的变化规律和分泌囊空腔的结构发育特征,可为陈皮适时采收提供外部形态、内部结构和植物化学三方面的综合指标。我们认为陈皮的最佳采收时期应为11月末到12月初,此时果实颜色为浅黄色或金黄色,分泌囊空腔平均直径最大(200 μm 左右),挥发油含油率最高,达到8.2%~8.5%。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北

京:中国医药科技出版社, 2010: 176-177.

- [2] FAHN A. Secretory tissue in plants[M]. London: Academic Press, 1979: 176-209.
- [3] BENNETT R N, WALLSGROVE R M. Transley review No. 72: Secondary metabolites in plant defence mechanisms[J]. New Phytol, 1994, 127 (4): 617-633.
- [4] TUMER G W. Comparative development of secretory in the tribes Amorphaeae and Psoraleae (Leguminosae: Papilionoideae)[J]. Amer J Bot, 1986, 73 (8): 1178-1192.
- [5] 吕洪飞. 金丝桃属植物的分泌结构及其与金丝桃素类物质的相关性研究[D]. 西安:西北大学, 2001.
- [6] 蔡周权, 代勇, 袁浩宇. 陈皮挥发油的药效学实验研究[J]. 中国药业, 2006, 15 (13): 29-30.
- [7] 钱士辉, 王侑先, 亢寿海, 等. 陈皮提取物体外抗肿瘤作用的研究[J]. 中药材, 2002, 26 (10): 744-745.
- [8] HEINRICH G. Licht-und elektronenmikroskopische untersuchungen zur genese der exkrete in den lysigenen exkretäumen von *Citrus medica*[J]. Flora, 1966 (156): 451-456.
- [9] HEINRICH G. Elektrinenmikroskopische beobachtungen zur entstehungsweise der exkretbehälter von *Ruta graveolens*, *Citrus Limon* and *Poncirus trifoliata*[J]. Öesterr Bot Z, 1969, 117(4/5): 397-403.
- [10] TURNER G W, BERRY A M, GIFFORD E M. Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. F. and a re-evaluation of the lysigenous gland concept[J]. Inter J Plant Sci, 1998, 159 (1): 75-88.
- [11] LIANG Shejian, WANG Haiyang, YANG Ming, et al. Sequential actions of pectinases and cellulases during secretory cavity formation in *Citrus* fruits [J]. Trees-Struct Funct, 2009, 23 (1): 19-27.
- [12] CHEN Zhiwei, HU Yongzhou, WU Haohao, et al. Synthesis and biological evaluation of flavonoids vasorelaxant agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14 (15): 3949-3952.
- [13] LIU Peiwei, LIANG Shejian, YAO Nan, et al. Programmed cell death of secretory cavity cells in fruits of *Citrus grandis* cv. Tomentosa is associated with activation of caspase 3-like protease[J]. Trees-Struct Funct, 2012, 26 (6): 1821-1835.
- [14] LIANG Shejian, WU Hong, LUN Xuan, et al. Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle[J]. J Integra Plant Biol, 2006, 48(5): 573-583.
- [15] 王其献, 朱满洲, 庞国兴, 等. 陈皮炮制的历史沿革研究[J]. 中药材, 1998, 21(3): 127-129.
- [16] 杨春雨, 王继容, 朱平, 等. 甜蜜陈皮制作研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 134-138.

【责任编辑 李晓卉】

<http://xuebao.scau.edu.cn>