

水杨酸延缓猕猴桃果实采后衰老与精氨酸分解代谢的关系

苏金龙¹, 王小璐¹, 李素方¹, 李姚瑶¹, 王 婷², 高 慧^{1*}

(1 西北大学 食品科学与工程学院, 西安 710069; 2 西安市灞桥区农产品质量安全检验检测中心, 西安 710038)

摘 要: 采用 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸(SA)处理‘徐香’猕猴桃果实, 测定果实在常温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 贮藏过程中失重率、硬度、多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性和丙二醛(MDA)含量, 以及精氨酸分解代谢相关酶活性和物质含量的变化, 探究 SA 处理延缓猕猴桃果实采后衰老的作用机理。结果显示: (1) 与对照(不处理)相比, 贮藏第 20 天时, SA 处理果实的失重率较对照降低 13.77%, 硬度较对照提高 78.25%, 表明 SA 处理有效抑制了猕猴桃果实硬度和鲜重的下降。(2) 贮藏第 20 天时, SA 处理果实的 PG 活性($13.61 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)显著低于对照($16.77 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); 猕猴桃果实中的 MDA 含量在贮藏第 15 天时差异最大, SA 处理较对照降低 33.40%。(3) 与对照相比, 在贮藏过程中 SA 处理显著促进了果实中鸟氨酸的累积以及精氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶活性的升高, 同时抑制了多胺氧化酶和二胺氧化酶活性, 并显著提高了猕猴桃果实中多胺(腐胺、精胺、亚精胺)的累积。(4) 与对照相比, SA 处理显著诱导了猕猴桃果实中一氧化氮合酶活性的增强, 并促进了果实中一氧化氮(NO)的累积, 且在贮藏第 5 天以后果实中的 NO 含量显著高于对照。研究发现, SA 能够显著延缓常温下猕猴桃果实的采后衰老进程, 这可能与 SA 触发了果实中精氨酸分解代谢的不同途径有关。

关键词: 猕猴桃; 采后衰老; 水杨酸; 精氨酸分解代谢

中图分类号: Q945.6⁺6

文献标志码: A

Relationship between Salicylic Acid Delaying Postharvest Senescence and Arginine Catabolism in Kiwifruit

SU Jinlong¹, WANG Xiaolu¹, LI Sufang¹, LI Yaoyao¹, WANG Ting², GAO Hui^{1*}

(1 College of Food Science and Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2 Quality and Safety Inspection and Monitoring Center for Agricultural Products, Xi'an 710038, China)

Abstract: ‘Xuxiang’ kiwifruit were pretreated with $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ salicylic acid (SA) and then weight loss, firmness, polygalacturonase (PG) activity, malondialdehyde (MDA) content, as well as enzyme activities and substances contents related to arginine catabolism were measured during ambient storage (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ for investigating the mechanism of SA on delaying postharvest senescence of kiwifruit. The results showed: (1) weight loss and firmness of SA treated fruit were 13.77% lower and 78.25% higher than that of control at 20 d, indicating that SA treatment effectively inhibited the decrease of firmness and fresh weight. (2) At 20 d, the PG activity of SA-pretreated fruit ($13.61 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) was significantly lower than that of the control ($16.77 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); The difference of MDA content in kiwifruit reached the

收稿日期: 2020-06-30; 修改稿收到日期: 2020-10-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31401550); 西安市科技计划(20193042YF030NS030)

作者简介: 苏金龙(1994—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为果蔬采后生物学。E-mail: jinlongSU8028@163.com

* 通信作者: 高 慧, 教授, 博士, 主要研究方向为果蔬采后生物学。E-mail: gaohui0815@nwu.edu.cn

maximum at 15 d of storage, and the MDA content of SA treatment was 33.40% lower than that of control. (3) Compared to control, SA treatment markedly improved the content of ornithine and the activities of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase. Meanwhile, SA treatment inhibited the activities of polyamine oxidase and diamine oxidase, and prominently increased the accumulation of polyamines (putrescine, spermine, spermidine) in kiwifruit during the whole storage. (4) In comparison with control fruit, SA treatment notably induced the enhancement of nitric oxide synthase activity in kiwifruit and promoted the accumulation of nitric oxide (NO) in fruit, and the content of NO in fruit was significantly higher than that of control after the 5 d of storage. The above results showed that SA-mediated delay of postharvest senescence in kiwifruit at ambient storage, which may be associated with its trigger of different pathways of arginine catabolism.

Key words: kiwifruit; postharvest senescence; salicylic acid; arginine catabolism

猕猴桃原产中国,最早以‘苌楚’之名出现在《诗经》中。猕猴桃果实风味独特,营养成分多样,尤以维生素 C 含量高而著称,是消费者最喜爱的时令水果之一。然而,作为典型的呼吸跃变型果实,猕猴桃采摘后有明显的后熟过程,常温下更是极易迅速衰老,并表现出失水萎蔫、软化、发酵、腐烂变质等衰老症状,加之产期集中,往往造成很大的经济损失^[1]。因此,人们一直致力于开发适宜的外源控制措施,以延长其贮运保鲜期。

水杨酸(SA)是植物体内广泛存在的一种小分子酚酸,具有调节植物生长发育、成熟衰老和逆境胁迫等生理效应^[2]。研究表明,SA 参与了对猕猴桃果实采后衰老进程的调控。曹毛毛等^[3]发现,随果实衰老程度的不断加剧,猕猴桃果实组织中内源 SA 含量逐渐降低,且在贮藏的中后期与果肉硬度呈显著正相关关系。Zhang 等^[4]也得出了相似的研究结论。而外源 SA 及其类似物乙酰 SA 处理则可有效延缓猕猴桃果实的后熟衰老,延长贮运保鲜期^[4-6]。在猕猴桃果实上,目前已明确 SA 延缓衰老的作用机理主要包括:抑制乙烯生物合成、减少超氧化物自由基生成、促进内源 SA 积累和提高组织抗氧化活性等^[3-6]。

精氨酸是植物体内重要的氮素储藏营养物质,同时也是多胺(PAs)、一氧化氮(NO)等生物合成的前体物质,而 PAs 和 NO 则作为信号分子,参与植物的众多生理过程^[7-8]。基于此,精氨酸分解代谢引起了人们的关注。目前认为,精氨酸在植物中的积极作用一定程度上与其分解代谢的发生并促进 PAs、NO 等信号分子的生物合成密切相关。例如,在番茄果实上的研究显示,低温胁迫明显刺激了精氨酸分解代谢关键酶,包括精氨酸酶、精氨酸脱羧酶(ADC)和一氧化氮合酶(NOS)的活化,促进了精氨酸向其分解代谢的转变,进而提高了果实中 PAs 和

NO 水平,增强了果实对低温伤害的防御能力^[9]。但从精氨酸分解代谢入手探究 SA 延缓猕猴桃果实采后衰老的机制还鲜有报道。本试验以‘徐香’猕猴桃为试材,研究 SA 处理对猕猴桃果实采后衰老与精氨酸分解代谢的关系,旨在进一步丰富猕猴桃果实采后理论,同时为推动 SA 处理在生产实践中应用提供一定的技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

供试‘徐香’猕猴桃果实采自陕西省西安市一个商业果园,果实于商业成熟度采摘,选择大小、形状均匀,无机械损伤的果实进行试验。将挑选好的猕猴桃果实随机分为两组(120 个/组),其中一组以蒸馏水浸泡 10 min,作为对照;另一组以预实验筛选的 1.0 mmol · L⁻¹ SA(用于筛选的 SA 浓度范围为 0、0.5、1.0 和 2.0 mmol · L⁻¹)溶液浸泡 10 min,作为处理组。晾干表面水分后,将果实装入低密度聚乙烯保鲜袋(8 个/袋),并于(23±2)℃下贮藏 20 d。贮藏期间每隔 5 d 取样测定果实失重率和硬度,并收集果肉组织,经液氮冷冻研磨后,存放于-80℃超低温冰箱中,用于后期指标的测定。每个处理均设置 3 个重复。

1.2 指标测定

1.2.1 失重率和硬度 果实失重率(%)采用称重法测定;果实硬度采用硬度测试仪(GY-3 型果实硬度计,8 mm 探头)测定,单位为 N。

1.2.2 多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性 参考 Sethu 等^[10]的方法测定 PG 活性。取 1 g 果肉,加入 5 mL 含 6%(W/V)NaCl 的 50 mmol · L⁻¹ pH 5.5 醋酸钠缓冲液匀浆后,8 000×g、4℃离心 15 min 后,取上清液为粗酶提取液。以 1 mL 50 mmol · L⁻¹ pH 5.5 醋酸钠缓冲液、0.5 mL 1%半乳糖醛酸溶液和 0.5 mL 粗酶提取液构建反应体系,混匀后于 37℃

温浴 1 h。此后,在反应体系中进一步加入 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,再次混匀,于沸水浴煮沸 5 min,快速冷却后于 540 nm 处测定吸光值。PG 活性以每小时每克果肉组织催化多聚半乳糖醛酸生成半乳糖醛酸的质量表示($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)。

1.2.3 丙二醛(MDA)含量 参考 Dhindsa 等^[11]的方法并略作修改后测定 MDA 含量。取 2 g 果肉,加入 6 mL 含 0.5%(W/V)硫代巴比妥酸的 10% 三氯乙酸溶液匀浆后,混合物于沸水浴煮沸 10 min,迅速冷却后,4 000×g 离心 15 min。取上清液于 450、532 和 600 nm 处测定吸光值 OD_{450} 、 OD_{532} 和 OD_{600} ,并按公式计算 MDA 含量 $[6.45 \times (OD_{532} - OD_{600}) - 0.56 \times OD_{450}]$,单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2.4 精氨酸和鸟氨酸含量 精氨酸和鸟氨酸含量参考 Micallef 等^[12]的方法略作修改后提取。取 2 g 果肉,加入 4 mL、3%(W/V)5-磺基水杨酸溶液匀浆后,12 000×g、4℃离心 10 min,取上清液用 4 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调 pH 至 7,再经 0.45 μm 膜过滤器过滤。收集滤液,并根据 Waters AccQ·FluorTM 氨基酸衍生试剂盒说明书进行衍生。

采用高效液相色谱法对精氨酸和鸟氨酸进行定量分析。液相色谱配备氨基酸专用色谱柱(4 μm)和二极管阵列(DAD)检测器。流动相由乙腈(溶剂 A)、超纯水(溶剂 B)和缓冲液(溶剂 C)组成,洗脱梯度为:0 min 100% A;0.5 min 99% A:1% B;18 min 95%:5% B;19 min 91% A:9% B;29.5 min 83% A:17% B;33 min 60% B:40% C;36 min 100% A;65 min 60% B:40% C;100 min 60% B:40% C。流速为 1 mL·min⁻¹,柱温 30℃,检测波长 248 nm,进样量 10 μL 。在相同色谱条件下,以精氨酸和鸟氨酸标准品绘制标准曲线计算果实中精氨酸和鸟氨酸含量,单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2.5 精氨酸脱羧酶(ADC)和鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性 ADC 和 ODC 活性参考 Zhang 等^[9]的方法测定。取 2 g 果肉,加入 5 mL 含 0.1 mmol·L⁻¹ PMSF、1 mmol·L⁻¹ 吡哆醛磷酸盐(PLP)、5 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇(DTT)、5 mmol·L⁻¹ EDTA、25 mmol·L⁻¹ 抗坏血酸和 1% PVPP 的 100 mmol·L⁻¹ pH 8.0 磷酸钠缓冲液匀浆后,4℃、12 000×g 离心 20 min,取上清液作为粗酶提取液。取 1.5 mL 10 mmol·L⁻¹、pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液(含 5 mmol·L⁻¹ EDTA、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PLP 和 5 mmol·L⁻¹ DTT)和 0.3 mL 粗酶提取液构建反应体系,反应开始时加 0.2 mL 25 mmol·L⁻¹ 精氨酸(或鸟氨酸)用于测定 ADC

活性(或 ODC 活性)。混匀,37℃温浴 1 h 后,加入磷酸溶液终止反应。最后,将反应混合液于 5 000×g 离心 10 min,取上清在 254 nm 处测定吸光值。ADC 和 ODC 活性以每克果肉每分钟内吸光值变化 0.01 为一个酶活单位(U),表示为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2.6 多胺(PAs)含量 猕猴桃果实中的 PAs 主要为腐胺(Put)、精胺(Spd)和亚精胺(Spm)3 种。PAs 含量参考 Palma 等^[13]的方法略作修改后提取、衍生和测定。取 2 g 果肉,加入 4 mL 5%(W/V)经预冷的高氯酸溶液匀浆后,12 000×g、4℃离心 20 min。取 2 mL 上清液,加入 2 mL 2 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液和 10 μL 苯甲酰氯,涡旋 20 s,37℃温浴 30 min,之后再加入 4 mL 饱和 NaCl 溶液,混匀。以 2 mL 乙醚萃取苯甲酰化后的 PAs,氮吹仪吹干,残留物用 500 μL 甲醇(色谱级)溶解,过 0.22 μm 滤膜后备用。采用高效液相色谱法对 Put、Spd 和 Spm 进行定量分析。液相色谱配备 DAD 检测器和 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 64% 甲醇,柱温 30℃,流速为 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 20 μL 。在相同色谱条件下,以苯甲酰化的 Put、Spd 和 Spm 标准品绘制标准曲线计算果实中 Put、Spd 和 Spm 含量,单位为 nmol·g⁻¹。

1.2.7 多胺氧化酶(PAO)和二胺氧化酶(DAO)活性 参考 Palma 等^[13]的方法测定 PAO 和 DAO 活性。取 2 g 果肉,加入 5 mL 100 mmol·L⁻¹、pH 6.5 的磷酸盐缓冲液匀浆后,12 000×g、4℃离心 20 min,取上清液作为粗酶提取液。以 2.0 mL 100 mmol·L⁻¹ pH 6.5 磷酸盐缓冲液、0.2 mL 的颜色试剂(含 25 μL N,N-二甲基苯胺和 10 mg·100 mL⁻¹ 4-氨酰安替比林)、0.1 mL 250 U·mL⁻¹ 辣根过氧化物酶和 0.5 mL 粗酶提取液构建反应体系。加入 0.2 mL 20 mmol·L⁻¹ Put(或 Spd 和 Spm)用于 DAO(或者 PAO)活性测定,混匀后于 550 nm 测定吸光度的变化,PAO 和 DAO 活性以每克果肉每分钟内吸光值变化 0.01 为一个酶活单位(U),表示为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2.8 NO 含量和 NOS 活性 参考 Liu 等^[14]的方法并略作修改后测定 NO 含量。取 2 g 果肉,加入 5 mL 100 mmol·L⁻¹、pH 7.0 含 0.6% PVPP 的预冷磷酸缓冲液匀浆后,10 000×g、4℃离心 15 min。取 1 mL 上清液与等量的格里斯试剂 A 和 B 混合,在避光条件下 25℃温浴 30 min,随后于 540 nm 处测定吸光值。NO 含量根据 NaNO₂ 标准曲线计算,

单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

同时,采用 Lea 等^[15]的方法测定 NOS 活性。取 2 g 果肉,加入 3 mL 含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、 $320 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胃蛋白酶抑制剂、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟(PMSF)和 0.5% PVPP 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液匀浆后,4 ℃、 $10\,000 \times g$ 离心 10 min。取 400 μL 上清液,加入 600 μL 含 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄素腺嘌呤二核苷酸、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄素核苷酸、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH、 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙和 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 精氨酸的 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液,混匀后于 37 ℃ 温浴 30 min,之后加入含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 200 μL $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 5.5 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液作为除氧停止液,随后再加入 400 μL 等体积的格里斯试剂 A 和 B,避光反应 15 min 后,于 540 nm 处测量吸光值。NOS 活性定义为每分钟每克果肉产生 NO 的量,单位表示为 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3 数据统计

采用 Origin 8.5 软件进行作图分析,SPSS 20 软件对数据进行多重差异显著性检验, $P < 0.05$ 被认为处理和对照之间在 0.05 水平具有显著性差异,用星号(*)进行标记。

2 结果与分析

2.1 SA 处理对贮藏期猕猴桃果实失重率、硬度和 PG 活性及 MDA 含量的影响

随贮藏时间的延长,对照和 SA 处理猕猴桃果实的失重率均逐步上升,但 SA 处理延缓了这一过程,并在贮藏 10~20 d 时差异显著,在贮藏末期时,SA 处理果实的失重率较对照显著降低 13.77%(图 1,A)。贮藏期间果实硬度的损失主要发生在贮藏中后期,SA 处理有利于果实硬度的保持,SA 处理始终高于相应对照;在贮藏第 15 和 20 天时,SA 处理果实的硬度分别显著高于对照果实 49.32%和 78.25%(图 1,B)。

同时,对照和 SA 处理猕猴桃果实的 PG 活性和 MDA 含量均随着贮藏时间呈逐渐增加趋势,但 SA 处理果实始终低于相应对照。其中,对照果实的 PG 活性随贮藏期延长而持续上升,在贮藏第 20 天时达到最大值($16.77 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),而 SA 处理果实的 PG 活性在贮藏 0~15 d 呈上升趋势变化,之后则保持平稳,在贮藏第 20 天时为 $13.61 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,与对照差异显著(图 1,C);对照果实的 MDA 含量随贮藏期延长而不断增加,在贮藏第 15 天时与 SA 处理差异最大,较 SA 处理果实显著高 1.5 倍(图 1,D)。

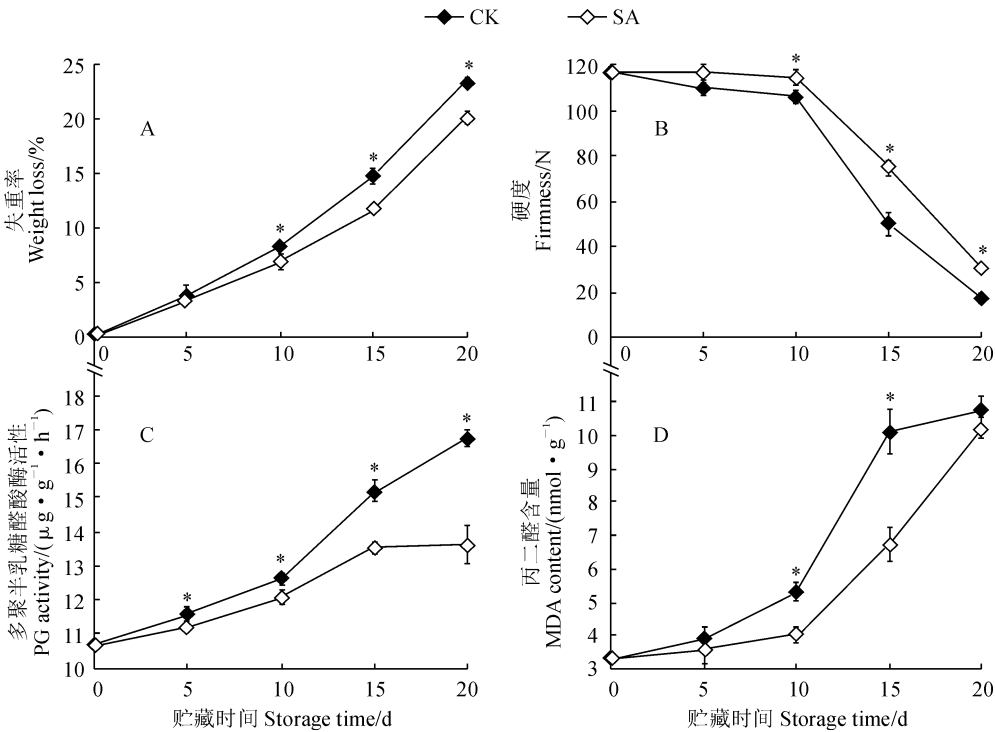


图 1 SA 处理下猕猴桃果实失重率、硬度、PG 活性及 MDA 含量的变化

Fig. 1 The weight loss, firmness, PG activity and MDA content in kiwifruit under SA treatment during storage

2.2 SA 处理对贮藏期猕猴桃果实精氨酸和鸟氨酸含量及 ADC 和 ODC 活性的影响

随着贮藏时间延长,对照和 SA 处理猕猴桃果实精氨酸含量基本上均呈先稍有升高后大幅度降低的趋势,且变化主要发生在贮藏的中后期(10~20 d),它们在贮藏第 20 天时比采收当天(0 d)分别降低 38.0%和 36.60%,且两者间除第 5 天外均无显著差异(图 2,A)。而对照和 SA 处理猕猴桃果实中鸟氨酸的含量相较采收当天总体呈逐渐上升趋势变化,它们在贮藏第 20 天时比采收当天分别升高 33.33%和 36.36%;但整个贮藏期内,SA 处理果实的鸟氨酸含量始终显著高于同期对照果实(图 2,B)。

同时,随贮藏期延长,对照和 SA 处理猕猴桃果实的精氨酸脱羧酶(ADC)活性均逐渐降低,在贮藏第 20 天时,对照和 SA 处理果实的 ADC 活性较采收当天分别降低 45.65%和 41.24%;整个贮藏期内,SA 处理果实 ADC 活性始终显著高于同期对照,有效延缓了 ADC 活性的下降,其在贮藏第 20 天时较对照高 1.08 倍(图 2,C)。如图 2,D 所示,对照和 SA 处理猕猴桃果实鸟氨酸脱羧酶(ODC)均随着贮藏时间先升后降,并不同程度地高于采收当天,尤其是贮藏中后期增加更明显,在贮藏第 20 天时,两者果实的 ODC 活性较采收当天分别升高 64.05%和 73.85%;SA 处

理诱导增强了果实 ODC 活性,SA 处理果实的 ODC 活性在贮藏期间始终高于同期对照,且除第 5 天外均与同期对照差异显著,并在第 10 和 15 天的差异最大,分别较对照果实高 1.24 和 1.17 倍。

2.3 SA 处理对贮藏期猕猴桃果实 PAs 含量及 DAO 和 PAO 活性的影响

对照和 SA 处理猕猴桃果实 Put、Spd 和 Spm 含量在贮藏期间均大幅度增加,而 SA 处理始终高于同期的对照,其两者差异大多达到显著水平。对照和 SA 处理果实 Put 含量呈先升后降的趋势,并在第 15 天时达到峰值,此时对照和 SA 处理分别较采收当天分别增加了约 5.26 倍和 5.84 倍,而 SA 处理显著高于对照 10.93%(图 3,A);对照和 SA 处理果实的 Spd 和 Spm 含量均随贮藏期延长而持续增加,在贮藏末期时达到最大值,此时两者的 Spd 含量分别是采收当天 2.43 倍和 2.73 倍,而它们的 Spm 含量分别是采收当天 1.63 倍和 2.03 倍,SA 处理果实的 Spd 和 Spm 含量分别较对照显著提高 12.45%和 24.89%(图 3,B、C)。即猕猴桃果实 Put、Spd 和 Spm 含量随着贮藏时间而增加,而 SA 处理进一步促进了果实 Put、Spd 和 Spm 的累积。

同时,随贮藏期延长,对照和 SA 处理猕猴桃果实的多胺氧化酶(PAO)和二胺氧化酶(DAO)活性均

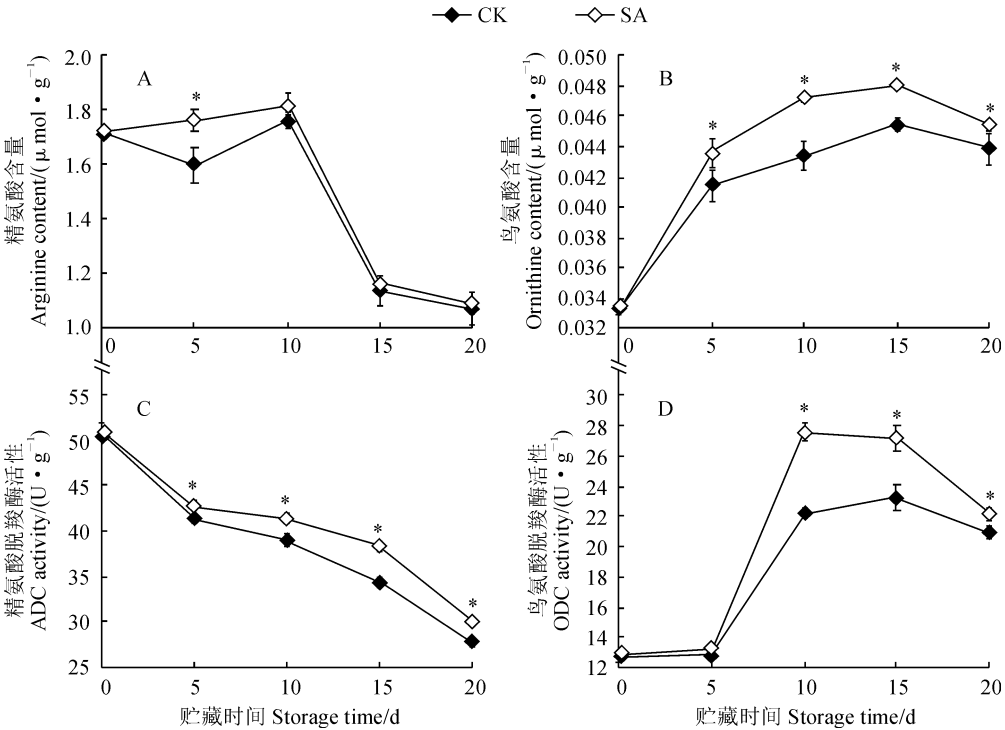


图2 SA 处理下猕猴桃果实精氨酸、鸟氨酸含量及其脱羧酶 ADC、ODC 活性在贮藏期间的变化

Fig.2 The contents of arginine and ornithine and the activities of ACD and ODC in kiwifruit under SA treatment during storage

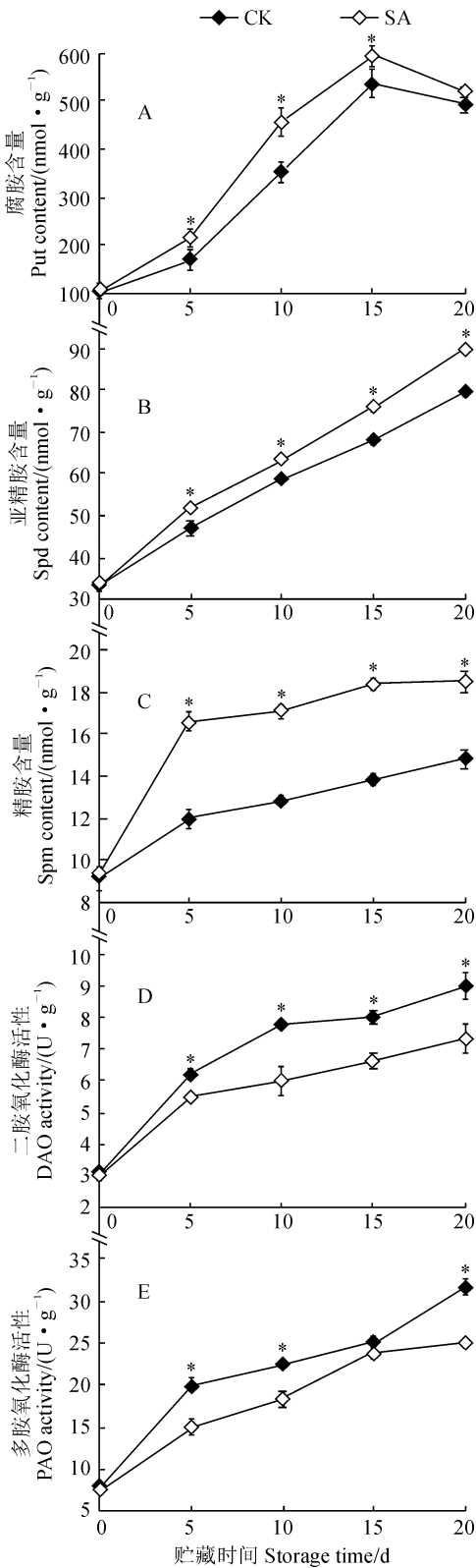


图 3 SA 处理下猕猴桃果实 Put、Spd 和 Spm 含量及 DAO 和 PAO 活性在贮藏期的变化
Fig. 3 The contents of Put, Spd and Spm and the activities of DAO and PAO in kiwifruit under SA treatment during storage

逐渐升高,SA 处理增速较小,贮藏第 20 天时 SA 处理果实的 DAO 和 PAO 活性分别是采收当天的 2.44 倍和 3.33 倍,而对照果实的 DAO 和 PAO 活性分别是采收当天的 3.00 倍和 4.22 倍;在整个贮藏期内,SA 处理果实的 DAO 和 PAO 活性始终低于同期对照,且几乎大多具有显著差异,SA 处理果实的 DAO 和 PAO 活性在贮藏第 20 天时分别较对照果实显著降低 18.61% 和 21.05%(图 3,D,E)。可见,对照和 SA 处理果实的 DAO 和 PAO 活性均随着贮藏时间大幅增加,但 SA 处理显著延缓了这一过程。

2.4 SA 处理对贮藏期猕猴桃果实 NO 含量和 NOS 活性的影响

对照猕猴桃果实的 NO 含量在贮藏前 5 d 迅速升高,之后趋于稳定;SA 处理提高了果实的 NO 水平,除贮藏第 5 天外,SA 处理果实的 NO 含量始终显著高于对照,在贮藏第 20 天时比同期对照显著提高 14.79%(图 4,A)。同时,对照果实的一氧化氮合成酶(NOS)活性在贮藏的前 10 d 逐渐升高,之后快速降低并在贮藏末期趋于稳定;与对照有所不同,SA 处理果实的 NOS 活性在贮藏的前 5 d 呈上升趋势,之后保持稳定直到贮藏的第 15 天,随后逐渐降低。在整个贮期内,SA 处理果实的 NOS 活性均显著高于对照果实,其中以第 15 天两者差异最大,SA

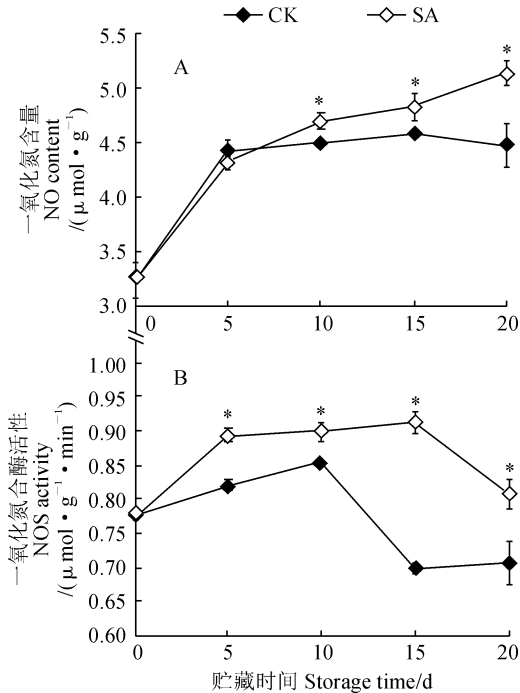


图 4 SA 处理下猕猴桃果实 NO 含量及 NOS 活性在贮藏期的变化
Fig. 4 The NO content and NOS activity in kiwifruit under SA treatment during storage

处理果实的 NOS 活性较对照高 1.31 倍(图 4,B)。可见,在猕猴桃果实贮藏过程中,SA 处理显著增强了果实的 NOS 活性,从而使 NO 含量显著增加。

3 讨论

失水萎蔫、软化、细胞膜稳定性下降等都是猕猴桃果实后熟衰老的主要表现^[1]。本研究中,1.0 mmol·L⁻¹ SA 处理有效减缓了‘徐香’猕猴桃果实失重,抑制了果肉硬度的下降以及 PG 活性和 MDA 含量的增加,进而延缓了果实的后熟衰老进程,这与前人的研究结果一致^[4,6]。

PAs 是精氨酸分解代谢的重要产物,具有清除自由基,稳定细胞膜结构和强化细胞壁等作用,对植物的成熟、衰老也表现出积极的延缓效应^[16-17]。Tiecher 等^[15]的研究表明,较高的内源 PAs 水平有利于番茄果实的衰老延缓,张秋明等^[18]在柑桔上也得出了相似的结论。Jhalegar 等^[19]也指出,外源 Spm 和 Spd 处理能显著减缓猕猴桃果实贮藏期间的呼吸速率和乙烯产生,抑制 PG 和脂氧合酶活性的上升,进而延长果实采后贮藏保鲜期。本研究中,SA 处理猕猴桃果实较对照果实保持了较高的内源 Put、Spm 和 Spd 含量,结合 SA 处理抑制了果实硬度的下降以及 MDA 的累积综合分析,我们认为 SA 处理延缓猕猴桃果实采后衰老与其对 PAs 合成调控促进 PAs 浓度的增加有关。这与在柑桔^[18]和芦笋^[20]上的研究结果一致,SA 处理保持了常温贮藏柑桔和芦笋中较高的 PAs 水平,有利于抗衰老和延长贮藏寿命。

同时,ADC 和 ODC 是植物合成 Put 的关键酶^[9]。其中,ADC 的主要作用是催化精氨酸脱羧生成胍丁胺,胍丁胺在胍丁胺亚氨基水解酶和 N-氨基甲酰基腐胺酰水解酶的催化作用下生成 Put;ODC 则催化鸟氨酸脱羧生成 Put。之后,Put 分别在亚精胺合酶和精胺合酶的催化下,依次顺序添加氨丙基生成 Spd 和 Spm^[13]。而 DAO 和 PAO 则是催化 Put、Spd 和 Spm 氧化分解的关键酶^[16]。本研究中,SA 处理明显保持了猕猴桃果实较高的 ADC 活性,促进了

鸟氨酸含量的增加以及 ODC 活性的升高,同时还抑制了果实的 DAO 和 PAO 活性。因此,SA 处理诱导猕猴桃果实中内源 Put、Spm 和 Spd 的累积,是其对 PAs 合成激活与 PAs 分解抑制的协同调控结果。

另外,NO 是精氨酸分解代谢的又一重要产物,NOS 是植物合成 NO 的关键酶^[21]。精氨酸代谢过程中以精氨酸为底物,经 NOS 的催化作用,即可生物合成 NO 和瓜氨酸。本研究中,SA 处理激活了猕猴桃果实中的 NOS 活性,进而一定程度上促使了精氨酸分解代谢向 NO 合成的方向进行。SA 处理猕猴桃果实中 NO 水平显著高于对照果实是这一客观事实的有力证据。Zottini 等^[22]也发现,SA 诱导了拟南芥 NO 的生物合成,且主要通过 NOS 依赖途径进行。NO 在植物体内作用复杂,兼具信号分子和活性氧的双重作用^[23-24]。事实上,植物细胞中的 NO 含量极低,且淬灭速度极快,主要通过信号分子的形式发挥生理功能^[25],只有当内源 NO 浓度高过一定阈值时,方与超氧阴离子作用生成具有强氧化性的过氧亚硝酸,并进一步破坏生物大分子的结构与功能,产生破坏性影响,如引起细胞膜氧化损伤等^[26]。本研究中 SA 处理有效提高了猕猴桃果实中 NO 水平,同时也显著抑制了果实中 MDA 含量的增加。鉴于 MDA 是细胞膜损伤的指示性物质^[11],推测 SA 处理诱导生成 NO 在保持猕猴桃果实细胞膜完整性方面发挥了重要作用,这可能是 SA 处理延缓猕猴桃果实采后衰老的重要机理之一。

综上所述,1.0 mmol·L⁻¹ SA 处理延缓了贮藏期猕猴桃果实衰老程序的启动,促进了果实贮藏品质的维持,这可能与其触发了精氨酸分解代谢,进而诱导 PAs 和 NO 的合成有关。相似的,Zhang 等在冷藏樱桃番茄上的研究表明,外源水杨酸甲酯(一种水杨酸衍生物)处理通过影响精氨酸分解代谢,保持了果实中较高的 PAs 和 NO 含量,进而有效改善了果实的耐贮性^[27]。氧化胁迫下,植物 PAs 和 NO 存在信号级联反应的协同作用^[28-29],这可能对明确 SA 延缓猕猴桃果实衰老的作用机理具有重要意义,需进一步探究。

参考文献:

[1] ZHANG J Y,ZHOU Z X,XUAN J P, *et al.* Research on the relationship between plant growth regulating substances and kiwifruit fruit post-harvest senescence process[J]. *Northern Horticulture*, 2011,(24): 228-231.

[2] MOHAMED H I, EL-SHAZLY H H, BADR A. Role of Salicylic Acid in Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants [M]//Plant Phenolics in Sustainable Agriculture. Singapore: Springer Singapore, 2020: 533-554.

[3] 曹毛毛. *p*-香豆酸调控猕猴桃果实采后衰老的作用机制研究[D]. 西安:西北大学, 2019.

[4] ZHANG Y, CHEN K S, ZHANG S L, *et al.* The role of salicylic acid in regulating the post-harvest senescence of kiwifruit fruit[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2019, 100(1): 1-10.

- cyclic acid in postharvest ripening of kiwifruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2003, **28**(1): 67-74.
- [5] FATEMI H, MOHAMMADI S, AMINIFARD M H. Effect of postharvest salicylic acid treatment on fungal decay and some post-harvest quality factors of kiwi fruit[J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2013, **46**(11): 1 338-1 345.
- [6] 傅丽娜, 孙旭科, 吴超, 等. 水杨酸处理对猕猴桃细胞壁的影响[J]. *山西农业科学*, 2012, **40**(7): 712-715.
- FU L N, SUN X K, WU C, *et al.* Effects of salicylic acid treatment to cell wall in kiwifruit[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2012, **40**(7): 712-715.
- [7] 杨洪强, 高华君. 植物精氨酸及其代谢产物的生理功能[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2007, **33**(1): 1-8.
- YANG H Q, GAO H J. Physiological function of arginine and its metabolites in plants[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, **33**(1): 1-8.
- [8] NAHAR K, HASANUZZAMAN M, ALAM M M, *et al.* Polyamine and nitric oxide crosstalk: Antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, **126**: 245-255.
- [9] ZHANG X H, SHEN L, LI F J, *et al.* Amelioration of chilling stress by arginine in tomato fruit: Changes in endogenous arginine catabolism[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, **76**(1): 106-111.
- [10] PRIYA SETHU K M, PRABHA T N, THARANATHAN R N. Post-harvest biochemical changes associated with the softening phenomenon in *Capsicum annum* fruits[J]. *Phytochemistry*, 1996, **42**(4): 961-966.
- [11] DHINDSA R S, PLUMB-DHINDSA P, THORPE T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1981, **32**(1): 93-101.
- [12] MICALLEF B J, SHEL P B J. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons: I. relationship to nitrogen nutrition[J]. *Plant Physiology*, 1989, **90**(2): 624-630.
- [13] PALMA F, CARVAJAL F, JAMILENA M, *et al.* Contribution of polyamines and other related metabolites to the maintenance of zucchini fruit quality during cold storage[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, **82**(3): 161-171.
- [14] LIU J L, YANG J, ZHANG H Q, *et al.* Melatonin inhibits ethylene synthesis via nitric oxide regulation to delay postharvest senescence in pears[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, **67**(8): 2 279-2 288.
- [15] LEA U S, TEN HOOPEN F, PROVAN F, *et al.* Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue[J]. *Planta*, 2004, **219**(1): 59-65.
- [16] POOJA, GOYAL V, DEVI S, *et al.* Role of Polyamines in Protecting Plants from Oxidative Stress[M]// *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, 2019.
- [17] TIECHER A, DE PAULA L A, CHAVES F C, *et al.* UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, **86**(4): 230-239.
- [18] 张秋明, 魏岳荣. 柑桔多胺代谢及其对生长结果调控的研究 II. 果实成熟期多胺与水杨酸含量变化及其对耐贮性的影响[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2000, **26**(4): 271-273.
- ZHANG Q M, WEI Y R. Studies on polyamine metabolism and its regulation of growth and fruit set in citrus[J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Nat. Sci. Edi.), 2000, **26**(4): 271-273.
- [19] JHALEGAR M J, SHARMA R R, PAL R K, *et al.* Effect of postharvest treatments with polyamines on physiological and biochemical attributes of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cv. Allison[J]. *Fruits*, 2012, **67**(1): 13-22.
- [20] WEI Y X, LIU Z F, SU Y J, *et al.* Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities, and free polyamines of *Asparagus*[J]. *Journal of Food Science*, 2011, **76**(2): S126-S132.
- [21] PROCHÁZKOVÁ D, HASEL D, PAVLÍKOVÁ D. Nitric oxide biosynthesis in plants - the short overview[J]. *Plant, Soil and Environment*, 2014, **60**(3): 129-134.
- [22] ZOTTINI M, COSTA A, DE MICHELE R, *et al.* Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**(6): 1 397-1 405.
- [23] SINGH Z, KHAN A S, ZHU S, *et al.* Nitric oxide in the regulation of fruit ripening: challenges and thrusts[J]. *Stewart Postharvest Review*, 2013, **9**(4): 1-11.
- [24] FANCY N N, BAHLMANN A K, LOAKE G J. Nitric oxide function in plant abiotic stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2017, **40**(4): 462-472.
- [25] 杨杨. 一氧化氮参与调控番茄果实采后成熟衰老信号机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [26] 任小林, 张少颖, 于建娜. 一氧化氮与植物成熟衰老的关系[J]. *西北植物学报*, 2004, **24**(1): 167-171.
- REN X L, ZHANG S Y, YU J N. Nitric oxide and its role in maturation and senescence in plant[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, **24**(1): 167-171.
- [27] ZHANG X H, SHEN L, LI F J, *et al.* Methyl salicylate-induced arginine catabolism is associated with up-regulation of polyamine and nitric oxide levels and improves chilling tolerance in cherry tomato fruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**(17): 9 351-9 357.
- [28] 白雪, 熊俊兰, Asfa Batool, 等. 多胺与一氧化氮在植物逆境适应中的协同效应[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2015, **51**(3): 397-404.
- BAI X, XIONG J L, ASFA BATOOL, *et al.* Interactive effects of polyamines and NO in plants' adaptation to diverse stresses[J]. *Journal of Lanzhou University* (Nat. Sci. Edi.), 2015, **51**(3): 397-404.
- [29] RECALDE L, GÓMEZ MANSUR N M, CABRERA A V, *et al.* Unravelling ties in the nitrogen network: polyamines and nitric oxide emerging as essential players in signalling roadway[J]. *Annals of Applied Biology*, 2020, DOI: 10.1111/aab.12642.