



一氧化氮对苹果果实愈伤苯丙烷代谢的影响及生理机制分析

柴秀伟¹, 孔蕊¹, 李宝军¹, 朱亚同¹, 毕阳^{1*}, Dov Prusky²

(1 甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2 Department of Postharvest Science of Fresh Produce, Agricultural Research Organization, Rishon LeZion 7505101, Israel)

摘要:以“红星”苹果果实为试材,采用 0.5 mmol/L 的 NO 供体硝普钠(SNP)溶液浸泡人工损伤的苹果 5 min,考察 SNP 处理后愈伤期间果实失重率和病情指数,分析伤口处苯丙烷代谢关键酶活性和产物含量,以及 H₂O₂ 含量和过氧化物酶活性,并探讨其相关生理机制,为苹果果实采后快速愈伤提供方法及理论依据。结果表明:(1)SNP 处理显著降低了愈伤期间损伤苹果果实的失重率和扩展青霉(*Penicillium expansum*)损伤接种果实的病情指数,处理果实的失重率和病情指数于处理第 5 天时较对照分别显著降低 40.2% 和 31.4%。(2)SNP 处理显著提高了果实伤口处苯丙烷代谢关键酶苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟化酶和肉桂醇脱氢酶的活性,并提高了肉桂酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸、总酚、类黄酮、*p*-香豆醇、松柏醇、芥子醇及木质素的含量水平;SNP 处理显著提高了果实伤口处的 H₂O₂ 含量以及 POD 活性。研究发现,NO 可通过激活苹果果实伤口处苯丙烷代谢,提高 H₂O₂ 含量以及 POD 活性来促进苹果果实的愈伤。

关键词:一氧化氮(NO);苹果果实;愈伤;苯丙烷代谢

中图分类号:Q945.78

文献标志码:A

Effect of Nitric Oxide on Phenylpropanoid Metabolism in Healing of Apple Fruit and Analysis of Its Physiological Mechanism

CHAI Xiuwei¹, KONG Rui¹, LI Baojun¹, ZHU Yatong¹, BI Yang^{1*}, Dov Prusky²

(1 College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2 Department of Postharvest Science of Fresh Produce, Agricultural Research Organization, Rishon LeZion 7505101, Israel)

Abstract: Apple fruits of the ‘cv. Starkrimson’ were artificially wounded, dipped with sodium nitropruside (SNP) as an exogenous donor of NO at 0.5 mmol/L for 5 minutes. To investigate the weight loss and disease index of apple fruits during healing by SNP treated, we analyzed the activities of key enzymes and content of products in phenylpropanoid metabolism, H₂O₂ content and peroxidase activity at wound sites, and explored its relevant physiological mechanism, so as to provide a method and theoretical basis for rapid postharvest healing of apple fruits. The results indicated that: (1) SNP treatment effectively reduced the weight loss and disease index of inoculated fruits with *Penicillium expansum* during healing, which were 40.2% and 31.4% lower than the control at the 5th day after healing. (2) The treatment significantly increased the activities of phenylalanine ammonia lyase, cinnamic acid-4-hydroxylase and cinnamyl alcohol

收稿日期:2021-11-21;修改稿收到日期:2022-02-19

基金项目:国家自然科学基金中以国际合作与交流项目(31861143046)

作者简介:柴秀伟(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向为果蔬采后生物学与技术。E-mail:cxw288424@163.com

* 通信作者:毕阳,教授,博士生导师,主要从事果蔬采后生物学与技术研究。E-mail:biyang@gsau.edu.cn

dehydrogenase, the key enzymes of phenylpropanoid metabolism, and enhanced the contents of cinnamic acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, total phenols, flavonoids, *p*-coumaroyl alcohol, coniferyl alcohol, sinapyl alcohol and lignin at wound sites of fruits. SNP treatment also significantly raised H₂O₂ content and POD activity at wound sites of fruits. It was found that NO could promote the wound healing of apples by activating phenylpropanoid pathway, increasing H₂O₂ content and POD activity at wound sites.

Key words: nitric oxide; apple fruits; wound healing; phenylpropanoid pathway

苹果是最重要的温带水果,但其在采收及采后处理期间极易遭受机械损伤^[1]。表面形成的伤口不仅会加剧水分蒸腾,而且会为病原物的侵染提供通道,加剧腐烂的发生^[2]。苹果果实具备愈伤的能力^[3],但自然愈伤所需时间较长,因此,需要采取措施加速果实愈伤。作为植物体内的信号分子,一氧化氮(nitric oxide, NO)在介导植物生长发育、成熟衰老和防御反应等诸多生物学过程中发挥着重要作用^[4]。有报道表明,采用 NO 供体 SNP 浸泡甘薯块根,可以有效促进伤口处的木质化,增加伤口处木质化细胞层厚度,促进甘薯愈伤^[5]。SNP 处理还可通过加速伤口处聚酚软木酯及木质素的沉积来降低马铃薯块茎愈伤期间的失重率和病情指数^[6]。果实发育期多次喷洒 SNP 还可促进采后厚皮甜瓜伤口处聚酚软木酯及木质素的沉积,有效降低愈伤期间损伤果实的病情指数^[7]。进一步研究表明,NO 处理可提高厚皮甜瓜和马铃薯伤口处的苯丙氨酸解氨酶活性,增加总酚、类黄酮和木质素的含量;NO 还可使厚皮甜瓜和马铃薯伤口处的 H₂O₂ 含量和过氧化物酶活性显著提高^[6-7]。此外,NO 处理激活了损伤甘薯块根的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX),提高块根抗坏血酸(ASA)的含量及抗氧化能力^[5]。虽然已有 SNP 促进甘薯、马铃薯及甜瓜等一年生地下根茎和果实采后愈伤的报道,但 SNP 是否影响苹果果实采后愈伤尚鲜见报道。因此,本研究以“红星”苹果为试材,采用 SNP 浸泡处理人工模拟损伤的果实,评价处理对愈伤期间果实失重率和病情指数的影响,分析伤口处苯丙烷代谢关键酶活性和产物含量,以及 H₂O₂ 含量和过氧化物酶活性,为苹果果实采后快速愈伤提供方法及理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试‘红星’苹果(*Malus domestica* Borkh. cv. Starkrimson)于 2019 年 10 月采自甘肃省景泰县条山农场,选择大小均匀、未受机械和病虫害影响的果

实,并将单个果实套网后装箱,于次日运至本实验室,常温(20~25℃;相对湿度 80%~85%)下贮藏待用。SNP(纯度 98.5%)购自 Sigma 公司。供试病原菌扩展青霉 *Penicillium expansum* Link. (T01)由中国科学院植物研究所提供,于 PDA 培养基上保存待用。

1.2 方法

1.2.1 苹果果实人工损伤、SNP 处理及愈伤 果实人工损伤参照 Zhang 等^[3]的方法并适当修改。苹果清洗后用 1%次氯酸钠浸泡 2 min,蒸馏水冲洗,待自然晾干后,用灭菌刀片在果实赤道周围切出 3 个人工伤口(15 mm×1 mm)。30 min 后将损伤的果实分别用蒸馏水(对照)和 0.5 mmol/L SNP 溶液(前期预实验筛选)浸泡 5 min。处理果实在常温[(20±5)℃,相对湿度(80%~85%)]黑暗条件下愈伤。

1.2.2 失重率及病情指数的测定 失重率的测定采用重量法,在果实愈伤的第 0、0.5、1、3、5、7 天分别称取果实的重量,每个处理重复 3 次,每处理用果实 6 个。病情指数的测定参照 Zhang 等^[3]的方法。在果实愈伤的第 0、0.5、1、3、5、7 天,分别将 20 μL 浓度为 1×10⁶ spores/mL 的 *P. expansum* 孢子悬浮液均匀涂于果实伤口处,晾干后常温[(20±5)℃,相对湿度(80%~85%)]黑暗培养 5 d 后统计发病级别。每个处理用果实 9 个,重复 3 次。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各病级伤口个数} \times \text{发病级别})}{\text{总伤口个数} \times \text{最高发病级别}} \times 100\%$$

式中,发病级别标准:果面全部发病为 4 级,四分之三发病为 3 级,一半发病为 2 级,四分之一发病为 1 级,不发病为 0 级。

1.2.3 生化指标取样测定 参照 Zhang 等^[3]的方法并作适当修改。分别于愈伤的第 0、0.5、1、3、5 和 7 天时用不锈钢刀切取果实伤口下 2~3 mm 厚的组织,液氮速冻后,用研磨机(A11 basic S025 型, IKA 艾卡(广州)仪器设备有限公司,中国)磨成粉后装入离心管,于 -80℃ 的超低温冰箱(DW-86L828 型,北京盛科信德科技有限公司,中国)中保存待用。每个苹果取样 3 个伤口,每个伤口取样 0.2 g,共用 150 个苹果。

1.2.4 酶活性的测定 苯丙氨酸解氨酶(phenyl-lanine ammonia-lyase, PAL)活性的测定参照 Koukol 等^[8]的比色法,以每小时 290 nm 处吸光值变化 0.01 为 1 个酶活力单位(U),PAL 活性以 U/g 表示。肉桂酸氢化酶(cinnamate-4-hydroxylase, C4H)活性的测定参照 Lamb 等^[9]的比色法,以每分钟 340 nm 处吸光度值变化 0.01 为 1 个酶活力单位(U),C4H 活性以 U · g⁻¹ 表示。肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)活性的测定参照 Goffner 等^[10]的比色法,以每分钟 400 nm 处吸光值变化 0.01 为 1 个酶活力单位(U),CAD 活性以 U · g⁻¹ 表示。过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的测定参照 Venisse 等^[11]的比色法,以每分钟 470 nm 处吸光值变化增加 1 为一个酶活性单位(U),POD 活性以 ΔOD₄₇₀ · min⁻¹ · g⁻¹ 表示。

1.2.5 酚酸及木质素单体含量的测定 酚酸及木质素单体含量的测定参照 Ayaz 等^[12]的方法。(1)样品制备:取 1.0 g 冷冻粉末,加入 3 mL 70%的甲醇在 40 kHz 常温超声提取 30 min,在 8 000×g 下离心 20 min,收集上清液并用浓缩仪浓缩后,用复溶液(甲醇:水:冰醋酸=70:30:1)溶至 1 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,将滤液转移至 2 mL 自动进样瓶中。采用 Waters Symmetry® C₁₈ 柱(4.6×250 mm,5 μm)进行四元梯度超快速液相色谱仪(ACQUITY Arc, Waters, USA)分析。(2)HPLC 条件:以 100%甲醇(A)和 1%乙酸(B)为流动相,进样量 5 μL,流速 0.8 mL/min,柱温 35 ℃,检测波长 325 nm。在相同条件下分别用肉桂酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸、*p*-香豆醇、芥子醇和松柏醇标准品建

立标准曲线,并计算样品含量,4 种酚酸及 3 种木质素单体含量以 μg · g⁻¹ 表示。

1.2.6 总酚、类黄酮和木质素含量的测定 总酚和类黄酮含量的测定参照 Scalbert 等^[13]的比色法并作适当修改。总酚于 760 nm 处测定吸光度(OD)值,并以没食子酸(GAE)为标准物质制定标准曲线来评估总酚含量,单位以 mg · (100 g)⁻¹ 表示。类黄酮于 510 nm 处测定 OD 值,并以儿茶素(CE)为标准物质建立标准曲线评估类黄酮含量,单位以 mg · (100 g)⁻¹ 表示。木质素含量的测定参照 Hamerschmidt 等^[14]的比色法,于 280 nm 处测定 OD 值,单位以 OD₂₈₀ · g⁻¹ 表示。

1.2.7 H₂O₂ 含量的测定 H₂O₂ 含量的测定参考 Prochazkova 等^[15]的比色法,于 410 nm 处测定 OD 值,单位以 μmol · g⁻¹ 表示。

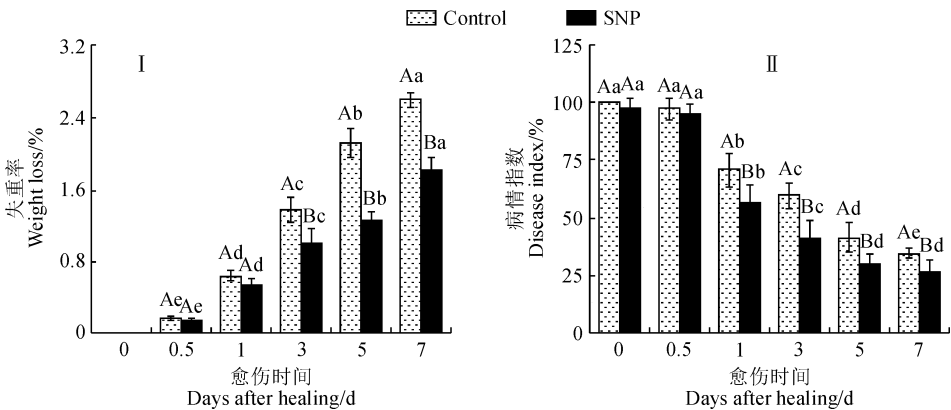
1.3 数据统计

上述各项指标的测定至少重复 3 次,用 Excel 2010 计算平均值和标准误,用 SPSS 19.0 进行 Duncan's 差异显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 SNP 处理对愈伤期间损伤果实失重率和病情指数的影响

失重率和病情指数是用来评价果实愈伤效果的常用指标。图 1 显示,在愈伤期间,SNP 处理组和对照组苹果果实的失重率均逐渐提高,但不同时间点存在明显差异。其中,SNP 处理组果实的失重率在第 0 和 0.5 天无显著差异,在第 1~7 天迅速上升,且不同时间点之间均存在显著差异($P<0.05$);对照



不同大写和小写字母分别代表处理间和处理内在 0.05 水平存在显著性差异($P<0.05$)。下同

图 1 SNP 处理对愈伤期间损伤果实失重率(A)和损伤接种果实病情指数(B)的影响

Different capital and normal letters indicate significant differences between and within treatments at 0.05 level, respectively ($P<0.05$). The same as below

Fig. 1 Effect of SNP treatment on weight loss (A) of wounded fruit and disease index (B) of inoculated fruit during healing

组果实失重率的变化趋势与 SNP 处理组果实基本一致;SNP 处理组果实的失重率在愈伤期间显著低于对照,如处理第 5 天时显著低于对照 40.2%(图 1,I)。同时,在果实愈伤期间,SNP 处理组和对照组果实的病情指数逐渐下降,但不同时间点之间存在差异。其中,SNP 处理组果实的病情指数在第 0~0.5 天无显著差异,在第 1~5 天迅速下降,且各时间点间均差异显著($P<0.05$);对照组果实的病情指数除第 0.5~1 天外,其余时间点之间均差异显著($P<0.05$);SNP 处理组果实的病情指数在第 0 和 0.5 天与对照组果实无显著性差异,对照组病情指数在第 5 天低于 50%,而处理组病情指数在第 3 天时已低于 50%,且处理组果实的病情指数在第 1~7 天显著低于对照,第 3 天时显著低于对照 31.4%(图 1,II)。以上结果表明,SNP 处理有效促进了苹果果实的愈伤。

2.2 SNP 处理对愈伤期间果实伤口处 PAL、C4H 和 CAD 活性的影响

PAL、C4H 和 CAD 的活性与酚类物质的合成水平呈正相关。在苹果果实愈伤期间,SNP 处理组和对照组果实伤口处的 PAL、C4H 和 CAD 活性均呈单峰型变化,三者的峰值依次出现在第 1 天、第 5 天和第 3 天,且各酶活性在不同时间点之间均存在差异(图 2, I - III)。其中,SNP 处理组果实的 PAL 活性在第 0~1 天迅速上升,之后迅速显著降低($P<0.05$);对照组果实的 PAL 活性在第 0~1 天无显著差异,之后迅速显著降低;处理组果实伤口处的 PAL 活性在愈伤期间均显著高于相应对照,其峰值时的活性显著高出对照 26.1%(图 2, I)。同时,处理组果实的 C4H 活性在第 0~3 天迅速上升,在第 5~7 天迅速显著降低($P<0.05$);对照组果实的 C4H 活性在第 0~0.5 天迅速上升,之后缓慢增加,在第 3~5 天再迅速上升后又迅速降低($P<0.05$);处理组果实伤口处的 C4H 活性在愈伤期间显著高于相应对照(图 2, II)。另外,SNP 处理组果实的 CAD 活性在第 0~0.5 天迅速上升,之后缓慢增加后下降,在第 5~7 天迅速显著降低($P<0.05$);对照组果实的 CAD 活性在第 0~5 天无显著差异,之后迅速显著降低($P<0.05$);SNP 处理组果实伤口处的 CAD 活性在愈伤期间均显著高于相应对照(图 2, III)。上述结果表明 SNP 处理激活了苹果果实伤口处的 PAL、C4H 和 CAD 活性。

2.3 SNP 处理对愈伤期间果实伤口处 4 种酚酸及总酚和类黄酮含量的影响

酚酸不仅参与愈伤封闭层的形成,而且具有抗

菌和抗氧化活性。SNP 处理组和对照组果实伤口处的肉桂酸、咖啡酸和芥子酸含量在愈伤期间均呈单峰型变化,峰值依次出现在第 3 天、第 1 天和第 1 天,且不同时间点的含量存在差异;处理组果实的肉桂酸、咖啡酸和芥子酸含量水平在愈伤期间始终显著高于同期对照(图 3, I、II、IV)。其中,处理组果实的肉桂酸含量在第 0~0.5 天迅速显著上升后缓慢增加,在第 1~3 天又迅速显著增加,之后迅速显著降低($P<0.05$);对照组果实的肉桂酸含量在第 0~0.5 天无显著差异,之后迅速显著上升,在第 3~5 天又迅速显著下降(图 3, I)。SNP 处理组果实的咖啡酸含量先迅速上升后迅速显著下降($P<0.05$);对照组果实的咖啡酸含量在第 0~0.5 天迅速上升后基本稳定,1 d 后迅速显著下降($P<0.05$) (图 3, II)。SNP 处理组果实的芥子酸含量在第 0~1 天迅速显著上升,之后迅速显著降低($P<0.05$);对照组果实芥子酸含量的变化趋势与处理果实基本一致(图 3, IV)。

同时,SNP 处理组果实伤口处的阿魏酸含量在愈伤期间先上升后趋于平稳,相应的对照组果实的

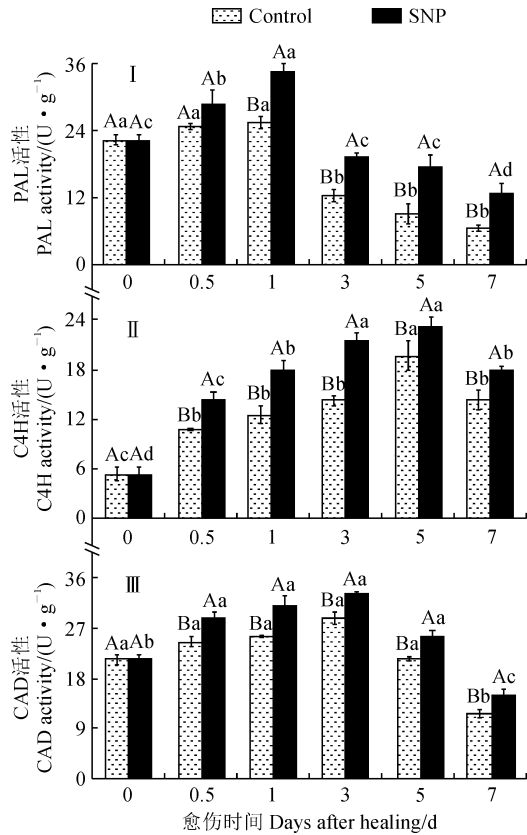


图 2 SNP 处理对愈伤期间果实伤口处 PAL、C4H 和 CAD 活性的影响

Fig. 2 Effect of SNP treatment on PAL, C4H and CAD activities at wounded sites of fruit during healing

含量则逐渐上升;处理组果实的阿魏酸含量在第 0~0.5 天无显著差异,之后迅速显著增加($P<0.05$);对照组果实伤口处的阿魏酸含量在愈伤期间持续增加,但不同时间点无显著性差异;除了第 0.5 天和第 7 天外,处理组果实阿魏酸的含量在愈伤期间均显著高于同期对照(图 3,Ⅲ)。

另外,在愈伤期间,SNP 处理组和对照组果实伤口处的总酚和类黄酮含量均先上升后降低,峰值分别出现在第 5 天和第 3 天,且不同时间点的含量存在差异(图 3,Ⅴ、Ⅵ)。其中,SNP 处理组果实的总酚含量先迅速显著上升,在第 0.5~1 天基本稳定,在第 1~5 天又迅速显著上升,之后迅速显著下降($P<0.05$);对照组果实的总酚含量在愈伤期间虽有变化但不同时间点无显著差异;处理果实的总酚含量在愈伤期间始终显著高于同期对照(图 3,Ⅴ)。SNP 处理组和对照组果实的类黄酮含量均呈先迅速显著上升后迅速显著下降的变化趋势;处理组果实的类黄酮含量在愈伤期间大多显著高于同期对照,在峰值时显著高出对照 28.5%(图 3,Ⅵ)。可

见,SNP 处理有效促进了苹果果实伤口处 4 种酚酸及总酚和类黄酮的合成。

2.4 SNP 处理对愈伤期间果实伤口处 3 种木质素单体及木质素水平的影响

木质素由 *p*-香豆醇、松柏醇和芥子醇 3 种单体构成。SNP 处理组和对照组苹果果实的 *p*-香豆醇含量在愈伤期间呈单峰型变化,峰值出现在第 5 天,且不同时间点的含量存在差异(图 4,Ⅰ)。其中,SNP 处理组果实的 *p*-香豆醇含量在第 0~0.5 天无显著差异,在第 0.5~1 天和第 3~5 天都迅速显著上升,之后迅速显著下降($P<0.05$);对照组果实的 *p*-香豆醇含量在第 0~1 天迅速显著增加,之后基本稳定,第 5 天后迅速显著下降($P<0.05$);处理组果实的 *p*-香豆醇含量在愈伤的中后期显著高于同期对照(图 4,Ⅰ)。同时,SNP 处理组和对照组果实伤口处的松柏醇和芥子醇含量均随愈伤时间的延长逐渐上升,且在不同时间点之间存在差异;处理组果实伤口处的松柏醇和芥子醇含量在愈伤的中后期均显著高于同期对照,在第 5 天时分别显著高出相应对照

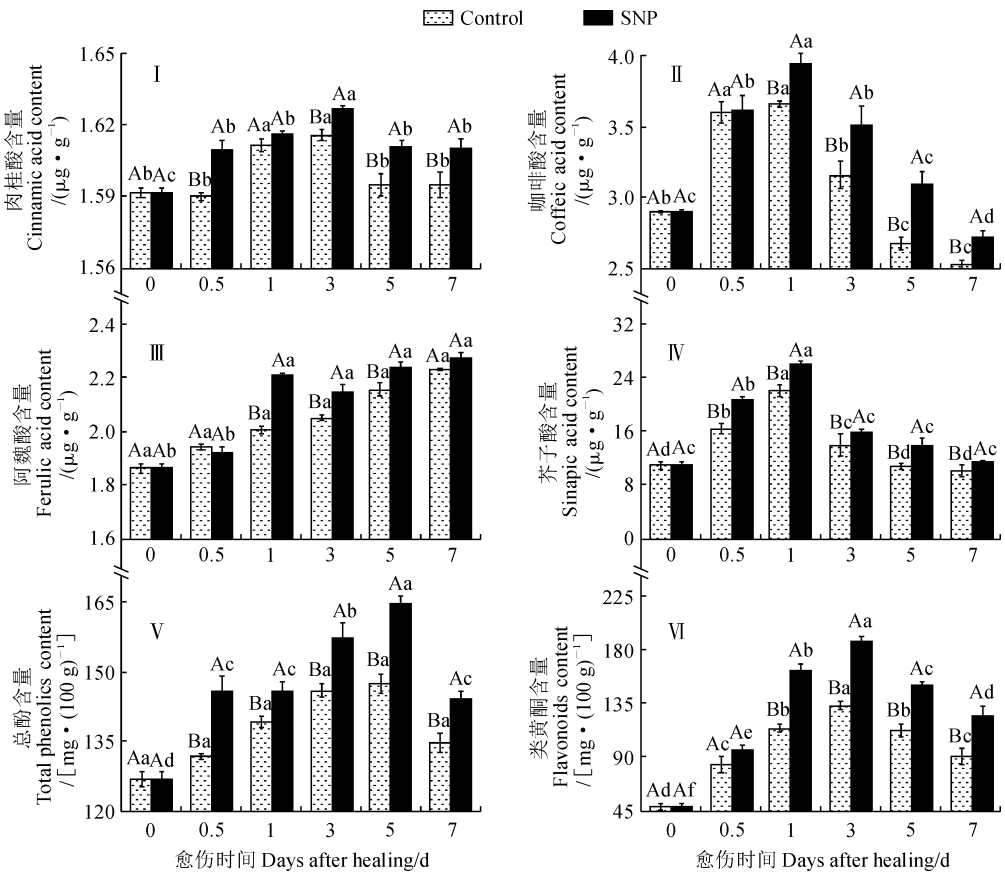


图 3 SNP 处理对愈伤期间果实伤口处肉桂酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸、总酚和类黄酮含量的影响

Fig. 3 Effect of SNP treatment on the contents of cinnamic acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, total phenolic and flavonoids at wound sites of fruit during healing

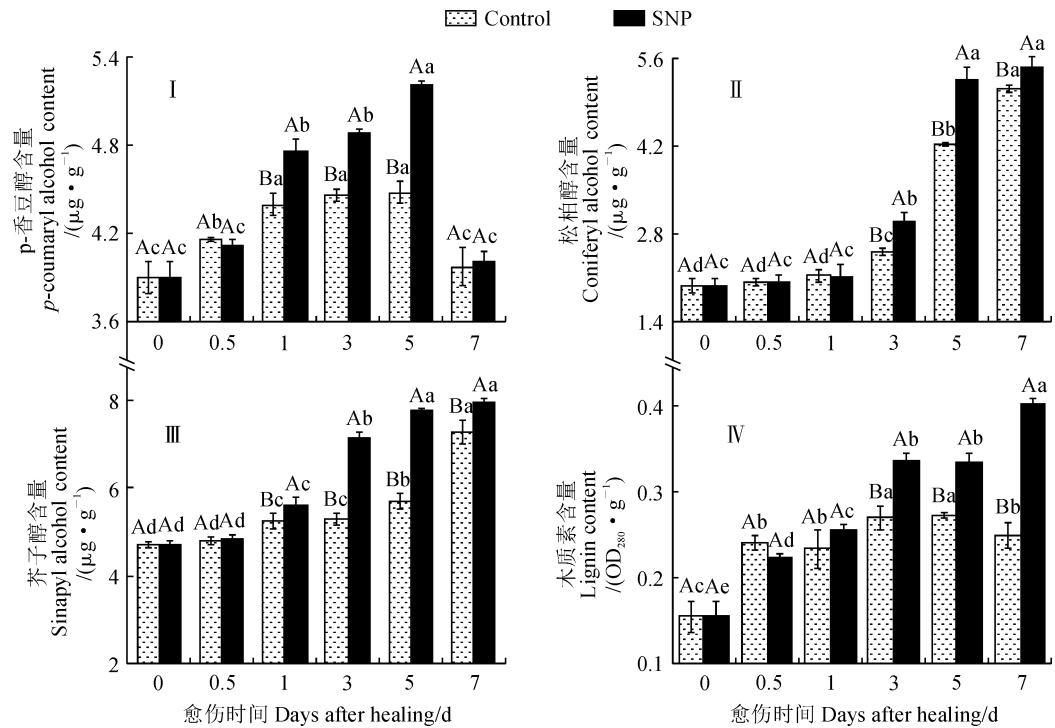


图 4 SNP 处理对愈伤期间果实伤口处 *p*-香豆醇、松柏醇、芥子醇和木质素含量的影响
Fig. 4 Effects of SNP treatment on contents of *p*-coumaroyl alcohol, coniferyl alcohol, sinapyl alcohol and lignin at wound sites of fruit during healing

19.8%和26.9%(图4, II、III)。其中,SNP处理组和对照组果实的松柏醇含量在第0~1天均无显著性变化,之后均迅速显著上升(图4, II);SNP处理果实的芥子醇含量在第0~0.5天无显著变化,之后迅速显著上升($P<0.05$),而对照组果实的芥子醇含量在第3~7天迅速显著上升(图4, III)。另外,SNP处理组和对照组果实伤口处的木质素含量在愈伤期间均逐渐上升,且不同时间点的含量存在差异(图4, IV)。其中,处理组果实的木质素含量在第0~3天迅速显著上升,之后基本稳定,在第5~7天又迅速显著上升($P<0.05$);对照组果实的木质素含量在第0~0.5天和第1~3天均迅速显著上升($P<0.05$);处理组果实的木质素含量在愈伤的中后期均显著高于同期对照($P<0.05$),在第7天时显著高出对照38.2%。以上结果表明,SNP处理明显提高了苹果伤口处 *p*-香豆醇、松柏醇、芥子醇和木质素含量。

2.5 SNP处理对愈伤期间果实伤口处的H₂O₂含量及POD活性的影响

H₂O₂含量和POD活性在一定程度上反映了果实伤口处木质素单体的聚合水平。在苹果果实愈伤期间,SNP处理组和对照组果实的H₂O₂含量均呈双峰型变化,峰值分别出现在第0.5天和第3天;

处理组果实的H₂O₂含量在不同时间点均存在显著性差异,对照组果实的H₂O₂含量除第5~7天外的时间点也均存在显著性差异($P<0.05$);处理组果实伤口处的H₂O₂含量在愈伤期间始终显著高于同期对照组,第3天时显著高出对照45.1%(图5, I)。同时,SNP处理组和对照组果实伤口处的POD活性在愈伤期间均呈单峰型变化,峰值出现在第1天,且不同时间点的活性存在差异;处理组果实伤口处的POD活性在第0~1天先迅速显著上升,之后迅速显著下降($P<0.05$);对照组果实的POD活性的变化趋势与处理组果实基本一致;除第0.5天外,处理组果实的POD活性在愈伤期间显著高于同期对照($P<0.05$),在第1天时显著高出对照34.4%(图5, II)。因此,SNP处理有效提高了苹果果实伤口处H₂O₂含量及POD活性。

3 讨论

亚硝基铁氰化钠(SNP)作为外源NO供体进入植物体后在半胱氨酸、谷胱甘肽或其他2SH类化合物、细胞色素P2450/NADPH系统的催化下会逐步分解,释放出NO^[16]。外源NO会促进内源NO的产生,而内源NO作为信号分子参与了植物对生物和非生物胁迫的应答^[17]。

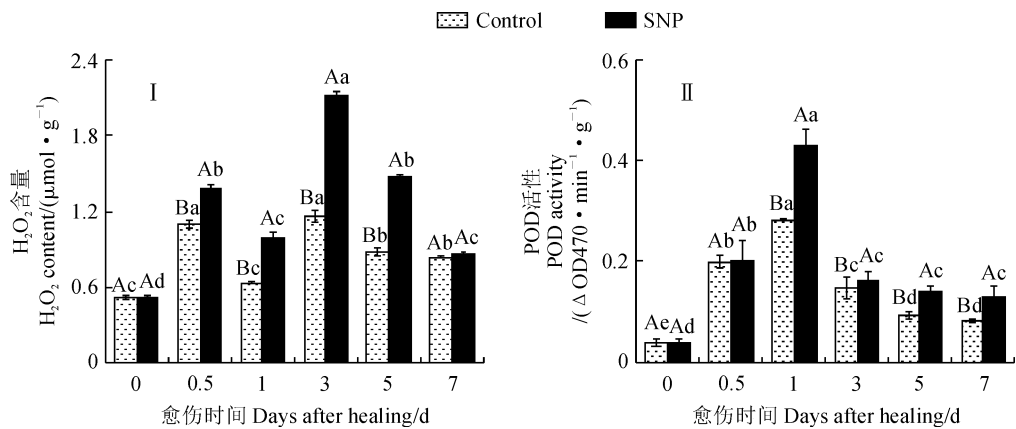


图5 SNP处理对愈伤期间果实伤口处H₂O₂含量和POD活性的影响

Fig. 5 Effects of SNP treatment on H₂O₂ content and POD activity at wound sites of fruit during healing

苯丙烷代谢既可提供愈伤封闭层形成所需的底物,又可合成具有抗菌和抗氧化活性的酚类和黄酮类物质^[18]。PAL作为苯丙烷代谢的关键酶和限速酶,催化L-苯丙氨酸脱氨基生成反式肉桂酸^[19-20]。反式肉桂酸在C4H的作用下羟基化生成*p*-香豆酸,*p*-香豆酸在香豆酸-3-羟基化酶作用下经过羟基化和酯化生成咖啡酸,咖啡酸经儿茶酚氧位甲基转移酶生成阿魏酸,阿魏酸首先羟化生成5-羟基阿魏酸,接着在5-羟基阿魏酸-O-甲基转移酶作用下催化生成芥子酸^[21]。本研究观察到,SNP处理提高了苹果果实伤口处的PAL和C4H活性,促进了4种酚酸以及总酚和类黄酮的合成。该结果与SNP处理及NO气体熏蒸处理提高苹果及甜瓜果实的PAL与C4H活性,促进总酚、类黄酮合成的结果类似^[22-23]。据报道,NO作为信号分子可以激活PAL,促进甜瓜果实中总酚、类黄酮的合成^[23-24];NO还可促进桃果实中茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)以及马铃薯块茎中H₂O₂的合成,而JA、SA和H₂O₂可作为信号分子激活苯丙烷代谢^[25-28]。JA可上调盐芥中芥子油苷生物合成转录因子MYB28和MYB51的表达,从而启动盐芥对损伤及非生物胁迫的响应^[22];SA可诱导瞿麦*DsMYB*的表达,增强瞿麦对盐胁迫的抗性^[22]。此外,SNP处理还可诱导苹果果实的莽草酸途径,促进L-苯丙氨酸的合成,从而为苯丙烷代谢提供所需底物^[22]。据此,我们认为NO可能通过诱导JA、SA等信号分子合成,激活莽草酸途径来促进苯丙烷代谢,从而提高酚酸和类黄酮的合成水平。

PAL及C4H作用下生成的酚酸在4CL的催化下生成酚酸-CoA,接着在肉桂酰辅酶A还原酶的催化下分别形成芥子醛、松柏醛和香豆醛,这些醛进一

步在CAD的作用下转化为芥子醇、松柏醇和*p*-香豆醇^[29]。在POD和H₂O₂的共同作用下,*p*-香豆醇、松柏醇和芥子醇通过碳-碳键、醚键、酯键聚合形成木质素,沉积在细胞壁中^[30]。木质素可增加细胞壁强度,抵御病原菌的侵入,其单体还可对病原菌具有直接毒杀作用^[31]。本研究观察到,SNP处理有效提高了苹果果实伤口处CAD活性,促进了3种木质素单体及木质素的合成。该结果与SNP处理促进苹果果实中木质素合成的结果一致^[22]。我们还观察到,SNP处理显著提高了苹果果实伤口处H₂O₂的含量,该结果与NO处理提高甜瓜果实中H₂O₂含量的结果类似^[7]。H₂O₂在愈伤初期可作为信号分子激活相关的防卫反应,又可在愈伤中后期与POD共同参与木质素前体的氧化交联^[32]。愈伤期间的H₂O₂主要来源于NADPH氧化酶(NOX),NOX通过转移电子产生超氧阴离子(O₂⁻)^[33],由于O₂⁻存活寿命较短,很快又在超氧化物歧化酶(SOD)的作用下迅速歧化为H₂O₂^[34]。有报道表明,NO可上调葡萄皮和肉中的VvSOD以及香蕉果实中*MaSOD*基因的表达,促进H₂O₂的积累^[35-36]。因此,我们推测NO可能在转录水平上通过上调SOD基因的表达来促进H₂O₂的积累。同时,我们还观察到,SNP处理显著提高了苹果果实伤口处的POD活性,该结果与NO处理提高冬枣POD活性的结果类似^[37]。由于NO可提高葡萄和香蕉果实中VvPOD2及*MaPOD*的基因表达,导致POD活性升高^[35-36]。因此,NO可能在转录水平上通过上调POD基因的表达来提高POD活性。

SNP处理有效降低了愈伤期间苹果果实的失重率和病情指数,该结果与SNP降低马铃薯块茎愈

伤期间失重率和病情指数的结果一致^[6]。由于 NO 促进了聚酚软木酯及木质素在伤口处的沉积,通过形成物理屏障进而抑制了水分经由伤口蒸腾,有效抵御了病原物的侵染和扩展^[6]。NO 还可以促进烟草和番茄 SA 和 JA 的合成,而 SA 和 JA 可调控植物气孔关闭,从而减少水分经由气孔蒸腾^[38,16]。另外,NO 还可抑制番木瓜的呼吸速率,通过降低呼吸强度来减少呼吸底物的消耗,进而减轻失重^[39]。因此,我们认为 SNP 处理减少苹果愈伤期间失重率的原因除了促进伤口处物理屏障的形成外,还与诱导气孔关闭,减少呼吸底物消耗有关。此外,苯丙烷代谢形成的酚类和类黄酮物质还能直接抑制病原菌的生长发育^[40,22],NO 还可促进病程相关蛋白 PR1 的积累,从而破坏病原菌的结构^[41]。因此,我们认为

SNP 处理减少苹果愈伤期间病情指数的原因除了促进伤口处物理屏障的形成外,还与提高总酚和类黄酮含量,增加病程相关蛋白有关。

4 结 论

SNP 处理激活了苹果果实伤口处 PAL、C4H 和 CAD 的活性,促进了肉桂酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸、总酚和类黄酮以及 *p*-香豆醇、松柏醇、芥子醇及木质素的合成;SNP 处理还提高了果实伤口处的 H₂O₂ 含量和 POD 活性。上述苯丙烷代谢产物在 H₂O₂ 和 POD 共同作用下氧化聚合形成木质素在伤口表面沉积,木质素作为物理屏障有效降低了果实愈伤期间的失重率和病情指数,促进了苹果愈伤。

参考文献:

[1] KOMARNICKI P, STOPA R, SZYJEWICZ D, *et al.* Influence of contact surface type on the mechanical damages of apples under impact loads[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, **10**(8): 1 479-1 494.

[2] VAN ZEEBROECK M, VAN LINDEN V, RAMON H, *et al.* Impact damage of apples during transport and handling[J]. *Post-harvest Biology and Technology*, 2007, **45**(2): 157-167.

[3] ZHANG X M, ZONG Y Y, LI Z C, *et al.* Postharvest *Pichia guilliermondii* treatment promotes wound healing of apple fruits[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 167: 111 228.

[4] CORPAS F J, BARROSO J B. Nitric oxide from a “green” perspective[J]. *Nitric Oxide*, 2015, 45: 15-19.

[5] YIN J Y, BAI S, WU F H, *et al.* Effect of nitric oxide on the activity of phenylalanine ammonia-lyase and antioxidative response in sweetpotato root in relation to wound-healing[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 74: 125-131.

[6] 韩占红, 王 斌, 杨瑞瑞, 等. 一氧化氮处理对马铃薯采后块茎愈伤的促进及机制[J]. *食品科学*, 2020, **41**(21): 222-229.

HAN Z H, WANG B, YANG R R, *et al.* Effect and mechanism of postharvest nitric oxide treatment on promoting wound healing in potato tubers[J]. *Food Science*, 2020, **41**(21): 222-229.

[7] WANG B, JIANG H, BI Y, *et al.* Preharvest multiple sprays with sodium nitroprusside promote wound healing of harvested muskmelons by activation of phenylpropanoid metabolism[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 158: 110 988.

[8] KOUKOL J, CONN E E. The metabolism of aromatic and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare* [J]. *Biology Chemistry*, 1961, **236**(10): 2 692-2 698.

[9] LAMB C J, RUBERY P H. A spectrophotometric assay for *trans*-cinnamic acid 4-hydroxylase activity[J]. *Analytical Bio-*

chemistry, 1975, **68**(2): 554-561.

[10] GOFFNER D, JOFFROY I, GRIMA-PETTENATI J, *et al.* Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus xylem*[J]. *Planta*, 1992, **188** (1): 48-53.

[11] VENISSE J S, MALNOY M, FAIZE M, *et al.* Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 2002, **15**(12): 1 204-1 212.

[12] AYAZ F A, HAYIRLIOGLU-AYAZ S, GRUZ J, *et al.* Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(21): 8 116-8 122.

[13] SCALBERT A, MONTIES B, JANIN G. Tannins in wood: Comparison of different estimation methods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, **37**(5): 1 324-1 329.

[14] HAMMERSCHMIDT R. Rapid deposition of lignin in potato tuber tissue as a response to fungi non-pathogenic on potato [J]. *Physiological Plant Pathology*, 1984, **24**(1): 33-42.

[15] PROCHAZKOVA D, SAIRAM R K, *et al.* Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves[J]. *Plant Science*, 2001, **161**(4): 765-771.

[16] 程 园, 李灿婴, 侯佳宝, 等. 采后硝普钠处理对南果梨果实贮藏品质和细胞壁降解酶的影响[J]. *食品科学*, 2020, **41** (1): 252-257.

CHENG Y, LI C Y, HOU J B, *et al.* Effect of postharvest sodium nitroprusside treatment on the storage quality and cell wall degrading enzymes of Nanguo pears[J]. *Food Science*, 2020, **41**(1): 252-257.

[17] 刘零怡, 于萌萌, 郑 杨, 等. 采后一氧化氮处理调控番茄果实茉莉酸类物质合成并提高灰霉病抗性[J]. *食品科学*,

- 2010, **31**(22): 457-461.
- LIU L Y, YU M M, ZHENG Y, *et al.* Effect of postharvest nitric oxide treatment on jasmonates biosynthesis and disease incidence to *Botrytis cinerea* Pers. in tomato fruits[J]. *Food Science*, 2010, **31**(22): 457-461.
- [18] LULAI E C, NEUBAUER J D. Wound-induced suberization genes are differentially expressed, spatially and temporally, during closing layer and wound periderm formation[J]. *Post-harvest Biology and Technology*, 2014, 90: 24-33.
- [19] 蒋超男, 李灿婴, 李伊涵, 等. 采后核黄素处理对苹果青霉病及活性氧和苯丙烷代谢的影响[J]. 保鲜与加工, 2021, **21**(3): 1-7.
- JIANG C N, LI C Y, LI Y H, *et al.* Effects of riboflavin treatment on blue mould and reactive oxygen species and phenylpropanoid metabolisms in postharvest apples[J]. *Storage and Process*, 2021, **21**(3): 1-7.
- [20] RIVERO R M, RUIZ J M, *et al.* Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants[J]. *Plant Science*, 2001, **160**(2): 315-321.
- [21] VOGT T. Phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2010, **3**(1): 2-20.
- [22] GE Y H, CHEN Y R, LI C Y, *et al.* Effect of sodium nitroprusside treatment on shikimate and phenylpropanoid pathways of apple fruit[J]. *Food Chemistry*, 2019, 290: 263-269.
- [23] YAN B W, ZHANG Z, ZHANG P, *et al.* Nitric oxide enhances resistance against black spot disease in muskmelon and the possible mechanisms involved[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256: 108 650.
- [24] 王 晨. NO 信号分子及其在植物抗病反应中的作用研究综述[J]. 现代园艺, 2019, (11): 42-44.
- WANG C. A review of NO signaling molecules and their roles in plant disease resistance[J]. *Modern Horticulture*, 2019, (11): 42-44.
- [25] ZHAO Z G, CHEN G C, ZHANG C L. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings[J]. *Functional Plant Biology*, 2001, **28**(10): 1 055.
- [26] 刘 娜. 外源 NO 诱导采后肥城桃果实抗褐腐病的效果及机理研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2013.
- [27] 赵 彤, 安 慧, 李佳文, 等. 外源茉莉酸对盐芥芥子油苷含量与抗氧化特性的影响[J]. 植物生理学报, 2021, **57**(3): 614-622.
- ZHAO T, AN H, LI J W, *et al.* Effects of exogenous jasmonic acid on glucosinolate content and antioxidant properties of *Eutrema salsugineum* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, **57**(3): 614-622.
- [28] ZHENG J, MA X H, ZHANG X L, *et al.* Salicylic acid promotes plant growth and salt-related gene expression in *Dianthus superbus* L. (Caryophyllaceae) grown under different salt stress conditions[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2018, **24**(2): 231-238.
- [29] WENG J K, MO H P, CHAPPLE C. Over-expression of F5H in COMT-deficient *Arabidopsis* leads to enrichment of an unusual lignin and disruption of pollen wall formation[J]. *The Plant Journal*, 2010, **64**(6): 898-911.
- [30] IKEDA Y, PHAKKEEREE T, *et al.* Reinforcing biofiller “Lignin” for high performance green natural rubber nanocomposites[J]. *RSC Advances*, 2017, **7**(9): 5 222-5 231.
- [31] HAHNBROCK K, GRISEBACH H. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1979, **30**(1): 105-130.
- [32] ANGELINI R, TISI A, REA G, *et al.* Involvement of polyamine oxidase in wound healing [J]. *Plant Physiology*, 2008, **146**(1): 162-177.
- [33] SAENGNI K, CHUMYAM A, FAIYUE B, *et al.* Use of chlorine dioxide fumigation to alleviate enzymatic browning of harvested ‘Daw’ longan pericarp during storage under ambient conditions[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, 91: 49-56.
- [34] 姜 红, 王 毅, 毕 阳. 马铃薯块茎的愈伤过程、机制和影响因素[J]. 园艺学报, 2019, **46**(9): 1 842-1 852.
- JIANG H, WANG Y, BI Y. The process, mechanism and influential factors of wound healing of potato tubers [J]. *Journal of Horticulture*, 2019, **46**(9): 1 842-1 852.
- [35] ZHANG Z, XU J, CHEN Y, *et al.* Nitric oxide treatment maintains postharvest quality of table grapes by mitigation of oxidative damage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 152: 9-18.
- [36] WU B, GUO Q, LI Q P, *et al.* Impact of postharvest nitric oxide treatment on antioxidant enzymes and related genes in banana fruit in response to chilling tolerance[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, 92: 157-163.
- [37] ZHAO Y T, ZHU X, HOU Y Y, *et al.* Postharvest nitric oxide treatment delays the senescence of winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) fruit during cold storage by regulating reactive oxygen species metabolism [J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 261: 109 009.
- [38] SONG F, GOODMAN R M. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, **14**(12): 1 458-1 462.
- [39] 郭 芹, 吴 斌, 王吉德, 等. NO 处理对番木瓜采后贮藏性的影响[J]. 食品科学, 2011, **32**(4): 227-231.
- GUO Q, WU B, WANG J D, *et al.* Effects of nitric oxide fumigation on storage characteristics of postharvest papaya [J]. *Food Science*, 2011, **32**(4): 227-231.
- [40] REGEV-SHOSHANI G, CROWE A, MILLER C C. A nitric oxide-releasing solution as a potential treatment for fungi associated with tinea pedis[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, **114**(2): 536-544.
- [41] ZHENG Y, SHEN L, YU M M, *et al.* Nitric oxide synthase as a postharvest response in pathogen resistance of tomato fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, **60**(1): 38-46.