

一氧化氮处理对香蕉多聚半乳糖醛酸酶及 *MaPGs* 基因表达的影响

吴斌^{1,2}, 郭芹³, 王刚霞², 陈维信¹, 李雪萍^{1*}

1. 华南农业大学园艺学院, 广东省果蔬保鲜重点实验室, 广州 510642;
2. 新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所, 乌鲁木齐 830091;
3. 中国农业科学院农产品加工研究所, 农产品贮藏保鲜与物流研究室, 北京 100193

摘要: 为了解多聚半乳糖醛酸酶(PG)在香蕉采后软化中的分子调控机制, 采用 40 $\mu\text{L/L}$ NO 熏蒸处理绿熟期的‘巴西’香蕉果实 3 h 后, 在 20℃ 和相对湿度为 85% 的条件下贮藏, 研究 NO 对香蕉果实乙烯释放量、硬度、PG 活性及 *MaPGs* 基因表达的影响。结果表明: NO 处理降低了果实乙烯释放量, 延缓了果实硬度的下降, 抑制了 PG 的活性; 降低了 *MaPG2*、*MaPG3* 和 *MaPG4* 基因的表达, 延缓了香蕉果实的软化。

关键词: 一氧化氮; 香蕉; 软化; 多聚半乳糖醛酸酶; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2014.01.06

Effects of Nitric Oxide Treatment on Polygalacturonase Activity and Expression of *MaPGs* Genes in Harvested Banana Fruit During Storage

WU Bin^{1,2}, GUO Qin³, WANG Gang-xia², CHEN Wei-xin¹, LI Xue-ping^{1*}

1. Guangdong Province Key Laboratory for Postharvest Technology of Fruits and Vegetables, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Institute of Agro-products Storage and Processing, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China;
3. Preservation and Logistics Division, Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: In order to explore the molecular regulation mechanism of polygalacturonase (PG) during banana softening, fruit harvested at the mature green stage were fumigated with 40 $\mu\text{L/L}$ of NO for 3 h, and then stored at 20℃ with 85% relative humidity. Ethylene production, firmness, PG activity and *MaPGs* genes were measured during banana ripening. The results showed that NO treatment resulted in significantly lower rates of ethylene production than those in the control fruit. The NO treated fruit underwent a lesser loss of firmness during storage. The activity of PG and expression of *MaPG2*, *MaPG3* and *MaPG4* genes were effectively reduced in NO treated fruit, indicating that the softening of banana fruit was delayed by NO treatment.

Key words: nitric oxide; banana; softening; polygalacturonase; gene

香蕉 (*Musa* spp. cv. Brazil) 是典型的呼吸跃变型果实, 在采后很短的时间会发生大量的生理生化变化^[1], 硬度、外观、风味和营养价值都会降低。因此, 该果实的货架期较短。软化是香蕉成熟过程的一个显著变化, 制约了香蕉的市场销售。

研究发现导致软化的主要原因是细胞壁软化酶的组成和结构发生了变化, 例如果胶甲酯酶 (PME)、多聚半乳糖醛酸酶 (PG)、果胶裂解酶 (PL) 和纤维素酶 (Cx)^[2~4] 等。其中, PG 的主要功能是降解细胞壁和果胶成分, 对果实的成熟软

收稿日期: 2013-10-14; 接受日期: 2013-11-08

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-32-09A); 广东省岭南水果产业技术体系项目 (LNSG2011-2012) 资助。

作者简介: 吴斌, 博士后, 研究方向为果蔬贮藏与加工。E-mail: xjuwubin0320@sina.com。* 通信作者: 李雪萍, 副教授, 博士, 研究方向为采后保鲜与病理。E-mail: lxp88@scau.edu.cn

化起重要作用^[5,6],但其具体作用机理尚不清楚。目前,虽然已在香蕉果实中克隆到 4 个 PG 家族基因^[3,7],但是从基因表达揭示调控作用机制的研究报道较少,通常采用热处理、植物生长调节剂和化学添加剂等^[3,8]调控香蕉果实的采后软化。

一氧化氮(NO)作为一种生长调节剂,可控制许多植物的生长、成熟和抗病性^[9~11],但对 NO 在采后香蕉果实贮藏中的研究报道较少。本研究以‘巴西’香蕉为试材,研究 NO 处理果实中 PG 活性及 *MaPGs* 基因表达的变化,探讨 NO 延缓香蕉果实软化的分子作用机理,为进一步深入研究 NO 在果蔬采后的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的香蕉品种为‘巴西’(*Musa* spp. cv. ‘Brazil’),2010 年 10 月采自广州市番禺宝升生态农场,采后立即运回实验室,选取成熟度一致(绿熟)、大小均一、无病虫害、无机械伤的果实,用 2 g/L 强力溶液浸泡 10 min,再用 500 μ L/L 的抑菌鲜浸果 1 min,晾干备用。

NO 气体,纯度 99.9%,购自广州市世源气体有限公司。

1.2 仪器与设备

GC-2014C 型气相色谱仪,日本岛津公司;UV-2450 型紫外分光光度计,日本岛津公司;3k15 型台式高速冷冻离心机,德国 SIGMA 公司;5542 型果蔬材料硬度测试机,美国 INSTRO 公司;iCycleriQ5 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 处理方法

在 20℃ 条件下,将香蕉置于密封箱内(30.8 L),进行 NO 处理,具体操作参照郭芹等^[10]方法,在无氧 N₂ 环境下,通入 40 μ L/L NO 气体,熏蒸 3 h,处理完后装入厚度为 0.03 mm 的保鲜袋内装箱,在 20 $\pm$ 1℃、相对湿度 85% 条件下贮藏。对照组通入 N₂ 维持 3 h,其他条件不变。各处理均设 3 个重复,每个重复 60 个果实。

1.4 乙烯和硬度的测定

各处理分别取 5 个果实,在 20℃ 条件下密封 2 h 后抽取气体测定乙烯释放量。乙烯含量采用

GC-2014C 型气相色谱仪测定,色谱条件为:采用不锈钢色谱柱,柱温 80℃,进样口温度 140℃,氢火焰离子检测器(FID)温度 150℃,气体样品进样量 1 mL。重复 3 次取平均值,以 μ L/h $\cdot$ kg $\cdot$ FW 表示。硬度测定采用 5542 型果蔬材料硬度测试机测定,探头直径为 8 mm。以 300 mm/min 速度在每果赤道线均匀测 5 个点,最大硬度值用牛顿(N)表示,取平均值。

1.5 多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性的测定

多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性参照 Guo 等^[12]的方法测定,以每分钟每克鲜样 37℃ 时分解果胶产生 1 μ g 游离半乳糖醛酸定义为一个果胶酶活性单位(U)。

1.6 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen,上海,中国)提取香蕉果实总 RNA,RNA 的完整性通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳确定。cDNA 的合成参照 Guo 等^[12]方法。

1.7 *MaPGs* 基因表达量实时荧光定量 PCR 检测

使用 iCycler iQ5 实时定量 PCR 仪进行 RT-PCR 检测,反应体系(20.0 μ L)为:10.0 μ L SYBR[®] qPCR Mix,2.0 μ L cDNA,6.0 μ L ddH₂O,上下游引物各 1.0 μ L(引物浓度 10 μ mol/L)。运行程序为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,50℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 10 s,40 次循环。每个样品重复 3 次。

以香蕉 *Actin* 基因(登录号为:AF246288.1)作为内参,参照 *MaPGs* 基因序列设计特异性引物。引物对为:*MaPG1*-F:5'-TGTCGTCGGTCTCATCAA-3',*MaPG1*-R:5'-GGTGCATTCCATGTGTATTC-3',(登录号:AF311881);*MaPG2*-F:5'-TCATTACAGCATTGAAGGGAAA-3',*MaPG2*-R:5'-GTCAAGTTATTTGGGCTGCATT-3',(登录号:AF311882);*MaPG3*-F:5'-GCACCCAACATCACTCTATC-3',*MaPG3*-R:5'-AGGGAATCGTCAGCGTCT-3',(登录号:AY603339.1);*MaPG4*-F:5'-GTA-TTGAAGCTTAGGAAAGCAG-3',*MaPG4*-R:5'-ACGGTGTCATGCGTATGTT-3',(登录号:AY603341);*Actin*-F:5'-GAGAAGATACAGTGTCTGGA-3',*Actin*-R:5'-ATTACCATCGAAATATTAAG-3'。采用姜妮娜等^[6]方法计算基因相对表达量。

1.8 数据统计与作图

使用 SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) 软件作图; 使用 SPSS 16.0 (Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 在 $P=0.05$ 水平进行显著性 (LSD) 分析。测得值均以平均数 $\pm$ 标准误 (S. E.) 表示。

2 结果与分析

2.1 NO 处理对香蕉果实乙烯释放量的影响

乙烯在果实成熟过程中起着重要的调节作用, 这种作用通过乙烯生成量的增加和组织对乙烯敏感性的改变而实现。从图 1 可知: 香蕉果实在贮藏前 5 d 都无乙烯产生, 从第 16 d 开始对照果实乙烯释放量迅速增加, 在第 23 d 达到最大值, 之后开始下降。NO 处理果在贮藏的前 23 d 乙烯释放量较低, 在第 25 d 达到最大值, 是对照果峰值的 0.77 倍。结果表明, NO 处理可降低香蕉果实乙烯释放量, 延缓乙烯峰值的出现。

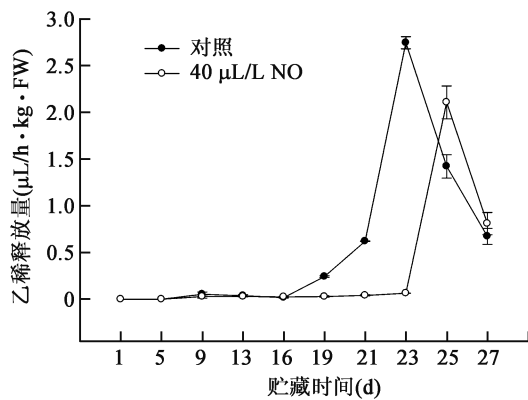


图 1 NO 处理对香蕉果实乙烯释放量的影响

Fig.1 Effect of NO treatment on ethylene production of banana fruit.

2.2 NO 处理对香蕉果实硬度的影响

果实硬度是判断果实质地、反映果实贮藏性和衡量贮藏效果的主要指标。香蕉果实硬度在采后前 21 d 下降缓慢, 之后迅速下降, 表明在此阶段果实快速软化, 与乙烯的迅速释放量相一致。NO 处理香蕉果实硬度的变化与对照相似, 前期随着乙烯的缓慢释放逐渐下降, 之后随着乙烯峰值的出现迅速下降, 但在贮藏过程中硬度明显高于对照, 在第 27 d 果实的硬度是 8.88 N, 约是对照 (1.80 N) 的 5 倍 (图 2)。结果表明, NO 处理显

著抑制了乙烯的生成, 从而延缓了香蕉果实硬度的下降, 尤其在贮藏后期效果较为显著。

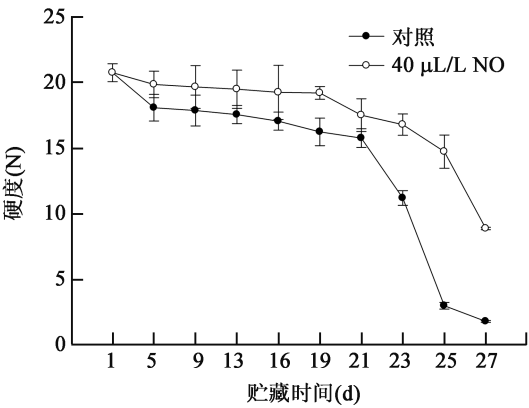


图 2 NO 处理对香蕉果实硬度的影响

Fig.2 Effect of NO treatment on firmness of banana fruit.

2.3 NO 处理对香蕉果实多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 的影响

多聚半乳糖醛酸酶在水果细胞壁的降解和软化过程起着重要作用。从图 3 可知, 对照香蕉果实的 PG 活性从第 0 d 的 0.37 U/g · min · FW 逐渐增加到第 21 d 的 0.94 U/g · min · FW, 之后开始下降。NO 处理果 PG 活性在贮藏过程低于对照果, 尤其是贮藏后期显著低于对照。

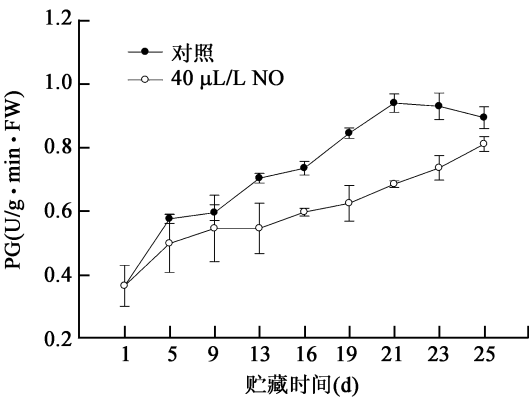


图 3 NO 处理对香蕉果实 PG 活性的影响

Fig.3 Effect of NO treatment on PG activity of banana fruit.

2.4 NO 处理对香蕉果实 MaPGI 基因表达的影响

从图 4 可知, 在香蕉的贮藏过程, 对照果与 NO 处理果 MaPGI 基因表达的变化趋势相似, 随着果实中 PG 活性的增加, MaPGI 基因表达水平

也逐渐增加,在第 21 d 达到最大值,之后随着 PG 活性的下降逐渐降低,但 NO 处理果 *MaPG1* 的表达水平在贮藏过程与对照果无显著差异。

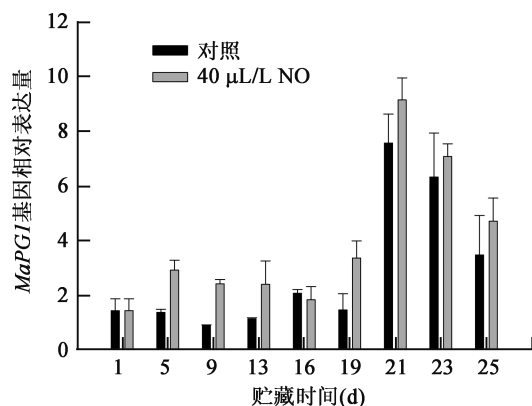


图 4 NO 处理对香蕉果实 *MaPG1* 基因表达的影响

Fig.4 Effect of NO treatment on the expression of *MaPG1* of banana fruit.

2.5 NO 处理对香蕉果实 *MaPG2* 基因表达的影响

对照香蕉果实 *MaPG2* 基因表达水平在贮藏过程逐渐增加,在第 21 d 达到最大,之后开始下降,而 NO 处理的香蕉果实 *MaPG2* 基因表达水平在贮藏前 13 d 与对照无显著差异,之后 *MaPG2* 基因表达水平显著低于对照(图 5),说明 NO 对香蕉果实 *MaPG2* 基因表达有一定的抑制作用。

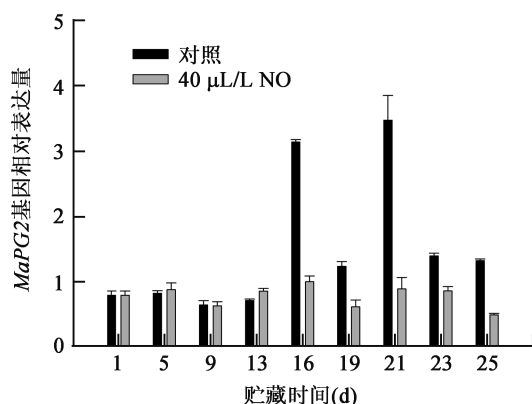


图 5 NO 处理对香蕉果实 *MaPG2* 基因表达的影响

Fig.5 Effect of NO treatment on the expression of *MaPG2* of banana fruit.

2.6 NO 处理对香蕉果实 *MaPG3* 基因表达的影响

对照果与 NO 处理果 *MaPG3* 基因在香蕉果实的贮藏前 13 d 表达较弱,从第 16 d 开始对照香

蕉果实 *MaPG3* 基因表达量迅速增加,在第 23 d 达到最大值。NO 处理的香蕉果实 *MaPG3* 基因在第 25 d 才有较高的表达,说明 NO 可显著抑制贮藏过程香蕉果实 *MaPG3* 基因的表达。

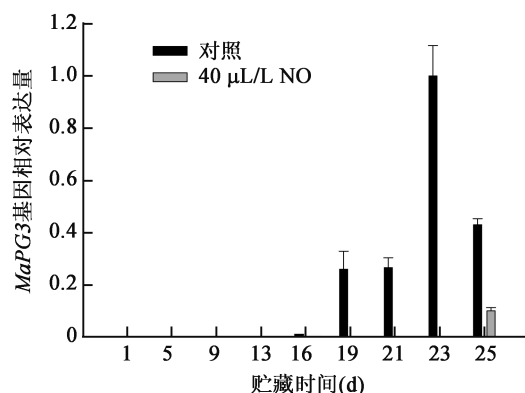


图 6 NO 处理对香蕉果实 *MaPG3* 基因表达的影响

Fig.6 Effect of NO treatment on the expression of *MaPG3* of banana fruit.

2.7 NO 处理对香蕉果实 *MaPG4* 基因表达的影响

从图 7 可知,在贮藏过程中,香蕉果实的 *MaPG4* 基因在贮藏的前 16 d 表达较弱,与低的乙烯释放量相一致,之后随着乙烯的迅速释放 *MaPG4* 基因的表达量急剧增加,在第 23 d 达到最大,之后开始下降。NO 处理果 *MaPG4* 基因在贮藏的前 23 d 都表达较弱,随着乙烯峰值的出现表达量在第 25 d 迅速增加。说明 NO 可显著抑制香蕉果实贮藏过程 *MaPG4* 基因的表达,并延缓基因表达峰值的出现。

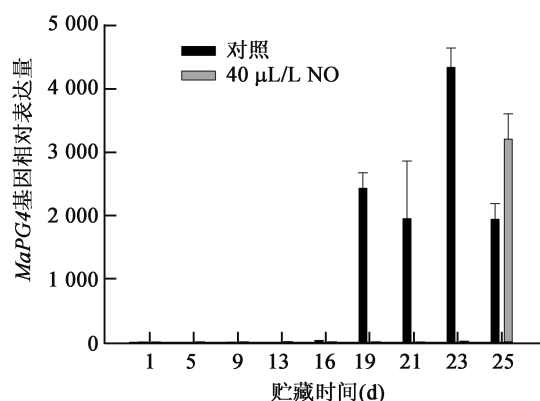


图 7 NO 处理香蕉果实 *MaPG4* 基因表达的影响

Fig.7 Effect of NO treatment on the expression of *MaPG4* of banana fruit.

3 讨论

香蕉果实软化是成熟衰老过程的重要特征,直接影响到果实的采后贮藏和商品价值。本研究的结果表明 NO 可显著抑制香蕉果实乙烯的生成,延缓硬度的下降,与 NO 对番茄、番木瓜、草莓的研究结果相一致^[10,13,14]。已有研究表明 NO 可通过抑制果实 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 氧化酶 (ACO) 的活性及 *CpACO1* 基因的表达量来降低乙烯释放量^[15],从而延缓硬度的下降^[12],这可能是 NO 与 ACO 反应生成 ACO-NO 配合物,再与 ACC 反应形成 ACC-ACO-NO 配合物,阻止了乙烯的产生。但也有研究发现果实成熟过程乙烯释放量的降低是由于 NO 与 ACC 合成酶 (ACS) 发生硝基化反应从而抑制了 ACS 的活性^[16]。这些结果表明:NO 降低乙烯释放量的机理可能还与果实的种类有关。

乙烯的迅速释放会加快果实的软化,果实的软化与细胞壁中果胶物质的增溶作用以及酶活性的变化有关^[4,17]。香蕉果实软化是细胞壁中层结构变化,大量细胞壁结构丧失以及细胞壁物质降解,导致细胞发生分离所致。PG 是导致细胞壁、果胶降解的主要因素,在果实成熟软化过程中起重要作用^[6],PG 活性的变化与乙烯及其合成相关酶的变化趋势一致,对果实的快速软化产生较大的影响^[4,15]。本研究结果表明 NO 处理可延缓香蕉贮藏过程 PG 活性的增加,与 Guo 等^[4]在番木瓜中的研究一致。PGs 可以催化番茄果实中果胶分子 β -(1,4)-聚半乳糖醛酸的裂解,从而参与果胶的降解,促进果实软化。NO 可能是抑制了 PG 活性,从而阻止了果实细胞壁多糖中多聚半乳糖醛酸降解为半乳糖醛酸,维持了细胞壁结构的完整性。但是,对反义 PG 转基因番茄及成熟变异植株的研究发现,果实的硬度并非随 PG 活性及果胶的降解而变化,或者在抑制 PG 活性的情况下果实仍然变软^[18],说明 PG 在果实成熟软化过程不是单独起作用,而是与软化调控网络中其它物质相互影响共同决定着果实的软化^[4]。

PG 基因的表达受乙烯调控,乙烯可以诱导绿熟期番茄 PG mRNA 的积累^[6]。Wei 等^[19]研究发现乙烯利处理金冠苹果,PG 基因表达量显著增加,且峰值极显著高于对照。Hiwasa 等^[20]发现

丙烯能促进梨果实乙烯的产生、PG 基因的大量表达以及果实的快速软化。本研究中发现 NO 处理的香蕉果实与对照相比,乙烯释放量明显降低,前期 *MaPGs* 基因表达量都很低,*MaPG2*、*MaPG3* 和 *MaPG4* 基因表达峰值显著低于对照,出现的时间也被推迟,这些结果表明 NO 可下调 *MaPG2*、*MaPG3* 和 *MaPG4* 基因的表达,但对 *MaPG1* 基因的表达水平无显著影响,进一步说明 *MaPGs* 基因可能分别调控香蕉果实 PG 不同时期的表达,且这些基因的表达受乙烯调控,参与 PG 合成,但 *MaPG1* 基因对香蕉果实软化的影响不大。

40 $\mu\text{L/L}$ NO 可降低‘巴西’香蕉果实乙烯释放量,延缓果实硬度的下降,也可抑制 PG 活性及 *MaPG2*、*MaPG3* 和 *MaPG4* 基因的表达来延缓果实的软化,但 NO 在香蕉果实软化调控网络中的信号途径还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Huang H, Jing G, Guo L, *et al.*. Effect of oxalic acid on ripening attributes of banana fruit during storage[J]. *Postharv. Biol. Technol.*, 2013, 84: 22-27.
- [2] Nunes C, Santos C, Pinto G, *et al.*. Effects of ripening on microstructure and texture of ‘‘Ameixad’ Elvas’’ candied plums[J]. *Food Chem.*, 2009, 115: 1094-1101.
- [3] Amnuaysina N, Jones M L, Seraypheap K. Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peels of hot water treated bananas[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 142: 98-104.
- [4] Guo Q, Wu B, Chen W, *et al.*. Effects of nitric oxide treatment on the cell wall softening related enzymes and several hormones of papaya fruit during storage[J]. *Food Sci. Technol. Int.*, 2013, DOI: 10.1177/1082013213484919.
- [5] Crookers P R, Grierson D U. Trastructure of tomato fruit ripening and the role polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation[J]. *Plant Physiol.*, 1983, 72(4): 1088-1093.
- [6] 姜妮娜, 饶景萍, 付润山, 等. 柿果实采后软化中 PG 酶活性及其基因 *DkPG1* 的表达[J]. *园艺学报*, 2010, 37(9): 1507-1512.
- [7] Asif M H, Nath P. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit[J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2005, 43: 177-184.
- [8] de B Vilas-Boas E V, Kader A A. Effect of atmospheric modification, 1-MCP and chemicals on quality of fresh-cut banana[J]. *Postharv. Biol. Technol.*, 2006, 39: 155-162.
- [9] Zhang L, Zhu S, Chen C, *et al.*. Metabolism of endogenous nitric oxide during growth and development of apple fruit[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 127: 500-506.
- [10] 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): 227-23.
- [11] Zheng Y, Shen L, Yu M, *et al.*. Nitric oxide synthase as a

- postharvest response in pathogen resistance of tomato fruit[J]. Postharv. Biol. Technol., 2011, 60: 38-46.
- [12] Guo Q, Lv X, Xu F, *et al.*. Chlorine dioxide treatment decreases respiration and ethylene synthesis in fresh-cut ‘Hami’ melon fruit[J]. Int. J. Food Sci. Technol., 2013, 48: 1775-1782.
- [13] Eum H L, Kim H B, Choi S B, *et al.*. Regulation of ethylene biosynthesis by nitric oxide in tomato (*Solanumlycopersicum* L.) fruit harvested at different ripening stages [J]. Eur. Food Res. Technol., 2009, 228(3): 331-338.
- [14] 朱树华,周 杰,束怀瑞,等. 一氧化氮延缓草莓成熟衰老的生理效应[J]. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1418-1424.
- [15] 郭 芹,王吉德,李雪萍,等. 一氧化氮处理对采后番木瓜果实乙烯生物合成的影响[J]. 广东农业科学, 2013, (3): 75-78.
- [16] Zhu S H, Zhou J. Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage[J]. Food Chem., 2007, 100: 1517-1522.
- [17] Brummell D A, Labavitch J M. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates [J]. Plant Physiol., 1997, 115: 717-725.
- [18] Smith C J S, Waterson C G, Ray J, *et al.*. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression on transgenic tomatoes[J]. Nature, 1998, 334: 724-726.
- [19] Wei J M, Ma F W, Shi S G, *et al.*. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit[J]. Postharv. Biol. Technol., 2010, 56 (2): 147-154.
- [20] Hiwasa K, Kinugasa Y, Amano S, *et al.*. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyruscommunis* L.) fruit[J]. J. Exp. Bot., 2003, 54 (383): 771-779.