

## 信息与资料 Information and Data

## 植物中一氧化氮与园艺产品的成熟和衰老

朱树华<sup>1</sup> 周杰<sup>2,\*</sup> 束怀瑞<sup>1</sup>山东农业大学<sup>1</sup>园艺学院,<sup>2</sup>化学与材料科学学院, 泰安 271018

## Nitric Oxide in Plants and Ripening and Senescence of Horticultural Products

ZHU Shu-Hua<sup>1</sup>, ZHOU Jie<sup>2,\*</sup>, SHU Huai-Rui<sup>1</sup><sup>1</sup>College of Horticulture, <sup>2</sup>College of Chemistry and Material Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018

**提要** 概述了一氧化氮(NO)的生物学特性、植物中NO的来源、NO对园艺产品成熟保鲜的作用及其生理机制研究的新进展。

**关键词** NO; 园艺产品; 成熟; 衰老

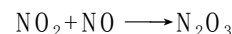
自从1980年发现血管内皮细胞能合成分泌一种血管内皮舒张因子<sup>[1]</sup>并证明该因子是一氧化氮(NO)<sup>[2,3]</sup>以来, NO引起了人们的重视, 并成为生物学研究的热点, 1992年被 *Science* 评为“年度明星分子”<sup>[4]</sup>。Furchgott、Ignarro和Murad也因对NO的出色研究而共同获得1998年诺贝尔生理学 and 医学奖。多年来, NO被视为一种植物毒性分子。直到1998年, Delledonne小组<sup>[5]</sup>和Klessig小组<sup>[6]</sup>发现NO可以作为植物抗病反应的信号分子后, 人们开始重新认识NO在植物中的生理作用。研究认为, NO可与植物的抗坏血酸氧化酶<sup>[7]</sup>、漆酶<sup>[8]</sup>、脂氧合酶<sup>[9]</sup>等反应, 并对植物呼吸作用<sup>[10]</sup>、光形态发生<sup>[11]</sup>、种子萌发<sup>[11,12]</sup>、根和叶片的生长发育<sup>[13,14]</sup>、植物抗病防御反应<sup>[6,15,16]</sup>和胁迫响应<sup>[5,6,17,18]</sup>等生理过程有作用。

Leshem和Wills<sup>[19]</sup>首次报道NO对草莓果实成熟和衰老有潜在的控制作用, 但迄今对此还未进行系统的研究。本文从下列几个方面概述了NO对园艺产品成熟、衰老的调控和与此问题相关领域的研究进展。

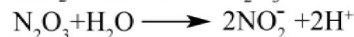
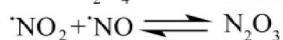
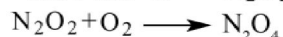
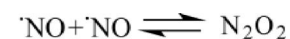
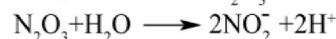
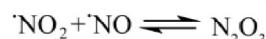
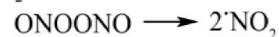
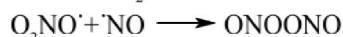
### 1 NO的生物学特性

NO是高脂溶性、结构简单、极不稳定的小分子气体, 在水中的溶解度随着温度的增高而降低, 相同温度下溶解度大于O<sub>2</sub>, NO不带电荷, 可以自由通过生物膜。

气相NO与O<sub>2</sub>反应中存在游离的NO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:



水溶液中NO的自氧化是非常复杂的过程, 存在两个可能反应机制<sup>[20]</sup>。在机制I中ONOO<sup>-</sup>是反应产生的第一个中间产物, 具体步骤如下:



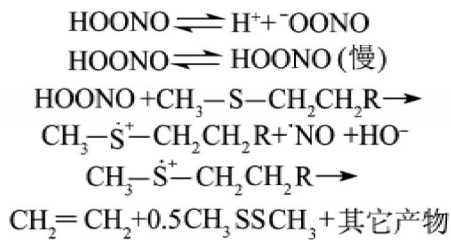
机制II是从NO的二聚化反应开始的:

但是水溶液中NO与O<sub>2</sub>的总反应式与气相中N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶于水后的总反应式相同。

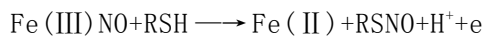
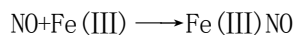
NO与O<sub>2</sub><sup>-</sup>反应生成ONOO<sup>-</sup>, 其质子化产物为化学活性很强的过氧亚硝酸(ONOOH)。后者可与甲硫氨酸或巯甲基化合物反应产生NO<sub>2</sub>、OH<sup>-</sup>、乙烯等<sup>[21]</sup>。

收稿 2004-02-17 修定 2004-08-27  
资助

\* 通讯作者 (E-mail:zhoujie@sda.u.edu.cn, Tel:0538-8242174)。



在电子受体作用下 NO 使有机化合物分子亚硝酰化。如：



另外, NO 可与脂质过氧化产物  $\text{LOO}^\cdot$  反应成为  $\text{LOONO}$ , 从而终止脂质过氧化链式反应<sup>[22]</sup>。

在生命体内, NO 通过上述各种化学反应表现出许多生物学特性。在动物体内, NO 可以作为一种信号分子和效应分子参与心血管、免疫和神经系统的一系列生理活动调节作用。在心血管系统中发挥作用的可能机制是: 通过提高细胞中鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC) 促进 3', 5'-环鸟苷酸 (guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cGMP) 的产生, 于是细胞内 cGMP 水平增高, 继而激活依赖 cGMP 的蛋白激酶对心肌肌钙蛋白 I 的磷酸化作用加强, 肌钙蛋白 C 对  $\text{Ca}^{2+}$  的亲和力下降, 肌细胞膜上  $\text{K}^+$  通道活性也下降, 从而导致血管舒张。NO 还能抑制血小板凝集, 是免疫细胞中的防御分子。在神经系统, 中 NO 通过扩散, 作用于相邻的周围神经元, 再激活 GC, 从而提高 cGMP 水平而产生生理效应<sup>[23]</sup>。如 NO 可诱导与学习、记忆有关的长时程增强效应, 并在其中起逆信使的作用<sup>[24]</sup>。另据报道, NO 在胃肠神经介导胃肠平滑肌松弛中起中介作用<sup>[25]</sup>, 并且作为神经元递质, 在泌尿系统中也有作用。经过二十多年的研究, NO 在动物和医学领域无论从理论上还是应用方面都取得了引人注目的成果。在植物体内, NO 的作用尽管没有像在医学上的研究取得那么多惊人的成果, 但经过近 10 年的努力, NO 在植物生长发育和抗逆生理等方面也取得一些进展, 其中, 在植物抗病等方面, 国内外已有一些评述报道<sup>[26~35]</sup>。

## 2 植物中 NO 的来源

植物内源 NO 可由下面 3 个途径产生:

(1) 由一氧化氮合酶 (NOS) 催化产生。

Ninnemann 和 Maier<sup>[36]</sup> 在黎豆 (*Mucuna hassjoo*) 中检测到 NOS 的活性, 显示植物中可能存在类似于哺乳动物的 NOS 产生 NO 的机制。随后, 在烟草<sup>[6]</sup>、大豆<sup>[37]</sup>、小麦<sup>[17]</sup> 和短叶紫杉 (*Taxus brevifolia*)<sup>[38]</sup> 等作物中也检测到 NOS 的活性, 且受动物 NOS 抑制剂  $\text{N}^6$ -单甲基-L-精氨酸 ( $\text{N}^6$ -monomethyl-L-arginine, NMMA) 和  $\text{N}^9$ -硝基-L-精氨酸 ( $\text{N}^9$ -nitro-L-arginine, LNNA) 等抑制。

但是 Garcia-Mata 和 Lamattina<sup>[39]</sup> 及 Butt 等<sup>[40]</sup> 发现哺乳动物 NOS 抗体可以识别一些与 NOS 无关的植物蛋白, 而植物中未发现序列与哺乳动物 NOS 相同的基因或蛋白, 认为不能用哺乳动物 NOS 来推断植物 NOS。

2003 年, Chandok 等<sup>[41]</sup> 证实烟草花叶病毒 (TMV) 诱导烟草 (*Nicotiana cv. Xanthi*) 合成 NO 的主要酶是甘氨酸脱羧酶复合物 (GDC) 的 P 蛋白变异体。该变异 P 蛋白与哺乳动物 NOS 同源序列很少, 表明植物 NOS 与哺乳动物 NOS 不完全相同。

最近, Ecker 小组公布了拟南芥突变体基因 *AtNOS1* (ID # AT3G47450, www.Arabidopsis.org)。Guo 等<sup>[42]</sup> 发现该基因可以编码一种蛋白, 该蛋白与蜗牛 (*Helix pomatia*) 体内 NO 合成有关的蛋白序列相同。用荧光染料 4, 5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) 检测发现, 野生型拟南芥幼苗根尖可以大量产生内源 NO, 而 *AtNOS1* 突变体中 NO 产生显著减少。脱落酸 (ABA) 可诱导野生型的 NO 水平增加, 而突变体中仍然很低。ABA 诱导的 NO 产生受  $\text{N}^6$ -nitro-L-Arg-methyl ester (L-NAME) 抑制, 但 ABA 处理后拟南芥根中 *AtNOS1* mRNA 水平并未显著增加, 证明 *AtNOS1* 参与拟南芥中的 NO 合成。

为检验 *AtNOS1* 是否编码具有 NOS 活性的酶, Guo 等<sup>[42]</sup> 把 *AtNOS1* 作为谷胱苷肽-S-转移酶的融合蛋白在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达, 分离到一个 *AtNOS1* cDNA 克隆, 该克隆编码有 561 个氨基酸的蛋白质。有融合蛋白表达的大肠杆菌提取液的 NOS 活性水平提高。经谷胱苷肽亲和层析纯化后发现, 该蛋白 NOS 活性依赖于 NADP、钙调素和  $\text{Ca}^{2+}$ , 并受 L-NAME 抑制, 这与哺乳动物 eNOS 和 nNOS 的性质相同。不同的是, 哺乳动物 NOS 的辅因子四氢生物蝶呤 ( $\text{BH}_4$ )、

黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、黄素单核苷酸(FMN)和亚铁血红素等不能激发AtNOS1蛋白的活性。哺乳动物NOS的中间产物N-羟基精氨酸(N-hydroxyarginine, NOHA)是AtNOS1的底物。动力学分析表明,其对精氨酸的 $K_m$ 值为 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,最大反应速率( $V_{\max}$ ) $5.0 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。这些实验证明AtNOS1编码的植物NOS具有一些特有性质。

ABA促进内源NO合成并诱导气孔关闭<sup>[18, 43, 44]</sup>。与野生型相比,ABA引发的AtNOS1突变体气孔反应很小,并且ABA不能抑制光诱导的AtNOS1突变体气孔开放,相同条件下野生型拟南芥却被显著抑制,说明ABA诱导的NO产生和气孔关闭过程中需要AtNOS1的参与,并进一步暗示AtNOS1依赖型NO的产生发生在该信号途径中的ABA下游<sup>[42]</sup>。

植物iNOS(诱导型NOS)蛋白产生NO的 $V_{\max}$ 和哺乳动物iNOS相似,并且可被诱导。但是植物iNOS受 $\text{Ca}^{2+}$ 调控,尤为重要,植物NOS蛋白序列不同于哺乳动物的NOS蛋白<sup>[42]</sup>。这一成果证实了植物体内NOS基因的存在,并表明在植物中也存在NOS酶,是对植物内源NO研究的巨大突破。

(2)硝酸还原酶(NR)介导NO产生。植物的NR可将电子从NAD(P)H转移到 $\text{NO}_3^-$ <sup>[45]</sup>。1981年Harper<sup>[46]</sup>分析大豆叶片组织中NR活性时检测到NOx的产生,其主要成分是NO和少量的 $\text{N}_2\text{O}$ 以及 $\text{NO}_2$ <sup>[39]</sup>。目前认为, NR也是植物体内的NO合成酶,NO是植物氮代谢的天然副产物<sup>[47]</sup>。Yamasaki等<sup>[48]</sup>发现,离体培养玉米的诱导型硝酸还原酶(iNR)将亚硝酸盐还原为NO,亚硝酸盐是iNR催化产生NO的真正底物。

Desikan等<sup>[43]</sup>报道在ABA诱导拟南芥气孔关闭过程中NR可介导NO产生。ABA和亚硝酸盐处理后拟南芥表皮NO产生量和气孔关闭显著相关,而经NO清除剂2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-羟-3-氧(2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, PITO)可降低ABA和亚硝酸盐诱导的气孔关闭和DAF-2DA荧光。而且,NaCl(亚硝酸钠拮抗剂)不能诱导气孔关闭,表明并不仅是亚硝酸盐的离子起作用。ABA和亚硝酸诱导气孔关

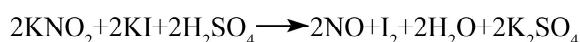
闭时保卫细胞合成NO。NR调控ABA诱导的保卫细胞NO合成和气孔关闭,但是目前还未发现NR的特异抑制因子。

(3)由反硝化作用、硝酸盐同化作用和植物的呼吸作用的副产品产生。早期研究表明,部分低等植物、高等草本植物或木本植物的野生种可以释放NO<sup>[46, 49~51]</sup>。光诱导白羽扇豆(*Lupinus albus*)根中 $\text{NO}_2$ 转化为NO<sup>[52]</sup>。20世纪70年代, Beevers<sup>[51]</sup>推测植物NO存在于土壤微生物介导的硝化和反硝化过程中。大多数情况下,植物组织中NO的产生是与 $\text{NO}_2$ 的积累相联系的。 $\text{NO}_2$ 既可通过非酶反应生成NO,又可通过由类胡萝卜素转化的光介导的非酶促反应产生,或是由NADPH硝酸还原酶的酶促反应产生<sup>[50]</sup>。植物体外的亚硝酸盐可通过非酶还原生成NO<sup>[53]</sup>,向培养基中加入亚硝酸盐后,大麦(*Hordeum vulgare*)糊粉层即可迅速产生NO,质外体中亚硝酸盐含量减少。此途径需要酸性环境,苯酚化合物可提高NO产生速度。NO还可在外界胁迫条件下如敌草快(diquat)和百草枯(paraquat)等除草剂处理后产生<sup>[54]</sup>。受无毒菌株及有毒菌株的相对微弱的迅速刺激,尤其在接种无毒菌株的细胞中,NO会增加好几倍<sup>[5]</sup>。

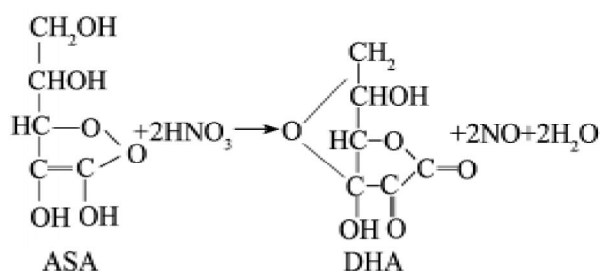
外源NO可以通过以下途径获得:

(1)含氮气体中获得。

(2)在溶液化学反应中产生,如将 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KI+ $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ 与 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KNO}_2$ 混合,发生如下反应( $\text{KNO}_2$ 和NO之间的比例为1:1):



亚硝酸和抗坏血酸等在酸性条件下反应也可以产生NO。



(3)可从释放NO的载体化合物中获得。目前已有一些商品化的载体化合物,如硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)和S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺(S-nitroso-N-acetyl-penicillamine, SNAP)。系列

NO 载体的出现为 NO 生物学特性研究提供了极大方便。

### 3 NO与园艺产品成熟衰老

#### 3.1 NO对园艺产品成熟衰老的调控

**3.1.1 果品** 柑橘、香蕉等果实的果肉先进入完熟阶段, 然后是果皮完熟。柑橘果皮稍微变绿时果肉就达到最佳商品阶段, 果皮由绿变黄时的果肉即丧失了商品价值。采收前数周喷施赤霉素可延缓柑橘果皮变色, 乙烯抑制剂可延缓香蕉腐败。对绿熟期酸橙(*Citrus aurantium*)照光后NO释放量增加, 完熟期柑橘(果皮黄色)未见NO量有增加。相比之下, 中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)无论成熟与否, 光照不能明显提高其NO产生速度。以上结果表明果皮叶绿体可能是NO代谢的位点之一<sup>[55]</sup>。在未成熟果实中, 产生NO的另一个可能部位是果肉组织的小泡, 此组织产生NO很活跃, 产生速率随果实的成熟而下降。果肉液囊中汁液可能对内源NO的产生和NO含量多少有一定的作用<sup>[55]</sup>。

1996年, Leshem和Haramaty<sup>[56]</sup>首次报道了经济作物内源NO的产生和作用, 并提出以NO作为果实成熟的调控因子。Leshem等<sup>[57]</sup>采用*N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitrone* (PBN)和3-morpholino silynonime (SIN-1)等所释放的一定浓度的外源NO来处理鳄梨、香蕉、樱桃、番茄、猕猴桃、柿和甜橙后, 发现未成熟果实产生的内源NO量均显著高于成熟的果实, 鳄梨和香蕉的未成熟组织中NO含量分别是其成熟果实的约10倍和4倍。

无论是呼吸跃变型还是非跃变型果实, 外源NO均可延迟其成熟衰老。降低草莓等果实周围的乙烯浓度可以延长其贮藏时间<sup>[58, 59]</sup>。以 $5\sim 10\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  NO熏蒸草莓2 h可使其贮藏期延长50%。这与1-甲基环丙烯(1-methylcyclopropene, 1-MCP)的效果相似。Ku等<sup>[60]</sup>报道 $5\sim 15\ \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$  1-MCP熏蒸2 h可以延长草莓贮藏期, 而 $500\ \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$  1-MCP则缩短其贮藏期。

跃变型果实成熟衰老过程中, 在呼吸逐渐降低后会产生一个乙烯诱导的呼吸高峰; 而非跃变果实成熟后没有呼吸高峰, 随着果实成熟其呼吸逐渐下降。Willis等<sup>[61]</sup>指出, 通常情况下, 跃变型果实完熟期产生乙烯的量高于非跃变果实, 浓

度低于 $0.1\sim 1.0\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙烯处理1 d就足以使其完熟。而外源乙烯仅引起非跃变果实呼吸的瞬时增加。Leshem<sup>[62]</sup>发现NO对非跃变品种作用比跃变型明显, 非跃变品种柑橘果肉组织汁液中内源NO含量特别高, 远远超出许多跃变品种果实中NO的含量, 并推测柑橘的果肉含有高浓度NO及NOS含量和活性高等特点可能有助于解释非跃变品种完熟机制, 但还需要进一步研究证实。

植物组织成熟和衰老进程中, NO释放量的下降与乙烯产量的升高密切相关<sup>[56]</sup>。未成熟的草莓和鳄梨的NO产量很高而乙烯产量很低, 但成熟的草莓和鳄梨正好相反, 表明NO可能是一种可延缓果实衰老的天然植物生长调节物质, 其作用机制与抑制乙烯产生有关<sup>[63]</sup>。随着草莓和鳄梨果实的成熟、衰老, 其内源NO量显著下降, 施用NO释放剂(PBN或SIN-1)可明显延缓成熟和衰老进程<sup>[19]</sup>。

**3.1.2 蔬菜** NO与内源乙烯关系的最初来源于一系列衰老豌豆叶片的实验<sup>[56]</sup>。早期报道, 豌豆断根处理60 min内乙烯释放显著<sup>[64]</sup>。Leshem和Haramaty<sup>[56]</sup>用 $\text{KNO}_3$ 等反应产生的NO熏蒸豌豆(*Pisum sativum*)叶片, 并在部分处理的溶液中加入乙烯前体物质ACC, 2 h后发现无论施用ACC与否, NO与乙烯均同时释放, 在未以ACC处理的实验中, 乙烯和NO释放均下降, 但NO释放量多于乙烯。低浓度NO促进豌豆叶片的伸展, 高浓度则有使其缩小的趋势, 将叶片直接置于纯NO中时出现明显生长下降趋势。统计分析表明, NO载体化合物抑制豌豆叶片生长的能力为:  $\text{SNAP} > \text{PBN} > \text{SIN-1}$ <sup>[56]</sup>。

**3.1.3 切花** Leshem等<sup>[57]</sup>用PBN和Sin-1等释放NO来熏蒸三友花(*Chanaelaucium uncinatum*)和极美泰洛帕(*Telopea speciosissima*)鲜切花, 发现花朵和萼片更加紧凑而舒展, 产生的内源NO量显著高于衰老花(约为衰老花的2.5倍)。并且, 货架期延长50%~150%<sup>[19]</sup>。在康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)的培养液中加入PBN和SIN-1(NO自由基浓度为 $10^{-7}\sim 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和ACC, 处理6 d后发现 $10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NO可有效抑制ACC引起的花瓣变褐萎蔫。这种抑制作用与NO浓度有关, 低浓度的NO供体抑制衰老的能力差<sup>[57]</sup>。任小林等<sup>[65]</sup>

提出, 适宜浓度( $10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>)NO气体熏蒸, 可延长玫瑰和香石竹鲜切花的货架期, 黄瓜和青椒得到的实验结果与此相同。

**3.1.4 在园艺产品保鲜中的应用前景** 当前, 园艺产品贮藏保鲜中常用低温贮藏保鲜技术和气调贮藏保鲜技术。低温贮藏保鲜是以控制温度为条件来抑制果蔬生理活性、抑制微生物的繁殖, 其缺点是在贮藏中果蔬尚存在部分微生物继续活动, 并发生萎缩现象, 因此贮藏时间较短。气调贮藏是较先进的果蔬保鲜法, 发展较快, 可以延缓果蔬衰老, 减少乙烯对果蔬的刺激, 降低腐烂率等, 因而成为正在兴起的研究热潮, 但是该方法耗能大, 成本高。

作为一种气体保鲜药剂, NO通过抑制乙烯产生和作用来延长新鲜园艺产品采后寿命的作用, 具有极大的潜在应用价值。在这一点上, 低浓度

NO短时熏蒸的效果优于N<sub>2</sub>O (N<sub>2</sub>O熏蒸需要长时间和高浓度)<sup>[19]</sup>。草莓经5~10 μL·L<sup>-1</sup>的NO熏蒸2 h后无论置于20℃还是5℃中, 均能延长货架期在50%以上<sup>[66]</sup>, 从而降低了库房费用和运输销售中的成本, 因而NO在实际贮藏保鲜应用中似乎更具有可行性。植物内源NO在空气中的半衰期仅5~12 s, 在这样短的时间内就迅速转化为NO<sub>2</sub>, 所以外源熏蒸时需要除氧。NO极易与水反应生成NO<sub>2</sub>, 一定浓度的NO<sub>2</sub>可以杀菌, 而人胃液和唾液中都含有NO<sub>2</sub>, 唾液中的含量大于50 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[67]</sup>, 所以低浓度的NO对生物体有积极作用。但是浓度高于10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup>的外源NO会对环境和生物体产生毒害, 因此NO用于贮藏保鲜时, 应先对其技术进行研究, 以进一步改善熏蒸环境, 使之易于操作。同时, 还应根据不同果实品种特性、产区和生长季节来确定适宜浓度NO的研究也相当重

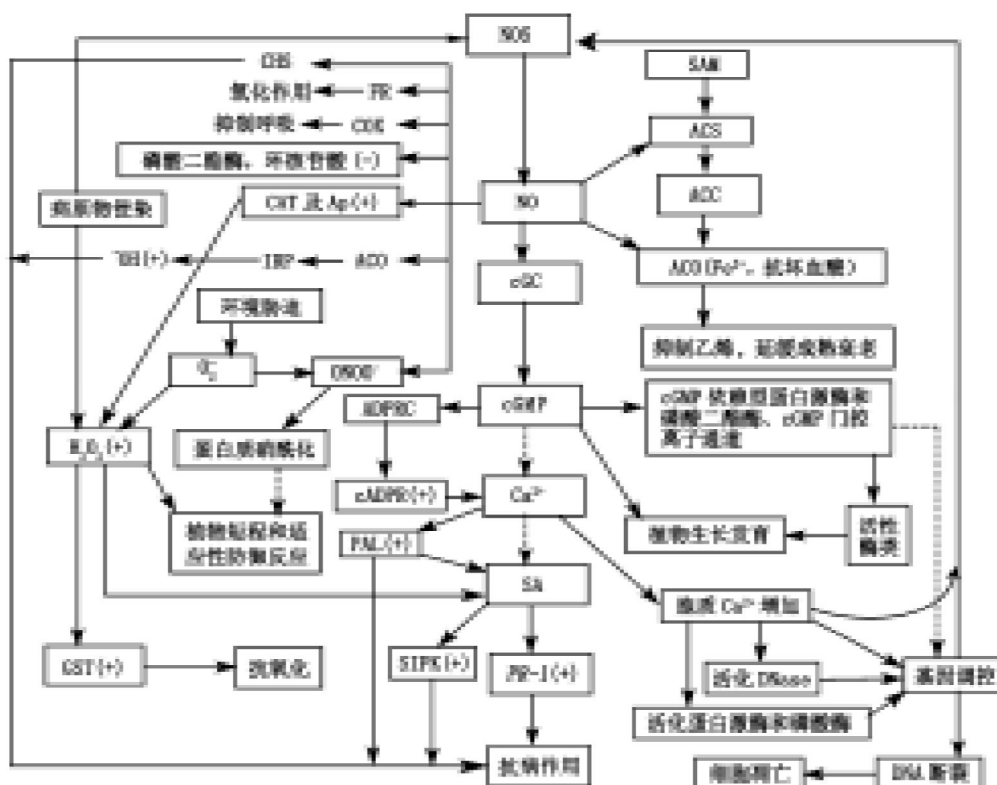


图1 植物体内NO作用途径

图1是参照Leshem<sup>[62]</sup>和张文利<sup>[68]</sup>, 并略有改动。ACC: 1-氨基环丙烷-1-羧酸, ACO: 顺乌头酸酶, ACS: ACC合成酶, ADPRC: ADP-核糖环化酶, Ap: 抗坏血酸过氧化物酶, cADPR: 环式ADP-核糖, CAR: 类胡萝卜素, CAT: 过氧化氢酶, CHS: 苯基苯乙烯酮合成酶, COX: 细胞色素氧化酶, FR: 自由基, cGC: 鸟苷酸环化酶, GST: 谷胱甘肽硫转移酶, IRP: 铁调节蛋白, NOS: 一氧化氮合酶, NR: 硝酸还原酶, PAL: 苯丙氨酸解氨酶, PR-1: 病程相关蛋白-1, SA: 水杨酸, SAM: S-腺苷甲硫氨酸, SIPK: 水杨酸诱导蛋白激酶, cGMP: 环鸟苷单磷酸。(+) : 促进作用, (-) : 抑制作用, (...) : 尚需确定的步骤。

要。

**3.2 可能的作用机制** 如图1所示,植物体内NO有多个作用途径, NO作为效应分子参与植物抗氧化、抗病及其它防御反应;同时,作为信号分子,参加植物生长和逆境条件下的信号调节过程,并通过抑制顺乌头酸酶(ACO)和ACC合成酶(ACS)活性来调控乙烯作用,从而延缓植物成熟衰老。

**3.2.1 NO的双重作用** 衰老自由基学说认为,自由基产生与清除的平衡对维持生物体正常物质代谢起作用,衰老是自由基过度氧化的过程,任何降低自由基过度氧化的措施都可以延缓衰老。NO对生物体有双重作用。一方面,低浓度NO能迅速清除超氧阴离子( $O_2^-$ )和脂质自由基( $R^-$ ),阻断包括脂质过氧化在内的ROS参与的各种伤害反应,诱导抗氧化酶基因的表达,起保护作用<sup>[42, 43]</sup>。另一方面,高浓度NO与 $O_2^-$ 相互作用生成大量的过氧亚硝酸阴离子( $ONOO^-$ ),后者质子化形成强氧化性的过氧亚硝酸( $ONOOH$ ),破坏生物大分子的结构与功能,最终具有生物毒性<sup>[42]</sup>。一般认为,这种双重作用取决于以下因素:(1)NO的生成量: $10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平的NO主要起到信息传递和免疫功能,对机体是有益的;当NO在局部产生过多,达到 $10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平时,则常常引起细胞毒性作用。(2)NO的氧化还原状态:以 $NO^+$ (氧化型)状态存在时有保护作用,以 $NO^-$ (还原型)状态存在时则有神经毒性作用。(3)环境pH值: $NO^-$ 和 $O_2^-$ 形成的 $ONOO^-$ 在碱性条件( $pH = 7.40 \pm 0.60$ )下相当稳定,一旦低于生理pH,立即分解为 $\cdot OH$ 自由基和 $NO^-$ 自由基,具有很强的细胞毒性。(4)产生NO的NOS类型:NOS是NO生成的主要限速因子。由cNOS(构成型NOS,包括神经元型nNOS和内皮细胞型eNOS)催化产生的NO主要起生理信使作用,而由iNOS(诱导型NOS)催化产生的NO主要参与免疫炎症反应和细胞毒性作用。cNOS激活后酶活力持续时间很短;iNOS诱导一般需数小时才显示酶活性,一经诱导生成,酶活性持续时间较长。

**3.2.2 NO参加乙烯调控植物衰老的过程** 乙烯是促进成熟的激素,增加乙烯生成量和改变组织对乙烯的敏感性均可调节果实成熟。NO参与乙烯的

调控过程,NO和/或过氧亚硝酸盐可以通过其辅因子(抗坏血酸和 $Fe^{2+}$ )氧化灭活作用抑制顺乌头酸酶(ACO)和ACC合成酶(ACS)活性,从而降低乙烯及其相关物质的释放速率。当然这并不排除植物体内还存在NO作用的其他模式。

#### 4 展望

近年来,NO研究已成为各学科中非常活跃的研究课题,并有多项成果申请专利,其中美国专利商标局(<http://www.uspto.gov/patft>)有131项,我国专利局有34项(<http://www.cnipr.com>),而2004年至今就已有7项专利问世。多数专利是关于NO在医学和相关领域的研究和应用。植物NO的研究起步较晚,目前只在草莓、鳄梨和樱桃番茄等极少数果品中进行了初步研究,国内只在鸭趾草<sup>[69]</sup>、蚕豆<sup>[70]</sup>和小麦叶片<sup>[68, 71~73]</sup>中作了实验,还未见到有关保鲜的正式报道,果品贮藏过程中NO的作用机制还不清楚,NO贮藏保鲜技术体系也尚未建立。但是,NO作为一种生物小分子,其藏保鲜功能已初现端倪,对此问题进行研究还有助于查明果品保鲜的机制。与其他保鲜措施相比,适宜浓度NO处理具有效果明显、省时省力、节约成本等优点。因此,研究NO在果蔬产品贮藏保鲜中的应用技术有一定的理论和实际意义,开发潜力很大,值得深入探讨。我们认为今后可考虑从以下几个方面深入研究:(1)植物体内NO代谢的生理机制;(2)NO参与成熟衰老过程中的乙烯调控及其信号转导过程;(3)NO保鲜的分子生物学机制;(4)调控内源NO代谢途径和含量变化进行产品保鲜的技术措施以及以NO保鲜不同园艺产品条件的优化和技术体系的构建。

#### 参考文献

- 1 Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288:373~376
- 2 Ignarro LI, Buga GM, Wsood KS et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84:9265~9269
- 3 Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327:524~526
- 4 Daniel E, Koshland Jr. The molecular of the year. *Science*, 1992, 258:1861

- 5 Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA et al. Nitric oxide function as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 1998, 394: 585~588
- 6 Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10328~10333
- 7 Van Leeuwen FXR, Wever R, Van Gelder BF et al. The interaction of nitric oxide with ascorbate oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 403:285~291
- 8 Martin CT, Morse RH, Kanne RM et al. Reactions of nitric oxide with tree and fungal laccase. *J Biochem*, 1981, 20: 5147~5155
- 9 Nelson MJ. The nitric oxide complex of ferrous soybean lipoxygenase-1, substrate, pH and ethanol effects on the active site iron. *J Biol Chem*, 1987, 262:12137~12142
- 10 Millar AH, Day DA. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett*, 1996, 398:155~158
- 11 Beligni MV, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 2000, 210:215~221
- 12 Giba Z, Grubisic D, Todorovic S et al. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of empress tree seeds. *Plant Growth Regul*, 1998, 26: 175~181
- 13 Leshem YY. Nitric oxide in biological system. *Plant Growth Regul*, 1996, 18(3):155~159
- 14 Ribeiro EA Jr, Cunha FQ, Tamashiro WMS et al. Growth phase dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett*, 1999, 445:283~286
- 15 Camp WV, Van Montagu M. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci*, 1998;3(9): 330~334
- 16 Dang IJ. Plants just say NO to pathogens. *Nature*, 1998, 394: 525~527
- 17 Zhao Z, Chen G, Zhang C. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Aust J Plant Physiol*, 2001, 28:1055~1061
- 18 Neil SJ, Desikan R, Clarke A et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 2002, 128:13~16
- 19 Leshem YY, Wills RBH. Harnessing senescence delaying gases nitric oxide and nitrous oxide: a novel approach to postharvest control of fresh horticultural produce. *Biol Plant*, 1998, 41(1):1~10
- 20 Czapski G, Goldsten S. The role of the reactions of <sup>•</sup>NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19(6):785~794
- 21 Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25(4/5):392~403
- 22 Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25(4/5): 434~456
- 23 Snyder SH. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science*, 1992, 257:494~496
- 24 Bliss TVP, Gardner MAR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 1973, 232:331~356
- 25 Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature*, 1991, 351:477~479
- 26 董海丽, 井金学. 活性氧和一氧化氮在植物抗病反应中的作用. *西北农林科技大学学报*, 2003, 31(1):161~166
- 27 梁五生, 李德葆. 一氧化氮(NO)对植物的生理和病理功能. *植物生理学通讯*, 2001, 37(6): 562~569
- 28 He Y-K, Zhang F-X, Liu Y-Z et al. Nitric oxide: a new growth regulator in plants. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2002, 28(5): 325~333
- 29 张明永, 梁承邛. 一氧化氮在植物对病原物反应中的信号作用. *植物生理学通讯*, 2000, 36(5):457~459
- 30 张文利, 沈文飏, 徐朗莱. 一氧化氮在植物体内的信号分子作用. *生命的化学*, 2002, 22(1):61~62
- 31 尉万聪, 李润植. 一氧化氮在植物抗病反应中的信号作用. *生物工程进展*, 2001, 21(1):25~28
- 32 赵志光, 谭铃铃, 王锁民等. 植物一氧化氮研究进展. *植物学通报*, 2002, 19(6):659~665
- 33 Durner J, Klessig DF. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2:369~374
- 34 Beligni MV, Lamattina L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ*, 2001, 24:267~278
- 35 Wojtaszek P. Nitric oxide in plants: To NO or not to NO. *Phytochem*, 2000, 54:1~4
- 36 Ninnemann H, Maier J. Indication for occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and involvement in photocondensation of *Neurospora crassa*. *Photochem Photobiol*, 1996, 64:393~398
- 37 Caro A, Puntarulo S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes: possible effect on mitochondrial function. *Free Rad Res*, 1999, 31: S205~212
- 38 Pedroso MC, Durzan DJ. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. *Ann Bot*, 2000, 86:938~944
- 39 Garcia-Mata C, Lamattina L. Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure —is nitrate reductase one of the missing

- links. Trends Plant Sci, 2003, 8(1):20~26
- 40 Butt YKC, Lum JHK, Lo SCL. Proteomic identification of plant proteins probed by mammalian nitric oxide synthase antibodies. Planta, 2003, 216:762~771
- 41 Chandok MR, Ytterberg AJ, Wijk KJ et al. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. Cell, 2003, 113:469~482
- 42 Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. Science, 2003, 302:100~103
- 43 Desikan R, Griffiths R, Hancock J et al. A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediate nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 16314~16318
- 44 Garcia-Mata C, Lamattina L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. Plant Physiol, 2002, 128(3): 790~792
- 45 Crawford NM. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell, 1995, 7:859~868
- 46 Harper JE. Evolution of nitrogen oxide[s] during *in vivo* nitrate reductase assay of soybean leaves. Plant Physiol, 1981, 68:1488~1493
- 47 沈文飏. 硝酸还原酶也是植物体内的NO合成酶. 植物生理学通讯, 2003, 39(2): 168~170
- 48 Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. Trends Plant Sci, 1999, 4(4):128~129
- 49 Dean JV, Harper JE. Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the *in vivo* nitrate reductase assay. Plant Physiol, 1986, 82:718~723
- 50 Wildt J, Kley D, Rockel A et al. Emission of NO from higher plant species. J Geo Res, 1997, 102: 5919~5927
- 51 Beevers L. Nitrogen Metabolism in Plant. New York:Elsevier, 1976. 115~333
- 52 Conney RV, Harwood PJ, Marocco A et al. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide synthase activity in roots and modules of *Lupinus albus*. FEBS Lett, 1996, 398:159~164
- 53 Bethke PC, Badger MR, Jones RL. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. Plant Cell, 2004, 16(2):332~341
- 54 Beligni MV, Lamattina L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. Nitric Oxide, 1993, 3(3):199~288
- 55 Leshem YY, Wills R, Ku VVV. On chloroplast involvement and ethylene/nitric oxide stoichiometry in fruit maturation. In: Kanellis AK, Klee H, Bleecker A et al (eds). Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II. Dordrecht Boston: Kluwer Acad Pub, 1999
- 56 Leshem YY, Haramaty E. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage. Jour Plant Physiol, 1996, 148:258~263
- 57 Leshem YY, Wills RBH, Ku VVV. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO<sup>•</sup>)—as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. Plant Physiol Biochem, 1998, 36: 825~833
- 58 El-Kazzaz MK, Sommer NF, Fortlage RJ. Effect of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. Phytopathol, 1983, 73:282~285
- 59 Wills RBH, Kim GH. Effect of ethylene on postharvest life of strawberries. Post Biol Tech, 1995, 6:249~255
- 60 Ku VVV, Wills RBH, Ben-Yehoshua S. 1-Methylcyclopropene can differentially affect the postharvest life of strawberries exposed to ethylene. Hortic Sci, 1999, 34:119~120
- 61 Wills RBH, McGlasson B, Graham D et al. An introduction to the physiology and handling of fruits, vegetables and ornamentals. Sydney: UNSW Press, 1998. 40~41
- 62 Leshem YY. Nitric oxide in plants: Occure, Function and Use. Dordrecht Boston: Kluwer Acad Pub, 2000:50~78
- 63 Leshem YY, Pinchasov Y. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). J Exp Bot, 2000, 51:1471~1473
- 64 Leshem YY, Sridhara S, Thompson JE. Involvement of calcium and calmodulin in membrane deterioration during senescence of per foliage. Plant Physiol, 1984, 75:329~335
- 65 任小林, 张少颖, 于建娜. 一氧化氮与植物成熟衰老的关系. 西北植物学报, 2004, 24(1):167~171
- 66 Wills RBH, Ku VVV, Leshem YY. Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life of strawberries. Post Biol Tech, 2000, 18:75~79
- 67 郑荣梁, 黄中洋. 自由基医学与农学基础. 北京:高等教育出版社, 2001. 63~64
- 68 张文利. 小麦顺乌头酸酶对一氧化氮和过氧化氢的敏感性[硕士学位论文]南京:南京农业大学. 2002
- 69 刘新, 张蜀秋, 娄成后. 气孔运动调控中过氧化氢和一氧化氮信号途径的交叉作用. 自然科学进展, 2003, 13(4): 355~358
- 70 刘新, 张蜀秋, 娄成后. 一氧化氮参与水杨酸对蚕豆气孔运动的调控. 科学通报, 2003, 48(1): 60~63
- 71 刘鹏程, 王辉, 程佳强等. NO对小麦叶片干旱诱导膜脂过氧化的调节效应. 西北植物学报, 2004, 24(1): 141~145
- 72 屠洁, 沈文飏, 叶茂炳等. 外源NO供体对小麦的离体叶片过氧化氢酶代谢的影响. 植物学通报, 2002, 19(3): 336~341
- 73 阮海华, 沈文飏, 叶茂炳等. 一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应. 科学通报, 2001, 46(23):1993~1997