

NO参与褪黑素延缓莲子采后褐变的作用机理

罗淑芬¹, 杨 何¹, 孙 露¹, 胡花丽¹, 周宏胜¹,
刘雪松¹, 凌 军¹, 张映瞳¹, 李鹏霞^{1,2*}

(1. 江苏省农业科学院农业设施与装备研究所, 南京 210014; 2. 农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室, 南京 210014)

摘 要:为研究 NO 参与褪黑素 (melatonin, MT) 延缓莲子采后褐变的作用机理, 该研究采用蒸馏水、NO、MT、一氧化氮合酶抑制剂 (nomega-nitro-l-arginine methyl ester, L-NAME)、硝酸还原酶抑制剂 (tungstate, TUN) 和 NO 清除剂 (Carboxy-PTIO, cPTIO)、MT + L-NAME、MT + TUN 和 MT + cPTIO 对莲子进行处理。MT 处理的莲子内源 NO 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性在贮藏前 3 d 提高 60.36%~71.08%, NO 合成途径中关键物质 L-精氨酸和瓜氨酸含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 尤其在第 1 天时瓜氨酸含量为对照组的 1.44~1.59 倍, 但对硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 活性的影响并无规律; 当 MT 结合 NOS 抑制剂 L-NAME 对莲子处理时, 莲子内源 NO 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 且 MT 保鲜效果消失; 当结合 NR 抑制剂 TUN 时, 莲子内源 NO 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且 MT 仍具有保鲜效果, 因此初步确定 MT 通过 NOS 途径诱导莲子内源 NO 生成。在此基础上, 通过分析鉴定得出莲子中主要酚类物质为儿茶素 (占总酚含量 60% 以上), 后续重点分析了 MT 通过 NO 调控莲子儿茶素代谢的机理。结果得出, MT 处理的莲子多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 活性低于对照组 35.39%~57.36%, 同时该处理显著提高了其儿茶素合成代谢关键酶肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate-4-hydroxylase, C₄H)、二氢黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 和植物无色花青素还原酶 (colorless anthocyanin reductase, LAR) 活性 ($P < 0.05$), 由此其儿茶素含量在 1 d 后高于对照组 15.35%~47.86%, 但当 MT 结合 L-NAME 或 cPTIO 处理时, 该效果消失。因此, 外源 MT 通过 NOS 途径诱导 NO 合成造成 NO 的大量积累, 并作用于莲子儿茶素, 一方面抑制其与 PPO 产生酶促褐变, 另一方面促进其合成, 最终延缓莲子采后褐变进程。

关键词: 莲子; 褪黑素; NO; 褐变; 儿茶素代谢

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202404194

中图分类号: S645.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2024)-21-0263-11

罗淑芬, 杨何, 孙露, 等. NO 参与褪黑素延缓莲子采后褐变的作用机理[J]. 农业工程学报, 2024, 40(21): 263-273. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202404194 <http://www.tcsae.org>

LUO Shufen, YANG He, SUN Lu, et al. Potential mechanism of NO participating in melatonin alleviating the postharvest browning of lotus seeds[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2024, 40(21): 263-273. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202404194 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

莲为睡莲科植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), 莲蓬的果实莲子富含膳食纤维、蛋白质、黄酮、酚酸以及生物碱等营养及活性成分, 具有很高的保健和药用价值, 如促进肠道消化、提高人体免疫力、抗氧化、利尿、降血糖等^[1-2]。鲜莲子采收于夏季, 该季节的高温 (30~40 ℃) 环境导致鲜莲子在采收后品质劣变速度极快, 保鲜期仅 1~2 d, 这严重影响了莲子的商品性, 限制了鲜莲子的销售范围。前期研究得出莲子采后品质劣变特征主要为褐变, 该褐变主要由酶促褐变引起^[3-4], 目前已有研究采用低温、包装、气调、化学保鲜剂 (NO、1-MCP

等) 等处理方式来延缓莲子的采后褐变进程^[5]。研究表明, 多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 是植物组织发生酶促褐变的主要酶, 而儿茶素为 PPO 最常见的直接天然底物之一^[6]; 在莲藕中也已经证实儿茶素和表儿茶素是其酶促褐变的关键底物, 是导致莲藕极易产生酶促褐变的重要原因^[7]。

褪黑素 (melatonin, MT) 在植物中是一种生物和非生物抗应激因子, 其作为强有力的自由基清除剂, 可通过直接或间接清除机体活性氧或活性氮来抵抗自身和外界引起的氧化损伤^[8]。在采后, MT 可通过降低组织的氧化损伤来延缓西番莲果实生理恶化和梨果实褐变^[9-10], 也可通过提高内源 MT 含量来调控香蕉和苹果的乙烯代谢, 从而延缓其衰老进程^[11-12]。而张亚林等^[13]和董小盼等^[14]分别证实 MT 可通过调控杏果实和桃的苯丙烷代谢途径来增强其组织抗病性。此外, SONG 等^[15]认为, 外源 MT 可通过增强茄子的抗氧化活性并抑制细胞壁降解来增强其冷害抗性, 由此保持其采后品质。

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种高反应活性的

收稿日期: 2024-04-28 修订日期: 2024-07-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (31901755)

作者简介: 罗淑芬, 副研究员, 研究方向为果蔬采后衰老机理及其控制技术。Email: luoshufen666@126.com

*通信作者: 李鹏霞, 博士, 研究员, 研究方向为果蔬保鲜流通技术及装备研究。Email: guoshubaoxian@163.com

气体自由基分子, 植物体内 NO 的产生主要有酶促与非酶促两个途径。其中酶促途径主要是指一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化 L-精氨酸转化为瓜氨酸以及硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 催化亚硝酸盐过程中 NO 的产生^[16]。适宜浓度的 NO 可有效延缓植物采后成熟衰老, NO 的这种特性与其作为植物信号转导系统中重要的成员从而介导多种生理反应有关, 如中断乙烯信号途径, 抑制呼吸作用, 抵御微生物侵染, 切断活性氧级联反应防止氧化损伤, 通过与其他激素或植物生长调节剂相互作用来达到抗衰老的效果^[17-18]。LIU 等^[19]研究发现, 外源 MT 可通过诱导梨果实内源 NO 的生成来调控其乙烯生成, 从而延缓其采后褐变。有研究得出 MT 处理可提高番茄果实精氨酸等途径的活性和 NOS 酶活性, 由此促进其组织 NO 积累, 从而保持番茄果实细胞膜的完整性^[20]。前期研究报道得出, MT 可通过诱导 NO 来保持莲子的线粒体功能, 从而延缓其采后衰老^[21], 但对莲子 NO 生成的途径及其褐变的调控机理尚不明确。

因此, 本文以“太空莲 36 号”莲子为试验材料, 首先明确 MT 诱导 NO 生成的途径, 然后鉴定了莲子中的酚类物质, 对其褐变底物进行初步判断, 在此基础上, 研究 MT 通过 NO 调控莲子采后褐变底物降解途径和合成途径中关键物质和关键酶活性的变化, 旨在阐明 NO 参与 MT 调控莲子采后褐变的潜在机理, 为莲子采后衰老调控提供理论及技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本试验采用“太空莲 36 号”莲子为试验材料, 采摘于江苏省淮安市金湖县“荷王农业”莲蓬种植基地, 采摘后 3 h 内采用泡沫箱+碎冰的方式立即运回江苏省农业科学院农产品预处理实验室, 挑选成熟度一致 (6~7 成熟)、无明显机械伤和病害的莲蓬, 将莲子剥出用于试验。

β -巯基乙醇、聚乙烯吡咯烷酮、邻苯二酚、L-苯丙氨酸、福林酚、Triton X-100、二硫苏糖醇、 Na_2MoO_4 、苯甲基磺酰氟、甘油、亮肽、黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavine-adenine dinucleotide, FAD) 购自国药集团; 亚硝基左旋精氨酸甲酯 (n-nitro-L-Arg methyl ester, L-NAME), 钨酸钠 (sodium tungstate, TUN) 购自上海源叶生物科技有限公司; 儿茶素、L-精氨酸、瓜氨酸分析标准品购自美国 Sigma-Aldrich; NOS 测定试剂盒、NR 测定试剂盒、肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate-4-hydroxylase, C_4H) 酶联免疫试剂盒、植物无色花青素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 酶联免疫试剂盒、二氢黄酮醇-4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 酶联免疫试剂盒、查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 酶联免疫试剂盒、查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 酶联免疫试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Eppendorf 5424 型离心机, 德国 Eppendorf 中国分公司; KY-II 型水浴式氮吹仪, 安简 (北京) 科技有限公司; Zqty-70 振荡培养箱, 上海知楚仪器公司; LC20 液相色谱串联 TripleTOF® 5600+- 飞行时间质谱分析仪, 加拿大 Sciex 公司; LC/MS-1260/6420 液相色谱质谱联用仪, 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 样品处理

将剥好的所有莲子随机分为以下 9 个处理组:

- 1) MT 组: 100 $\mu\text{mol/L}$ MT 溶液浸泡 12 h^[21];
- 2) NO 组: 250 $\mu\text{mol/L}$ NO 溶液浸泡 12 h^[21];
- 3) cPTIO 组: 500 $\mu\text{mol/L}$ cPTIO 溶液浸泡 12 h;
- 4) MT+cPTIO 组: 250 $\mu\text{mol/L}$ MT 与 500 $\mu\text{mol/L}$ cPTIO 混合溶液浸泡 12 h;
- 5) L-NAME 组: 0.5 mmol/L L-NAME 溶液浸泡 12 h, 浓度参考 SUN 等^[22]的方法;
- 6) MT+L-NAME 组: 100 $\mu\text{mol/L}$ MT 与 0.5 mmol/L L-NAME 混合溶液浸泡 12 h;
- 7) TUN 组: 0.2 mmol/L TUN 溶液浸泡 12 h, 浓度参考 ZAFARI 等^[23]的方法;
- 8) MT 与 TUN 组: 100 $\mu\text{mol/L}$ MT 与 0.2 mmol/L TUN 混合溶液浸泡 12 h;
- 9) 对照组: 蒸馏水浸泡 12 h。

每个处理组包含 3 个平行, 每个平行有 400 ± 20 g 莲子。浸泡完的莲子置于干净的纱布上铺平并在室温 ($22 \sim 25^\circ\text{C}$) 晾干后, 在相对湿度 80%~90% 和 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下贮藏 5 d, 观察表型并分析 NOS 和 NR 活性, 初步确定 MT 诱导 NO 生成的途径。

在上述试验的基础上, 以蒸馏水、MT、cPTIO、MT 结合 cPTIO, 以及 L-NAME、MT 结合 L-NAME 处理莲子, 按上述方法进行取样。每个处理做 18 组重复, 每天从每个处理组随机抽取 3 个平行取样, 取样方法为: 将莲子皮和莲子肉 (去除莲子心) 分离后迅速放入液氮中, 并储存在 -80°C 用于各项指标的测定。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 莲子内源 NO 含量的测定

采用液氮研磨器将莲子样品打碎, 存储在 -80°C , 用于后续指标的测定。NO 含量测定参照 ZHANG 等^[24]的方法。准确称取 1 g 莲子粉末, 加入 4 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS; pH 7.2) 混匀, 在 4°C 、10319 r/min 下离心 20 min, 收集的上清液用 NO 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定。NO 的单位为 mmol/kg。

1.4.2 莲子皮褐变度的测定

褐变度的测定参照高建晓等^[3]的方法, 准确称取 1 g 莲子皮, 并加入 4 mL PBS (0.1 mol/L, pH 6.8) 混匀。静置 1 h 后在 4°C 、8851 r/min 下离心 20 min 后, 取 2 mL 上清液, 在室温冷却 5 min 后, 用紫外可见分光光度计在 410 nm 下测定其吸光度值。褐变度表示为 $A_{410} \times 10$ 。

1.4.3 莲子 NOS 活性的测定

NOS 测定参考 LIU 等^[19]方法。将 0.5 g 莲子样品粉末与 2 mL 0.1 mol/L HEPES-KOH 缓冲液 (pH 7.4, 内含 0.1% Triton X-100 (v/v)、5 mmol/L 二硫苏糖醇、1 mmol/L 乙二胺四乙酸、5 mmol/L Na_2MoO_4 、0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟、10 g/L 聚乙烯吡咯烷酮、10% (v/v) 甘油、1 mmol/L 亮肽、20 mmol/L FAD) 混匀, 将混合物在 4℃ 下以 8 851 r/min 离心 20 min。使用 NOS 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 分析 NOS 活性。NOS 酶活性以 U/g 表示。

1.4.4 莲子 NR 活性的测定

提取方法同 1.4.3, 使用 NR 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 分析 NR 活性。NR 酶活性以 U/g 表示。

1.4.5 莲子 L-精氨酸和瓜氨酸含量的测定

L-精氨酸和瓜氨酸的测定参照 DONG 等^[25]方法, 并稍做改动。1 g 莲子粉末样品加入 4 mL 0.5% 甲酸+甲醇 (50: 50, v/v) 均质, 并在 4℃ 下超声提取 (80 Hz) 30 min, 4℃ 下 8 851 r/min 离心 20 min。上清液使用 0.22 μm 滤膜过滤, 并采用 Agilent 1 260/6 420-LCMS 液相色谱串联质谱进行分析。液相条件: 色谱柱为 Poroshell 120 HILIC-Z (2.7 μm , 3.0 \times 100 mm); 柱温为 35℃; 检测波长为 250 nm; 流动相为 A 相: 水 (pH 3.0, 甲酸调 pH); B 相 90% 乙腈; 洗脱程序为 0 min, 5% A; 6 min, 45% A; 9.1 min, 5% A; 16 min, 5% A; 流速为 1 mL/min; 进样量为 1 μL 。质谱条件: 牵引速度为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$; 喷射速度为 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; 反应时间为 16 min; 离子源: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式; 干燥气为 N_2 , 干燥气温度为 350℃。干燥气流速为 10 L/min; 雾化气压力为 45 psi; 毛细管电压为 4 000 V (+); 3 500 V (-); 扫描方式为 MRM 多反应监测; 驻留时间为 1.2 s; 母离子为 292.1 (m/z)。L-精氨酸和瓜氨酸结果分别以 mg/g 和 $\mu\text{g}/\text{g}$ 表示。

1.4.6 莲子酚类物质的鉴定

酚类物质鉴定方法参考 CHEN 等^[26], 并略作更改。莲子样品 (2 g) 与 6 mL 80% 丙酮 (v/v) 混合, 超声波提取。超声条件为: 频率 80 Hz; 温度 25~30℃; 时间 20 min。提取混合物在 4℃ 下以 8 851 r/min 离心 20 min。吸取 5 mL 上清液, 加入 5 mL 乙酸乙酯萃取。混匀后, 保留有机相, 剩余水相用 HCl 调节 pH 至 2.0, 然后用乙酸乙酯重新萃取 3 次。合并有机相, 用氮吹仪将有机相吹干后加入 1 mL 甲醇溶解样品, 用 0.45 μm 微孔膜过滤后保存至 -80℃ 等待测定。使用 LC-20 液相色谱串联 TripleTOF® 5 600+ 飞行时间液质联用仪对莲子中酚类化合物进行分离和鉴定。液相条件: 色谱柱为 SB Aq 反相柱 (5 μm , 4.6 \times 250 mm); 检测器为紫外检测器; 波长为 280 nm; 流速为 0.8 mL/min; 柱温为 30℃; 流动相为 A 相: 0.1% 甲酸 (v/v), 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱程序: 98% A (3 min)、98%~75% A (7 min)、75%~50% A (24 min)、50%~30% A (30 min)、30%~20% A (32 min)、20%~98% A (37 min)、98%

A (40 min); 进样量, 10 μL 。质谱条件: 保护层气流速率为 30 L/min; 辅助气流速率为 10 L/min; 尾气流速为 1 L/min; 喷雾电压为 4.3 kV; 毛细管温度为 320℃; S-镜头 RF 电平为 50; 加热器温度为 200℃。全扫描模式, 分辨率为 70 000; 最大注入时间为 100 ms; 负离子模式; 扫描范围为 100~800 m/z。在 MS^2 模式下分辨率: 17 500 FWHM (m/z 200)。

1.4.7 莲子总酚含量测定

总酚的测定参考贾文婷等^[27]方法, 并稍作改动。准确称取 1 g 莲子粉末样品, 并加入 4 mL 的 80% 甲醇 (v/v) 匀浆。静置 30 min 后于 4℃、10 319 r/min 下离心 20 min。取 0.1 mL 上清液加入 0.3 mL 碳酸钠溶液 (75 g/L), 静置 3 min 后, 加入 0.9 mL 水和 0.5 mL 福林酚在室温下显色, 30 min 后于 760 nm 下测定其吸光度值。总酚单位为 mg/kg。

1.4.8 莲子儿茶素含量测定

莲子儿茶素的测定方法参照 1.4.6, 采用儿茶素分析标准品进行外标法定量。

1.4.9 莲子多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 活性测定

PPO 测定方法参考 LI 等^[4]方法。准确称取 1 g 莲子粉末, 加入 4 mL PBS (0.05 mol/L, pH 8.8), 内含 5 mmol/L β -巯基乙醇和 20 g/L 的聚乙烯吡咯烷酮。混匀后, 在 4℃ 下静置 1 h, 8 851 r/min 下离心 20 min, 上清液 4℃ 保存备用。在反应开始前, 将邻苯二酚 (0.1 mol/L) 置于 30℃ 水浴锅保温。取 3 mL 加入 0.5 mL 粗酶提取液, 在 398 nm 下进行测定, 以 1 min 内吸光度值的变化为一个酶活性单位。PPO 单位为 U/g。

1.4.10 莲子植物无色花青素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 活性测定

采用 LAR 酶联免疫试剂盒 (江苏晶美生物科技有限公司) 进行测定。参照说明书, 取 1 g 莲子样品, 加入 4 mL PBS (0.1 mol/L, pH 7.4) 混匀后在 4℃ 静置 1 h, 8 851 r/min 离心 20 min, 上清液 4℃ 保存备用。取 10 μL 上清液加入 40 μL 样品稀释液于微孔板中制成固相抗体。混匀后加入 100 μL 酶标试剂, 于 37℃ 孵育 60 min 使提取液中的 LAR 与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的抗体结合 (设置空白组, 空白组不加稀释液和酶标试剂)。反应结束后, 弃去微孔板中溶液并用洗涤液清洗微孔板 5 次。随后, 加入显色液 A 和显色液 B 各 50 μL 于 37℃ 孵育 15 min, 加入 50 μL 终止液终止反应。使用酶标仪在 450 nm 下测定其吸光度值, LAR 单位为 U/g。

1.4.11 莲子 C_4H 、CHS、CHI、DFR 活性测定

C_4H 、CHS、CHI、DFR 提取方法同 LAR。 C_4H 、CHS、CHI、DFR 的测定分别采用相应的酶联免疫试剂盒 (江苏晶美生物科技有限公司) 测定, 单位为 U/g。

1.5 数据统计与分析

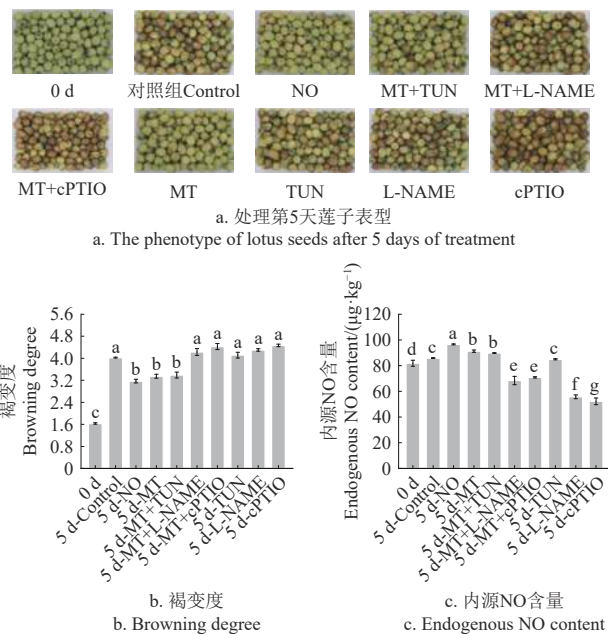
数据采用 Origin 2021 软件绘制图表, 所有数据均为 3 个重复的平均值 \pm 标准误差, 采用 SPSS 20.0 软件进行

最小显著性差异法分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同处理对莲子褐变及内源 NO 含量的影响

如图 1a 和图 1b 所示, 与 0 d 相比, 不同处理组莲子在第 5 天均发生了不同程度褐变。其中, 对照组的莲子在第 5 天时已出现明显褐变, 但 NO、MT 和 MT + TUN 处理的莲子只发生了轻微褐变, 且其褐变度显著低于对照组 ($P < 0.05$), MT + L-NAME、MT + cPTIO、L-NAME、cPTIO 和 TUN 处理的莲子出现大面积褐变, 褐变度结果也显示与对照组无明显差异 ($P < 0.05$)。



注: Control 为蒸馏水处理组, NO 为一氧化氮处理组, MT 为褪黑素处理组, TUN 为硝酸还原酶抑制剂处理组, L-NAME 为一氧化氮合酶抑制剂处理组, cPTIO 为一氧化氮清除剂处理组, MT+TUN 为 MT 结合 TUN 处理组, MT+L-NAME 为 MT 结合 L-NAME 处理组, MT+cPTIO 为 MT 结合 cPTIO 处理组。不同字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。
Note: Different letters at the same time point indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as below; Control indicates distilled water treatment, NO indicates nitric oxide treatment, MT indicates melatonin treatment, TUN indicates tungstate treatment, L-NAME indicates nomega-nitro-L-arginine methyl ester treatment, cPTIO indicates carboxy-PTIO treatment, MT+TUN indicates MT combined with TUN treatment, MT+L-NAME indicates MT combined with L-NAME treatment, MT+cPTIO indicates MT combined with cPTIO treatment.

图 1 不同处理对采后莲子褐变和 NO 含量的影响

Fig.1 Effects of different treatments on the browning and NO content of postharvest lotus seeds

如图 1c 所示, 与 0 d 相比, MT + L-NAME、MT + cPTIO、L-NAME 和 cPTIO 处理的莲子内源 NO 含量在第 5 天时有所降低, 而对照组、NO、MT、MT + TUN 和 TUN 处理组则增多, 且 NO、MT 和 MT + TUN 处理显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中 NO 处理组内源 NO 含量最高, MT 与 MT + TUN 处理之间无显著差异 ($P > 0.05$); 相比之下, TUN 处理与对照组无明显差异。MT + L-NAME、MT + cPTIO、L-NAME 和 cPTIO 处理在第 5 天内源 NO 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。综上所述, NO 和 MT 处理可提高莲子内源 NO 含量, 且在 MT 与 TUN 结合作用于莲子时, MT 仍能发挥积极的作

用效果, 但当与 L-NAME 或 cPTIO 共同处理时, MT 的作用效果消失。

结合图 1 可得出, TUN 作为 NR 抑制剂, 对莲子褐变和内源 NO 含量无显著影响, 而 L-NAME 作为 NOS 抑制剂却加速了莲子褐变且抑制了 NO 含量的积累。因此, 初步推断 MT 通过 NOS 途径来诱导莲子生成 NO, 并在后续试验中选用蒸馏水、MT、cPTIO、MT + cPTIO、L-NAME 和 MT + L-NAME 对莲子进行处理, 研究 NO 参与 MT 延缓莲子采后褐变机理。

2.2 MT 处理对莲子内源 NO 合成及褐变进程的影响

2.2.1 MT 及结合 NO 合成抑制剂处理对莲子外观品质及莲皮褐变度的影响

图 2a 显示, 在贮藏过程中莲子逐渐发生褐变。贮藏 1 d 时, 各处理中莲子的表型没有显著差异。但到第 2 天时, 除了 MT 处理组仍保持较好的表型外, 其他处理莲子表皮开始出现黄化现象, 并在第 3 天开始褐变; 至第 4 天时, 对照组的莲子出现了大面积褐变, 但 MT 处理组仅出现轻微褐变; 第 5 天时, 对照组和 L-NAME、cPTIO、MT + cPTIO 和 MT + L-NAME 处理组已经完全失去商品价值, 而 MT 处理组的莲子仅部分产生褐变。

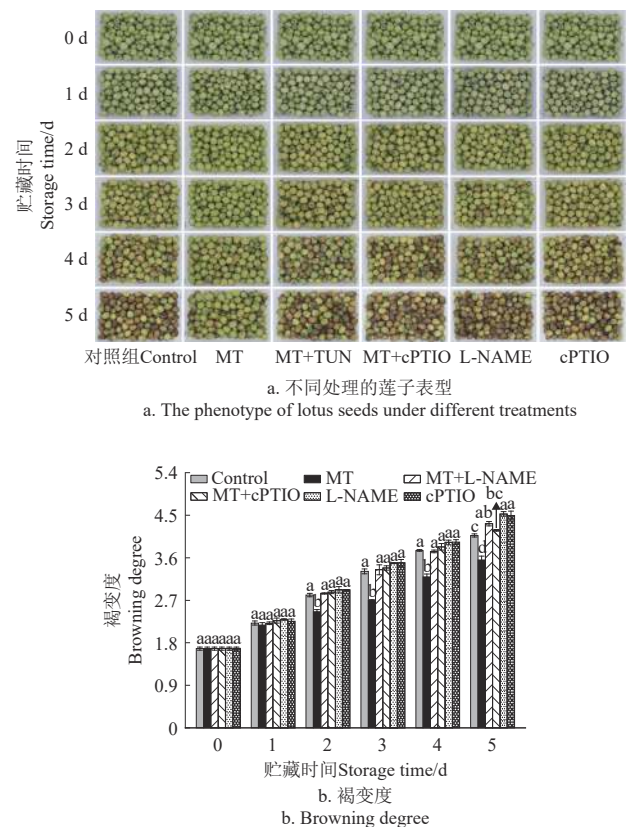


图 2 不同处理对采后莲子表型和莲子皮褐变度的影响

Fig.2 Effects of different treatments on phenotype of postharvest lotus seeds and browning degree of postharvest lotus seed coats

如图 2b 所示, 在贮藏期间莲皮褐变度呈逐渐上升趋势。在贮藏前 4 d, MT + L-NAME、MT + cPTIO、L-NAME 和 cPTIO 这四个处理组的莲皮褐变度与对照组无显著差异 ($P < 0.05$); 在第 5 天时, L-NAME 和 cPTIO

处理组高于对照组 10.44%~11.06%; 而 MT 处理组的莲皮褐变度在第 1 天后低于对照组 12.78%~18.43%。综上, MT 处理可有效延缓莲子褐变, 但当结合 L-NAME 和 cPTIO 时该作用效果消失。

2.2.2 MT 及结合 NO 合成抑制剂处理对莲子 NOS 和 NR 活性的影响

如图 3a 所示, 莲子中 NOS 活性在贮藏过程中呈波

动变化。与 0 d 相比, MT 和 MT + cPTIO 处理的莲子 NOS 活性分别在第 1、2 天时增加了 60.36%~71.08% 和 57.29%~69.57%, 且在前 3 d 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 而 cPTIO 处理在整个贮藏期间与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。相比之下, MT + L-NAME 和 L-NAME 处理在贮藏第 1、3 和 5 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

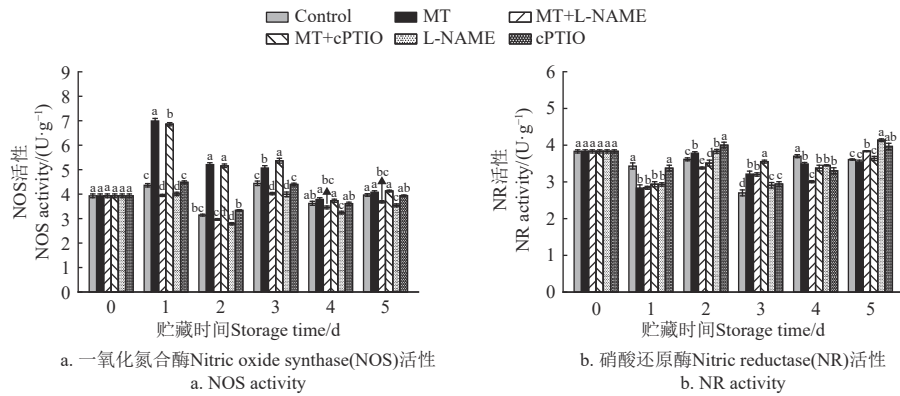


图 3 不同处理对采后莲子 NOS 和 NR 活性的影响

Fig.3 Effects of different treatments on NOS and NR activities of postharvest lotus seeds

如图 3b 所示, MT 处理的莲子 NR 活性在第 1、4 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但在第 2、3 天时又高于对照组 ($P < 0.05$)。同样, MT + L-NAME 和 MT + cPTIO 处理组在第 1、2 和 4 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但在第 3 天时显著高于对照组 ($P < 0.05$)。而 L-NAME 处理的 NR 活性在第 1、4 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但在第 2、3、5 天时显著高于对照组 ($P < 0.05$); cPTIO 处理组在第 2、3 和 5 天时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在第 4 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$)。综上, MT 处理提高了莲子组织的 NOS 活性, 但对

莲子的 NR 活性的影响并没有什么规律。

2.2.3 MT 及结合 NO 合成抑制剂处理对采后莲子 L-精氨酸和瓜氨酸含量的影响

图 4a 数据显示, 莲子中 L-精氨酸含量在贮藏期间整体呈先上升后下降的趋势。在整个贮藏期间, MT 和 MT + cPTIO 处理的莲子 L-精氨酸含量分别高于对照组 7.08%~59.17% 和 11.20%~63.59%; 而 L-NAME 和 MT + L-NAME 处理则分别在 1、3、5 d 和 1、4、5 d 时显著低于对照组 ($P < 0.05$); cPTIO 组则与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

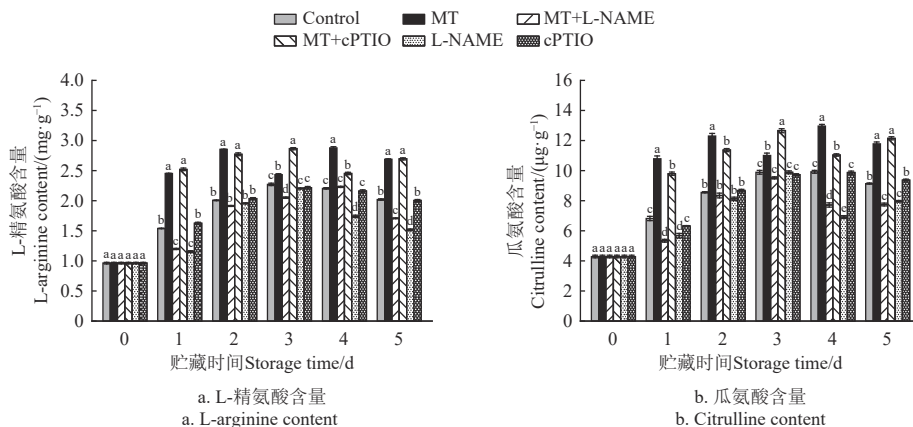


图 4 不同处理对采后莲子 L-精氨酸和瓜氨酸含量的影响

Fig.4 Effects of different treatments on L-arginine and citrulline contents of postharvest lotus seeds

如图 4b 所示, 莲子内瓜氨酸含量的变化趋势与 L-精氨酸相似。在贮藏期间, MT 和 MT + cPTIO 处理的瓜氨酸含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且在第 1 天时达到对照组的 1.44~1.59 倍; L-NAME 和 MT + L-NAME 处理组在第 1、4 和 5 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$); 同样, cPTIO 处理与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

结合图 4, MT 处理促进了莲子内 L-精氨酸和瓜氨酸的生成, 而经过 MT + L-NAME 和 L-NAME 处理后产生相反效果。

2.2.4 MT 及结合 NO 合成抑制剂处理对采后莲子酚类物质的影响

莲子内含有丰富的酚类物质。如表 1 所示, 莲子中主

要含有 6 种黄酮类物质, 7 种酚酸类物质, 其中儿茶素含量最高, 可达总酚含量的 60.45%, 其次为表儿茶素, 含量约占莲子总酚的 6.98%, 酚酸类物质中, 含量最高为鞣花酸, 其含量占总酚含量的 7.45% 左右, 其次为肉桂酸 (含量约为总酚含量的 5.89%)。基于以上结果, 后续重点探讨 NO 参与 MT 调控莲子儿茶素降解代谢和合成代谢的影响。

表 1 鲜莲子中的酚类物质及其含量
Table 1 The phenolic compounds and their contents in fresh lotus seeds

酚类物质 Phenolic compounds	化学式 Chemical formula	分子量 Neutral mass	保留时间 Retention time/min	母离子 Parent ion [M-H] ⁻ / (m·z ⁻¹)	碎片离子 Fragments MS ² /(m·z ⁻¹)	含量 Content/ (mg·100 g ⁻¹)
儿茶素 Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.05	9.06	289.05	245.06, 203.07, 137.01, 123.03, 109.03	51.46
表儿茶素 Epicatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.05	10.99	289.05	245.06, 203.07, 137.01, 123.03, 109.03	5.94
芦丁 Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.10	17.18	609.09	301.01, 300.03	0.77
金丝桃苷 Hyperin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.06	17.43	463.05	300.00, 179.00	3.70
异槲皮苷 Isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.06	19.91	463.08	300.00, 179.00	0.92
槲皮素 Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.02	23.80	301.01	178.98, 150.99	2.01
没食子酸 Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170.00	3.40	169.00	125.01	2.71
肉桂酸 Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	148.06	7.21	147.06	85.02	5.01
水杨酸 Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.02	9.22	137.01	93.03	1.39
p-香豆酸 P-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.04	13.41	163.04	119.04	0.24
阿魏酸 Ferulic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.04	14.44	193.03	178.01, 149.05, 134.03	0.91
芥子酸 Sinapic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.05	14.56	223.04	208.02, 193.00, 149.01, 121.02	3.73
鞣花酸 Ellagitannin	C ₁₄ H ₆ O ₈	302.01	23.84	301.01	178.98, 150.99, 121.02, 107.00	6.34
总酚 Total phenol						85.13

2.2.5 MT 及结合 NO 合成抑制剂处理对采后莲子总酚及儿茶素含量的影响

在整个贮藏过程中, 对照组和 MT 处理组莲子总酚含量的变化呈先上升后下降再上升的趋势 (图 5a), 而 MT + L-NAME、MT + cPTIO、L-NAME 和 cPTIO 处理的总酚含量整体先下降后上升。其中, MT 处理总酚含量始终高于对照组 ($P < 0.05$); MT + L-NAME 和 MT + cPTIO 处理组分别在 1、3、4 d 时和 1、2、4、5 d 时显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而 L-NAME 和 cPTIO 处理组在整个贮藏期间显著低于对照组 ($P < 0.05$), 且在 1~4 d 期间显著低于 MT + L-NAME 和 MT + cPTIO 处理组。

如图 5b 所示, MT 处理的莲子儿茶素含量在贮藏期

间整体上升, 而其他处理的儿茶素含量则先下降后上升。在第 1 天时, MT 处理与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$), 但在 2~5 d 时, MT 处理组儿茶素含量高于对照组 15.34%~47.87% ($P < 0.05$)。此外, MT + L-NAME 和 L-NAME 处理组在 2 d 时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但在 4~5 d 期间显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而 MT + cPTIO 和 cPTIO 处理组在 2~5 d 期间显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其中 cPTIO 处理的儿茶素含量在整个贮藏期间始终保持最低水平, 仅为对照组的 56.34%~77.48%。

结合图 5a、图 5b 得出, MT 处理可有效减缓莲子组织中总酚和儿茶素含量降低, 而 MT + L-NAME、MT + cPTIO、L-NAME 和 cPTIO 处理具有一定相反效果。

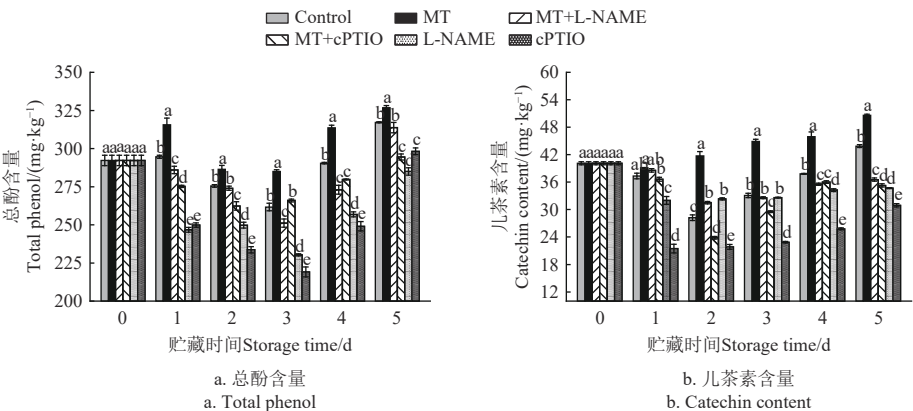


图 5 不同处理对采后莲子总酚和儿茶素含量的影响
Fig.5 Effects of different treatments on total phenol and catechin contents of postharvest lotus seeds

2.2.6 MT 及结合 NO 合成抑制剂处理对采后莲子 PPO 活性的影响

图 6 数据显示, 随着贮藏时间延长, 莲子的 PPO 活性先上升后下降, 并在第 4 天时达到峰值。在整个贮藏期间, MT 处理 PPO 活性一直保持较低水平, 且低于对

照组 35.39%~57.36%。而 MT + L-NAME 和 MT + cPTIO 处理组在 4~5 d 时显著高于对照组 ($P < 0.05$), L-NAME 和 cPTIO 处理在 1 d 后显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且在 2、3、5 d 时显著高于 MT + L-NAME 和 MT + cPTIO 处理组 ($P < 0.05$)。

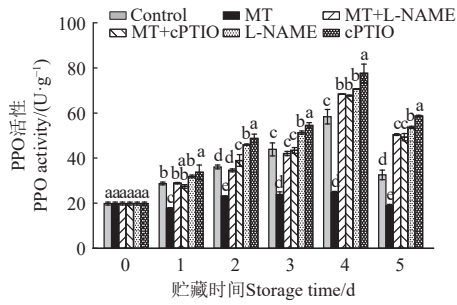


图 6 不同处理对采后莲子 PPO 活性的影响
Fig.6 Effects of different treatments on PPO activity of postharvest lotus seeds

综上, MT 处理可抑制贮藏期间莲子 PPO 活性, 而

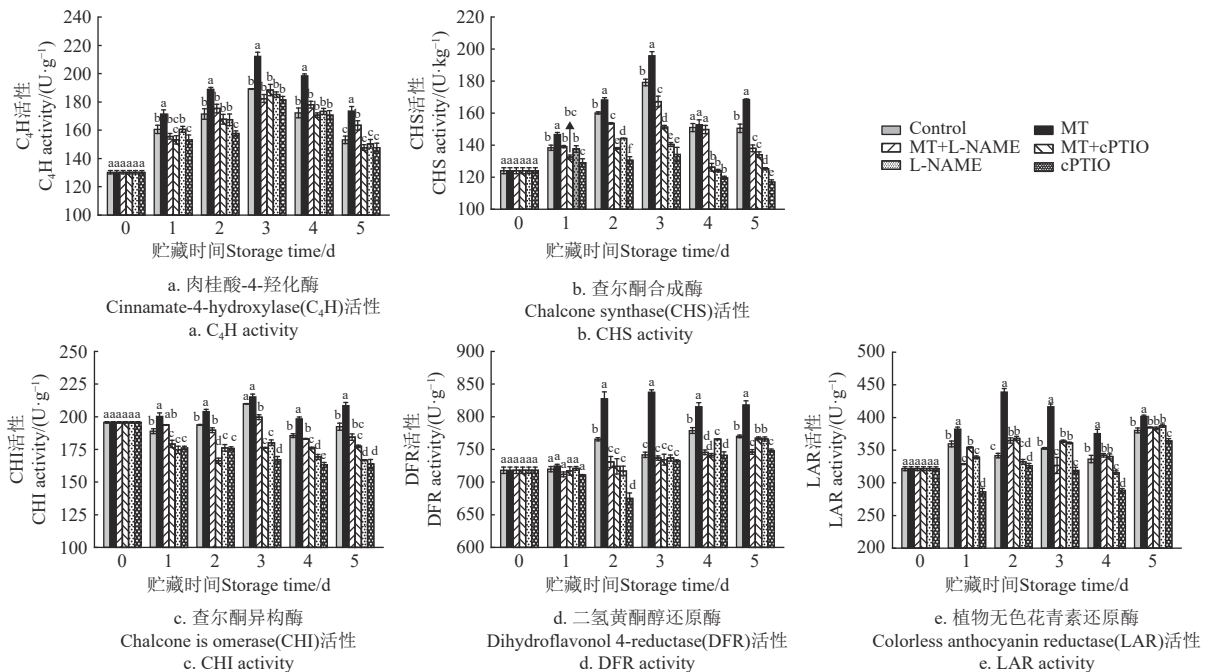


图 7 不同处理对采后莲子 C₄H、CHS、CHI、DFR 和 LAR 活性的影响
Fig.7 Effects of different treatments on C₄H, CHS, CHI, DFR and LAR activities of postharvest lotus seeds

图 7b 显示, 在贮藏过程中莲子的 CHS 活性变化趋势与 C₄H 相似。除第 4 天外, MT 处理显著高于对照组 ($P < 0.05$); 而 MT + L-NAME 处理却在 2、3、5 d 时显著低于对照组 ($P < 0.05$), MT + cPTIO 和 L-NAME 处理组也在 2~5 d 期间显著低于对照组 ($P < 0.05$), cPTIO 处理则在整个贮藏期间显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

莲子的 CHI 活性变化如图 7c 所示, 除第 3 天外, MT 处理在贮藏期间显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而 MT + L-NAME 处理仅在第 3 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$); MT+cPTIO、L-NAME 和 cPTIO 处理组的莲子 CHI 活性则在整个贮藏期间始终显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

图 7d 结果显示, MT 处理组莲子的 DFR 活性在贮藏期间明显上升, 而其他处理组上升幅度相对较小。由此 MT 组 DFR 的活性在 1 d 后高于对照组 4.69%~12.92% ($P < 0.05$)。相比之下, MT+L-NAME、L-NAME、MT + cPTIO 和 cPTIO 处理组在 1、3 d 时与对照相无显著差异, 但在 2、4 d 时显著低于对照组 ($P < 0.05$),

L-NAME 和 cPTIO 处理诱导了 PPO 活性增强, 当 MT 与这两个处理结合时, 对莲子 PPO 的抑制效果消失。

2.2.7 MT 及结合 NO 合成抑制剂处理对采后莲子儿茶素合成相关酶活性的影响

随着贮藏时间延长, 莲子内 C₄H 活性整体呈先上升后下降的趋势 (图 7a), 且各处理组的 C₄H 活性均在第 3 天时达到峰值。在整个贮藏期间, MT 处理组的莲子 C₄H 活性高于对照组 6.92%~15.19%; MT+L-NAME 处理组仅在第 5 天时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而 L-NAME 处理组则与对照组无显著差异 ($P > 0.05$); MT+ cPTIO 处理组在第 1 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$); cPTIO 处理组也在 1~2 d 期间显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

至第 5 天时, MT + L-NAME 和 cPTIO 处理组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。莲子中 LAR 活性变化结果如图 7e 所示, MT 处理的莲子 LAR 活性在整个贮藏期间显著高于对照组 ($P < 0.05$)。但 MT + L-NAME 处理组虽在第 2 天时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但在第 1、3 天时显著低于对照组 ($P < 0.05$); MT + cPTIO 处理组则在第 2 天时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其他时间与对照组无差异; L-NAME 处理组在 1、4 d 时显著低于对照组 ($P < 0.05$); 而 cPTIO 处理组在整个贮藏期间显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

综上, MT 处理显著提高了莲子儿茶素合成途径中 C₄H、CHS、CHI、DFR 和 LAR 等关键酶的活性, 但当结合 L-NAME 或 cPTIO 处理莲子时, 该效果几乎消失。

3 讨论

褐变是评价莲子采后衰老的主要指标。前期研究发现, MT 处理可有效延缓鲜莲子采后褐变进程, 但当结

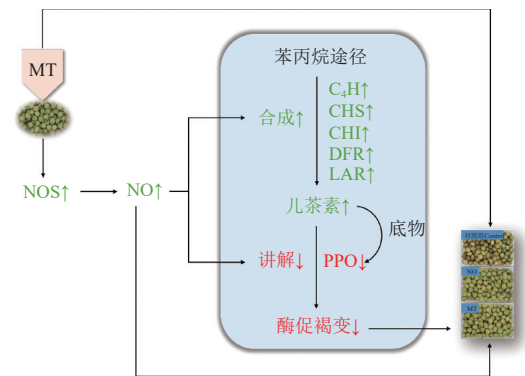
合 cPTIO 时, MT 保鲜效果消失, 因此判断 NO 是作为 MT 的下游信号分子参与调控鲜莲子采后褐变^[21]。那么, MT 是通过什么途径诱导 NO 生成的呢? 研究发现, 内源 NO 的生成依赖于氧化和还原两种途径, 氧化途径是通过 NOS 催化 L-精氨酸进而生成 NO; 而还原途径是 NR 通过催化硝酸盐还原成亚硝酸盐, 当亚硝酸盐与 NADH^+ 结合, 进而还原产生 NO^[17]。本试验采用 MT 结合 NOS 抑制剂 L-NAME 或 NR 抑制剂 TUN 对莲子进行处理, 发现 MT + L-NAME 处理的莲子 MT 保鲜效果消失, 但 MT + TUN 处理仍对莲子具有保鲜效果。因此, 初步推断 MT 通过 NOS 途径诱导 NO 合成。在 NOS 合成 NO 途径中, 伴随有 L-精氨酸向瓜氨酸的转化^[28], 本试验还发现, MT 处理显著提高了莲子中 NOS 的活性和 L-精氨酸及瓜氨酸的含量, 但对 NR 活性的影响并无明显规律。因此, MT 主要通过激发 NOS 合成途径来促进莲子 NO 的合成, 由此介导莲子的采后衰老。LIU 等^[19] 也发现 MT 通过诱导梨 NOS 的活性促进了 NO 含量增加, 由此延缓了梨的采后衰老。

莲子的褐变主要由酶促褐变引起, 酚类物质作为酶促褐变底物, 在 MT 处理后也发生一定的改变。本试验对莲子的酚类物质进行了鉴定, 发现莲子中儿茶素的含量十分丰富, 占总酚含量的 60% 以上。已有研究证实, 在活的有机体中, PPO 褐变酶最常见的直接天然底物为黄烷-3-醇, 尤其是儿茶素和表儿茶素, 他们被认为是植物组织褐变的重要贡献者^[6, 29]。因此, 推断儿茶素在莲子采后褐变中发挥了重要作用, 并重点从儿茶素代谢的角度解析 NO 参与 MT 调控莲子采后褐变的机理。本试验结果得出, MT 处理有效抑制了其 PPO 酶活性, 由此可能延缓了莲子内儿茶素产生酶促褐变反应, 这与本试验中 MT 处理组的莲子褐变度更低的结果相符, 由此最终 MT 处理促进了莲子内儿茶素和总酚的积累。与本试验结果类似, BAO 等^[30] 发现 MT 处理可有效抑制桃果实的 PPO 酶活性, 由此减轻其冷害引起的褐变, 最终促进了酚类物质的积累。

在儿茶素合成途径中, 儿茶素是由苯丙烷生物合成途径的不同分支合成, 儿茶素合成重要的前体物质查尔酮, 其合成是类黄酮生物合成途径的第一步, CHS 是编码这一步的关键酶; 除了 CHS 外, DFR、LAR 等也是多酚生物合成途径的下游酶; 此外查尔酮与 C_4H 、CHS 等共同参与儿茶素生物合成过程, 是儿茶素生物合成的关键酶^[31]。有研究报道, MT 处理可显著提升荔枝苯丙烷代谢途径中 C_4H 、4CL 等酶的活性, 由此促进酚类物质积累, 延缓其组织褐变^[32]。本试验结果得出, MT 显著提高了莲子内 C_4H 、CHS、CHI、DFR 和 LAR 等酶活性, 由此促进了其组织儿茶素的合成, 同时也提升其组织对衰老过程中产生氧化胁迫的抗性^[33]。类似地, 苹果在经 MT 处理后, 其组织的苯丙烷代谢途径被诱导, C_4H 等酶活性增加, 酚类物质合成加速, 其组织的抗性显著提升, 由此 MT 处理延缓了苹果的采后品质速度^[34]。

然而, 当 MT 结合 NO 清除剂 cPTIO 或 NOS 抑制 L-

NAME 对莲子进行处理时, MT 对莲子 PPO 酶活的抑制作用以及对苯丙烷途径关键酶活性的促进作用消失, 且该处理对提升莲子儿茶素含量和抑制其褐变的效果也随之消失。因此, 推断 MT 通过 NOS 合成途径诱导莲子 NO 大量合成后, 作用于其组织儿茶素的氧化反应, 通过抑制 PPO 酶活性来延缓莲子组织产生酶促褐变反应; 与此同时, 作用于莲子的苯丙烷代谢途径, 通过提升儿茶素合成支路中的关键酶活性来促进儿茶素合成 (图 8), 而 MT 处理中较高的儿茶素含量, 及 MT + L-NAME 和 MT + cPTIO 处理中较低的儿茶素含量也印证了这一推论。WANG 等^[35] 也发现, 褪黑素可通过诱导土豆创面组织中 NR 和 NOS 活性增加来促进 NO 合成, 从而作用于苯丙烷代谢途径, 促进软木脂质多酚和木质素的积累, 由此加速土豆创面愈合。



注: NOS 表示为一氧化氮合酶。

Note: NOS indicates nitric oxide synthase.

图 8 采后鲜莲子对外源 MT 处理的响应模式图

Fig.8 Possible model of postharvest lotus seeds response to MT treatment

4 结 论

1) 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 MT 处理可显著提升莲子贮藏期间的 L-精氨酸和瓜氨酸含量 ($P < 0.05$), 并将其组织贮藏 3 d 前的 NOS 活性提升 60.36%~71.08%, 由此诱导莲子内源 NO 大量生成。

2) MT 处理诱导莲子组织产生的 NO 一方面作用于莲子儿茶素的氧化降解, 抑制了其组织 PPO 酶活性 35.39%~57.36%, 降低莲子组织酶促褐变反应速度; 另一方面通过提升其儿茶素合成支路中的关键酶 (C_4H 、CHS、CHI、DFR 和 LAR) 活性, 使莲子儿茶素含量在贮藏 1 d 后高于对照组 15.35%~47.86%, 由此共同作用延缓了莲子采后品质劣变速度。

本试验结果对莲蓬及莲子的采后保鲜具有一定的实际意义, 同时可为 MT 调控果蔬采后衰老的信号途径研究提供理论依据, 以及 MT 在提升果蔬儿茶素成分方面的应用提供理论和技术支撑。

[参 考 文 献]

- [1] 辛佳, 孙恒, 刘娟, 等. 莲黄酮类化合物鉴定、功能与应用的研究进展[J]. 植物科学学报, 2023, 41(3): 400-410.

- XIN Jia, SUN Heng, LIU Juan, et al. Advances in the identification, function, and application of flavonoids in *Nelumbo*[J]. *Plant Science Journal*, 2023, 41(3): 400-410. (in Chinese with English abstract)
- [2] YANG Y A, LIU R L, HAN Y H, et al. Critical taste substances and regulatory pathways of fresh lotus seed pulps at different ripeness stages[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 205: 112522.
- [3] 高建晓, 王毓宁, 李鹏霞, 等. 漆蜡涂膜对鲜莲蓬采后褐变的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(18): 275-282.
GAO Jianxiao, WANG Yuning, LI Pengxia, et al. Effects of lacquer wax coating on postharvest browning of fresh lotus pods[J]. *Food Science*, 2016, 37(18): 275-282. (in Chinese with English abstract)
- [4] LI P X, HU H L, LUO S F, et al. Shelf life extension of fresh lotus pods and seeds (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) in response to treatments with 1-MCP and lacquer wax[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 125: 140-149.
- [5] 李梦蝶, 谢湘汝, 李娟娟. 鲜莲子采后保鲜的研究进展[J]. *湖北工程学院学报*, 2022, 42(6): 61-67.
LI Mengdie, XIE Xiangru, LI Juanjuan. Advance in the research on the preservation of fresh lotus seeds[J]. *Journal of Hubei Engineering University*, 2022, 42(6): 61-67. (in Chinese with English abstract)
- [6] JIANG Y M, DUAN X W, QU H, et al. Browning: enzymatic browning[J]. *Encyclopedia of Food and Health*, 2016: 508-514.
- [7] 李京芳. 莲藕酶促褐变及功能成分变化对降脂、降胆固醇的作用和机理探讨[D]. 南昌: 南昌大学, 2023: 67-68.
LI Jingfang. Effects of the enzymatic browning of lotus root and the transformation of functional components on regulating lipid and cholesterol metabolism [D]. Nanchang: Nanchang University, 2023: 67-68. (in Chinese with English abstract)
- [8] 薛建新, 王凯, 李泽珍, 等. 采后褪黑素处理对鲜切花椰菜保鲜品质及货架期的影响[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(13): 273-283.
XUE Jianxin, WANG Kai, LI Zezhen, et al. Influences of postharvest melatonin treatment on preservation quality and shelf life of fresh-cut cauliflower[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2021, 37(13): 273-283. (in English with Chinese abstract) (in Chinese with English abstract)
- [9] LI P P, ZHANG R H, ZHOU H D. Melatonin delays softening of postharvest pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) by regulating cell wall degradation, membrane stability and antioxidant systems[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2024, 212: 112852.
- [10] CAI S Y, ZHANG Z Q, WANG J L. Effect of exogenous melatonin on postharvest storage quality of passion fruit through antioxidant metabolism[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2024, 194: 11583.
- [11] WANG Z Q, PI H L, SHAN S S, et al. Melatonin enhanced chilling tolerance and alleviated peel browning of banana fruit under low temperature storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 179: 111571.
- [12] ONIK J C, SU C W, LI A, et al. Melatonin treatment reduces ethylene production and maintains fruit quality in apple during postharvest storage[J]. *Food Chemistry*, 2020, 337: 127753.
- [13] 张亚琳, 王慧慧, 芦玉佳. 外源褪黑素对杏果实采后黑斑病的调控作用[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(3): 201-209.
ZHANG Yalin, WANG Huihui, LU Yujia, et al. Regulation of postharvest black spot disease in apricot fruit by exogenous melatonin[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2024, 24(3): 201-209. (in Chinese with English abstract)
- [14] 董小盼, 汤静, 丁娇, 等. 褪黑素处理对桃果实采后软腐病的影响及其机理[J]. *食品科学*, 2024, 45(11): 243-249.
DONG Xiaopan, TANG Jing, DING Jiao, et al. Effects of melatonin treatment on rhizopus rot in postharvest peach fruit and possible mechanism[J]. *Food Science*, 2024, 45(11): 243-249. (in Chinese with English abstract)
- [15] SONG L J, ZHANG W W, QIANG L. Melatonin alleviates chilling injury and maintains postharvest quality by enhancing antioxidant capacity and inhibiting cell wall degradation in cold-stored eggplant fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 194: 112092.
- [16] 董莹飞. 独脚金内脂对采后草莓一氧化氮、硫化氢以及苯丙烷代谢的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020: 3-4.
DONG Yingfei. Effects of strigolactone on NO, H₂S and phenylpropane metabolism in postharvest strawberry fruits. [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020: 3-4. (in Chinese with English abstract)
- [17] POLS S, VAN DE POEL B, HERTOOG M L A T M, et al. The regulatory role of nitric oxide and its significance for future postharvest applications[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 188: 111869.
- [18] 陈燕, 张健, 魏佳, 等. 一氧化氮熏蒸抑制干制灰枣黑曲霉病及贮藏品质保持[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(12): 297-303.
CHEN Yan, ZHANG Jian, WEI Jia, et al. Nitric oxide fumigation inhibiting *Aspergillus niger* disease and maintaining storage quality of dried ash jujube[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2019, 35(12): 297-303. (in Chinese with English abstract)
- [19] 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: 2279-2288.
- [20] AGHDAM M S, LUO Z, JANNATIZADEH A, et al. Employing exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in tomato fruits by upregulating ZAT2/6/12 giving rise to promoting endogenous polyamines, proline, and nitric

- oxide accumulation by triggering arginine pathway activity[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 549-556.
- [21] SUN L, LUO S F, HU H L, et al. Melatonin promotes the normal cellular mitochondrial function of lotus seeds through stimulating nitric oxide production[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 185: 111814.
- [22] SUN H, LI J, SONG W, et al. Nitric oxide generated by nitrate reductase increases nitrogen uptake capacity by inducing lateral root formation and inorganic nitrogen uptake under partial nitrate nutrition in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(9): 2449-2459.
- [23] ZAFARI S, SHAEIFI M, CHASHMI N. Nitric oxide production shifts metabolic pathways toward lignification to alleviate Pb stress in *Prosopis farcta*[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 141: 41-49.
- [24] ZHANG Q, ZHANG L, GENG B, et al. Interactive effects of abscisic acid and nitric oxide on chilling resistance and active oxygen metabolism in peach fruit during cold storage[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(7): 3367-3380.
- [25] DONG M, QIN L, XUE J, et al. Simultaneous quantification of free amino acids and 5'-nucleotides in shiitake mushrooms by stable isotope labeling-LC-MS/MS analysis[J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 57-65.
- [26] CHEN S, XIE R, LI J, et al. Alteration on phenolic acids and the appearance of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) seeds dealt with antistaling agents during storage[J]. *International Journal of Food Properties*, 2018, 21(1): 1481-1494.
- [27] 贾文婷, 李文绮, 吴洪斌. 不同前处理联合压差闪蒸干燥对红枣脆片品质的影响[J]. *农业工程学报*, 2024, 40(2): 116-123. JIA Wenting, LI Wenqi, WU Hongbin. Effects of different pretreatments combined with instant controlled pressure drop drying on the quality of jujube slices[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2024, 40(2): 116-123. (in Chinese with English abstract)
- [28] SHU P, MIN D, AI W, et al. L-Arginine treatment attenuates postharvest decay and maintains quality of strawberry fruit by promoting nitric oxide synthase pathway[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 168: 111253.
- [29] LI J, DENG Z, HE Y, et al. Differential specificities of polyphenol oxidase from lotus seeds (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) toward stereoisomers, (-)-epicatechin and (+)-catechin: Insights from comparative molecular docking studies[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 148: 111728.
- [30] BAO Z Y, ZHOU Q H, YU Y, et al. Melatonin treatment induces DNA methylation to alleviate chilling induced-browning in cold stored peach fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2024, 208: 112686.
- [31] WANG Y, GAO L, WANG Z, et al. Light-induced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 133: 72-83.
- [32] 王甜. 外源褪黑素对荔枝采后褐变和病害的控制作用[D]. 海口: 海南大学, 2020: 35-36. WANG Tian. Effect of exogenous melatonin on postharvest browning and disease in harvested litchi fruit[D]. Haikou: Hainan University, 2020: 35-36. (in Chinese with English abstract)
- [33] 陈力维, 令阳, 邓丽莉, 等. L-半胱氨酸处理对采后青脆李果实苯丙烷代谢的影响[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(13): 257-263. CHEN Liwei, LIING Yang, DENG Lili, et al. Effects of L-cysteine treatment on phenylpropanoid metabolism of postharvest "Qingcui" plum fruit[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2020, 36(13): 257-263. (in Chinese with English abstract)
- [34] WANG M, LI Y H, LI C Y, et al. Melatonin induces resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit through enhancing phenylpropanoid metabolism[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2023, 127: 102082.
- [35] WANG Q H, HAN Y, YANG R R. Melatonin facilitates the deposition of suberin polyphenolic and lignin at wounds of potato tubers by mediating nitric oxide and reactive oxygen species[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 198: 112270.

Potential mechanism of NO participating in melatonin alleviating the postharvest browning of lotus seeds

LUO Shufen¹, YANG He¹, SUN Lu¹, HU Huali¹, ZHOU Hongsheng¹, LIU Xuesong¹,
LING Jun¹, ZHANG Yingtong¹, LI Pengxia^{1,2*}

(1. Institute of Facilities and Equipment in Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Cold Chain Logistics Technology for Agro-Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study aims to investigate the potential mechanism of melatonin (MT) to alleviate the browning of postharvest lotus seeds. 1) The samples were treated with the distilled water, nitric oxide (NO), MT, the inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) nomega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), the inhibitor of nitrate reductase (NR) tungstate (TUN), and the scavenger of NO carboxy-PTIO (cPTIO), MT + L-NAME, MT + TUN and MT + cPTIO. A systematic analysis was implemented to explore the possible pathway of NO biosynthesis in the lotus seeds. Then, the levels of key enzymes and substances were determined to involve in the NO biosynthesis. The results showed that the endogenous NO content of the MT treated lotus seeds was significantly higher than that of the control. The NOS activity of lotus seeds treated with MT was promoted by 60.36%~71.08% before 3 days of storage. In addition, the MT treatment significantly increased the contents of L-arginine and citrulline ($P < 0.05$), which were the key substances in the NO biosynthesis. It was notable that the citrulline content in the MT treated sample was 1.44~1.59 times than those of the controls. By contrast, there was the varying influence of MT treatment on the activity of NR in lotus seeds. There was the beneficial effect of MT on the lotus seeds and the endogenous NO content of the tissue, when the MT was combined with the inhibitor of NR (TUN). However, this beneficial effect disappeared, when the MT was combined with the inhibitor of NOS (L-NAME) for treating the lotus seeds. The endogenous NO content in this treatment was significantly lower than that in the control. Therefore, the exogenous MT treatment was induced the NO biosynthesis in lotus seeds through the pathway of NOS. 2) The potential mechanism of MT was clarified to regulate the browning of lotus seeds. The phenolic compounds were identified in the lotus seeds using a LC20 HPLC (Shimadzu, Japan) system coupled to a TripleTOF® 5600 + quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer equipped with a DuoSpray™ ion source (Sciex, Ontario, Canada). It was found that there were six flavanols and seven phenolic acids in the lotus seeds, and the content of catechin, a type of flavanol, accounts for over 60% of the total phenol content, the following was ellagitannin, a type of phenolic acid, accounts for 7.45% of the total phenol content. It infers that the catechin was the major phenolic compound of lotus seeds. The flavan-3-ol was the most common direct natural substrate of polyphenol oxidase (PPO) in the plant, especially for the catechin and epicatechin. Thereby, the potential mechanism of MT was determined, where the catechin metabolism was regulated to induce the NO production in the following experiments. The results indicated that the activity of PPO in the MT treated lotus seeds was lower by 35.39%~57.36% than those in the control. What's more, the MT treatment significantly increased the activities of key enzymes, including cinnamate-4-hydroxylase, dihydroflavonol reductase, chalcone synthase, chalcone isomerase and colorless anthocyanin reductase ($P < 0.05$) in the catechin synthetic metabolism. As a result, the content of catechin in the MT treated sample was higher by 15.35%~47.86% than those in the control after 1 days of storage. Whereas, this positive effect was negated, when the MT was combined with L-NAME or cPTIO for treating lotus seeds. Therefore, it was concluded that the exogenous MT treatment was induced the biosynthesis of NO through NOS pathway, and then the accumulated NO acted on the catechin metabolism of lotus seeds. The MT treatment was used to inhibit the PPO activity, and then the catechin was suppressed to participate in the enzymatic browning; The biosynthesis of catechin was promoted in this treatment. Consequently, the lotus seeds browning was also alleviated by the MT treatment. These findings can provide the theoretical and technical support to preservation of lotus seeds and the signal transduction between MT and NO.

Keywords: lotus seeds; melatonin; nitric oxide; browning; catechin metabolism