

苹果蜡质物质代谢及其调控机制研究进展

李昂¹, 柴奕丰^{1,2}, 李庆鹏¹, 宋丛丛¹, 张佰清², 林琼^{1*}, 段玉权^{1*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 农业农村部农产品质量安全收贮运管重点实验室, 北京 100193;
2. 沈阳农业大学食品学院, 沈阳 110866)

摘要: 苹果表皮蜡质, 是覆盖在苹果表面的一层疏水性脂类物质, 是苹果应对外界环境变化的第一道屏障, 在果实生长发育贮藏保鲜方面起着重要作用。苹果表皮蜡质可以通过减少水分非气孔性散失作用维持苹果的水分平衡, 可通过物理阻止和抗菌成分抵抗微生物感染, 还具有减少苹果冷害和病害等作用。本文结合近年来对苹果表皮蜡质的研究从苹果蜡质的生物学意义, 不同品种苹果蜡质形态、结构和化学组分, 蜡质合成途径及相关酶和基因等方面的研究进展进行了概述, 总结了苹果表皮蜡质研究在苹果贮藏保鲜方面的应用, 并对研究中存在的问题及前景进行了展望。

关键词: 苹果; 果皮蜡质; 化学成分; 合成途径; 作用机制

Research advances in metabolism and regulation of waxy substances in apple

LI Ang¹, CHAI Yi-Feng^{1,2}, LI Qing-Peng¹, SONG Cong-Cong¹, ZHANG Bai-Qing²,
LIN Qiong^{1*}, DUAN Yu-Quan^{1*}

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Quality, Safety, Storage and Transportation Control of Agricultural Products, Ministry of Agriculture and Rural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

ABSTRACT: Apple epidermis wax is a layer of hydrophobic lipids covering the surface of apples. It is the first barrier for apples to cope with changes in the external environment. It plays an important role in fruit growth and storage. Apple epidermis wax can maintain the water balance of apple by reducing the non-porosity of water, can prevent microbial infestation through physical inhibition and antibacterial components, and also reduce the cold damage and disease of apples. This paper overviewed the research on the apple epidermis wax in recent years from the biological significance of apple wax, the research on the morphology, structure and chemical composition of different waxes, wax synthesis pathway and related enzymes and genes, summarized the application of apple epidermis waxy research in apple storage and preservation, and prospected the problems

基金项目: 国家“十三五”计划重点研发专项课题(2016YFD0400101)

Fund: National Key Research and Development Plan (2016YFD0400101)

***通讯作者:** 林琼, 博士, 副研究员, 主要研究方向为果蔬贮藏保鲜。E-mail: linqiong@caas.cn

段玉权, 博士, 研究员, 主要研究方向为果蔬贮藏保鲜。E-mail: duanyuquan@caas.cn

***Corresponding author:** LIN Qiong, Ph.D, Associate Professor, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences CAAS, Key Laboratory of Quality, Safety, Storage and Transportation Control of Agricultural Products, Ministry of Agriculture and Rural Sciences, Beijing 100193, China. Email: linqiong@caas.cn

DUAN Yu-Quan, Ph.D, Professor, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences CAAS, Key Laboratory of Quality, Safety, Storage and Transportation Control of Agricultural Products, Ministry of Agriculture and Rural Sciences, Beijing 100193, China. Email: duanyuquan@caas.cn

and prospects in the research.

KEY WORDS: apple; peel wax; chemical composition; synthetic pathway; mechanism

1 引言

植物表皮蜡质是覆盖在所有陆生植物地上部分表皮细胞外的疏水层,是植物为了适应陆生环境所建立起的物理屏障^[1]。果实表面蜡质在其生长和贮藏过程中均起着非常重要的作用。苹果表皮细胞最外侧覆盖有一层不易溶于水而溶于有机溶剂的白色晶状物,属于次生代谢物质,由苹果表皮分泌,是苹果与外界环境相互作用的第一道屏障,将其称之为蜡质。没有蜡质层,苹果不仅容易受到微生物的侵染,发病率升高,而且容易发生一些物理伤害,更重要的是苹果表皮缺乏蜡质层会导致水分损失进而发生皱缩,从而失去商品价值。

本文将结合最新研究成果,从苹果果皮蜡质的生物学功能、微观形态、成分以及蜡质合成代谢的基因调控方面进行综述,希望对同类研究有所帮助。

2 果实蜡质层生物学意义

2.1 阻止水分流失

苹果表面蜡质层是果实的次生代谢产物,包含一系列疏水性物质,在果实表面形成一层蜡膜,其作用之一就是维持水分平衡,防止水分流失^[2]。Belding 等^[3]报道,“Golden Delicious”苹果因为外表皮蜡质含量较少,在贮藏过程中比其他品种更容易失水,发生皱缩;相反,“Red Rome”苹果果实表面含有较厚的蜡质层,在贮藏过程中水分流失较少,具有较长的贮藏期。Baur 等^[4]研究证明,蜡质层能够防止水分流失的原因可能是水分通过表皮由角质酯形成的极性通道框架时,蜡质作为表皮基质的填充物增加了扩散路径的长度和曲折性,减少组织内水分非气孔性散失;同时还表明,蜡质的保水性与蜡质的组分、厚度和含量多少有关。蜡质中的烃、醇、醛和酯与其他蜡质成分相比更能有效地阻止表皮中的水分运动,酸也能轻微地限制水分运动。胡晓君等^[5]研究表明,与其他的蜡质成分相比烷烃的保水功效最强,而其他脂肪酸类物质也均有一定的保水能力,在增强植物抗旱保水能力方面发挥重要作用。杨艳青^[6]报道,与蜜脆果实相比,“嘎啦”苹果中缺少 nC16、nC17、nC32 和 nC33 烷烃,失水率明显大于蜜脆。同样,对 *LeCER6* 功能丧失的番茄突变体表皮蜡成分进行分析,超长链的正构烷烃含量降低,同时淀粉水平升高,水分损失增加 3 到 8 倍^[7]。目前,研究多集中于角质结构变化对于苹果果皮透水性的影响。Veraverbeke 等^[8]使用扫描电子显微镜观察“乔纳金”苹果在为期 9 个月的贮藏期内蜡质结构和厚度的变化,发现贮藏过程中果皮蜡质裂痕逐

渐消失,果皮趋于光滑,水分的流失显著减少。

2.2 防止机械损伤和微生物侵染

在果蔬采后贮藏阶段病原菌通常会从果实表皮的机械伤口或蜡质裂纹处入侵,从而导致果实腐烂,严重影响果蔬品质,进而造成巨大的经济损失^[9-11]。蜡质层可有效地阻止病原体的侵入,作用途径主要有两种,第一种是通过营造病原微生物不适宜的生长环境来阻碍其侵染,如真菌的侵染常需要湿润的环境,而表皮蜡质的疏水作用,显著控制了病原真菌的生长。另一种是蜡质中的一些抗菌成分起到控制微生物侵袭的作用,而且光滑的蜡质表面大大降低了污染颗粒的附着,明显减少了植物表面病原微生物的数量。唐瑛^[12]通过试验发现与脱蜡表皮相比,完整的苹果果皮能有效的抑制 *A. alternata* 分生孢子的萌发和侵染菌丝的形成,并且不同发育期果实表皮对 *A. alternata* 侵染过程及侵染结构的促进作用有差异。夏瑞娥^[13]研究表明,油菜的表皮蜡成分的增加能够降低油菜菌核病的发生。大量研究证实,角质层的厚度、结构以及特定的抗菌成分是影响果实抗性的主要因素。Konarska^[14]利用扫描电镜观察“Lobo”和“Boskoop”苹果果皮蜡质结构,发现前者角质层厚度和蜡质含量都高于后者,而且贮藏期间可以观察到“Boskoop”苹果果皮蜡质裂纹里长有明显的菌丝,而在“Lobo”苹果表皮中并未发现菌丝,因此提出苹果果实的病害发生率与角质层厚度和结构之间有紧密的联系。倪郁等^[15]发现,水杨酸诱导中双 9 号油菜蜡质总量及组分含量增加,柱状晶体结构减少,片状结构增加,扩大了蜡质层覆盖叶表面积,增强对核盘菌的抗性。

2.3 延长果实贮藏期

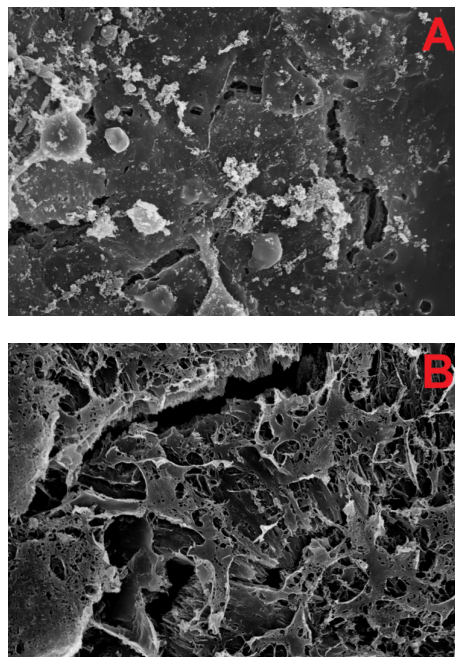
苹果表面蜡质能限制果实表面的营养渗漏、降低果实表面的生理紊乱(减少油腻)和延长果实的贮藏期^[3,16]。Curry 等^[16]分别对“Royal Gala”、“红富士”、“密脆”和“嘎啦”苹果研究表明,其表面蜡质均可减少果实油腻的发生和降低苹果贮藏过程中虎皮病的发病率。苹果在储运过程中出现的果肉褐变同角质层的形态和结构有着紧密的联系,角质层在一定程度上可以调节果实内部气体的交换,细胞内高浓度二氧化碳或者低浓度氧气都会引起果肉褐变,而角质层通过表皮气孔和蜡质裂纹调节果实内部氧气和二氧化碳的比例,从而抑制果肉褐变的发生^[17]。同样有研究表明,果皮蜡质含量的多少和形态与鸭梨黑心病的发生息息相关^[18]。王晓飞等^[19]研究发现“粉红女士”苹果随着贮藏时间的延长果皮油腻化程度加深,通过扫描电镜观察发现,果皮蜡质超微形态处于动态变化过程,表面蜡质颗粒不断进行融合,晶体结构消失,堵塞表皮气孔,因此影响了果皮的气

体调节能力。表皮蜡质组分的改变也会直接导致果实某些生理功能的紊乱。蜡质组分中 α -法尼烯的一种氧化产物共轭三烯在苹果表皮的积累,被认为是导致苹果虎皮病的直接原因^[20]。胡小松等^[21]以“红星”苹果为实验对象,研究 α -法尼烯和共轭三烯的合成和转化部位,试验表明, α -法尼烯在果实表皮角质层中大量合成,之后分别向外蜡质层和内皮下细胞和果肉薄壁细胞双向转移,在果实表皮蜡质层或角质层中与氧接触,迅速氧化生成共轭三烯和其他氧化产物,并且虎皮病的发生、 α -法尼烯与共轭三烯的含量都与贮藏温度呈显著的负相关。Busatto 等^[22]研究发现 α -法尼烯及其氧化产物共轭三烯一个新的作用即作为苹果果实褐变的信号开关,但详细致病机制尚不清楚。在最新的研究中 Sylvain 等^[23]和 Andre 等^[24]发现熊果酸和齐墩果酸的减少,伴随着烷基-羟基酸酯和桦木酸的积累,导致苹果表皮粗糙、颜色变褐化。

3 苹果果皮蜡质形态和结构

3.1 苹果果皮蜡质微观形态

植物表皮蜡质通常是由覆盖在角质层最外侧的外层蜡质和深嵌在角质内部的内层蜡质构成^[25]。外表皮蜡质的晶体结构常呈三维结构堆积在角质层最外层,可通过扫描电子显微镜清晰的观察到,一般将其分为片状、柱状、线状、棒条状、空心管状、血小管状和烟卤状等26类,这些晶型高度通常在0.2~100 μm 左右^[26],而内层蜡质为无定型态化合物,难以用电子显微镜观察到^[27]。苹果表皮蜡质通常表现为片状结构,并且不同品种的苹果间存在这显著差异^[28]。Belding 等^[3]用扫描电子显微镜观察表皮蜡的超微结构以揭示品种之间的结构差异,研究发现“澳洲青苹”和“首红”果实表面分布着大量不规则的片状晶体,而“Red Rome”表皮较为光滑,分布有少量的平行状蜡质晶体。苹果果皮蜡质微观形态容易受到光线、温度和湿度等外界环境因素的影响,在美国西部干旱环境中栽培的“金冠”苹果果皮蜡质片状结构较少,而在湿热的东南部果皮蜡质有较多的片状结构^[29]。除蜡质晶体外,苹果果实表面还布有网状或条状微小裂纹,这是由于处在发育期的果肉细胞不断膨大驱使表皮扩张从而导致表皮产生裂纹,一旦采收果肉细胞得不到营养供给,细胞发育停止也就不会产生新的裂纹,并且这些裂纹容易受外界环境因素的影响^[30]。郝燕燕等^[31]通过扫描电镜发现“红富士”苹果表面蜡质层光滑,并且布满了网状裂纹;套袋后形成的微环境使“红富士”苹果表皮蜡质层变薄,裂纹逐渐愈合,果实表面较未套袋处理的果实光滑。在“嘎拉”、“Royal Gala”、“澳洲青苹”和“Autumn Gold”苹果贮藏期间同样发现了类似的现象^[3,16,29]。“澳洲青苹”和“红富士”苹果的扫描电镜图见图1(图片来自本实验室,还未发表相关文章)。



注: A:“澳洲青苹”; B:“红富士”。

图1 苹果扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron micrograph of apple

3.2 苹果果皮蜡质的晶型结构

苹果果皮外层蜡质除了具有特定的外观形态,还具有典型的晶型结构。近年来研究人员建立了一个新的蜡质提取方法,利用甘油从植物中提取原生外层蜡质后立即冷却至 -100°C ,这样外层蜡质就完全嵌入冷冻甘油中,防止外加应力过大或蜡质重结晶带来的干扰^[32]。Ensikat 等^[33]利用X射线分析了35种植物的表皮蜡质的晶体结构,发现大多数蜡质表现出正交结构,这是脂肪族化合物最常见的结构,而有些含有仲醇和酮的管状晶体分别为三斜晶系和六边晶系。正二十九烷和10-二十九醇是苹果果皮蜡质的主要组分,而且具有明显的晶体特征^[34]。Ensikat 等^[32]利用冷冻甘油剥离了“Ontario”苹果的外层蜡质,并使用X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)和电衍射(energy detection, ED)对苹果外层蜡质进行了分析,结果表明,片状苹果蜡质为典型的正交晶型。尽管蜡膜形态呈无定型,但衍射结果显示蜡膜分子呈层状结构有序排列,具有显著的晶体特征。而果实内层蜡质分子排列无序,属于非晶形结构。

4 苹果果皮蜡质组分

通常所说的苹果果皮蜡质主要是由一些C20~C34的超长链的脂肪酸及其衍生物组成,近年来研究发现,其作为信号分子干预与表皮细胞分裂和扩张和防御机制有关的几个过程^[35]。苹果果皮蜡质超长链的脂肪族化合物主要包

括烷烃、初级醇、次级醇、醛类、酮类和酯类^[36],但是具体成分因不同品种、不同时期而差异较大^[37]。大量的研究证实,苹果表皮蜡质中最主要的组分为奇数碳的烷烃类化合物,Verardo 等^[36]对“Florina”、“Golden B”和“Ozark Gold”3种苹果果皮蜡质进行气相色谱—质谱测定,发现脂肪族化合物碳原子数一般为 18~30 个,其奇正构烷烃 C27 和 C29 在饱和部分中占主导地位,而酯类碳链较长,碳原子数为 33~48 个。Belding 等^[3]结合薄层色谱和气相色谱—质谱对 18 个品种的苹果果皮蜡质进行分析发现,醛和酮类化合物在表皮蜡中仅占较小的部分约 0%~6%,而烷烃占脂肪族化合物总量的 40%~70%,并且同样发现正二十九烷在脂肪族化合物中占有绝对优势,约为 16.6%~49%。不同品种间苹果果皮蜡质组分存在着显著差异,其中次级醇也被认为是种间差异最明显的组分,次级醇在“红星”系苹果果皮蜡质中占总蜡质含量的 20.4%,但在“金冠”系苹果中仅占 1.9%^[38]。近些年对苹果果皮蜡质化学成分分离研究的深入,已明确其蜡质主要包括烃类、醇、二醇、羰基化合物、脂肪酸酯、脂肪酸、羟基脂肪酸和熊果酸等,有的品种还可能包括萜类化合物、黄酮类化合物、甾醇、 β -二酮及其衍生物。

5 苹果果皮蜡质合成途径及基因调控

目前,尽管苹果表皮蜡质合成与转运途径仍不清楚,但凭借在拟南芥、番茄、小麦和水稻等植物的研究,基本上可以确定其大致合成路径。蜡质合成是在植物表皮细胞中进行的,需要多种酶的催化或多个细胞器的参与,其合成过程中至少需要 30 几个酶催化,几百个基因参与的复杂过程^[16]。众多研究表明,蜡质合成途径包括脂肪酸运出质体、从内质网到质膜、再从质膜到质外体和穿过细胞壁到表皮等过程^[7,39,40]。目前利用同位素示踪和气相色谱—质谱等技术,已经基本阐明了植物表皮蜡质的合成包括脱羧和酰基 2 个还原过程^[4]。

苹果表皮蜡质合成发生的场所是在表皮细胞的亚细胞结构中,主要分为 2 个步骤^[41,42]。如图 2 所示,首先是在苹果表皮细胞的质体中通过脂肪酸从头合成途径合成 C16 和 C18 脂肪酸,其中在细胞溶胶内合成 C16 软脂酸,然后在质体中延伸为 C18 的硬脂酸,该过程是在质体基质内由脂肪酸合成酶复合体(fatty acid synthase complex, FAS)催化完成的。之后进入延伸过程,乙酰辅酶 A 与酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)结合发生缩合、还原、脱水、二次缩合 4 步反应,经过这 4 步复杂的反应后,最初的酰基链增加了 2 个碳原子,从头合成反应每循环一次就增加 2 个碳原子,当碳原子数达到 16 或 18 个时,循环反应停止^[43]。第 2 步发生在内质网中,主要反应为蜡质合成的直接前体物质超长链脂肪酸(VLCFAs)及蜡质终产物的合成。质体中形成的 C16 或 C18 脂肪酸被长链酰基辅酶 A 合成酶(long

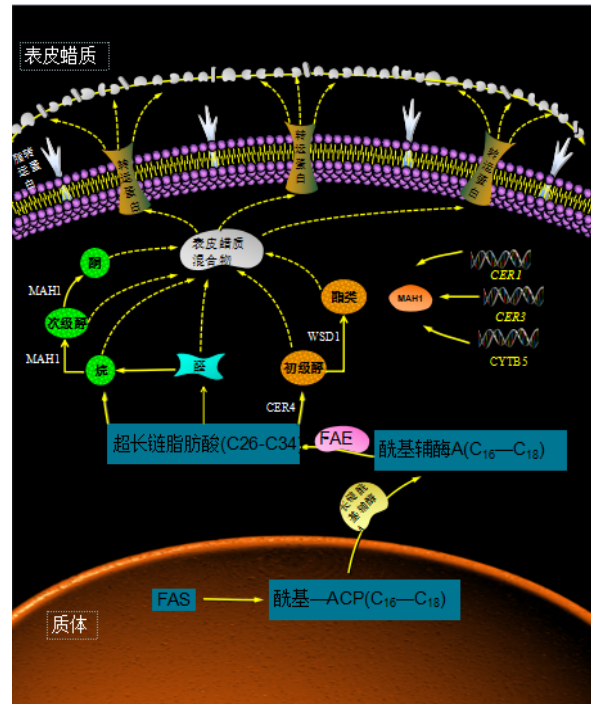


图 2 苹果表皮蜡质合成和转运可能路径示意图^[41,42]

Fig.2 Possible pathways of wax synthesis and transport in apple skin ^[41,42]

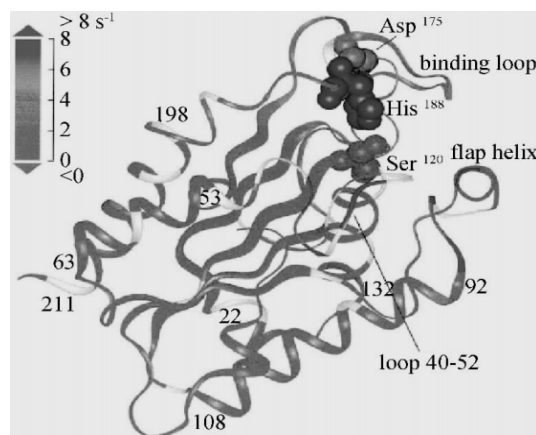
chain acyl-CoA synthase, LACS)酯化成对应的酰基辅酶 A,再与内质网上的脂肪酸延伸酶复合体(fatty acid elongase, FAE)结合,延伸合成超长链脂肪酸,再通过酰基还原途径和脱羧基途径进一步合成蜡质^[44]。饱和脂酰辅酶 A 转运到内质网的途径一直以来都是未知的,最新研究发现,膜蛋白脂肪酸转运蛋白 1(fatty acid export1, FAX1)参与了这一过程^[45]。FAE 由 4 种酶组成: β -酮脂酰辅酶 A 合成酶(β -ketoacyl-CoA synthase, KCS)、 β -酮脂酰辅酶 A 还原酶(β -ketoacyl-CoA reductase, KCR)、 β -羟酰基辅酶 A 水解酶(β -hydroxyacyl-CoA dehydratase, HCD)和烯酰基辅酶 A 还原酶(enoyl-CoA reductase, ECR),分别催化缩合、还原、脱羧和二次还原反应^[46,47],其中酰基还原途径生成初级醇和酯类,脱羧基途径生成醛、烷烃、次级醇和酮类,最终生成的产物被运至细胞外堆积分别形成角质和蜡质。目前已知的参与酰基还原合成途径的关键因子是脂酰基还原酶和蜡质合成酶/甘油二酯酰基转移酶(wax synthase/diacylglycerol acyltransferase, WS/DGAT)。WSD1 催化初级醇类和 C16:0 脂酰-CoA 形成酯类^[48]。而且最近研究表明,烷烃合成过程中的关键因子 CER1、CER3 及 CYTB5 相互作用形成一个复合体共同参与烷烃的合成^[49]。烷烃合成通路最终反应是由中链烷烃羟化酶 1(mid-chain alkane hydroxylase1, MAH1)催化完成,氧化烷烃形成二级醇类和酮类^[50]。最后这些蜡质成分在 ABC 转运蛋白(ATP binding cassette transporter)和脂转运蛋白(lipid transfer protein, LTP)

的共同作用下由内质网输送至植物蜡质层。ABC 转运蛋白在蜡质合成过程中起着至关重要的作用, 最新研究表明, ABC 转运蛋白基因 *Ts.ABCG11* 的过表达增加了拟南芥中的角质层脂质和非生物胁迫耐受性^[51]。尽管称为脂质转移蛋白(LTP)的脂质结合蛋白组的体内功能仍然相当不清楚, 但是有越来越多的证据表明 LTP 在角质层组装所需的单体转移和沉积中有重要作用。在最新的研究中, Tiina 等^[52]研究了藓类和苔藓中的 LTP, 整理了连接 LTP 与角质层合成的数据, 以揭示 LTP 在植物角质层的生物合成和进化中的特定功能和活性。

Albert 等^[53]通过对拟南芥蜡质合成相关基因与苹果 ESTs 及苹果基因组数据库的比对, 筛选出与苹果蜡质合成相关的候选基因, 并且利用荧光定量 PCR 技术对其在苹果果皮和果肉中的表达量进行了分析, 结果表明, 蜡质合成相关的结构基因 *LACS2*、*KCS7/2*、*CER4* 和 *CER1* 在苹果果皮中特异性表达。*LACS2* 和 *KCS7/2* 分别为长链酰基辅酶 A 合成酶和 β -酮脂酰辅酶 A 合成酶的编码基因, 对 C16 和 C18 脂肪酸延伸合成超长链脂肪酸有着重要作用^[54]; *CER4* 编码脂肪酰基还原酶, 在酰基还原途径中负责初级醇的合成^[55]; *CER1* 同长链烷烃合成相关, 可能编码链烷合成酶, 在内质网中催化醛类脱羧形成烷类化合物^[56,57]; *CER6* 是目前研究得较清楚且功能较为明确的蜡质基因, 是延长 C24 超长链脂肪酸必需的基因, 该基因编码苹果表皮 KCS, 控制苹果表皮蜡质中超长链脂肪酸的合成^[58]; *CER10* 基因编码烯酰辅酶 A 还原酶, 催化超长链脂肪酸延长反应的最后一步^[59]; *CER7* 可能在转录后通过 RNA 加工调节蜡质合成^[60]。最近对 *CER2* 及相关蛋白的研究表明, *CER2* 可能参与到 C28 脂肪酸的延伸过程, 而其相关蛋白可能参与到了最长达到 C34 脂肪酸的延伸过程^[61,62]。

6 苹果表皮蜡质与病原菌的互作作用

角质酶是一种真菌胞外酶, 在植物病原真菌侵染寄主的前期过程中起重要作用, 目前已经至少在 22 种植物病原真菌侵染寄主的过程中得到证实, 并且不同病菌角质酶氨基酸组成基本相同, 主要包括镰孢菌属(*Fusarium*)、链核盘菌属(*Monilinia*)、葡萄孢属(*Botrytis*)、曲霉属(*Aspergillus*)等^[63]。角质酶属于诱导酶, 在没有角质存在的情况下, 角质酶基本不产生。角质酶主要成分为糖蛋白, 其中含 3%~16% 碳水化合物, 一般是以 O-糖苷键与碳水化合物结合^[12]。角质酶活性中心是一种三分体结构, 即由 3 个基团组成, 丝氨酸(Ser)120-组氨酸(His)188-天门冬氨酸(Asp)175。与多数脂肪酶不同, 活性位点丝氨酸不是嵌在两性分子环内, 而是位于整个结构的顶端, 暴露于溶液中, 没有盖子结构遮挡, 没有界面活化现象^[64]。角质酶的立体结构见图 3。



注: Asp-天冬氨酸, His-组氨酸, Ser-丝氨酸, binding loop-结合环, flap helix-折板环, loop-环。

图 3 角质酶的立体结构^[64]

Fig.3 Spatial structure of cutinase^[64]

苹果表皮所含的角质成分是病原菌侵入寄主时需要突破的第一道屏障(如图 4)。植物表面的病原真菌孢子通过少量的角质酶来感受与寄主的接触, 病原菌需要依赖其自身分泌的角质酶作为工具酶, 催化角质多聚物水解。病菌在侵入前可在底物水平上产生少量的角质酶分解寄主表皮的角质层, 产生寡聚体, 最后产生单体, 这些单体物质可以诱导角质酶基因表达, 合成更多的角质酶, 加速降解寄主的表皮角质层, 降低寄主防御能力, 从而成功侵入, 角质层诱导角质酶的过程见图 4。角质蛋白酶对底物的降解机制是非常复杂的, 目前仍没有定论。以角蛋白为例, 角蛋白含较多二硫键, 降解过程一般分 3 个步骤: 变性、水解、转氨基。二硫键还原酶作用于二硫键, 将胱氨酸(-S-S-)还原为半胱氨酸(-SH), 使角蛋白高级结构解体而形成变性角蛋白; 在多肽水解酶作用下再逐渐水解成多肽、寡肽和游离氨基酸; 最后由转氨基作用产生氨气和硫化物而使角蛋白彻底水解^[65]。

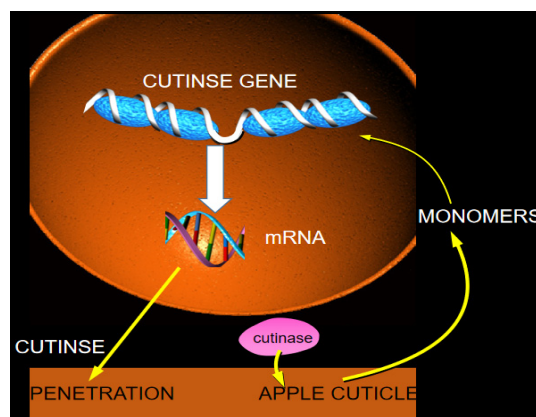


图 4 植物角质层诱导角质酶的图示

Fig.4 Schematic representation of how the plant cuticle induces cutinase

7 苹果果皮蜡质研究在其贮藏保鲜中的应用

植物表皮蜡质特殊的形态结构和生物学功能在果蔬贮藏保鲜中具有非常重要的作用,为果蔬新型保鲜剂的开发提供了新的方向。苹果果皮蜡质的薄厚、结构形态和化学组分等都会直接影响苹果的货架期,人为改善果实表皮蜡质层的组织结构或者性能,可明显地提高果实贮藏品质。大量的报道已经证实,苹果表面涂膜可以影响果实的营养成分、质量、芳香物质等,延长苹果的货架期^[66,67]。最新的研究表明苹果涂膜可以显著减缓果实油腻化的发生。植物表皮脂肪酸的积累被认为是导致果实油腻化的重要原因,而脂肪酸合酶是脂肪酸合成过程中的关键酶。有研究人员发现一种天然活性物质—表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)可以有效地抑制动物细胞中脂肪合酶的活性^[68]。王聪等^[69]首次将EGCG喷涂在“粉红女士”苹果果实表皮上,发现主要脂肪酸和酯类含量均低于对照组,并降低了果皮油腻化的发生程度。蜡质层过薄或有裂纹都会严重影响苹果的抗病性,蜂胶富含脂肪酸和醇、酚、醛类化合物与植物表皮蜡质成分相近,并且具有良好的成膜性,所以常用于配置涂膜保鲜剂。陈小利等^[70]利用蜂胶涂膜保鲜“红富士”苹果,发现蜂胶在表皮形成一层类似于蜡质的薄膜,一定程度上堵塞皮孔和微小创伤,阻止氧气进入果实内部,减少活性氧形成,另一方面可减少果皮蒸腾,抑制水分散失。

8 展望

目前,国内外学者对苹果叶片和果实蜡质微观形态和化学组成进行了相关的研究,为蜡质作用机制奠定了一定的基础,但是由于苹果果皮蜡质组分种类繁多,并且不同品种之间相差较大,许多组分仍难以鉴定,对研究苹果果皮蜡质采后变化特点及相关组分同蜡质生物学功能关系造成了较大困难。尤其是苹果虎皮病和黑心病同蜡质组分之间的关系缺乏深入详细的研究。因此有针对性的研究蜡质组分对苹果果实生理变化的影响,是研究苹果采后贮运的重要方向。这样不仅可以深入了解苹果表皮蜡质的生物学功能,还可以为人工开发天然果蜡和涂膜剂提供重要的实验依据。

虽然已经从拟南芥、小麦和番茄等作物上克隆得到了一些与蜡质合成和分泌相关的基因,但苹果中蜡质代谢缺乏系统的研究,蜡质合成、降解和转运相关基因尚未完全获得。而且较多的研究集中在外层蜡质,对内层蜡质研究较少。负责植物角质层最终结构的不同构件的分子组装是目前最前沿的研究方向之一,近年来取得了一些进展,但我们仍远未了解外表皮细胞中发生的机制^[71,72]。现代分子生物学和基因工程技术的迅速发展,为深入探讨蜡质代谢途径的基因功能奠定了坚实的基础。各种新的研究方法如质谱成像、酵母双杂交、RNA干扰、病毒诱导基因沉默技

术、全基因组关联研究和CRISPR-Cas9基因编辑等技术的应用将会为苹果蜡质研究注入活力。

参考文献

- [1] Carmit Z, Zhang ZZ, Gao YG, *et al.* Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1088.
- [2] Veraverbeke EA, Bruaene NV, Oostveldt PV, *et al.* Non destructive analysis of the wax layer of apple (*Malus domestica* Borkh.) by means of confocal laser scanning microscopy [J]. *Planta*, 2001, 213(4): 525–533.
- [3] Belding RD, Blankenship SM, Young E, *et al.* Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1998, 123(3): 348–356.
- [4] Baur P, Marzouk H, Schönherr J, *et al.* Estimation of path lengths for diffusion of organic compounds through leaf cuticles [J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 22(3): 291–299.
- [5] 胡晓君, 张正斌, 刘文, 等. 植物表皮蜡质及极长链脂肪酸类物质的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, (12): 5176–5178.
Hu XJ, Zhang ZB, Liu W, *et al.* Advances in research on plant epidermis waxes and very long chain fatty acids [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, (12): 5176–5178.
- [6] 杨艳青. 苹果果实表皮蜡质结构观察与组分分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
Yang YQ. Observation and composition analysis of waxy structure of apple fruit epidermis [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013.
- [7] Leide J, Hildebrandt U, Reussing K, *et al.* The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a beta-ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6) [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(3): 1667–1679.
- [8] Veraverbeke EA, Verboven P, Scheerlinck N, *et al.* Determination of the diffusion coefficient of tissue, cuticle, cutin and wax of apple [J]. *J Food Eng*, 2003, 58(3): 285–294.
- [9] 高森, 王亚虹, 邵惠芳, 等. 植物角质层结构组成、生物学功能及分离方法研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2018, 20(3): 46–54.
Gao S, Wang YH, Shao HF, *et al.* Advances in structural composition, biological function and separation methods of plant stratum corneum [J]. *J Agric Sci Technol*, 2018, 20(3): 46–54.
- [10] Schirra M, D'Hallewin G, Benyehoshua S, *et al.* Host-pathogen interactions modulated by heat treatment [J]. *Postharv Biol Technol*, 2000, 21(1): 71–85.
- [11] 袁树枝, 丁薪源, 王姣, 等. 果实细胞的结构抗病性及外源调控研究进展[J]. *保鲜与加工*, 2014, 14(6): 51–55.
Yuan SZ, Ding XY, Wang J, *et al.* Advances in research on structural disease resistance and exogenous regulation of fruit cells [J]. *Stor Process*, 2014, 14(6): 51–55.
- [12] 唐瑛. 发育及贮藏期苹果梨果皮蜡质对 *Alternaria alternata* 侵染的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
Tang Y. Effects of apple pear peel wax on the infection of *Alternaria alternata* during development and storage [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
- [13] 夏瑞娥, MeJA 对甘蓝型油菜菌核病抗性的诱导及其与叶表皮蜡质关系的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
Xia RE. Preliminary study on the induction of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and its relationship with leaf epidermis wax by MeJA [D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [14] Konarska A. Differences in the fruit peel structures between two apple

- cultivars during storage [J]. *Acta Sci Pol-Hortoru*, 2012, 11(2): 105–106.
- [15] 倪郁, 王婧, 宋超, 等. 外源 SA 影响油菜叶表皮蜡质及菌核病抗性的机制[J]. *作物学报*, 2013, (1): 110–117.
- Ni Y, Wang J, Song C, *et al*. Mechanism of exogenous SA affecting epidermal waxy and sclerotinia resistance in rapeseed leaves [J]. *Acta Agron Sin*, 2013, (1): 110–117.
- [16] Curry E. Effects of 1-MCP applied postharvest on epicuticular wax of apples (*Malus domestica* Borkh.) during storage [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 88(6): 996–1006.
- [17] Castro ED, Barrett DM, Jobling J, *et al*. Biochemical factors associated with a CO₂-induced flesh browning disorder of pink lady apples [J]. *Postharv Biol Technol*, 2008, 48(2): 182–191.
- [18] 霍君生, 李新强. 鸭梨黑心病与果表蜡质相关性的扫描电镜分析[J]. *河北农业大学学报*, 1992, (3): 50–53.
- Huo JS, Li XQ. Scanning electron microscopic analysis of the correlation between black pear disease and fruit wax in pear [J]. *J Hebei Agric Univ*, 1992, (3): 50–53.
- [19] 王晓飞, 任小林, 杨艳青, 等. ‘粉红女士’苹果果皮蜡质油膩化的研究[J]. *果树学报*, 2014, 31(2): 201–205.
- Wang XF, Ren XL, Yang YQ, *et al*. Study on oily ash of 'Pink Lady' apple peel wax [J]. *J Fruit Sci*, 2014, 31(2): 201–205.
- [20] Rowan DD, Hunt MB, Fielder S, *et al*. Conjugated triene oxidation products of α -farnesene induce symptoms of superficial scald on stored apples [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(6): 2780–2787.
- [21] 胡小松, 肖华志, 王晓霞, 等. 苹果-法尼烯和共轭三烯含量变化与贮藏温度的关系[J]. *园艺学报*, 2004, 31(4): 169–172.
- Hu XS, Xiao HZ, Wang XX, *et al*. Relationship between content changes of apple-farnesene and conjugated triene and storage temperature [J]. *J Hortic*, 2004, 31(4): 169–172.
- [22] Busatto N, Farneti B, Tadiello A, *et al*. Target metabolite and gene transcription profiling during the development of superficial scald in apple (*Malus x domestica* Borkh) [J]. *BMC Plant Bio*, 2014, 14(1): 193.
- [23] Sylvain L, Emmanuelle C, André-Christelle M, *et al*. Differential lipid composition and gene expression in the semi-russeted “cox orange pippin” apple variety [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1656.
- [24] Andre CM, Legay S, Deleruelle A, *et al*. Multifunctional oxidosqualene cyclases and cytochrome P450 involved in the biosynthesis of apple fruit triterpenic acids [J]. *New Phytol*, 2016, 211(4): 1279–1294.
- [25] Jetter R, Schäffer S, Riederer M. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: Evidence from *Prunus laurocerasus* L. [J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 23(6): 619–628.
- [26] Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, *et al*. Classification and terminology of plant epicuticular waxes [J]. *Bot J Linn Soc*, 1998, 126(3): 237–260.
- [27] Riedel M, Eichner A, Jetter MR, *et al*. Chemical composition of epicuticular wax crystals on the slippery zone in pitchers of five *Nepenthes* species and hybrids [J]. *Planta*, 2007, 225(6): 1517–1534.
- [28] Cajuste JF, Luis GC, Veyrat A, *et al*. Epicuticular wax content and morphology as related to ethylene and storage performance of ‘Navelate’ orange fruit [J]. *Postharv Biol Technol*, 2010, 55(1): 29–35.
- [29] Faust M, Shear CB. Fine structure of the fruit surface of three apple cultivars [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1972, 97(3): 351–355.
- [30] Lara I, Belge B, Goulao LF, *et al*. The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality [J]. *Postharv Biol Technol*, 2014, 87: 103–112.
- [31] 郝燕燕, 赵旗峰, 刘群龙, 等. 套袋微域环境对富士苹果果皮结构的影响[J]. *生态学报*, 2011, 31(10): 2831–2836.
- Hao YY, Zhao QF, Liu QL, *et al*. Effect of bagging micro-domain environment on the structure of Fuji apple peel [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, 31(10): 2831–2836.
- [32] Ensikat HJ, Neinhuis C, Barthlott W. Direct access to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method [J]. *Int J Plant Sci*, 2000, 161(1): 143–148.
- [33] Ensikat HJ, Boese M, Mader W, *et al*. Crystallinity of plant epicuticular waxes: Electron and X-ray diffraction studies [J]. *Che Phys Lipids*, 2006, 144(1): 45–59.
- [34] Koch K, Hans-Jürgen E. The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly [J]. *Micron*, 2008, 39(7): 759–772.
- [35] Nobusawa T, Okushima Y, Nagata N, *et al*. Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation [J]. *PLoS Biol*, 2013, 11: e1001531.
- [36] Verardo G, Pagani E, Geatti P, *et al*. A thorough study of the surface wax of apple fruits [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 376(5): 659–667.
- [37] Fich EA, Segerson NA, Rose JKC, *et al*. The plant polyester cutin: Biosynthesis, structure, and biological roles [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2016, 67(1): 043015–111929.
- [38] Dong X, Rao J, Huber DJ, *et al*. Wax composition of ‘Red Fuji’ apple fruit during development and during storage after 1-methylcyclopropene treatment [J]. *Hort Environ Biot*, 2012, 53(4): 288–297.
- [39] 朱守亮, 袁建琦, 董晓庆, 等. 苹果果皮蜡质的研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2016, 44(2): 120–124.
- Zhu SL, Yuan JQ, Dong XQ, *et al*. Research progress in wax of apple peels [J]. *Guizhou Agric Sci*, 2016, 44(2): 120–124.
- [40] 胡晓君, 张正斌, 刘文, 等. 植物表皮蜡质及极长链脂肪酸类物质的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, (12): 5176–5178.
- Hu XJ, Zhang ZB, Liu W, *et al*. Research progress on plant epidermis waxes and very long chain fatty acids [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, (12): 5176–5178.
- [41] 赵雪惠, 张蕊, 李玲, 等. 植物表皮蜡质合成及运输的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, (8): 1128–1134.
- Zhao XH, Zhang R, Li L, *et al*. Research progress in the synthesis and transportation of plant epidermis wax [J]. *J Plant Phy*, 2016, (8): 1128–1134.
- [42] 宋百成, 张新华, 任配培, 等. 植物表皮蜡质合成及其在果蔬贮藏中的作用研究进展[J]. *北方园艺*, 2013, (13): 212–216.
- Song BC, Zhang XH, Ren PP, *et al*. Research progress on wax synthesis of plant epidermis and its role in fruit and vegetable storage [J]. *North Hortic*, 2013, (13): 212–216.
- [43] 朱克明, 徐硕, 陶慧敏, 等. 植物表皮蜡质合成与转运机制的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2017, (9): 349–357.
- Zhu KM, Xu S, Tao HM, *et al*. Research progress in the synthesis and transport mechanism of plant epidermis waxes [J]. *Mol Plant Breed*, 2017, (9): 349–357.
- [44] Kunst L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax [J]. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(1): 51–80.
- [45] Li N, Gügel IL, Giavalisco P, *et al*. FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export [J]. *PLoS Biol*, 2015, 13(2): e1002053.
- [46] Kunst L, Samuels L. Plant cuticles shine: Advances in wax biosynthesis and export [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12(6): 721–727.
- [47] Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, *et al*. Acyl-lipid metabolism [J]. *Arabidopsis Book*, 2013, 11: e0161.

- [48] Li F, Wu X, Lam P, *et al.* Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme a:diacylglycerol acyltransferase *wsd1* required for stem wax ester biosynthesis in *arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 97–107.
- [49] Bernard A, Domergue F, Pascal S, *et al.* Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that *arabidopsis* ECERIFERUM1 and ECERIFERUM3 are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(7): 3106–3118.
- [50] Greer S, Wen M, Bird D, *et al.* The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of *arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(3): 653–667.
- [51] Ningmei C, Buerbatu S, Shuai T, *et al.* Overexpression of the ABC transporter gene *TsABCG11* increases cuticle lipids and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2018, (12): 303–313.
- [52] Tiina S, Eklund D, Valentin J, *et al.* Deciphering the evolution and development of the cuticle by studying lipid transfer proteins in mosses and liverworts [J]. *Plants*, 2018, 7(1): 6–16.
- [53] Albert Z, Ivanias B, Molanr A, *et al.* Candidate genes of cuticle formation show characteristic expression in the fruit skin of apple [J]. *Plant Growth Regul*, 2013, 70(1): 71–78.
- [54] Schnurr J, Shockey J, Browse J, *et al.* The Acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(3): 629–642.
- [55] Rowland O, Zheng H, Hepworth SR, *et al.* CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme a reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(3): 866–877.
- [56] Rashotte AM, Jenks MA, Amanda S, *et al.* Novel *eceriferum* mutants in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2004, 219(1): 5–13.
- [57] Qi CH, Zhao XY, Jiang H, *et al.* Isolation and functional identification of an apple *MdCER1* gene [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2019, (136): 1–13.
- [58] 甄方卉. 苹果 *MdCER6* 的克隆、表达及对乙烯调控的反应[D]. 淄博: 山东理工大学, 2016.
Zhen FH. Cloning, expression and response to ethylene regulation of *MdCER6* in apple [D]. Zibo: Shandong University of Technology, 2016.
- [59] Lee SB, Mi CS. Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(4): 557–72.
- [60] Lam P, Zhao L, Eveleigh N, *et al.* The exosome and trans-acting small interfering RNAs regulate cuticular wax biosynthesis during *Arabidopsis* inflorescence stem development [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(2): 323–336.
- [61] Wang X, Guan Y, Zhang D, *et al.* A β -ketoacyl-CoA synthase is involved in rice leaf cuticular wax synthesis and requires a CER2-LIKE protein as a cofactor [J]. *Plant Physiol*, 2016: pp. 01527. 2016.
- [62] Haslam TM, Haslam R, Thoraval D, *et al.* ECERIFERUM2-LIKE proteins have unique biochemical and physiological functions in very-long-chain fatty acid elongation [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(3): 682–692.
- [63] 孙媛. 灰葡萄孢角质酶的致病作用及角质酶突变菌株的基因分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2011.
Sun Y. Pathogenic effect of *Botrytis cinerea* and genetic analysis of cutinase mutant strains [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2011.
- [64] Martinez C, Nicolas A, Van TH, *et al.* Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole [J]. *Biochemistry*, 1994, 33(1): 83–89.
- [65] 张怀军, 赵志祥, 陈绵才. 角质蛋白酶产生菌及其酶基因研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2015, (1): 81–86.
- Zhang HJ, Zhao ZX, Chen MC. Research progress on keratinase producing bacteria and its enzyme gene [J]. *J Guizhou Agric Sci*, 2015, (1): 81–86.
- [66] 刘校男, 唐文婷, 刘瑞琦, 等. 高阻断性那他霉素玉米醇溶蛋白可食用膜的制备及对苹果的保鲜效果[J]. *中国食品添加剂*, 2017, (9): 188–193.
- Liu XN, Tang WT, Liu RQ, *et al.* Preparation of high-blocking natamycin zein edible film and its preservation effect on apple [J]. *China Food Addit*, 2017, (9): 188–193.
- [67] Kumar P, Sethi S, Sharma RR, *et al.* Improving the shelf life of fresh-cut 'Royal Delicious' apple with edible coatings and anti-browning agents [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(10): 1–12.
- [68] 葛建, 林芳, 李明揆, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)生物活性研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(2): 156–163.
- Ge J, Lin F, Li MK, *et al.* Progress in the biological activity of epigallocatechin gallate (EGCG) [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2011, 38(2): 156–163.
- [69] 王聪, 刘翠华, 杨艳青, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对'粉红女士'苹果果皮油膩化的影响[J]. *植物生理学报*, 2017, (6): 70–78.
- Wang C, Liu CH, Yang YQ, *et al.* Effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on the oily of 'Pink Lady' apple peel [J]. *Plant Phy J*, 2017, (6): 70–78.
- [70] 陈小利, 任小林, 蒲飞, 等. 蜂胶涂膜对红富士苹果贮藏品质和生理活性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(7): 230–234.
- Chen XL, Ren XL, Pu F, *et al.* Effect of propolis coating on storage quality and physiological activity of red fuji apple [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, 37(7): 230–234.
- [71] Domínguez E, Heredia-Guerrero, José A, *et al.* Plant cutin genesis: Unanswered questions [J]. *Trends Plant Sci*, 2015: S1360138515001387.
- [72] Petit J, Cécile B, Mauxion JP, *et al.* Breeding for cuticle-associated traits in crop species: traits, targets, and strategies [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(19): 5369–5387.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



李 昂, 硕士研究生, 主要研究方向为苹果贮藏保鲜。

E-mail: 1125351664la@gmail.com



林 琼, 博士, 副研究员, 主要研究方向为果蔬贮藏保鲜。

E-mail: linqiong@caas.cn



段玉权, 博士, 研究员, 主要研究方向为果蔬贮藏保鲜。

E-mail: duanyuquan@caas.cn