

## 褪黑素对采后荔枝果实冷害及生理变化的影响

刘家粮<sup>1,2,3</sup>, 张越<sup>1</sup>, 刘力霞<sup>1</sup>, 陈奕蒙<sup>1</sup>, 孟兰环<sup>1,2</sup>, 胡美姣<sup>3</sup>, 蒋跃明<sup>4</sup>, 张正科<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>海南大学食品科学与工程学院 海口 570228

<sup>2</sup>海南省食品营养与功能食品重点实验室 海口 570228

<sup>3</sup>中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 海口 571101

<sup>4</sup>中国科学院华南植物园 广州 510650

**摘要** 以采后“紫娘喜”荔枝果实为试材,使用 0.5 mmol/L 褪黑素(MT)溶液对其浸泡处理 10 min,晾干后置于(4±1) °C、(85±5)%条件下冷藏 30 d,研究 MT 处理对荔枝果实冷害及抗冷相关生理代谢的影响。结果表明,MT 处理显著降低了荔枝果实冷害指数,推迟了果皮色度  $a^*$  值下降;冷害指数在冷藏第 30 天较对照果实降低 49.4%,果皮色度  $a^*$  值在第 10~30 天期间平均提高 37.2%。MT 处理减缓了果实膜相对电导率升高,抑制了丙二醛(MDA)、超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )和过氧化氢( $H_2O_2$ )积累,如第 30 天时相对电导率、丙二醛含量、 $O_2^{\cdot-}$ 生成率和  $H_2O_2$  含量较对照组分别降低 29.6%,16.9%,6.9% 和 6.3%,从而减轻了果实氧化胁迫并使膜完整性得到维持。MT 处理降低了果实多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)活性,同时提高了总酚、类黄酮和花色苷含量,导致果实酶促褐变减轻。MT 处理提高了果实超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和谷胱甘肽还原酶(GR)等抗氧化酶的活性,维持了较高的抗坏血酸(AsA)和还原性谷胱甘肽(GSH)含量及 AsA/脱氢抗坏血酸(DHA)和 GSH/氧化型谷胱甘肽(GSSG)比值,从而增强了冷藏荔枝果实的抗氧化活性。此外,MT 处理促进了冷藏期间荔枝果实 *LcMsrA1*、*LcMsrA2*、*LcMsrB1* 和 *LcMsrB2* 上调表达,进而改善了果实蛋白质氧化损伤修复能力。结论:外源 MT 处理可通过调节冷藏荔枝果实抗冷相关生理代谢使果实冷害得到缓解。

**关键词** 荔枝; 褪黑素; 冷害; 抗氧化系统; 抗坏血酸-谷胱甘肽循环

**文章编号** 1009-7848(2022)12-0200-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.021

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)属无患子科木本植物,广泛种植于热带和亚热带地区,其果实因色泽红艳、滋味甘甜、营养丰富而具有较高的商业价值<sup>[1]</sup>。荔枝是典型的非呼吸跃变型果实,需完熟后采收,然而,采后果实在常温贮运过程中极易发生衰老和腐烂,极大地限制了产品流通与市场贸易<sup>[1]</sup>。冷藏是推迟果蔬采后衰老并维持其品质的主要技术手段之一<sup>[2]</sup>。荔枝属冷敏型果实,在冷藏过程中易发生冷害,且遭受冷害的果实由低温转入常温贮藏后,其症状迅速加剧,使产品货架寿命缩短至 24 h 以内<sup>[2]</sup>。探寻高效、环保的抗冷保鲜方法,对于减轻果实冷害具有重要意义。果皮褐变是荔枝果实冷害最为明显的特征,主要与花色苷降解、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxidase, POD)引发的酶促氧化反应、

细胞膜脂过氧化、细胞能量亏缺以及细胞氧化-还原稳态失衡等因素有关<sup>[3]</sup>。近年来,一些学者相继提出用于减轻荔枝果实冷害的采后技术,并取得较好的效果。例如: Xiao 等<sup>[4]</sup>使用干雾增湿技术处理采后“淮枝”荔枝果实,可显著降低果实在 4 °C 冷藏过程中的失重率,抑制膜透性增大及色泽损失,从而较好地保持了冷藏期间荔枝果实的品质。Siddiqui 等<sup>[5]</sup>报道,2 mmol/L  $H_2S$  真空(0.01 MPa)渗透处理,通过抑制 PPO 和 POD 活性,促进酚类物质的积累,增强 ROS 清除能力等作用使冷藏“Purbi”荔枝果实的抗冷能力提高。Ali 等<sup>[6]</sup>使用 0.25% 半胱氨酸预处理并结合 1%  $O_2$  + 5%  $CO_2$  气调冷藏(4 °C)技术对“Gola”荔枝进行保鲜,结果显示果实细胞膜透性、膜脂过氧化水平及 PPO 和 POD 活性均显著降低,而果实总酚含量和抗氧化能力有所提高,致果实冷害症状明显缓解。然而,上述方法存在处理方式复杂且成本较高等问题。在荔枝采后生产中仍需不断开发安全可靠且易操作的冷害控制技术,以改善产品的贮藏品质。

**收稿日期:** 2021-12-03

**基金项目:** 国家自然科学基金地区基金项目(32060363)

**第一作者:** 刘家粮,男,硕士生

**通信作者:** 张正科 E-mail: zhangzhengke@hainanu.edu.cn

褪黑素 (melatonin, MT), 化学名为 *N*-乙酰基-5-甲氧基色胺, 是一种吲哚杂环类化合物, 于 1958 年首次在牛松果体中发现, 现已证实其广泛存在于自然界生命有机体中<sup>[7]</sup>。在高等植物中, MT 合成于线粒体和叶绿体, 分布于多个组织和器官中, 是重要的氧化-还原信号分子, 其在调节种子萌发、组织分化、昼夜节律、光合效率、成熟衰老以及逆境胁迫应答等多种生理活动中发挥着显著作用<sup>[8]</sup>。此外, 因 MT 独特的天然属性和生物活性, 而被开发为保健药品, 具有改善睡眠, 调节生理失调, 提高免疫力、抗衰老和抗炎等功效<sup>[9]</sup>。近年来, 随着人们对 MT 功能认识的不断深入, 对果蔬采后生理与品质的调控作用也日益受到关注。外源褪黑素浸泡处理可有效延迟采后桃<sup>[10]</sup>、香蕉<sup>[11]</sup>、猕猴桃<sup>[12]</sup>和梨<sup>[13]</sup>等果实常温贮藏期间的成熟和衰老, 并维持较好的贮藏品质。在控制采后果实冷害方面, 外源褪黑素处理可促进 1 °C 和 4 °C 冷藏期间桃果实  $\gamma$ -氨基丁酸代谢和脯氨酸代谢, 增加 ATP 供应, 抑制细胞壁多糖解聚, 减轻膜脂过氧化, 以及提高不饱和脂肪酸比例, 从而改善果实抗冷性并使冷害减轻<sup>[14-16]</sup>。

先前的研究结果显示, MT 处理通过调节果实细胞能量和脯氨酸代谢来减轻“白糖罂”荔枝果实经冷藏转入常温贮藏后的冷害症状<sup>[2]</sup>, 表明 MT 可提高受冷荔枝果实在常温货架期间的适应能力, 然而, 目前尚不清楚 MT 对冷藏期间荔枝果实抗冷性的调节作用及其机制。本研究以“紫娘喜”荔枝为试材, 调查外源 MT 处理对采后荔枝果实冷藏期间冷害发生的影响, 通过分析膜脂过氧化、酚类物质代谢、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 代谢及蛋白质氧化损伤修复能力的变化, 探讨 MT 对荔枝果实抗冷性的诱导作用, 以期 MT 应用于荔枝冷藏保鲜提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试“紫娘喜”荔枝果实采摘于海口市永兴镇一商业果园。选取外观、大小均一, 且无机械伤和病虫害的果实, 于采收当日运送至海南大学食品科学与工程学院采后生物学实验室。

MT、愈创木酚、邻苯二酚、柠檬酸, 上海源叶

生物科技有限公司; 氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠, 西陇科学股份有限公司; 红菲咯啉、二硫代硝基苯甲酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; TritonX-100, 北京索莱宝科技有限公司; 植物多糖多酚总 RNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; AE301 cDNA 合成试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; SuperReal 荧光定量预混试剂盒, 天根生化科技有限公司; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量可见分光光度法检测试剂盒、O<sub>2</sub><sup>·-</sup>含量可见分光光度法检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; MDHAR 活性测定试剂盒、DHAR 活性测定试剂盒, 苏州科铭生物技术有限公司。以上化学试剂均为分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

色差仪 (型号 CR-400), 日本大阪美能达公司; 紫外分光光度计 (型号 UV-5500PC), 上海元析仪器有限公司; 电导率仪 (型号 FE30), 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; 荧光定量 PCR 仪 (型号 CFX Connect™ Optics Module), 美国 Bio-Rad 公司; 高速万能粉碎机 (型号 FW100), 北京永光明医疗仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 采后处理 用 0.5% 次氯酸钠对荔枝果实进行浸泡消毒处理 30 s, 果实沥水后置于通风处自然晾干。将果实随机分成 2 组, 分别置于蒸馏水 (对照组) 和 0.5 mmol/L (该浓度经前期预实验筛选获得) MT 溶液浸泡处理 10 min, 自然晾干。将晾干后的荔枝果实装入带孔聚乙烯自封袋, 15 果/袋, 置于 (4 ± 1) °C、(85 ± 5)% 相对湿度的冷库中贮藏 30 d。冷藏期间每隔 5 d 测定果实冷害指数、果皮色泽和相对电导率, 同时对果皮进行取样, 将样品用液氮速冻并捣成碎片, 置于 -80 °C 下冻存, 待测。每处理在各测定时间点设 3 次重复, 30 果/重复用于冷害指数调查, 其它指标分析设定为 15 果/重复。待测冻样使用时先用 FW100 粉碎机将其在低温下粉碎成果皮粉末, 然后测定。

1.3.2 冷害指数和色度 *a*\* 值测定 冷害指数: 根据冷藏果实褐变严重程度将其分为 5 个级别 (0~4 级), 评判标准按照 Zhang 等<sup>[3]</sup>的方法。冷害指数即褐变指数, 计算公式:  $\sum (\text{褐变等级} \times \text{对应等级果实数量}) / 4 \times \text{调查果实总数}$ 。

色度 *a*\* 值: 使用 CR-400 色差仪在果实赤道

轴中心对应两点各测1次色度值。 $a^*$ 值由低到高代表颜色由绿至红,正值越高红色越深,将 $a^*$ 值作为本研究中果皮色泽的特征参数。

1.3.3 相对电导率和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定 相对电导率测定采用Zhang等<sup>[3]</sup>的方法。相对电导率(%)=初始电导值/总电导值 $\times 100$ 。

取0.5 g冷冻荔枝果皮粉末,按照Zhang等<sup>[3]</sup>描述的硫代巴比妥酸法测定MDA含量,单位以每千克鲜重(fresh weight, FW)果皮含有的物质的量(mmol/L)表示,即mmol/kg FW。

1.3.4  $O_2\cdot^-$ 生成率和 $H_2O_2$ 含量测定 分别取0.15 g果皮粉末,使用可见分光光度法检测试剂盒测定超氧阴离子(superoxide anion,  $O_2\cdot^-$ )生成率和过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )含量,具体操作流程参照试剂盒说明书。 $O_2\cdot^-$ 生成率和 $H_2O_2$ 含量分别以每千克鲜重果皮每秒生成 $O_2\cdot^-$ 的物质的量( $\mu\text{mol}$ )和每千克鲜重果皮所含 $H_2O_2$ 的物质的量(mmol)表示,即分别为 $\mu\text{mol}/(\text{kg FW}\cdot\text{s})$ 和mmol/kg FW。

1.3.5 总酚、类黄酮总花色苷含量测定 取1 g荔枝果皮粉末溶于10 mL预冷的80%甲醇溶液,匀浆后在4 °C条件静置20 min,然后于10 000  $\times g$ 、4 °C条件下离心15 min,上清液即总酚和类黄酮提取液。

使用福林酚法测定总酚<sup>[7]</sup>,以没食子酸为参照物计算总酚含量,单位表示为g/kg FW。

使用 $AlCl_3$ 比色法测定类黄酮<sup>[8]</sup>,以芦丁为参照物计算类黄酮含量,单位表示为g/kg FW。

取1 g冷冻荔枝果皮,参照Zhang等<sup>[9]</sup>描述的pH差示法测定并计算花色苷含量,单位表示为g/kg FW。

1.3.6 PPO和POD活性测定 PPO和POD粗酶液提取:称取0.15 g果皮粉末,加入1.5 mL预冷乙酸-乙酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 5.5, 含1 mmol/L PEG、4% PVP和1% Triton X-100),混匀后在4 °C条件静置20 min,随后于10 000  $\times g$ 、4 °C条件下离心30 min,收集上清液,即粗酶提取液。

PPO活性测定参照Kumar等<sup>[20]</sup>的方法,以邻苯二酚溶液作为反应底物,加入粗酶液后记录反应液体吸光值在波长420 nm处的变化,以每分钟

吸光值变化0.01定义为1个酶活力单位(U),PPO活性表示为U/kg FW。

POD测定参照Zhang等<sup>[21]</sup>的方法,以愈创木酚溶液作为反应底物,依次向其中加入粗酶液和 $H_2O_2$ ,反应启动后记录溶液在470 nm处的吸光值变化,以每分钟吸光值变化0.01定义为1个酶活力单位(U),POD活性表示为U/kg FW。

1.3.7 抗氧化酶活性测定 参照Zhang等<sup>[3]</sup>的方法,分别取0.1 g果皮粉末溶解于不同的预冷缓冲液并匀浆,将各匀浆液在12 000  $\times g$ 离心力、4 °C下离心20 min,各上清液分别作为超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)粗酶液,进行下述酶活性测定。

1) SOD活性测定 参照Toivonen等<sup>[22]</sup>的方法。依据SOD抑制氮蓝四唑(NBT)在光下的还原能力来衡量酶活性强、弱,将抑制50%的NBT光还原反应所需酶量定义为1个酶活力单位(U)。

2) CAT活性测定 参照Chance等<sup>[23]</sup>的方法,以20 mmol/L  $H_2O_2$ 溶液为反应底物,加入粗酶液后检测混合液在波长290 nm处的吸光值变化。以每分钟降解1  $\mu\text{mol}$   $H_2O_2$ 所需酶量定义为1个酶活力单位(U)。

3) APX活性测定 参照Liu等<sup>[24]</sup>的方法,以抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)作为反应底物,依次加入粗酶液和 $H_2O_2$ ,记录反应混合液在290 nm处的吸光值变化,以每分钟氧化1  $\mu\text{mol}$  AsA所需酶量定义为1个酶活力单位(U)。

4) GR活性测定 参照Smith等<sup>[25]</sup>的方法,反应体系包括0.2 mL氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)(5 mmol/L)、0.1 mL粗酶液、0.1 mL NADPH溶液(4 mmol/L)、2.6 mL磷酸缓冲液(pH 7.5, 含1 mmol/L EDTA)。记录反应液在340 nm处的吸光值变化,以每分钟吸光值降低0.01定义为1个酶活力单位(U)。

5) 单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)和脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)的提取及活性测定 分别使用MDHAR和DHAR测试试剂盒,具体操作参照试剂盒说明书。以每秒氧

化1  $\mu\text{mol}$  NADPH 定义为 1 个 MDHAR 活力单位 (U);以每秒生成 1  $\mu\text{mol}$  AsA 定义为 1 个 DHAR 活力单位(U)。

以上酶活性均用 U/kg FW 表示。

1.3.8 抗坏血酸-谷胱甘肽循环代谢产物含量测定 取 0.15 g 果皮粉末加入预冷的 1.5 mL 三氯乙酸(50 g/L)中混匀,提取 20 min 后,于 10 000  $\times$  g、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 20 min,收集上清液于低温保存,待测 AsA、脱氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid,DHA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)和 GSSG 含量。

1) AsA 含量 按照 Zhang 等<sup>[26]</sup>描述的红菲咯啉比色法测定,单位表示为 g/kg FW。

2) DHA 含量 参考 Chumyam 等<sup>[27]</sup>的方法测定,将 0.2 mL 上清液加入 0.8 mL DTT(10 mmol/L)中,42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min,然后加入 0.2 mL *N*-乙基马来酰亚胺(0.5%)终止反应。按上述 AsA 含量分析方法测定总 AsA。DHA 含量=总 AsA 含量-还原型 AsA 含量。DHA 含量单位表示为 g/kg FW。

3) GSH 含量 使用 5,5-二硫代双-2-硝基苯甲酸法测定<sup>[11]</sup>,含量单位表示为 g/kg FW。

4) GSSG 含量 采用 Chotikakham 等<sup>[28]</sup>的方法测定,首先测定总谷胱甘肽(GSH + GSSG)含

量,其减去 GSH 含量即得到 GSSG 含量,单位表示为 g/kg FW。

1.3.9 氧化蛋白修复系统相关基因表达分析 使用 RNAPrep pure DP441 植物多糖多酚总 RNA 提取试剂盒提取荔枝果皮总 RNA,具体操作参照说明书。使用 AE301 cDNA 合成试剂盒,按其说明书描述进行反转录,合成第 1 链 cDNA。使用 FP205 SuperReal 荧光定量预混试剂盒进行实时定量 PCR 操作,并使用 Bio-Rad CFX96 实时定量 PCR 仪分析。实时定量 PCR 操作中使用 20  $\mu\text{L}$  体系:10  $\mu\text{L}$  SuperReal 预混液、2  $\mu\text{L}$  模板 DNA,上、下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$ 、6.8  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O),反应程序:1) 95  $^{\circ}\text{C}$  持续 10 s;2)55  $^{\circ}\text{C}$  持续 30 s;3)72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,40 次循环。各基因的相对表达量按照 2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup>  方法<sup>[29]</sup>计算。

*LcMsrA1* (KY475577.1)、*LcMsrA2* (KY475578.1)、*LcMsrB1* (KY475579.1)和 *LcMsrB2* (MH396620.1) 序列信息获取自美国国立生物信息中心(NCBI)。利用 Primer 6.0 软件设计实时定量 PCR 引物,所有引物委托上海铂尚生物技术有限公司合成。以 *LcACT1* 基因<sup>[30]</sup>作为内参基因,所有相关引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
<i>LcMsrA1</i>	AGCGGTGGGTGTAGTCA	CCTGATCTATATTGTGCACC
<i>LcMsrA2</i>	AGGCTTTATGCACAGTCCC	CCTTCTCTTGCTCAGGAGTATAG
<i>LcMsrB1</i>	GTTATCAAATCGGAGGAGG	GCACATGTGATCTCAGTTCTC
<i>LcMsrB2</i>	CAGAAGCCAGACAACACTCA	AGCATCACATCCAGCACA
<i>LcACT1</i>	GTGGTTCTACTATGTTCCCTG	CTCGTCTACTCATCCTTTG

1.3.10 数据统计分析 使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。采用独立样本 *t* 检验法分析处理组与对照差异组在相同时间点的显著差异 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源 MT 处理对冷藏荔枝果实冷害指数、果皮色泽的影响

荔枝果实在冷藏期间的冷害症状及冷害指数变化如图 1a 和 1b 所示,对照果实在第 10 天时开

始出现冷害症状,其冷害指数在 10~15 d 略微增长,随后快速升高,第 30 天时冷害指数达到  $0.71 \pm 0.02$ 。外源 MT 处理有效延缓了果实冷害的发生,其处理果实在冷藏 10~30 d 的冷害指数显著低于对照果实;第 30 天时,MT 处理果实冷害指数较对照果实低 49.4%。

如图 1c 所示,荔枝果皮色度  $a^*$  值在冷藏期间持续下降,其初始值为  $25.41 \pm 0.46$ ,冷藏 30 d 后,对照果实色度  $a^*$  降至  $10.74 \pm 0.44$ 。MT 处理果实在冷藏 10~30 d 的色度  $a^*$  值平均高于对照果实

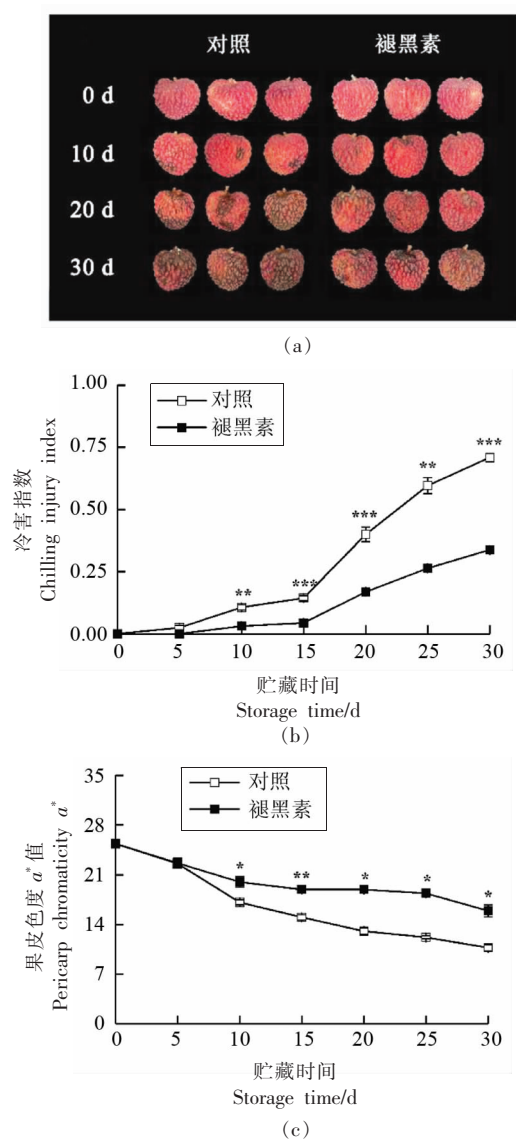


图1 MT处理对冷藏期间荔枝果实外观(a)、冷害指数(b)和色度 $a^*$ 值(c)的影响

Fig.1 Effect of MT treatment on appearance (a), chilling injury index (b) and chromaticity  $a^*$  (c) in litchi fruit during refrigeration

37.2%。上述结果表明 MT 处理可有效降低冷藏荔枝果实冷害发生并维持其外观品质。

## 2.2 MT 处理对荔枝果实膜透性、膜脂过氧化和 ROS 生成的影响

相对电导率和 MDA 含量分别是评价膜透性和膜脂过氧化程度的重要生理指标。由图 2a 和 2b 可知,荔枝果皮相对电导率和 MDA 含量在冷藏期间均呈总体升高趋势,对照组相对电导率和 MDA

含量在冷藏期间的增幅分别为 186.5%和 73.9%。MT 处理果实相对电导率和 MDA 含量增速较慢,二者值均在第 15~30 天期间显著低于对照果实,且在第 30 天较对照组分别降低 29.6%和 16.9%(图 2a 和 2b)。

如图 2c 所示,对照组果实  $O_2\cdot^-$ 生成率初始值为  $(0.84 \pm 0.01) \times 10^{-2} \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{s})$ ,冷藏至 25 d 时达到  $(1.33 \pm 0.04) \times 10^{-2} \mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{s})$ ,最后 5 d 中略有降低。MT 处理果实  $O_2\cdot^-$ 生成率增长缓慢,其在 5~25 d 期间显著低于对照果实(图 2c)。

荔枝果实  $H_2O_2$  含量在冷藏 0 d 时为  $(11.27 \pm 0.21)\text{mmol}/\text{kg}$ (图 2d)。对照果实  $H_2O_2$  含量在冷藏期间总体呈不断增加趋势,冷藏第 30 天时达到  $(14.94 \pm 0.19)\text{mmol}/\text{kg}$ (图 2d)。MT 处理组果实  $H_2O_2$  含量除冷藏 25 d 外,其余时间均显著低于对照果实(图 2d)。

上述结果表明 MT 处理可抑制冷藏期间荔枝果实 ROS 生成,从而减轻氧化胁迫并使膜完整性得到维持。

## 2.3 MT 处理对荔枝果实总酚、类黄酮和花色素苷的影响

荔枝果实冷藏期间总酚、类黄酮和花色素苷含量变化如图 3 所示。果实中总酚和类黄酮含量均在冷藏前 5 d 迅速升高,分别从  $(6.72 \pm 0.10)\text{g}/\text{kg}$  和  $(1.17 \pm 0.02)\text{g}/\text{kg}$  升至  $(8.35 \pm 0.09)\text{g}/\text{kg}$  和  $(1.27 \pm 0.01)\text{g}/\text{kg}$ ,随后持续下降(图 3a 和 3b)。MT 处理果实的总酚和类黄酮含量变化趋势与对照果实相似,然而,分别在第 5,10,20,30 天和第 5,10,15,20 天显著高于对照果实(图 3a 和 3b)。

对照果实花色素苷含量在整个冷藏过程中持续下降,从  $(0.33 \pm 0.01)\text{g}/\text{kg}$ (0 d)降至  $(0.18 \pm 0.01)\text{g}/\text{kg}$ (30 d),降幅达 45.2%(图 3c)。MT 处理延缓了果实花色素苷含量的下降,贮藏 15~30 d 其含量平均值显著高于对照 16.4%(图 3c)。

上述结果表明褪黑素处理可有效减缓冷藏荔枝果实酚类物质氧化和降解。

## 2.4 MT 处理对荔枝果实 PPO 和 POD 活性的影响

荔枝果实冷藏期间 PPO 和 POD 活性变化如图 4 所示,对照果实二者的酶活性变化均呈先上升后下降的趋势,分别于冷藏第 15 天和 20 天达

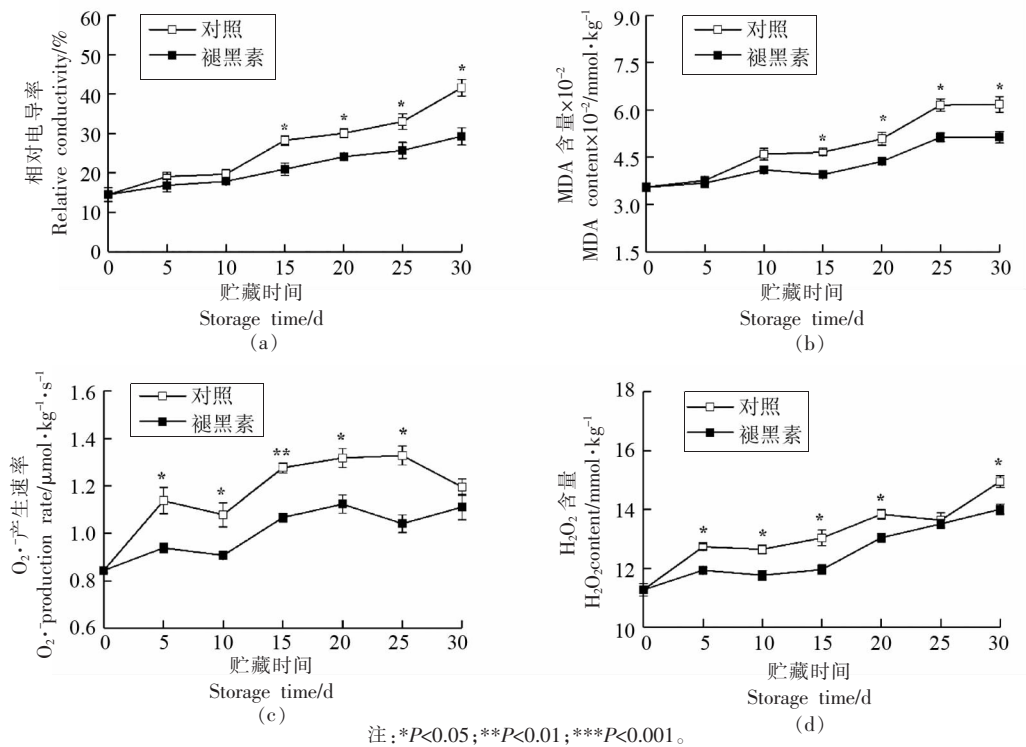


图 2 MT 处理对冷藏期间荔枝果实相对电导率(a)、MDA 含量(b)、O $_2$ · $^-$ 生成率(c)和 H $_2$ O $_2$  含量(d)的影响  
Fig.2 Effect of MT treatment on relative conductivity (a), MDA content (b), O $_2$ · $^-$  production rate (c) and H $_2$ O $_2$  content (d) in litchi fruit during refrigeration

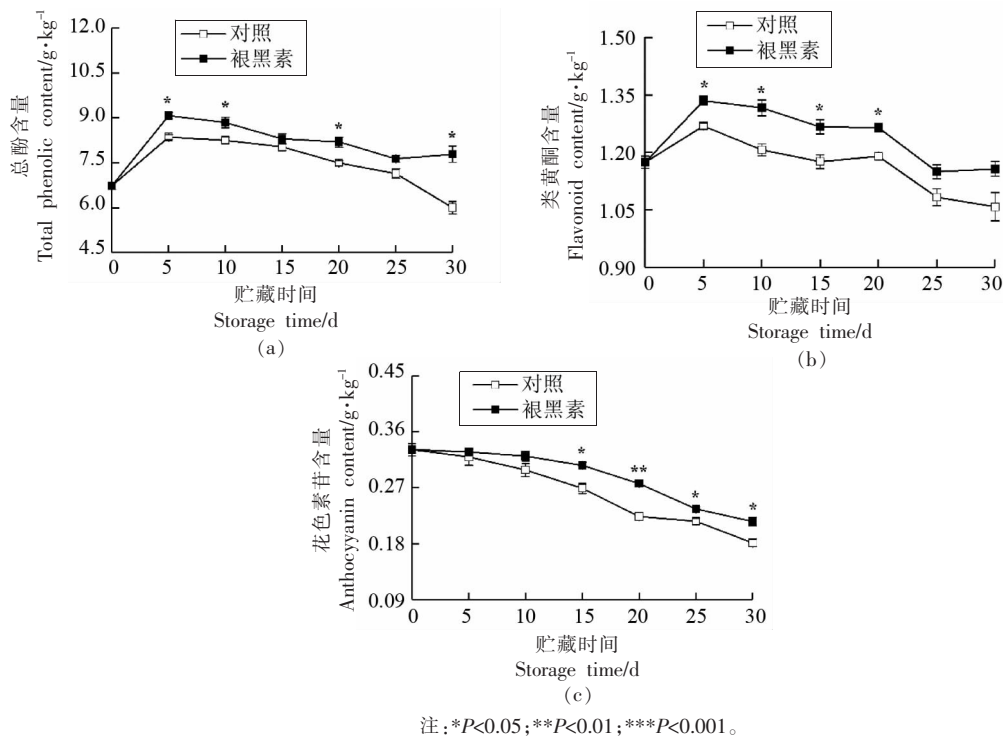


图 3 MT 处理对冷藏期间荔枝果实总酚(a)、类黄酮(b)和花色素苷(c)含量的影响  
Fig.3 Effect of MT treatment on contents of total phenolics (a), flavonoids (b) and anthocyanins (c) in litchi fruit during refrigeration

到峰值。MT处理果实的PPO与POD活性变化规律和对照类似,然而其在冷藏大部分时间显著低于对照(图4a和4b)。结果表明MT处理能够显著

抑制冷藏期间荔枝果实氧化酶活性,从而减轻果实酶促褐变。

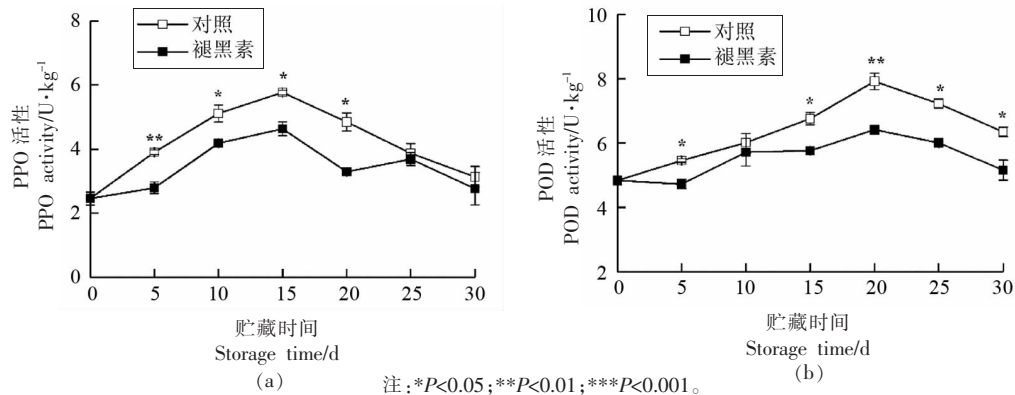


图4 MT处理对冷藏期间荔枝果实PPO(a)和POD(b)活性的影响

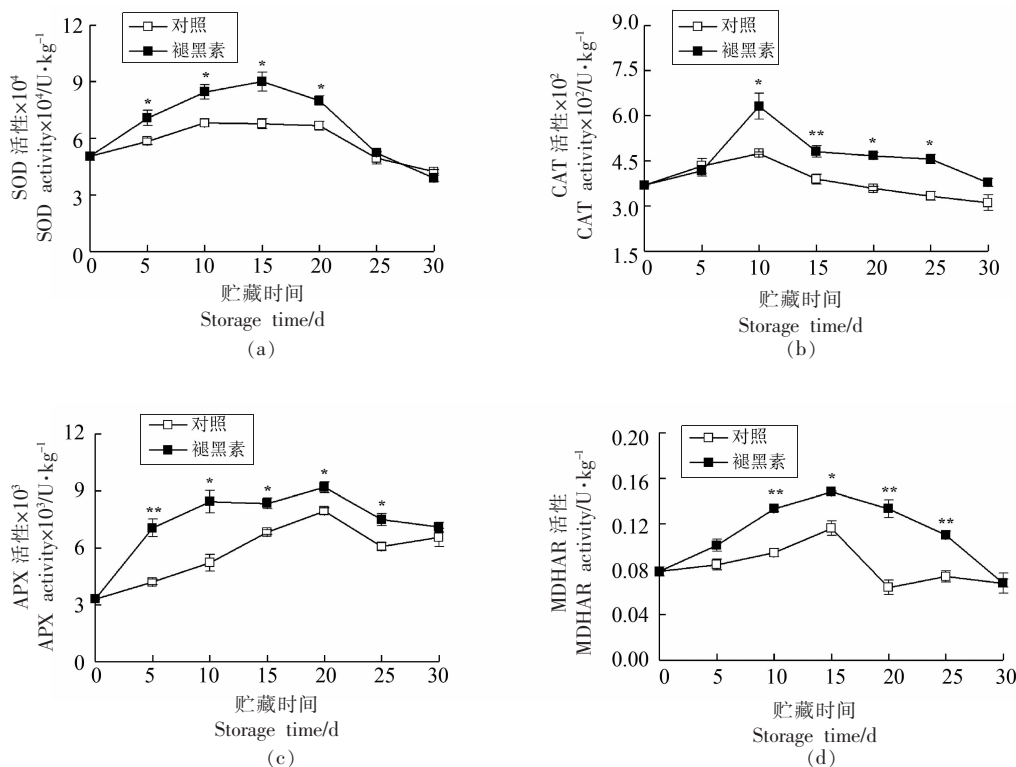
Fig.4 Effect of MT treatment on PPO (a) and POD (b) activities in litchi fruit during refrigeration

## 2.5 MT对荔枝果实抗氧化酶活性的影响

如图5a所示,对照果实SOD活性在冷藏的前10d中稳步上升,随后10d内保持不变,冷藏20~30d期间呈下降趋势。MT处理诱导果实SOD活性增加,其活性在冷藏5~20d期间显著高于对照(图5a)。

总体而言,对照和MT处理果实的CAT活性在整个冷藏期间均呈先上升后下降的趋势,且均在第10天达到最大值(图5b)。比较而言,MT处理果实的CAT活性在冷藏10~25d期间显著高于对照。

如图5c所示,对照组果实APX活性在冷藏



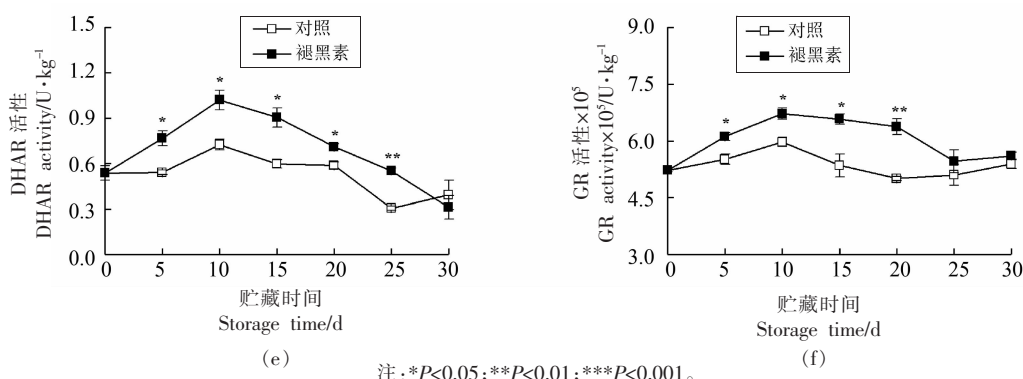


图 5 MT 处理对冷藏期间荔枝果实 SOD(a)、CAT(b)、APX(c)、MDHAR(d)、DHAR(e)和 GR(f)活性的影响

Fig.5 Effect of MT treatment on SOD (a), CAT (b), APX (c), MDHAR (d), DHAR (e) and GR (f) activities in litchi fruit during refrigeration

的前 20 d 呈线性升高趋势,随后有所降低。MT 处理使果实 APX 活性迅速提升,其活性在冷藏期间(除第 30 天外)显著高于对照果实(图 5c)。

对照果实 MDHAR、DHAR 和 GR 活性均在冷藏前期逐渐升高,MDHAR 活性在 15 d 时达到最大值,DHAR 和 GR 活性在 10 d 时达到最大值,随后逐渐下降(图 5d-5f)。MT 处理使果实 MDHAR、DHAR 和 GR 活性提高(图 5d-5f),三者活性值分别在 10~25、5~25 d 和 5~20 d 显著高于对照。

上述结果表明,MT 处理显著提高了冷藏期间荔枝果实抗氧化酶活性,从而提高了果实细胞 ROS 清除能力。

## 2.6 MT 对荔枝果实 AsA-GSH 循环代谢产物含量的影响

冷藏期间荔枝果实 AsA、DHA、GSH 和 GSSG 含量以及 AsA/DHA 和 GSH/GSSG 比值变化情况如图 6a-6f 所示。荔枝果实 AsA 含量在第 0 天时为(0.70 ± 0.001)g/kg,冷藏期间对照果实 AsA 含量先升高后降低,于第 15 天达到峰值(0.97 ± 0.02)g/kg(图 6a)。与对照果实相比,MT 处理显著提高了冷藏 10~30 d 果实 AsA 含量,此期间处理组含量的平均增幅达 18.2%(图 6a)。

对照组和 MT 处理组果实 DHA 含量在冷藏的前 10 d 中并无差异,随后 2 组果实 DHA 含量显示快速升高趋势,然而,后者变化滞后于前者(图 6b)。对照果实 DHA 含量在冷藏后期(20~30 d)无明显变化,而 MT 处理果实的 DHA 含量在冷藏最后 5 d 又明显下降(图 6b)。比较而言,MT 处

理果实的 DHA 含量在第 15、20 天和 30 天时显著低于对照果实,降幅分别为 39.5%、36.2%和 58.8%(图 6b)。

荔枝果实 GSH 在冷藏 0 d 时的含量为(0.072 ± 0.003)g/kg,对照果实 GSH 含量在冷藏的前 10 d 轻微提高,增至(0.085 ± 0.003)g/kg,随后呈线性下降趋势,第 30 天时降至(0.064 ± 0.003)g/kg(图 6c)。MT 处理果实的 GSH 含量在冷藏开始后稳步上升,在第 20 天时达到最大值(0.096 ± 0.004)g/kg,随后呈直线下滑,直至贮藏结束(图 6c)。相比之下,MT 处理果实 GSH 含量在冷藏 15~25 d 显著高于对照果实,此期间处理组较对照组的平均增幅达 33.1%(图 6c)。

荔枝果实在冷藏初始时的 GSSG 含量为(0.079 ± 0.002)g/kg,对照果实 GSSG 含量在冷藏前期略微降低,第 10 天时降至(0.071 ± 0.008)g/kg,随后稳步升高,并在第 25 天到最大值(0.103 ± 0.011)g/kg,最后 5 d 略有回落(图 6d)。MT 处理抑制了果实 GSSG 积累,其处理果实在第 15、20 天和 25 天的 GSSG 含量分别显著低于对照 39.8%、46.9%和 43.7%(图 6d)。

荔枝果实的 AsA/DHA 和 GSH/GSSG 初始比值分别为 2.66 ± 0.26 和 0.91 ± 0.02,对照果实二者的比值均在冷藏第 10 天达到最大值,分别为 3.62 ± 0.12 和 1.27 ± 0.17,随后逐渐降低(图 6e 和 6f)。相较于对照组,MT 处理极大地提升了果实 AsA/DHA 和 GSH/GSSG 比值,其处理果实的二者比值分别第 10、15、20、30 天和第 15~25 天显著



高于对照,整个冷藏期间较对照组分别平均提高80.4%和64.6%(图6e和6f)。

上述结果表明,褪黑素处理可促进 AsA-GSH

循环中还原性产物的积累,维持果实细胞的氧化-还原平衡。

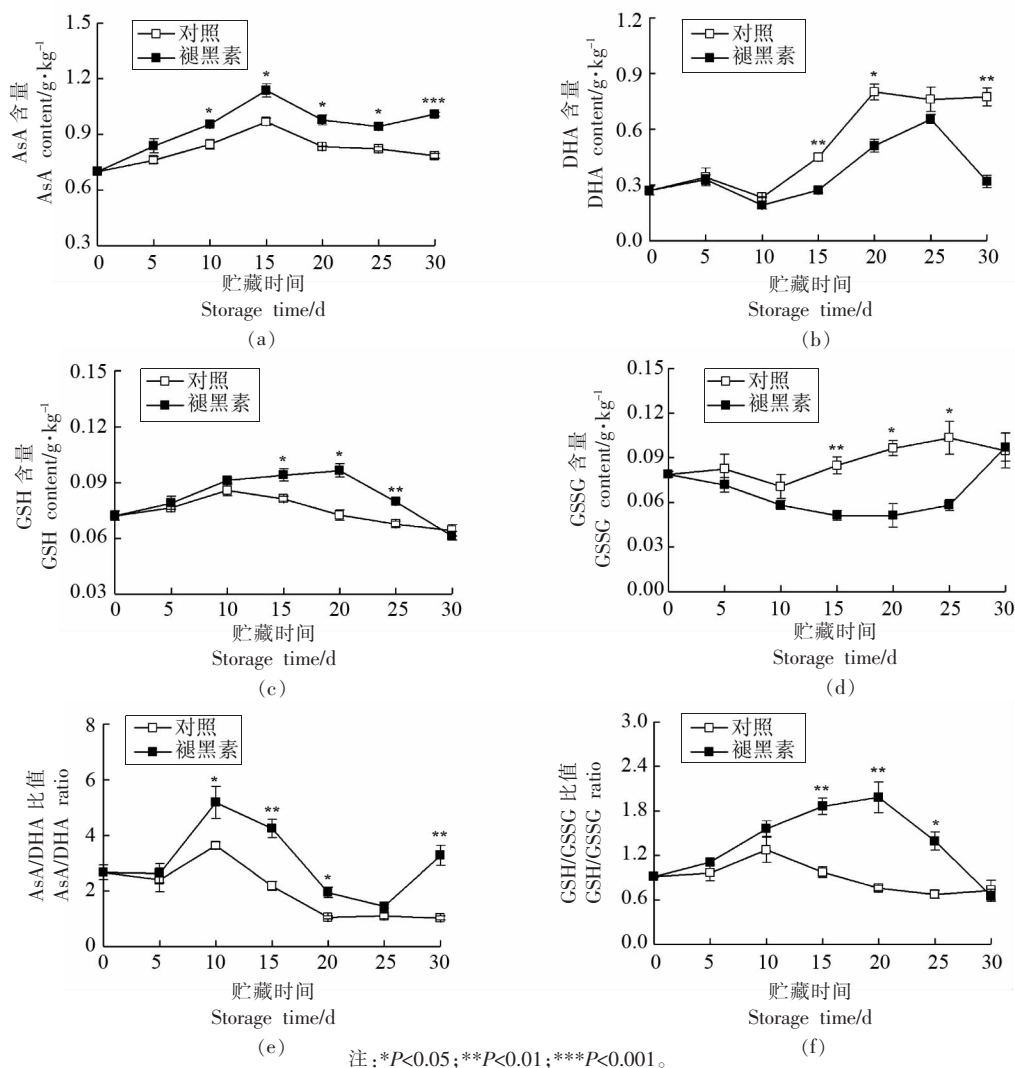


图6 MT处理对冷藏期间荔枝果实AsA(a)、DHA(b)、GSH(c)、GSSG(d)含量和AsA/DHA(e)、GSH/GSSG(f)比值的影响

Fig.6 Effect of MT treatment on AsA (a), DHA (b), GSH (c), GSSG (d) contents and AsA/DHA (e),

GSH/GSSG (f) ratio litchi fruit during refrigeration

## 2.7 MT处理对荔枝果实*LcMsr*表达的影响

对照荔枝果实*LcMsrA1*表达量在冷藏初期迅速升高,第10天达到高峰,峰值是0d的2.7倍,随后持续降低(图7a)。与对照果实相比,MT处理诱导了果实*LcMsrA1*表达量上调,其在第5,10,15,25天时显著高于对照,其中在第10天时较对照高85.3%(图7a)。

对照组果实*LcMsrA2*表达量在冷藏开始后升高,5d后增到初始表达量的1.99倍,随后的10d

保持不变,15d后有所下降(图7b)。除冷藏第15天,MT处理果实*LcMsrA2*表达量均显著高于对照,其中在冷藏第5天和第10天较为典型,分别是对照的2.47倍和1.88倍(图7b)。

对照果实*LcMsrB1*表达量在冷藏的前5d迅速增加并达到最大值,之后持续下降,直至冷藏结束(图7c)。MT处理显著促进了果实*LcMsrB1*转录,其表达量在冷藏10~25d显著高于对照组(图7c)。

冷藏过程中荔枝果实 *LcMsrB2* 表达量呈先升高后降低的变化趋势, 对照组和 MT 处理组果实分别在第 15 天和第 20 天达到最大值(图 7d)。相比较, MT 处理果实的 *LcMsrB2* 表达水平在第 5,

10, 15 天和第 20 天显著高于对照。

上述结果表明, MT 处理可通过显著上调冷藏期间荔枝果实 *Msr* 基因表达而使蛋白质氧化损伤修复能力提高。

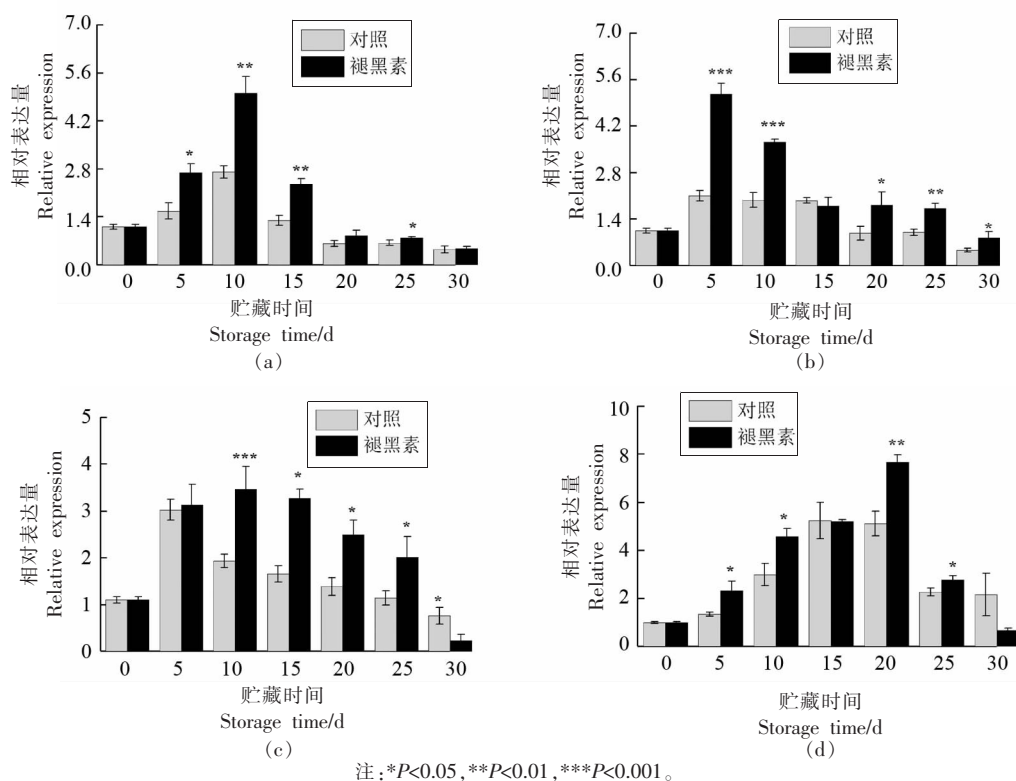


图 7 MT 处理对冷藏期间荔枝果实 *LcMsrA1* (a)、*LcMsrA2* (b)、*LcMsrB1* (c) 和 *LcMsrB2* (d) 表达的影响  
Fig.7 Effect of MT treatment on *LcMsrA1* (a), *LcMsrA2* (b), *LcMsrB1* (c) and *LcMsrB2* (d) expressions in litchi fruit during refrigeration

### 3 讨论

作者先前的研究表明, 外源 MT 处理可以调节“白糖罂”荔枝果实从低温贮藏转入货架期的能量代谢和脯氨酸代谢, 提高其能荷水平和脯氨酸含量, 以及维持细胞膜的功能与完整性, 从而减轻果实冷藏出库后的冷害症状<sup>[2]</sup>。本研究发现, 0.5 mmol/L MT 浸泡处理可显著降低冷藏期间“紫娘喜”荔枝果实冷害指数并减缓果皮失色, 表明 MT 能够诱导荔枝果实耐冷性提高并维持荔枝果实的冷藏品质, 这与在“妃子笑”荔枝<sup>[31]</sup>果实上获得的结果一致。

细胞膜是分隔细胞内部与外界环境的屏障, 也是细胞响应外界环境胁迫的关键部位<sup>[32]</sup>。低温胁迫可引发 ROS 过量积累, 继而攻击细胞膜并引

发膜脂过氧化, 使膜透性增大及膜完整性被破坏, 最终引发果实冷害<sup>[32-33]</sup>。膜相对电导率、MDA 积累水平和 ROS 生成量等是衡量膜完整性和氧化破坏程度的重要生理、生化指标<sup>[32]</sup>。本研究中, MT 处理可显著抑制冷藏荔枝果实 ROS 生成量、MDA 积累量和膜相对电导率升高, 表明 MT 可缓解冷藏荔枝果实氧化胁迫并维持膜完整性, 从而减轻果实冷害, 这与 Jannatizadeh<sup>[34]</sup>对石榴果实的研究结果一致。

植物细胞膜系统损伤可引起细胞区室化结构丧失, 促使酚类物质与 PPO 和 POD 接触, 进而引发酶促褐变反应<sup>[3]</sup>。Sun 等<sup>[35]</sup>对荔枝果皮 PPO 酶促动力学的研究表明, PPO 可催化酚单体(表儿茶素和原花青素 A2)生成邻醌, 其进一步缩合成棕色

不溶性物质,从而导致果皮褐变。此外,花色素苷也是一类酚类化合物,是使荔枝果皮呈现红色的主要物质,可被花色素苷酶催化降解,导致荔枝果皮红色损失,且其降解产物可作为 POD 的催化底物而引起果皮褐变<sup>[3]</sup>。本研究中,荔枝果实总酚和类黄酮含量在冷藏初期呈上升趋势,表明低温胁迫诱导酚类物质合成,其可能作为抗氧化物质参与果实抗冷响应。随着冷藏时间的不断延长,果实遭受氧化胁迫的程度加剧,导致总酚、类黄酮及花色素苷发生氧化反应而使其含量降低。MT 处理增加了果实在冷藏初期的总酚和类黄酮含量,表明 MT 可激活酚物质合成途径,增强果实抗冷能力。该结论与 MT 应用在桃果实上的结果相一致<sup>[10]</sup>。进一步研究发现,MT 处理延缓了冷藏中、后期荔枝果实总酚、类黄酮与花色素苷含量下降,并抑制了 PPO 和 POD 活性,表明 MT 可维持细胞区室化功能,从而减轻冷藏荔枝果实酶促褐变,这与作者先前使用 MT 控制“紫娘喜”荔枝果实常温褐变所得结论相似<sup>[36]</sup>。

植物抗氧化系统在维持细胞氧化-还原稳态中发挥着重要作用<sup>[32,37]</sup>。SOD、CAT、APX、MDHAR、DHAR 和 GR 是植物抗氧化系统中重要的抗氧化酶,直接或间接催化清除细胞内 ROS 并参与调节低温胁迫响应<sup>[38]</sup>。这些抗氧化酶中,SOD 可以催化  $O_2\cdot^-$  发生歧化反应,生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,而  $H_2O_2$  进一步在 CAT 催化下分解成  $H_2O$  和  $O_2$ <sup>[33,38-39]</sup>。APX、MDHAR、DHAR 和 GR 是植物 AsA-GSH 循环中的关键酶,可确保细胞内  $H_2O_2$  被有效清除<sup>[38]</sup>。AsA 和 GSH 均具有较强的还原性,是构成植物非酶抗氧化系统的重要物质,提高 AsA 和 GSH 含量水平对于增强植物抗冷性有着重要意义<sup>[40-41]</sup>。

外源 MT 已被证实可以通过激活抗氧化系统及抑制 ROS 生成来提高小麦、番茄等作物的抗冷性<sup>[42-43]</sup>。本研究中,外源 MT 处理诱导了荔枝果皮抗氧化酶 (SOD、CAT、APX、MDHAR、DHAR 和 GR) 和非酶抗氧化物 (AsA 和 GSH) 水平的提升,能够有效猝灭过量生成的 ROS,进而延缓荔枝果实低温贮藏期间冷害的发生。值得注意的是,上述抗氧化酶在荔枝冷藏中、后期呈降低趋势,这意味着果实受冷胁迫影响而使细胞逐渐丧失蛋白质合成功能,而此过程可被 MT 处理所延缓。

在生物体中,含巯基的氨基酸(如甲硫氨酸和半胱氨酸)极易被 ROS 氧化修饰,导致蛋白质损伤<sup>[44]</sup>。甲硫氨酸氧化后形成甲硫氨酸亚砜 (Methionine sulfoxide, MetO),其以 S 型和 R 型 2 种非对映异构体 (S-MetO 和 R-MetO) 形式存在<sup>[30]</sup>。然而,S-MetO 和 R-MetO 可分别被甲硫氨酸亚砜还原酶 (Methionine sulfoxide reductase, Msr) A 和 B (MsrA 和 MsrB) 催化还原<sup>[30]</sup>。在植物中,Msr 系统可以通过氧化蛋白修复机制参与细胞对氧化胁迫的应答<sup>[45]</sup>。有研究表明,编码 *MsrA* 和 *MsrB* 的基因在调控采后荔枝和龙眼果实的抗冷性和抗衰老方面具有积极作用<sup>[30,36,45]</sup>。本研究中,对照荔枝果实 *LcMsrA1*、*LcMsrA2*、*LcMsrB1* 和 *LcMsrB2* 在冷藏前期和中期的表达水平呈上调趋势,这可能与低温胁迫下 ROS 及少量蛋白氧化产物的诱导有关。随着冷藏时间的延长,ROS 过量积累引发的蛋白质氧化损伤与自身修复能力发生失衡,导致这些基因表达量下调,从而使果实冷害加剧。外源 MT 显著上调了冷藏荔枝果实 *LcMsrA1*、*LcMsrA2*、*LcMsrB1* 和 *LcMsrB2* 表达,表明 MT 可通过调节氧化蛋白修复系统来减轻蛋白质氧化损伤,进而降低了果实冷害发生。

## 4 结论

MT 浸泡处理有效减轻了“紫娘喜”荔枝果实在低温贮藏期间的冷害。相关机制研究表明,MT 能够抑制冷藏荔枝果实 ROS 生成,减轻膜脂过氧化,从而维持细胞膜完整性并使酶促褐变反应减弱。此外,MT 处理可提高冷藏荔枝果实的抗氧化活性及蛋白质氧化损伤修复能力,导致 ROS 生成水平及蛋白质氧化损伤程度减轻。由于 MT 属天然有机化合物,具有安全、环保的优点,因此其在荔枝冷藏保鲜中具有良好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] ZHAO L, WANG K, WANG K, et al. Nutrient components, health benefits, and safety of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 2139-2163.
- [2] LIU G S, ZHANG Y X, YUN Z, et al. Melatonin

- enhances cold tolerance by regulating energy and proline metabolism in litchi fruit[J]. *Foods*, 2020, 9(4): 454.
- [3] ZHANG Z K, HUBER D J, QU H X, et al. Enzymatic browning and antioxidant activities in harvested litchi fruit as influenced by apple polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2015, 171: 191-199.
- [4] XIAO L, LI T T, JIANG G X, et al. Effects of dry fog humidification on pericarp browning and quality of litchi fruit stored at low temperature[J]. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2019, 12(4): 192-196.
- [5] SIDDIQUI M W, DESHI V, HOMA F, et al. Inhibitory effects of hydrogen sulfide on oxidative damage and pericarp browning in harvested litchi[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2021, 40(6): 2560-2569.
- [6] ALI S, KHAN A S, MALIK A U, et al. Postharvest application of antibrowning chemicals modulates oxidative stress and delays pericarp browning of controlled atmosphere stored litchi fruit[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(3): e12746.
- [7] LERNER A B, CASE J D, TAKAHASHI Y, et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(10): 2587-2587.
- [8] 巩彪, 史庆华. 园艺作物褪黑素的研究进展[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(12): 2326-2337.
- GONG B, SHI Q H. Review of melatonin in horticultural crops[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(12): 2326-2337.
- [9] GOMES DOMINGOS A L, HERMSDORFF H H M, BRESSAN J. Melatonin intake and potential chronobiological effects on human health[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(1): 133-140.
- [10] GAO H, ZHANG Z K, CHAI H K, et al. Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 118: 103-110.
- [11] HU W, YANG H, TIE W, et al. Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(46): 9987-9994.
- [12] 胡苗, 李佳颖, 饶景萍. 褪黑素处理对采后猕猴桃果实后熟衰老的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(19): 226-232.
- HU M, LI J Y, RAO J P. Effect of melatonin on ripening and senescence of postharvest kiwifruits[J]. *Food Science*, 2018, 39(19): 226-232.
- [13] LIU J, YANG J, ZHANG H, 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(8): 2279-2288.
- [14] CAO S, BIAN K, SHI L, et al. Role of melatonin in cell-wall disassembly and chilling tolerance in cold-stored peach fruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(22): 5663-5670.
- [15] CAO S, SONG C, SHAO J, et al. Exogenous melatonin treatment increases chilling tolerance and induces defense response in harvested peach fruit during cold storage[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(25): 5215-5222.
- [16] GAO H, LU Z M, YANG Y, et al. Melatonin treatment reduces chilling injury in peach fruit through its regulation of membrane fatty acid contents and phenolic metabolism[J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 659-666.
- [17] SU Z H, HU M J, GAO Z Y, et al. Apple polyphenols delay senescence and maintain edible quality in litchi fruit during storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 157: 110976.
- [18] JIA Z S, TANG M C, WU J M. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals[J]. *Food Chemistry*, 1999, 64(4): 555-559.
- [19] ZHANG Z Q, PANG X Q, JI Z L, et al. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning[J]. *Food Chemistry*, 2001, 75(2): 217-221.
- [20] KUMAR V B A, MOHAN T C K, MURUGAN K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.)[J]. *Food Chemistry*, 2008, 110(2): 328-333.
- [21] ZHANG Z Q, PANG X Q, DUAN X W, et al. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp[J]. *Food Chemistry*, 2005, 90(1/2): 47-52.
- [22] TOIVONEN P M A, SWEENEY M. Differences in chlorophyll loss at 13 °C for two broccoli (*Brassica*

- oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities[J]. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 1998, 46(1): 20–24.
- [23] CHANCE B, MAEHLY A C. Assay of catalases and peroxidases[J]. *Method in Enzymology*, 1955, 2: 764–765.
- [24] LIU J, LI F J, LIANG L, et al. Fibroin delays chilling injury of postharvest banana fruit via enhanced antioxidant capability during cold storage[J]. *Metabolites*, 2019, 9(7): 152.
- [25] SMITH I K, VIERHELLER T L, THORNE C A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)[J]. *Analytical Biochemistry*, 1988, 175(2): 408–413.
- [26] ZHANG W L, ZHAO H D, JIANG H T, et al. Multiple 1-MCP treatment more effectively alleviated postharvest nectarine chilling injury than conventional one-time 1-MCP treatment by regulating ROS and energy metabolism[J]. *Food Chemistry*, 2020, 330: 127256.
- [27] CHUMYAM A, SHANK L, FAIYUE B, et al. Effects of chlorine dioxide fumigation on redox balancing potential of antioxidative ascorbate-glutathione cycle in 'Daw' longan fruit during storage[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 222:76–83.
- [28] CHOTIKAKHAM S, FAIYUE B, UTHAIBUTRA J, et al. Exogenous methyl salicylate alleviates senescent spotting by enhancing the activity of antioxidative ascorbate-glutathione cycle in harvested 'Sucrier' bananas [J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 267: 109324.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [30] JIANG G X, XIAO L, YAN H L, et al. Redox regulation of methionine in calmodulin affects the activity levels of senescence-related transcription factors in litchi[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2017, 1861(5): 1140–1151.
- [31] 乔沛, 殷菲彤, 王雨萱, 等. 外源褪黑素处理对采后荔枝褐变及活性氧代谢的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(6): 282–287.
- QIAO P, YIN F L, WANG Y X, et al. Effects of exogenous melatonin on browning and active oxygen metabolism of postharvest litchi [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(6): 282–287.
- [32] SEVILLANO L, SANCHEZ - BALLESTA M T, ROMOJARO F, et al. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(4): 555–573.
- [33] 谷会, 弓德强, 朱世江, 等. 冷激处理对辣椒冷害及抗氧化防御体系的影响[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(12): 2523–2530.
- GU H, GONG D Q, ZHU S J, et al. Effects of cold shock treatments on chilling injury and antioxidative defense system of pepper[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(12): 2523–2530.
- [34] JANNATIZADEH A. Exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in pomegranate fruit during cold storage[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 246: 544–549.
- [35] SUN J, JIANG Y M, SHI J, et al. Antioxidant activities and contents of polyphenol oxidase substrates from pericarp tissues of litchi fruit[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(2): 753–757.
- [36] ZHANG Y Y, HUBER D J, HU M J, et al. Delay of postharvest browning in litchi fruit by melatonin via the enhancing of antioxidative processes and oxidation repair[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(28): 7475–7484.
- [37] KAPOOR D, SINGH S, KUMAR V, et al. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)[J]. *Plant Gene*, 2019, 19: 100182.
- [38] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12):909–930.
- [39] 张婷婷, 姚文思, 朱惠文, 等. 冷激处理减轻茄子冷害与活性氧代谢的关系[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 205–211.
- ZHANG T T, YAO W S, ZHU H W, et al. Effect of cold shock treatment on reducing chilling injury in eggplant and its relationship with reactive oxygen species metabolism[J]. *Food Science*, 2018, 39(23): 205–211.
- [40] MARTA B, SZAFRAŃSKA K, POSMYK M M. Exogenous melatonin improves antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) germinated

- under chilling stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 575.
- [41] WANG B, ZHU S J. Pre-storage cold acclimation maintained quality of cold-stored cucumber through differentially and orderly activating ROS scavengers [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 129: 1-8.
- [42] TURK H, ERDAL S, GENISEL M, et al. The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings[J]. *Plant Growth Regulation*, 2014, 74(2): 139-152.
- [43] DING F, LIU B, ZHANG S X. Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 219: 264-271.
- [44] UGARTE N, PETROPOULOS I, FRIGUET B. Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 13(4): 539-549.
- [45] LI T T, WU Q X, ZHOU Y J, et al. L-Cysteine hydrochloride delays senescence of harvested longan fruit in relation to modification of redox status[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 143: 35-42.

### Effect of Melatonin on Chilling Injury and Physiological Changes in Litchi Fruit during Cold Storage

Liu Jialiang<sup>1,2,3</sup>, Zhang Yue<sup>1</sup>, Liu Lixia<sup>1</sup>, Chen Yimeng<sup>1</sup>, Meng Lanhuan<sup>1,2</sup>,  
Hu Meijiao<sup>3</sup>, Jiang Yueming<sup>4</sup>, Zhang Zhengke<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228

<sup>2</sup>Key Laboratory of Food Nutrition and Functional Food of Hainan Province, Haikou 570228

<sup>3</sup>Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101

<sup>4</sup>South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650

**Abstract** Postharvest ‘Ziniangxi’ litchi fruit were used as experimental materials and dipped in 0.5 mmol/L melatonin (MT) solution for 10 min. After drying, the fruit was refrigerated at  $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$  and  $(85 \pm 5)\%$  relative humidity for 30 d. During refrigeration, the effects of MT treatment on the chilling injury (CI) and its related physiological metabolism in litchi were investigated. The results showed that MT treatment reduced the chilling injury index and delayed the decrease in the chromaticity  $a^*$  value in cold-stored litchi fruit. The CI index in MT-treated fruit was 49.4% lower than that in control fruit at 30 d, while chromaticity  $a^*$  value in MT-treated fruit was 37.2 % on average higher than that in control fruit from 10 to 30 d of refrigeration. MT treatment significantly inhibited the increases in membrane relative conductivity while suppressing the accumulations of malondialdehyde (MDA), superoxide anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), as shown by the decreases of 29.6%, 16.9%, 6.9% and 6.3% in relative conductivity, MDA content,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  production rate and  $\text{H}_2\text{O}_2$  content in MT-treated fruit at 30 d, respectively, thus contributing to mitigation of oxidative stress and maintenance of membrane integrity. MT reduced the activities of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) as well as inhibited the decreases in total phenolics, flavonoids and anthocyanins contents in cold-stored litchi fruit, thereby ameliorating enzymatic browning. MT treatment significantly enhanced the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR), and maintained higher levels of ascorbic acid (AsA) and reduced glutathione (GSH) contents and the higher ratios of AsA/dehydroascorbic acid (DHA) and GSH/oxidized glutathione (GSSG) when compared to control fruit, which could lead to increases in antioxidant activity in litchi fruit during cold storage. In addition, MT treatment up-regulated the expression abundance of *LcMsrA1*, *LcMsrA2*, *LcMsrB1* and *LcMsrB2* during cold storage, thereby promoting the improvement in repair capacity of oxidized protein. The results indicate that exogenous MT treatment could alleviate the CI occurrence in cold-stored litchi fruit by modulating the chilling tolerance-related physiological metabolisms.

**Keywords** litchi; melatonin; chilling injury; antioxidant system; ascorbic acid-glutathione cycle