

正丁醇对冷藏哈密瓜果实脯氨酸代谢的调控

刘彩红, 王雪, 王静*, 王新宇, 李慧, 毕莹

(新疆农业大学食品科学与药学院 乌鲁木齐 830052)

摘要 为探究正丁醇处理对冷藏哈密瓜中脯氨酸代谢的影响,以“西州密 25 号”哈密瓜为试材,分别选用体积分数为 1.0% 和 0% 的正丁醇溶液浸泡哈密瓜 30 min 作为处理组和对照组,于(3±0.5)℃机械冷库中贮藏,观察期为 42 d,每 7 d 取样 1 次,观察记录哈密瓜从低温到常温下的冷害症状并统计冷害指数,测定脯氨酸代谢相关指标。结果表明:与对照组相比,正丁醇处理能够显著抑制哈密瓜第 35 天和第 42 天冷害指数的上升($P<0.05$),对降低贮藏后期冷害症状具有一定的作用,可显著提高脯氨酸含量(除第 7 天)和 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)活性(除第 21 天外)及其相对应的基因表达量,提高贮藏 35~42 d 的鸟氨酸转氨酶(OAT)活性($P<0.01$),显著降低脯氨酸脱氢酶(ProDH)活性(除第 14 天外)以及贮藏 28 d 和 42 d 的基因相对表达量($P<0.01$),说明正丁醇通过显著提高脯氨酸合成关键酶 P5CS、OAT 的活性和对应基因的相对表达量,降低 ProDH 活性和其基因表达量,维持较高的脯氨酸含量,进而降低哈密瓜冷害指数,减轻哈密瓜冷害症状,提高哈密瓜细胞的低温耐受性,维持较佳的果实品质。

关键词 正丁醇; 哈密瓜; 低温冷害; 脯氨酸代谢

文章编号 1009-7848(2023)05-0281-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.028

新疆哈密瓜,属葫芦科(Cucur-bitaceae)黄瓜属(*Cucumis*)的厚皮甜瓜(*Cucumis melo* var. *reticulatus*),为新疆的主要特产之一,有效促进了新疆地区的经济发展^[1]。新疆哈密瓜风味独特,味甘如蜜,肉厚细质,使其畅销全国各地,赢得广大消费者青睐,有“瓜中之王”的美誉^[2]。哈密瓜属于典型的呼吸跃变型果实,采后极易衰老软化,严重降低了果实商品价值。低温贮藏可以明显减缓果实衰老进程,然而,哈密瓜对低温敏感,低温贮藏易造成果实冷害的发生。冷害症状往往由表皮组织被破坏而导致下陷,随着冷害时间的延长,呈现不规则的下陷斑,且一般冷害症状会在移至常温后表现出来。哈密瓜果实采后易发生冷害已严重影响了产业的发展^[3-4]。亟需探索出适合调控哈密瓜果实采后冷害的技术,以促进当地经济的发展。

研究者使用不同方式处理采后哈密瓜果实。李学文^[4]发现使用 10 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯(MeJA)处理“8601”哈密瓜,可以提高冷藏哈密瓜果实过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性及后

期脯氨酸含量,延缓膜渗透率,从而降低果实冷害指数。张婷^[5]使用 60 $\mu\text{L/L}$ NO 处理“新密 3 号”哈密瓜果实,结果发现 NO 处理可显著提高冷藏哈密瓜果实中游离脯氨酸,可溶性蛋白、可溶性糖等渗透物质含量,显著诱导 *CmCBF₁* 及 *CmCBF₃* 基因的表达,进而减缓果实冷害症状,降低冷害指数。王静^[6]发现,草酸处理可诱导 P5CS 酶活性上升,提高 P5CS 酶基因表达量和后期脯氨酸含量上升,且草酸处理减轻采后哈密瓜果实冷害的作用与提高其脯氨酸含量呈正相关。另有研究发现,磷脂酶 D (PLD) 特异性抑制剂通过抑制磷脂酸和磷脂降解的速度,较好地保持了果实细胞膜结构的完整性,增强了果实细胞的抗逆性能,保持了果实的采后品质^[1]。PLD 抑制剂目前已应用于桑葚^[7]、草莓^[8]、蟠桃^[9]、龙眼^[10]等果实的采后保鲜中。研究表明正丁醇信号分子是磷脂酸依赖 PLD 产生的特异性抑制剂,可作为转磷脂酰化反应的底物来保护膜的完整性,从而降低果蔬受损程度^[11-12]。也有研究报告,正丁醇处理可有效降低荔枝果实 PLD 活性,减少膜脂过氧化与降解,并保持膜的功能和完整性^[13]。正丁醇处理可有效降低南果梨果心组织的脂氧合酶(LOX)、PLD 活性和其基因表达量,脂质过氧化对膜结构的破坏也相应减轻,果实品质得

收稿日期: 2022-05-24

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31760478)

第一作者: 刘彩红,女,硕士

通信作者: 王静 E-mai:wxj770903@163.com

眼果实在常温贮藏过程中的果皮褐变、果肉自溶和可溶性固形物的下降,有助于龙眼果实采后品质的维持。此外,正丁醇处理可通过提高抗氧化酶活性,增加抗坏血酸-谷胱甘肽循环(ASA-GSH)循环底物的含量,降低活性氧自由基积累,显著降低冷藏后期再放置常温2d的果实冷害指数,减轻哈密瓜采后冷害症状,维持较好的果实品质^[1,12]。

脯氨酸为渗透调节物质,以主动调节的方式应对各种环境胁迫。有研究报道,果蔬在采后的低温贮藏中通过脯氨酸的积累来缓解果实冷害的发生及提高其抗冷性^[16]。姚明华等^[17]使用低温诱导茄果实,结果茄子冷害加重,脯氨酸含量提高。Cao等^[18]使用茉莉酸甲酯和 γ -氨基丁酸处理桃和枇杷果实,结果脯氨酸相关酶活力升高,导致脯氨酸积累,从而有利于桃和枇杷果实的抗冷性能。王静^[6]使用草酸处理采后冷藏的哈密瓜果实,结果发现随着低温时间的延长,脯氨酸含量相对增加,此现象在黄瓜^[16]、桃^[19]、香蕉^[20]、芒果^[21]等果蔬中也有发现。然而,有关正丁醇处理调控哈密瓜采后脯氨酸代谢降低冷害的研究尚未见报道。本文通过正丁醇调控采后哈密瓜中的脯氨酸代谢,以减轻冷害,为哈密瓜贮运保鲜奠定参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

“西州密25号”哈密瓜,采自乌鲁木齐市周边五家渠市103团商品瓜基地。采摘后的哈密瓜使用网状泡沫将每个瓜进行独立包装,预冷后采用专用包装纸箱,以每箱4个为标准装箱,选择大小均一、无病虫害,健康的果实为试验原料。

磺基水杨酸、茚三酮、甲苯,天津市大茂化学试剂厂;正丁醇,无锡市亚盛化工有限公司;冰乙酸,天津市鑫铂特化工有限公司;磷酸二氢钾,天津市科密欧化学试剂有限公司;磷酸氢二钾,天津市光复发展有限公司;丙三醇、NaOH,国药集团化学试剂有限公司;聚乙烯吡咯烷酮,上海伊卡生物技术有限公司;EDTA,天津市福晨化学试剂厂;天津市北联精细化学品开发有限公司;酮戊二酸,上海展云化工有限公司;鸟氨酸,SIGMA公司;NADH、NAD,BioFRoxx公司;DTT,Solarbio公司;

氯化钾,天津市凯通化学试剂有限公司;氯化镁,方信生物科技有限公司;盐酸,珠海市华成达化工有限公司;无水碳酸钠,天津市永大化学试剂有限公司;碳酸氢钠,天津华盛天和化工有限公司;以上所有试剂等均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

QL-861旋涡震荡器,江苏省海门市麒麟医用仪器厂;玻璃仪器气流烘干器,河南省予华仪器有限公司;LE204E电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)仪器有限公司;SF-GL-16A高速冷冻离心机,上海菲恰尔分析仪器有限公司;P4PC型紫外-可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;DZKW-S-4型电热恒温水浴锅,河南沃林仪器设备有限公司;XW-80A高速分散器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;SW-CJ-2D洁净工作台,苏州净化设备有限公司;EDC-810型普通PCR仪,北京东胜创新生物科技有限公司;Haier医用低温保存箱,青岛海尔特种电器有限公司;Mini Pro 300V Power Supply电泳仪,USAmajor science公司;MA-6000实时荧光定量仪,苏州雅睿生物技术有限公司;Labnet Sub System 70电泳槽,美国Labnet Inc公司。

1.3 试验方法

1.3.1 原料处理 将经过严格挑选的哈密瓜试验原料分成两组,采用体积分数为0%和1.0%的正丁醇(前期试验筛得^[1])溶液分别浸泡哈密瓜果实30min,充分晾干后置入(3±0.5)℃的机械冷库进行低温贮藏(依据刘同业等^[22]研究结果),平均每7d取样1次,共计取7次,低温冷库取样时在果实的赤道区域削取约2cm厚度的瓜皮组织,混匀后立即用液氮冷冻并在-40℃冰箱中保存备用。冷害症状观察和冷害指数统计的低温冷藏果实每7d取样,放置常温连续观察7d,取观察第2天的数据,每个指标3个重复。

1.3.2 指标测定

1.3.2.1 冷害指数的测定 2个处理的果实,每隔6d从低温冷藏库中随机分别取9个果实,共计3个重复。转移至室温(25℃)下连续观察,取观察统计2d的结果。冷害指数参照Bi等^[23]的测定方法,冷害症状按照果实受冷害严重程度分为5级:没有发生冷害症状为0级;冷害斑点约占哈密瓜表

面积 10% 为 1 级;冷害斑占哈密瓜表面积 11%~25% 为 2 级;冷害斑占哈密瓜表面积 25%~50% 的为 3 级;冷害斑占哈密瓜表面积 50% 以上为 4 级。

冷害指数=

$$\sum \frac{(\text{果实冷害级别} \times \text{该级别的果实数})}{(\text{果实总数量} \times \text{最高级别})}$$

1.3.2.2 游离脯氨酸含量的测定 参考黄琦辉^[24]和 Gao 等^[25]的酸性茚三酮法,并略作修改。称取 2 g 哈密瓜果皮,加入 6 mL 经预冷的 30 g/L 磺基水杨酸溶液,进行提取。反应液取 2 mL 酶液、3 mL 酸性茚三酮、进行摇匀煮沸,冷却后加入甲苯,测定波长 520 nm 处吸光度值。用脯氨酸作标准曲线,哈密瓜样品中脯氨酸的含量表示为 $\mu\text{g/g}$ 。

1.3.2.3 脯氨酸代谢关键酶 P5CS 活性的测定 参考黄琦辉^[24]和 Shang 等^[26]的方法,略作修改。取 1.0 g 哈密瓜果皮,加入 3 mL Tris-HCl 缓冲液进行提取。反应液取 2.4 mL Tris-HCl 缓冲液、0.1 mL 25 mmol/L 的 MgCl_2 、0.1 mL 75 mmol/L 的谷氨酸钠、0.1 mL 5 mmol/L 的 ATP、0.2 mL 酶提取液,混匀后加入 0.1 mL 0.4 mmol/L 的 NADPH,测定 2.5 min 内波长 340 nm 处的吸光值变化,以每分钟每克哈密瓜果实吸光值变化 0.001 为 1 个 P5CS 活性单位,表示为 U/g FW。

1.3.2.4 脯氨酸代谢关键酶 OAT 活性的测定 参考黄琦辉^[24]和 Sánchez 等^[27]的方法,并略作修改。取 2 g 哈密瓜果皮,加入 6 mL 磷酸钾缓冲液进行提取。反应液取 2.2 mL 200 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液、0.2 mL 46.8 mmol/L 的鸟氨酸、0.2 mL 12.5 mmol/L 的 α -酮戊二酸、0.2 mL 酶液,充分混匀,加入 0.6 mL 0.25 mmol/L 的 NADH 启动反应,测定 2.5 min 内波长 340 nm 处的吸光值变化,以每分钟每克哈密瓜果实吸光值变化 0.001 为 1 个 OAT 活性单位,表示为 U/g FW。

1.3.2.5 脯氨酸降解关键酶 ProDH 活性的测定 参考黄琦辉^[24]和 López-Carrión 等^[28]的方法,并略作修改。称取 1 g 哈密瓜果皮,加入 6 mL Tris-HCl 缓冲液进行提取。反应液吸取 2.4 mL 0.15 mmol/L 的碳酸钠缓冲液、0.2 mL 2.67 mmol/L 脯氨酸、0.2 mL 酶提取液,混匀后加入 0.2 ml 10 mmol/L NAD 启动反应,测定 2.5 min 内波长 340 nm 处的吸光值变化,以每分钟每克哈密瓜果实吸

光值变化 0.001 为 1 个 PDH 活性,表示为 U/g FW。

1.3.2.6 荧光定量 PCR 检测 P5CS、OAT 和 ProDH 基因相对表达情况 取贮藏在 3 °C 条件中 14, 28, 42 d 的哈密瓜果实,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法。将 -40 °C 冰箱中保存备用的哈密瓜皮组织提取总 RNA,用于后续的反转录 cDNA,后取 1 μL cDNA 用于 PCR 检测。

1) 总 RNA 提取 采用试剂盒法提取哈密瓜总 RNA。

2) cDNA 第一链的合成 经检测合格并定量的总 RNA 逆转录成 cDNA,在冰浴的试管中加入表 2 中反应混合物:

表 1 逆转录反应体系 1

引物	体系
模板 RNA:总 RNA	1 000 ng
引物:Oligo(dT) (50 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
dNTP Mix(10 mmol/L)	1 μL

加无酶水至 10 μL ,混匀后 65 °C 孵育 5 min,结束后迅速冰浴。在冰浴的试管中加入如下反应混合物:

表 2 逆转录反应体系 2

试剂	体系/ μL
模板 RNA 引物混合物	10
5 \times 反应缓冲液	4
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	0.5
MMLV RT(200 U/ μL)	1
无酶水	至 20

反应混合物 42 °C 30~60 min。在 95 °C 加热 5 min 结束反应,置冰上进行后续试验或冷冻保存。

结合贮藏过程中脯氨酸代谢酶活性的差异显著性,选择 P5CS、OAT、ProDH 3 种酶进行相应酶基因的定量表达测定。

qRT-PCR 的定量基因特异性引物如表 3 所示。

表3 qRT-PCR引物序列表
Table 3 Primer sequence of qRT-PCR

基因名称	引物名称	引物序列(5'→3')
<i>CmP5CS</i>	CmP5CS-2F	CTTGCGAGCGACCTTGTT
	CmP5CS-2R	ATGACTGAAGTGATGACCTTATGC
<i>CmOAT</i>	CmOAT-2F	AATCGCCGTTAATTCCTTAGGTC
	CmOAT-2R	GCTTCCGTGCCAGAGTTG
<i>CmProDH</i>	CmProDH-2F	GCTTGTGAGAGGTGCTTATATGT
	CmProDH-2R	TGCGTATCTTGAATGGTATTGTGA
18S	18S-F	GCTGTCACTGTTTTTGGCGT
	18S-R	GCACCACCCTTCAAATGAGC

3) 选择该目的基因的 cDNA 为模板, 进行 PCR 反应, PCR 反应体系如表 4 所示。

按照表 4 反应体系配置的 PCR 反应溶液进行 PCR 反应, 反应程序如表 5 所示。

1.4 数据处理与分析

分析数据和制图使用的软件有: Origin 9 及 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 17.0; * 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析计算 $P < 0.05$ 水平条件下实时荧光定量 PCR 检测的相对表达水平。

2 结果与分析

2.1 正丁醇对哈密瓜采后冷害症状和冷害指数的影响

由图 2 得知, 采后哈密瓜果实在低温冷藏 14 d 取出放置常温下 2 d 后正丁醇和对照果实均出现冷害, 随低温冷藏时间延长, 果实冷害症状加剧, 冷害指数上升(图 1)。哈密瓜低温冷藏 14 d 时, 正丁醇处理和对照处理果实虽均出现冷害, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 在贮藏后期(35~42 d)对照

表4 qPCR 上机反应体系

Table 4 qPCR reaction system

试剂	体系/ μL
2 \times SYBR 染料法荧光定量预混物	10
10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PCR 特异引物 F	0.4
10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PCR 特异引物 R	0.4
cDNA	1
无酶水	至 20

表5 荧光定量 PCR 扩增程序

Table 5 Fluorescent quantitative PCR amplification procedure

程序(ABI)	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环/圈
预变性	95	5 min	
变性	95	15 s	40
退火及延伸	60	30 s	

组果实的冷害指数均显著高于正丁醇处理组, 说明正丁醇处理抑制果实冷害的作用在后期表现显著 ($P < 0.05$)。

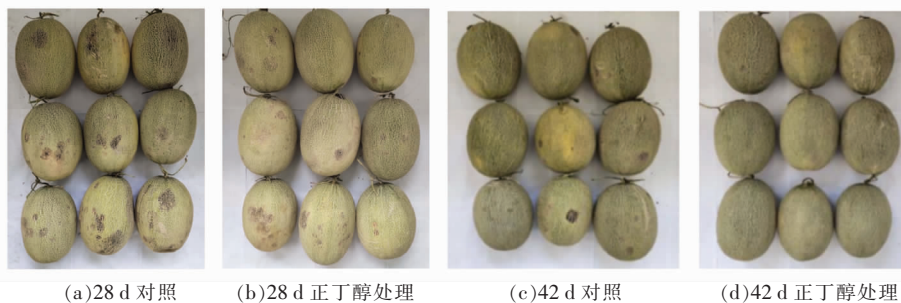
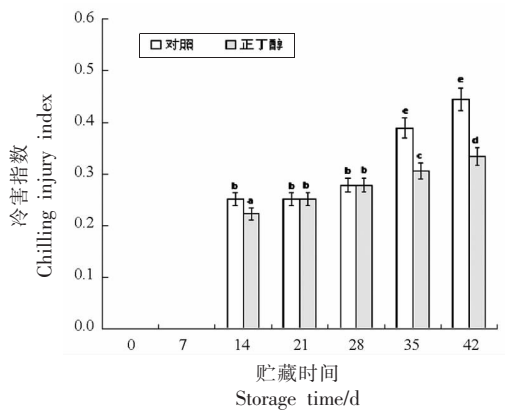


图1 不同处理的哈密瓜果实在低温冷藏 28 d 和 42 d 后分别放置常温下 2 d 的冷害症状图

Fig.1 Symptom of chilling injury of Hami melon fruits in two treatments after low temperature storage for 28 d and 42 d at room temperature for 2 d



注:不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$)。

图 2 正丁醇处理对哈密瓜采收后贮藏冷害指数的影响
Fig.2 Effect of *N*-butanol on chilling injury index of postharvested Hami melon fruits during storage

2.2 正丁醇处理对哈密瓜脯氨酸含量的影响

脯氨酸是植物组织细胞中水溶性最大的氨基酸,在低温胁迫下,果实体内脯氨酸的含量会明显增加来抵抗果实组织对逆境的抵抗能力^[6]。由图 3 可知,哈密瓜果实在低温贮藏期间,脯氨酸含量整体呈现上升的趋势,两个处理的趋势大致相同,且在整个贮藏期间正丁醇处理组脯氨酸含量始终高于对照组。对照组哈密瓜果皮脯氨酸含量在贮藏 0~7 d 虽出现了微微下降的现象,但是并不明显,7 d 至贮藏结束匀速上升;正丁醇处理组果实在贮藏 0~7 d 的上升速度很慢,贮藏 7~14 d 哈密瓜果皮脯氨酸含量呈现出快速上升的现象,14 d 至贮藏结束,匀速上升。在贮藏 14, 21, 28, 35, 42 d 时正丁醇处理组哈密瓜果皮脯氨酸含量分别高出对

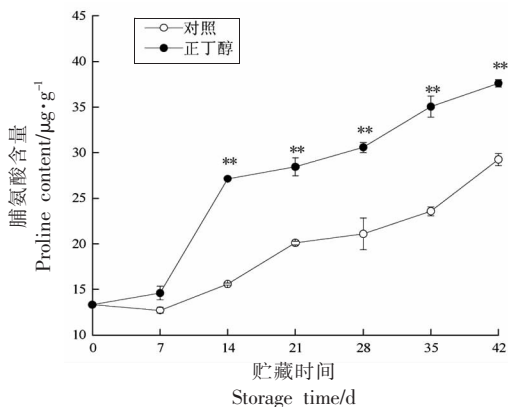


图 3 正丁醇处理对哈密瓜果实采收后脯氨酸含量的影响
Fig.3 Effect of *N*-butanol on the proline content of postharvested Hami melon fruits during cold storage

照组 74.21%, 41.54%, 48.62%, 28.63%, 两者之间差异极显著($P<0.01$)。至贮藏结束正丁醇处理组和对照组哈密瓜果皮脯氨酸含量分别高出贮藏起始点, 24.29 $\mu\text{g/g}$ FW 和 15.91 $\mu\text{g/g}$ FW。结果表明, 正丁醇处理可以有效维持冷藏哈密瓜果皮贮藏过程中脯氨酸含量的积累, 除第 7 天外整体效果显著($P<0.05$)。

2.3 正丁醇处理对哈密瓜 P5CS 活性及基因表达量的影响

P5CS 是植物合成脯氨酸的关键酶, 它可以通过催化谷氨酸(Glu)生成谷氨酰半醛(GSA), GSA 自动环化为吡咯啉-5-羧酸(P5C), 然后 P5C 在吡咯啉 5-羧酸还原酶(P5CR)作用下生成脯氨酸^[28]。P5CS 活性由图 4a 可以看出, 两个处理整体呈现一个上升的态势, 至贮藏结束时正丁醇处理组与对照组哈密瓜果皮 P5CS 活性分别高出贮藏起始点 1.9 倍与 1.3 倍, 且在整个贮藏期间正丁醇处理组 P5CS 活性始终要高于对照组, 除贮藏 21 d 外, 正丁醇处理组 P5CS 活性均显著高于空白对照组($P<0.01$), 由此可得, 用正丁醇处理哈密瓜可促进果实 P5CS 活性上升。*CmP5CS* 表达量如图 4b 所示, 在贮藏 14 d 时正丁醇处理组表达量达到最大值, 此时是对照组表达量的 4.2 倍, 进一步比较可以发现在整个贮藏期间正丁醇处理组哈密瓜 *CmP5CS* 表达量均要高于对照组, 此结果与 P5CS 活性结果相同。说明正丁醇处理增强了 P5CS 活性可能与在此段时间内的调控 *CmP5CS* 基因表达有关。

2.4 正丁醇处理对哈密瓜 OAT 活性及基因表达量的影响

OAT 是脯氨酸代谢关键酶, 同样对鸟氨酸(Om)起催化作用^[6]。OAT 活性由图 5a 可以看出, 除去对照组贮藏 35~42 d 外, 两个处理变化趋势比较相似, 均表现出波动上升, 在贮藏 0~14 d 两组果实 OAT 活性同时出现“上升-下降”波动, 贮藏 14~28 d 正丁醇处理组出现第 2 次“上升-下降”趋势后至贮藏结束均持续上升, 而对照组哈密瓜果皮 OAT 活性在贮藏 14~35 d 的持续上升后, 果实 OAT 活性突然下降至贮藏结束。在贮藏结束时, 正丁醇处理组果实 OAT 活性高出对照组 2.02 倍($P<0.01$), 在整个贮藏期间, 正丁醇处理组果实

OAT 活性均高于对照组,在贮藏第 21,35,42 天表现为显著($P<0.01$)。由此可以看出,正丁醇处理有利于提升果实 OAT 活性;*CmOAT* 基因表达由 5b 显示,在贮藏第 14 天和第 28 天,正丁醇处理组 *CmOAT* 基因表达量均低于对照组,在贮藏 42 d

正丁醇处理组哈密瓜果实 *CmOAT* 基因表达量高于对照组,图中可以看出 2 个处理的 *CmOAT* 基因表达量整体变化趋势与 OAT 活性变化趋势较为相似。

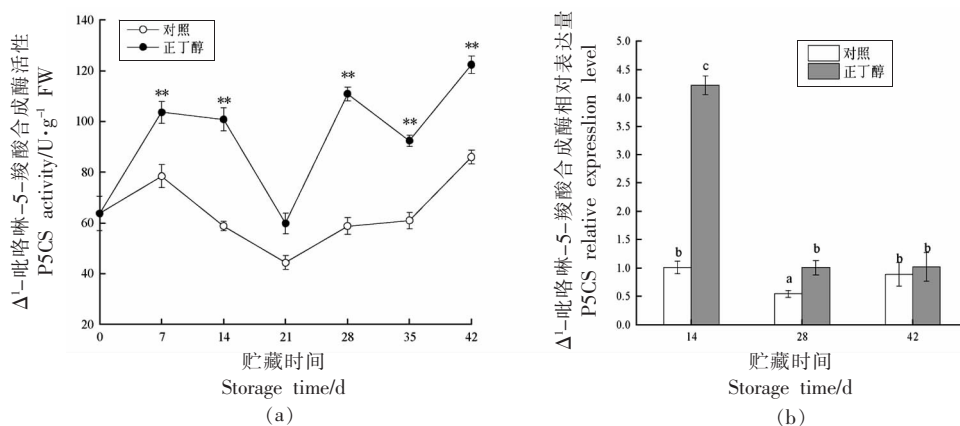


图4 正丁醇处理对哈密瓜 P5CS 活性(a)及其相对表达量(b)的影响

Fig.4 Effect of *N*-butanol on the of P5CS activity (a) and relative expression level (b) of Hami melon

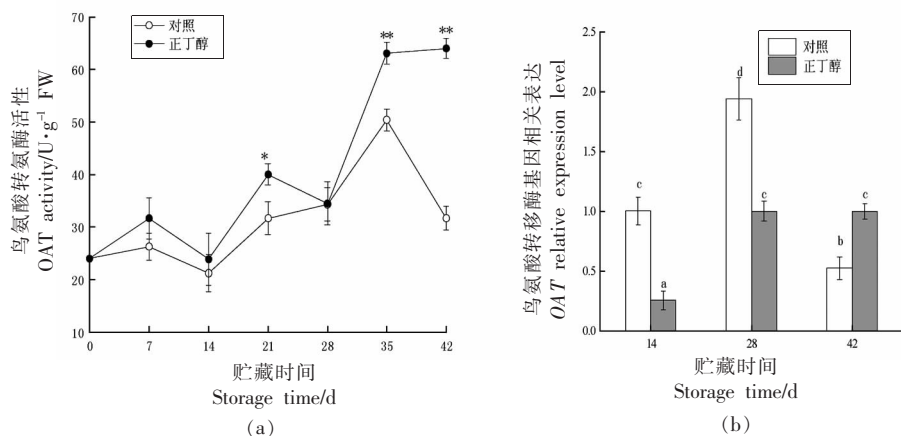


图5 正丁醇处理对哈密瓜 OAT 活性(a)及其相对表达量(b)的影响

Fig.5 Effect of *N*-butanol on the of OAT activity (a) and relative expression level (b) of Hami melon

2.5 正丁醇处理对哈密瓜 ProDH 活性及基因表达量的影响

ProDH 是脯氨酸降解的限速酶^[29],由 6a 可知,正丁醇处理组和对照组的 ProDH 活性均整体呈现下降趋势,对照组果实 ProDH 活性在贮藏 0~14 d 急速下降,在贮藏 14~28 d 缓慢上升,贮藏 28 d 至贮藏结束 ProDH 活性持续下降。正丁醇处理组哈密瓜果实 ProDH 活性贮藏 0~14 d 急速下降后缓慢下降,贮藏 14~28 d 哈密瓜果实 ProDH 活性呈

现出“上升-下降”的轻微波动,贮藏 28~35 d ProDH 活性基本处于无变化状态,35 d 至贮藏结束,ProDH 活性快速下降。进一步得知,在相同的贮藏时间,果实经正丁醇处理 ProDH 活性均低于对照组果实,除了贮藏第 14 天外,正丁醇处理组均显著低于对照组($P<0.05$)。结果表明,正丁醇处理可以较好的抑制 ProDH 活性。*CmProDH* 基因表达如 6b,可以看出,对照组哈密瓜果实 *CmProDH* 基因表达呈现上升趋势,而正丁醇处理组哈密瓜

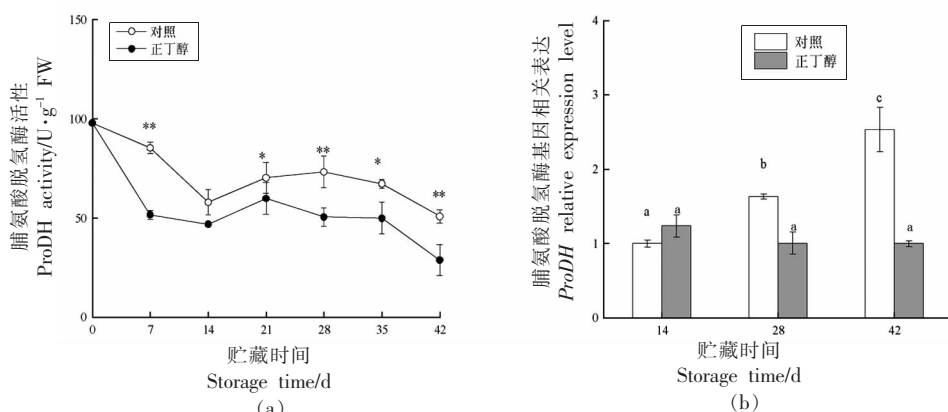


图 6 正丁醇处理对哈密瓜 ProDH 活性(a)及其相对表达量(b)的影响

Fig.6 Effect of *N*-butanol on the of ProDH activity (a) and relative expression level (b) of Hami melon

果实 *CmProDH* 基因表达呈现下降趋势,且进一步比较发现,贮藏中后期正丁醇处理组 *CmProDH* 基因的相对表达量要低于对照组,在贮藏 28 d 和 42 d 正丁醇处理组 *CmProDH* 基因达量分别低于对照组 38.5%,60.5%,说明正丁醇处理较好的抑制了贮藏后期哈密瓜果皮的 *CmProDH* 基因表达,与 ProDH 活性基本相似。

3 讨论与结论

哈密瓜属冷敏性果实,不适宜的低温贮藏会造成哈密瓜果实发生冷害,症状通常表现为:随冷害加剧,不规则的失水干缩的凹陷斑点发展成凹陷斑块^[23,30]。本研究也发现同样的冷害症状,且果实冷藏 14 d 在常温下放置 2 d,冷害症状开始出现,随冷藏时间延长冷害症状加重,冷害指数升高,与 Wang 等^[31]对“西周密 25 号”报道冷害症状基本相似。由图 1 可以看出,在贮藏后期正丁醇处理组与对照组果实相比,冷害斑面积明显少于对照组果实,且与冷害指数相符合,表明正丁醇处理组果实表皮细胞膜受损程度较对照组轻,说明正丁醇处理调控了哈密瓜果实采后冷害的发展。

脯氨酸是植物体内重要的渗透调节物质,用来稳定细胞蛋白,清除自由基及调节渗透态势^[32],本研究发现,在哈密瓜果实低温贮藏第 7 天开始,脯氨酸含量开始逐渐增大,说明哈密瓜果实在感应低温胁迫信号后,体内脯氨酸含量通过快速大量累积,从而降低低温胁迫对果实细胞造成的

危害(图 3)。该结果在桃子^[25]、芒果^[21]、青茄^[24]等果实在低温贮藏条件下,通过脯氨酸含量快速积累,以抵御冷胁迫的现象一致。有研究表明,在植物体内,脯氨酸主要经过 2 个途径进行合成,分别为谷氨酸和鸟氨酸途径,其中 P5CS 为谷氨酸途径合成关键酶,OAT 为鸟氨酸合成关键酶。在脯氨酸降解过程中,ProDH 是关键限速酶,这几种酶的活性及其基因表达对脯氨酸含量有直接作用^[33]。在本研究中,在低温条件下谷氨酸途径合成关键酶 P5CS 酶活性上升,其酶活性和基因相对表达量均始终高于对照处理(图 4),说明本试验哈密瓜果实在低温贮藏过程中,脯氨酸含量逐渐升高,并且正丁醇处理组哈密瓜果皮脯氨酸含量始终高于对照组,该结论与正丁醇处理始终诱导 *P5CS* 的基因高表达和 *P5CS* 酶高活性有直接的关系,相似结论在草酸处理的哈密瓜中也得到验证^[6]。OAT 作为鸟氨酸合成关键酶,从结果可以看出,2 个处理组 OAT 酶活性均上升,且正丁醇处理组活性始终高于对照组。且在贮藏后期正丁醇处理的哈密瓜果皮 OAT 活性才表现出极显著高于对照组,相应的基因相对表达量只有在后期 OAT 活性才呈现出高于对照表达(图 5),说明正丁醇处理增强哈密瓜果实采后抗冷的效果在后期表达显著,该结论与草酸处理的番茄果实相类似^[34]。表明正丁醇处理通过提高 2 个途径关键酶 *P5CS* 和 *OAT* 酶活性及其相应基因表达量来促进脯氨酸含量的积累,尤其是谷氨酸途径 *P5CS* 活性的促进作用更加显著。

脯氨酸脱氢酶(ProDH)是脯氨酸降解中第一步限速酶,为植物生长发育提供能量^[35]。在本次试验结果中,在低温冷藏条件下,ProDH活性下降,正丁醇处理组哈密瓜果实基因相对表达量与酶活性较一致,在贮藏中后期 *ProDH* 基因相对表达量显著低于对照处理组(图6),表明正丁醇处理较好地促进了脯氨酸限速酶 ProDH 活性及 *Cm-ProDH* 表达量的下降,对提升脯氨酸含量起促进作用,进一步增强哈密瓜果实的抗冷能力。该结果与王静^[6]和凌晨等^[35]的部分研究结果相似。

综合以上研究结果,正丁醇处理诱导了脯氨酸代谢中鸟氨酸途径与谷氨酸途径关键酶 P5CS 及 OAT 酶活性上升,促进了限速酶 ProDH 活性的下降,调节了其相应酶基因相对表达与活性变化,显著降低脯氨酸降解酶活性,促进 *CmProDH* 基因表达量下降。脯氨酸含量的积累是哈密瓜果皮中几种酶活性共同作用的结果,进而减轻哈密瓜果实的冷害症状,降低哈密瓜果实的冷害指数。

参 考 文 献

- [1] 刘彩红,张琪,李乾,等.正丁醇处理对冷藏哈密瓜果实冷害和贮藏品质的影响[J].食品工业科技,2021,42(13):324-330.
LIU C H, ZHANG Q, LI Q, et al. Research of the *N*-butanol treatment on chilling injury and quality of postharvest Hami melon fruits[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 324-330.
- [2] 王静,茅林春,张辉,等.草酸处理对哈密瓜采后冷害及品质的影响[J].食品研究与开发,2017,38(16):167-172.
WANG J, MAO L C, ZHANG H, et al. Research of the effects of oxalic acid-treatment on the chilling injury and quality of harvested Hami melon[J]. Food Research and Development, 2017, 38(16): 167-172.
- [3] 许玲,张维一,田允温.低温冷害对哈密瓜外部形态和细胞结构的影响[J].植物学报,1990,32(10):772-776.
XU L, ZHANG W Y, TIAN Y W. Effects of chilling injury on the morphology and cell structure of Hami melon fruits[J]. Acta Botanica Sinica, 1990, 32(10): 772-776.
- [4] 李学文.1-MCP和MeJA对哈密瓜采后品质调控及其机理研究[D].南京:南京农业大学,2011.
LI X W. Study on 1-MCP and MeJA on the quality regulation and mechanism of Hami melon after harvest[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [5] 张婷.哈密瓜不同品种采后冷害表现特点及控制研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.
ZHANG T. Studies on the characteristics and controlling of postharvest chilling injury in different Hami melon cultivars[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [6] 王静.草酸诱导哈密瓜果实采后耐冷性的作用机理[D].杭州:浙江大学,2018.
WANG J. Mechanism of oxalic acid inducing cold resistance in postharvest Hami melon fruit [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.
- [7] 霍宪起.正己醇处理对桑葚采后生理与抗氧化酶的影响[J].食品科学,2012,33(6):252-255.
HUO X Q. Effect of 1-hexanol treatment on physiology and antioxidant enzymes of post-harvest mulberry fruits[J]. Food Science, 2012, 33(6): 252-255.
- [8] 李英华.正己醇对草莓果实采后抑菌及保鲜效果的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2009.
LI Y H. Effect of 1-Hexanol treatment on postharvest pathogenic fungi control and quality maintenance of strawberry fruits during storage period[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2010.
- [9] 李银.磷脂酶D抑制剂对蟠桃果实采后贮藏品质调控的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2009.
LI Y. Effect of phospholipase D inhibitors treatment on postharvest quality maintenance of flat peach fruits[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2010.
- [10] 李丽,李杰民,孙健,等.仲丁醇对采后龙眼低温贮藏特性的影响[J].南方农业学报,2017,48(12):2247-2252.
LI L, LI J M, SUN J, et al. Effects of 2-butanol on characteristics of postharvest longan fruits stored under low temperature[J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(12): 2247-2252.
- [11] MOTES C M, PECHTER P, YOO C M, et al. Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and *N*-acylethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling

- growth[J]. *Protoplasma*, 2005, 226(3/4): 109–123.
- [12] 刘彩虹, 王雅琪, 王静, 等. 正丁醇对采后哈密瓜冷害及活性氧代谢的影响[J]. *果树学报*, 2021, 38(11): 1984–1994.
- LIU C H, WANG Y Q, WANG J, et al. Effects of *N*-butanol on chilling injury and active oxygen metabolism of postharvest Hami melon fruit[J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(11): 1984–1994.
- [13] SUN J, YOU X R, LI L. Effects of a phospholipase D inhibitor on postharvest enzymatic browning and oxidative stress of litchi fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 62(3): 288–294.
- [14] 孙扬扬. 基于膜脂代谢的常温贮藏南果梨果心褐变机理及调控研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- SUN Y Y. Study on the browning mechanism and regulation of Nanguo pear core stored at room temperature based on membrane lipid metabolism [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [15] LI L, LI J M, SUN J, et al. Effects of 2-butanol on quality and physiological characteristics of longan fruit stored at ambient temperature [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 101: 96–102.
- [16] 姜玉, 张苗, 汤静, 等. 冷激结合水杨酸处理对黄瓜果实冷害及能量和脯氨酸代谢的影响[J]. *核农学报*, 2021, 35(1): 128–137.
- JIANG Y, ZHANG M, TANG J, et al. Effects of cold shock combined with salicylic acid treatment on chilling injury, energy and proline metabolism of postharvest cucumber fruit[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(1): 128–137.
- [17] 姚明华, 徐跃进, 李晓丽, 等. 茄子耐冷性生理生化指标的研究[J]. *园艺学报*, 2001, 28(6): 527–531.
- YAO M H, XU Y J, LI X L, et al. Studies on biochemical and physiological indices of chilling tolerance in eggplant [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(6): 527–531.
- [18] CAO S F, CAI Y T, YANG Z F, et al. MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and γ -aminobutyric acid contents [J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(4): 1466–1470.
- [19] 张阔, 秦文, 李正国, 等. 草酸对桃贮藏期抗性相关酶活性的诱导[J]. *食品科学*, 2010, 31(22): 492–495.
- ZHANG K, QIN W, LI Z G, et al. Induction of enzyme activity in peach with oxalic acid treatment during storage [J]. *Food Science*, 2010, 31(22): 492–495.
- [20] LUO Z, LI D, DU R, et al. Hydrogen sulfide alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content [J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 183: 144–151.
- [21] LI P, ZHENG X, LIU Y, et al. Pre-storage application of oxalic acid alleviates chilling injury in mango fruit by modulating proline metabolism and energy status under chilling stress [J]. *Food Chemistry*, 2014, 142(1): 72–78.
- [22] 刘同业, 张婷, 车凤斌, 等. 不同贮藏温度下西州密 25 号哈密瓜果实冷害生理的研究[J]. *新疆农业科学*, 2015, 52(1): 26–32.
- LIU T Y, ZHANG T, CHE F B, et al. Studies on chilling injury physiology of xizhoumi No. 25 Hami melon fruits at different storage temperatures [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2015, 52(1): 26–32.
- [23] BI Y, TIAN S P, LUI H X, et al. Effect of temperature on chilling injury, decay and quality of Hami melon during storage [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2003, 29(2): 229–232.
- [24] 黄琦辉. 丁香酚处理对采后青茄冷害及其冷诱导转录因子 CBF 表达的影响[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.
- HUANG Q H. Effect of eugenol treatment on chilling injury and expression of CBF transcription factor in green eggplant fruit during cold storage [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2018.
- [25] GAO H, ZHANG Z, LV X, et al. Effect of 24-epibrassinolide on chilling injury of peach fruit in relation to phenolic and proline metabolisms [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 111: 390–397.
- [26] SHANG H, CAO S, YANG Z, et al. Effect of exogenous γ -aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(4): 1264–1268.
- [27] SÁNCHEZ E, LÓPEZ-LEFEBRE L R, GARCÍA P C, et al. Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, 158(5): 593–598.
- [28] LÓPEZ-CARRIÓN A I, CASTELLANO R, ROSALES M A, et al. Role of nitric oxide under saline

- stress; Implications on proline metabolism[J]. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(3): 587–591.
- [29] 王小璐. 24-表油菜素内酯对猕猴桃果实冷藏品质的影响及其机理[D]. 西安: 西北大学, 2020.
- WANG X L. Effect and mechanism of 24-epibrassinolide treatment maintain kiwifruit cold storage quality[D]. Xi'an: Northwest University, 2020.
- [30] 王静, 茅林春, 杨璐, 等. 草酸处理对采后哈密瓜果实膜脂代谢的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(8): 189–198.
- WANG J, MAO L C, YANG L, et al. Effect of oxalic acid on reduction of membrane lipids metabolism of Hami melon's fruit in postharvest[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(8): 189–198.
- [31] WANG J, MAO L C, LI X W, et al. Oxalic acid pretreatment reduces chilling injury in Hami melons (*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.) by regulating enzymes involved in antioxidative pathways[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 241: 201–208.
- [32] 陈智智. 脯氨酸对减轻桃果实冷害的作用及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- CHEN Z Z. Study on effect and mechanisms of proline on alleviating chilling injury of peach fruit [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [33] LUO Z, CHEN C, XIE J. Effect of salicylic acid treatment on alleviating postharvest chilling injury of 'Qingnai' plum fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 62(2): 115–120.
- [34] 李佩艳. 草酸处理对冷敏型果实采后冷害的缓解效应及其机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2014.
- LI P Y. Effect of oxalic acid treatment on alleviating chilling injury in chilling-sensitive fruits its involved mechanism [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2014.
- [35] 凌晨, 谢兵, 郑永华, 等. 外源钙和钙调素拮抗剂对冷藏桃果实耐冷性的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(1): 240–248.
- LING C, XIE B, ZHENG Y H, et al. Effects of exogenous calcium and calmodulin antagonist treatments on chilling tolerance of cold-stored peach fruit[J]. *Food Science*, 2019, 40(1): 240–248.

Regulation of *N*-Butanol on Proline Metabolism of Hami Melon

Liu Caihong, Wang Xue, Wang Jing*, Wang Xinyu, Li Hui, Bi Ying

(College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052)

Abstract To investigate the effect of *N*-butanol treatment on proline metabolism of Hami melon fruits in cold temperature, the fruits of 'Xizhou Mi 25 hao' Hami melon were soaked in *N*-butanol solution at the volume fraction 1.0% and 0% for 30 min as the treated and control group, and the Hami melons were placed at $(3 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ for 42 d. Samples were taken every 7 d. The chilling injury symptoms of Hami melons leaving low temperature to room temperature were recorded and the chilling injury index was counted, and the related indexes of proline metabolism were measured. The results showed that *N*-butanol treatment significantly ($P < 0.05$) suppressed the increase of chilling injury index at 35 d and 42 d in Hami melons compared with the control group, and reduced the chilling injury symptoms in the later storage period, significantly increased the proline content (except 7 d) and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) activity (except 21 d) and the relative gene expression as well as the activity of ornithine (OAT) at 35–42 d in storage, and significantly decreased proline dehydrogenase (ProDH) activity (except at 14 d) and relative gene expression at 28 and 42 d of storage ($P < 0.01$). It indicates that *N*-butanol treatment maintained higher proline content significantly by increasing the activity and relative expression of the corresponding genes of *CmP5CS* and *CmOAT*, which was the key enzymes of proline synthesis, and the activity and gene expression of *CmProDH* was decreased, which reduced the chilling injury index and alleviated the symptoms of chilling injury in Hami melons, which was more effective treatment in improving the low temperature tolerance of Hami melon cells and maintaining better fruit quality.

Keywords *N*-butanol; Hami melon; low-temperature chilling injury; proline metabolism