

# 水杨酸处理诱导采后甜瓜 AsA-GSH 循环代谢清除过氧化氢的作用及机制

杨乾，范存斐，王毅，任亚琳，毕阳\*

(甘肃农业大学食品科学与工程学院，甘肃 兰州 730070)

**摘要：**【目的】研究 AsA-GSH 循环在水杨酸处理诱导的过量过氧化氢清除过程中的作用。【方法】用 4 mmol·L<sup>-1</sup> 水杨酸浸泡“玉金香”厚皮甜瓜 10 min，测定处理果实丙二醛含量，分析活性氧的积累水平、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性，以及 AsA-GSH 循环作用酶活性以及产物和底物含量。【结果】水杨酸处理降低了果实丙二醛含量，第 10d 处理组 MDA 含量低于对照 14.6%。SA 处理显著提高了果实 O<sub>2</sub><sup>-</sup>的产生速率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量，其中处理后第 2d O<sub>2</sub><sup>-</sup>的产生速率高于同期对照的 1.9 倍，第 6d H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量高出对照果实 29.7%。SA 提高了果实超氧化物歧化酶活性，但抑制了过氧化氢酶活性。SA 处理提高了果实抗坏血酸过氧化物酶、单脱氢抗坏血酸过氧化物酶、脱氢抗坏血酸还原酶和谷胱甘肽还原酶的活性，增加了抗坏血酸和氧化型谷胱甘肽的含量，降低了脱氢抗坏血酸和还原型谷胱甘肽的含量。【结论】SA 处理诱导了厚皮甜瓜果实的氧爆，抑制了 MDA 产生，由 SA 诱导产生的过量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要 AsA-GSH 循环清除。

关键词：厚皮甜瓜；水杨酸；活性氧；AsA-GSH 循环

## AsA-GSH cycle participates in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in muskmelons induced by salicylic acid

YANG Qian, FAN Cun-fei, WANG Yi, REN Ya-lin, BI Yang\*

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** 【Objective】An experiment was conducted to assay AsA-GSH cycle scavenging the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in muskmelons induced by salicylic acid (SA) during storage. 【Method】The muskmelons (cv. Yujinxiang) were used as experimental material, soaked in 4 mmol L<sup>-1</sup> SA for 10 min, and stored at ambient temperature. The malondialdehyde content and the accumulation level of ROS were measured in treat fruit. The activity of superoxide dismutase and catalase was determined, also with the activity of relative enzymes and the contents of substrate and product of AsA-GSH cycle. 【Results】SA treatment reduced the malondialdehyde content. The MDA content was 14.6% lower than that the control after 10 days of treatment. SA significantly increased the O<sub>2</sub><sup>-</sup> production rate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in fruit. The O<sub>2</sub><sup>-</sup> production rate was 1.9 times higher in treated fruits than that the control after 2 days of treatment. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was 29.7% higher than that the control after 6 days of treatment. The chemical increased superoxide dismutase activity and inhibited catalase activity. SA increased the activity of ascorbate peroxidase, glutathione reductase, monodehydroascorbate peroxidase and dehydroascorbate reductase. Meanwhile, SA also significantly increased the content of ascorbic acid and oxidized glutathione, and decreased the content of dehydroascorbic acid and reduced glutathione. 【Conclusion】SA treatment promotes

---

基金项目：公益性行业（农业）科研专项（201303075）

作者简介：杨乾（1993—），男，硕士研究生，研究方向为果蔬采后生物学与技术。E-mail: yangqian11026@163.com

\*通讯作者：毕阳（1962—），男，教授，博士，研究方向为果蔬采后生物学与技术。E-mail: biyang@gau.edu.cn

oxygen burst in muskmelons and reduces the malondialdehyde content. However, the scavenging of higher level H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mainly depend on AsA-GSH cycle.

Keywords: muskmelon; salicylic acid; reactive oxygen species; AsA-GSH cycle

中图分类号： TS255.36 文献标志码： A

DOI： 10.7506/spkx1002-6630-20191128-276

化学诱抗剂可有效诱导厚皮甜瓜对多种采后真菌的抗性<sup>[1]</sup>，诱抗的机制与激活苯丙烷、活性氧和能量等代谢密切相关<sup>[2]</sup>。氧爆是诱抗剂处理果实后的典型反应<sup>[3]</sup>，氧爆初期产生的少量活性氧可作为信号分子激活相关防御反应，而后期产生的大量活性氧则具有直接抑菌、促进氧化交联等作用<sup>[4]</sup>。然而，过量活性氧会破坏细胞膜结构，降低果实的抗病性<sup>[5]</sup>。植物体内已进化出有效的清除系统来平衡活性氧，以防止过量活性氧的伤害<sup>[6]</sup>。清除系统包括酶促和非酶促两类，前者包括超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶以及 AsA-GSH 循环相关酶，后者包括维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽、多酚和类黄酮等<sup>[7]</sup>。有研究表明，采后水杨酸处理诱导了柑桔的氧爆，同时提高了超氧化物歧化酶活性，但降低了过氧化氢酶活性<sup>[8-9]</sup>。同样，采后苯丙噻二唑处理也诱导了苹果的氧爆，增加了超氧化物歧化酶活性，抑制了过氧化氢酶活性<sup>[10]</sup>。由此表明，诱抗剂所诱导的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除不依赖于过氧化氢酶。AsA-GSH 循环是植物体内心存在的重要抗氧化保护系统，主要通过谷胱甘肽和抗坏血酸的氧化还原来清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，在维持 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生和清除平衡中发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。有研究表明，水杨酸及其类似物苯丙噻二唑处理提高了柑橘和苹果 AsA-GSH 循环的活性<sup>[9-10]</sup>。由此表明，AsA-GSH 循环在诱抗剂激发的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除中具有重要作用。我们前期研究发现，采后苯丙噻二唑处理会通过激发厚皮甜瓜的氧爆来提高果实的抗病性<sup>[12]</sup>，但 AsA-GSH 循环如何系统参与诱抗剂激发的厚皮甜瓜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除尚未见报道。本研究以‘玉金香’厚皮甜瓜为试材，研究采后水杨酸浸泡处理对果实活性氧的积累和 MDA 含量的影响，测定处理果实的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性，以及 AsA-GSH 循环代谢酶活性和产物含量。以期为揭示 AsA-GSH 循环在清除诱抗剂激发的果实过量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 方面提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试‘玉金香’甜瓜于 2010 年 7 月采自甘肃省民勤县收成乡露地大田。选取大小一致，成熟度大约 9 成，果重约在 0.5kg-0.7kg，可溶性固形物含量（TSS）约在 12-13%，无损伤、无病虫害的果实。单果套发泡网袋，入包装箱(20 个/箱)，第 2d 运抵甘肃农业大学采后生物学与技术实验室，于常温( $22\pm2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 55%—60%)下贮藏待用。

水杨酸（Salicylic acid）由天津市光复精细化工研究所生产，分析纯。

台式高速冷冻离心机（3K30，Sigma 公司，德国）；紫外-可见光分光光度计（UV-2450，岛津公司，日本）；电导率仪（DDS-307A，上海雷磁，中国）；超低温冰箱（DW-HL218；中科美菱低温科技有限公司；中国）

### 1.2 方法

#### 1.2.1 SA 浸泡处理

参照范存斐等的方法<sup>[13]</sup>。SA 用少量 75%乙醇溶解后加水配制成 4 mmol/L 的 SA 溶液中(内含 0.05%的 Tween80, 用 1%NaOH 溶液调节 pH 至 7.0)。取甜瓜果实表面用自来水冲洗干净后晾干, 将晾干后的果实浸入 4 mmol·L<sup>-1</sup> 的 SA 溶液中 10 min, 取出晾干后, 单果套发泡网袋, 放入包装箱(20 个/箱), 于常温 (22±2°C、相对湿度 55%—60%)下贮藏待用。以清水(内含 0.05%的 Tween80, 用 1%NaOH 溶液调节 pH 至 7.0)处理作对照。每处理用果实 40 个, 重复 3 次。

### 1.2.2 取样

参照 Ren 等的方法<sup>[15]</sup>。分别于处理后 0、2、4、6、8、10 d 用直径 5 mm 打孔器打取皮下 3—10 mm 处组织 3g, 锡箔纸包好后液氮冷冻, 在-80°C 超低温冰箱中保存待测。

### 1.2.3 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)含量的测定

参照 Hodges 等<sup>[16]</sup>的方法。取 3g 冷冻组织, 加 5 mL 100g·L<sup>-1</sup> 三氯乙酸溶液研磨, 研磨后的匀浆于 4°C, 12,000×g 条件下离心 20 min。取 2 mL 上清液, 加 2 mL 0.67%的 2-硫代巴比妥酸, 混匀后煮沸 20min, 冷却至室温后再次进行一次离心。分别测定反应液在 450 nm、532 nm 以及 600 nm 处的吸光值, MDA 含量用为  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW 表示。

### 1.2.4 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>产生速率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的测定

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>产生速率的测定参照 Ren 等<sup>[15]</sup>的方法。取 3g 冷冻组织, 加 5 mL 0.1mol·L<sup>-1</sup> pH7.8 磷酸缓冲液 (含 0.1% PVPP), 在冰浴条件下进行研磨, 匀浆于 4°C, 12,000 ×g 条件下离心 20 min。取 1mL 上清液, 加入 1 mL 50mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.8 磷酸缓冲液、1 mL 1 mmol·L<sup>-1</sup> 盐酸羟胺溶液, 常温下保温 60min。保温后加入 1 mL 17 mmol·L<sup>-1</sup> 对氨基苯磺酸、1 mL 7mmol·L<sup>-1</sup> α-萘胺, 于室温下再次保温 20 min 进行显色反应, 测定其在 530 nm 处吸光值。O<sub>2</sub><sup>·-</sup>产生速率用  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  FW 表示。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的测定参照 Prochazkova<sup>[17]</sup>等的方法。取 3 g 冷冻组织, 加入 3 mL 经 4°C 预冷的丙酮, 冰浴条件下研磨成匀浆后, 于 4°C, 12,000×g 条件下离心 20 min。取 1 mL 上清液, 加入 0.1mL 20% 的四氯化钛溶液和 0.2mL 浓氨水, 反应 5 min 后再离心 15 min。沉淀部分用经 4°C 预冷的丙酮进行 4 次洗涤, 然后用 1.5 mL 1mmol·L<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液将沉淀溶解, 并在 410 nm 处测定其吸光值。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量用  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  FW 表示。

### 1.2.5 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性测定

粗酶液的提取参照 Lacan and Baccou<sup>[18]</sup>的方法并修改。取 3.0 g 冷冻组织, 分别向研钵内加入 3 mL 浓度为 0.1mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 (pH 7.5, 含 5 mmol·L<sup>-1</sup> 二硫苏糖醇和 2% PVP), 在冰浴条件下研磨成匀浆后于 4°C, 12,000×g 离心 30 min, 上清液即为粗酶液。

SOD 活性测定参照 Oberley and Spitz<sup>[19]</sup>的方法并修改。取 5 mL 指形管 4 支, 2 支为测定管, 另 2 支为对照管, 依次加入 1.5 mL 50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液、0.3 mL 130 mmol·L<sup>-1</sup> 甲硫氨酸溶液、0.3 mL 750  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氮蓝四唑溶液、0.3 mL 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA-Na<sub>2</sub> 溶液、0.3 mL 粗酶液、0.3 mL 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  核黄素。其中对照 2 支管以缓冲液代替酶液, 混匀后将 1 支对照管置于暗处, 其它各管于 4000 LUX 日光灯下反应 15 min。至反应结束后, 以不照光管做空白参比, 于 560 nm 处测定吸光度值。SOD 活性以 OD<sub>560</sub>·g<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> FW 表示。

CAT 活性测定参照 Clairbone 等<sup>[20]</sup>的方法并修改。反应体系包括 2 mL 10 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mmol·L<sup>-1</sup>、pH 7.5 的磷酸缓冲液) 和 200 μL 粗酶液。在 240 nm 处测定 2 min 时的吸光值。CAT 活性表示为 OD<sub>240</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。

#### 1.2.6 AsA-GSH 循环酶活性的测定

粗酶液的提取参照 Nakano and Asada<sup>[21]</sup>的方法。取 3.0 g 冷冻组织于预冷的研钵中，加 5 mL 预冷的 50mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH7.0, 含 1mmol·L<sup>-1</sup> 抗坏血酸, 1mmol·L<sup>-1</sup>EDTA, 2% PVP, 0.25%TritonX- 100) 研磨，于 4°C, 16,000×g 离心 20min, 上清液即为粗酶液。

抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate Peroxidase, APX) 的活性的测定参照 Nakano and Asada<sup>[21]</sup>的方法。反应体系由 2 mL 100 mmol·L<sup>-1</sup>、pH 7.5 的磷酸缓冲液 (含 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA), 0.8 mL 3 mmol·L<sup>-1</sup> 抗坏血酸, 200 μL 粗酶液和 0.5 mL 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组成。在 290 nm 的吸光度值。APX 活性表示为 OD<sub>290</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。

谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR) 的活性测定参照 Halliwell and Foyer<sup>[22]</sup>的方法。反应体系由 2 mL 100 mmol·L<sup>-1</sup>、pH 7.5 的磷酸缓冲液 (含 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA), 0.1 mL 5 mmol·L<sup>-1</sup> GSSG, 30μL 3 mmol·L<sup>-1</sup> NADPH 和 0.4 mL 粗酶液组成。在 340 nm 的吸光度值。GR 活性表示为 OD<sub>340</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。

单脱氢抗坏血酸还原酶 (Dehydroascorbate reductase, DHAR) 的活性测定参照 Nakano and Asada<sup>[21]</sup>的方法并修改，取 0.3mL 粗酶液，加入 2.1mL50mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液，0.3mL20mmol·L<sup>-1</sup> GSH, 0.3mL2mmol·L<sup>-1</sup> DHA，以不加酶液为对照，在 265 nm 处测定其吸光度值。DHAR 活性表示为 OD<sub>265</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。

单脱氢抗坏血酸过氧化物酶 (Monodehydroascorbate reductase, MDHAR) 的活性测定参照 Nakano and Asada<sup>[21]</sup>的方法并修改，取 90μL 粗酶液，加入 2.7mL50mmol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 (pH7.0, 含 2mmol·L<sup>-1</sup>AsA)，0.12mLAAO, 0.09mL 2mmol·L<sup>-1</sup> NADPH，以不加酶液为对照，在 340 nm 处测定其吸光度值。MDHAR 活性表示为 OD<sub>340</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。

#### 1.2.7 AsA-GSH 循环产物和底物含量的测定

参照 Turcsányi<sup>[23]</sup>并修改。取 3 g 冷冻组织，加入 5 mL 100 mmol·L<sup>-1</sup> 盐酸，冰浴条件下充分研磨，于 4°C, 7800×g 离心 10min, 上清液立即用于抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的测定。抗坏血酸 (Ascorbic Acid, ASA) 和脱氢抗坏血酸 (Dehydroascorbate, DHA) 含量的测定取 100 μL 上清液加入 2 mL 100 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲液，再加入 0.5 mL 蒸馏水在 265 nm 下测其 OD 值，ASA 含量表示为 OD<sub>265</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。总抗坏血酸含量的测定：取 100μL 上清液加入 2 mL 100 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲液和 0.5 mL 2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT 置于室温下反应 8 min，之后在 265 nm 下测定其 OD 值，总抗坏血酸含量表示为 OD<sub>265</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。则总抗坏血酸含量减去 AsA 含量即为 DHA 的含量，DHA 含量表示为 OD<sub>265</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。

还原型谷胱甘肽 (Reduced glutathione, GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (Oxidized glutathione, GSSG) 含量的测定参照 Brehe 等<sup>[24]</sup>的方法并修改。取 3 g 冷冻组织，加入 5 mL 预冷的 6%偏磷酸 (pH

2.8)，冰浴条件下研磨成匀浆，于4℃，12500×g条件下离心20 min，上清液用于测定GSH和GSSG的含量。GSH+GSSG(总的谷胱甘肽)含量测定：500 μL粗酶液加入2.5 mL反应液，其中包含800 μL反应液1(110 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 15mmol·L<sup>-1</sup>EDTA, 0.3mmol·L<sup>-1</sup>二硫代二硝基苯甲酸, 0.04%牛血清蛋白)，800 μL反应液2(1mmol·L<sup>-1</sup>EDTA, 50mmol·L<sup>-1</sup>咪唑和0.02%BSA)、800 μL反应液3(5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.5)和100 μL9mmol·L<sup>-1</sup> NADPH，以6%偏磷酸(pH2.8)代替提取液作为对照，412nm下测其OD值，含量表示为OD412·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。GSSG含量测定：500 μL提取液加入2.5 mL乙烯吡啶，25℃下水浴1 h，在412nm下测其OD值，含量表示为OD412·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。则GSH的含量是总的谷胱甘肽含量与GSSG含量相减的结果，含量表示为OD412·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>FW。

### 1.3 数据统计

上述每项测定至少重复3次。全部结果用Microsoft Excel 2010计算平均值和标准误(±SE)，用SPSS 19.0进行Duncan's多重差异显著性分析( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 SA处理对果实MDA含量的影响

贮藏期间，处理和对照果实的MDA含量在贮藏期间显著升高，处理果实的MDA的含量在贮藏的中后期低于对照，第10d时低于对照14.6%( $P<0.05$ ) (图1)。MDA含量的结果表明，SA处理维持了厚皮甜瓜果实细胞膜的完整性。

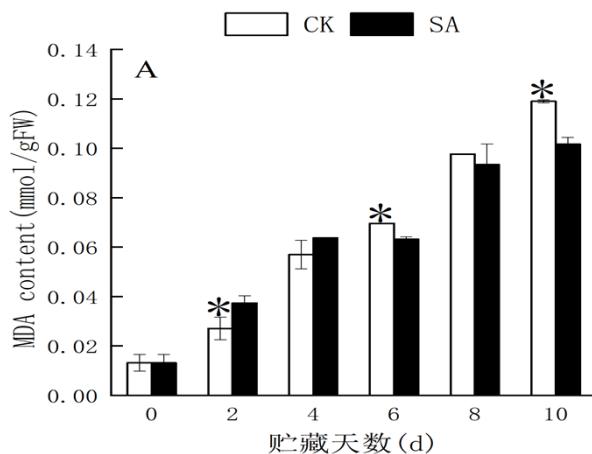


图1 SA处理对厚皮甜瓜果实MDA含量的影响。图中竖线表示标准误(±SE)。\*代表差异显著( $P<0.05$ )。

**Fig.1 Effects of SA treatment on the MDA content in muskmelons. Bars present standard error (±SE). Asterisks indicate significant differences ( $P<0.05$ ).**

### 2.2 SA处理对果实O<sub>2</sub><sup>·</sup>产生速率和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响

贮藏期间，处理和对照果实的O<sub>2</sub><sup>·</sup>产生速率呈先升高后降低再升高的趋势，SA处理果实的O<sub>2</sub><sup>·</sup>产生速率均显著高于对照，第2d高出同期对照的1.9倍( $P<0.05$ ) (图2A)。处理和对照果实的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量在贮藏期间呈现先上升后下降的趋势，处理果实的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量显著高于对照，处理后第6d

高出对照 29.7% ( $P<0.05$ ) (图 2B)。O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量结果表明，SA 处理促进了厚皮甜瓜果实的氧爆。

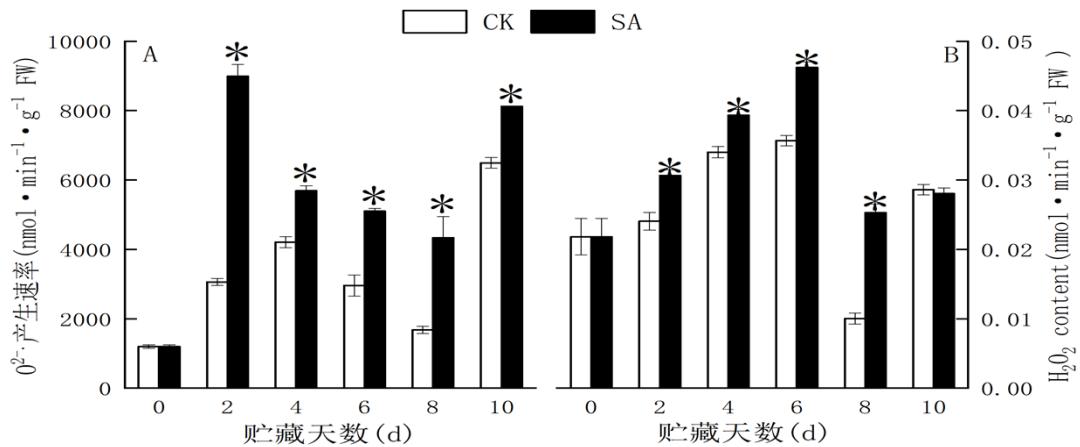


图 2 SA 处理对厚皮甜瓜果实 O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率 (A) 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量 (B) 的影响. 图中竖线表示标准误 ( $\pm$ SE) . \*代表差异显著 ( $P<0.05$ ) .

**Fig.2 Effects of SA treatment on the O<sub>2</sub><sup>-</sup> production rate (A) and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content (B) in muskmelons. Bars present standard error ( $\pm$ SE). Asterisks indicate significant differences ( $P<0.05$ ).**

### 2.3 SA 处理对果实 SOD 及 CAT 活性的影响

贮藏期间，处理和对照果实的 SOD 活性均呈先下降后上升再下降的趋势，处理果实的 SOD 活性整体高于对照，第 6d 高于对照 21.3% ( $P<0.05$ ) (图 3A)。处理和对照果实的 CAT 活性在贮藏期间呈下降趋势，处理果实的活性明显低于对照，第 4d 低于对照 22.9% ( $P<0.05$ ) (图 3B)。SOD 和 CAT 活性的结果表明，SA 处理提高了厚皮甜瓜果实的 SOD 活性，但抑制了 CAT 活性。

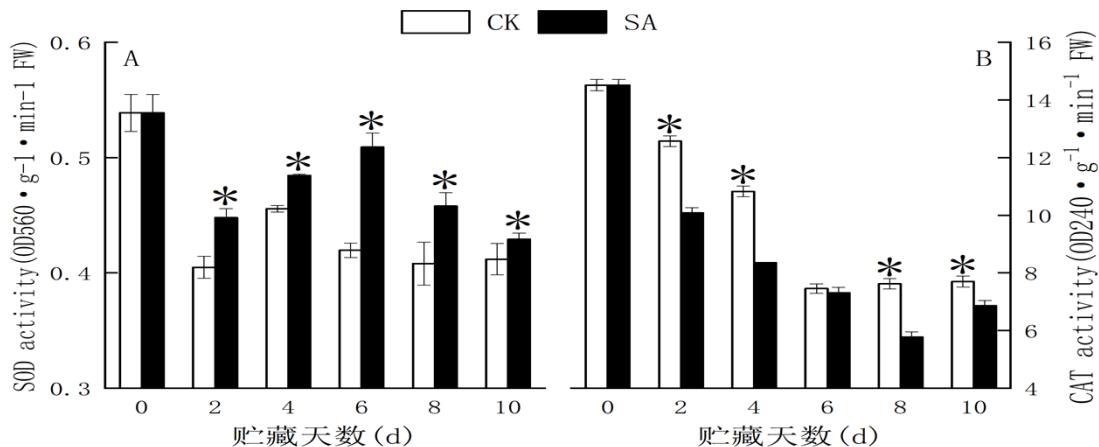


图 3 SA 处理对厚皮甜瓜果实 SOD (A) 和 CAT (B) 活性的影响. 图中竖线表示标准误 ( $\pm$ SE) . \*代表差异显著 ( $P<0.05$ ) .

**Fig.3 Effects of SA treatment on the activity of SOD (A) and CAT (B) in muskmelons. Bars present standard error ( $\pm$ SE).**

Asterisks indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

### 2.4 SA 处理对果实 AsA-GSH 循环代谢活性的影响

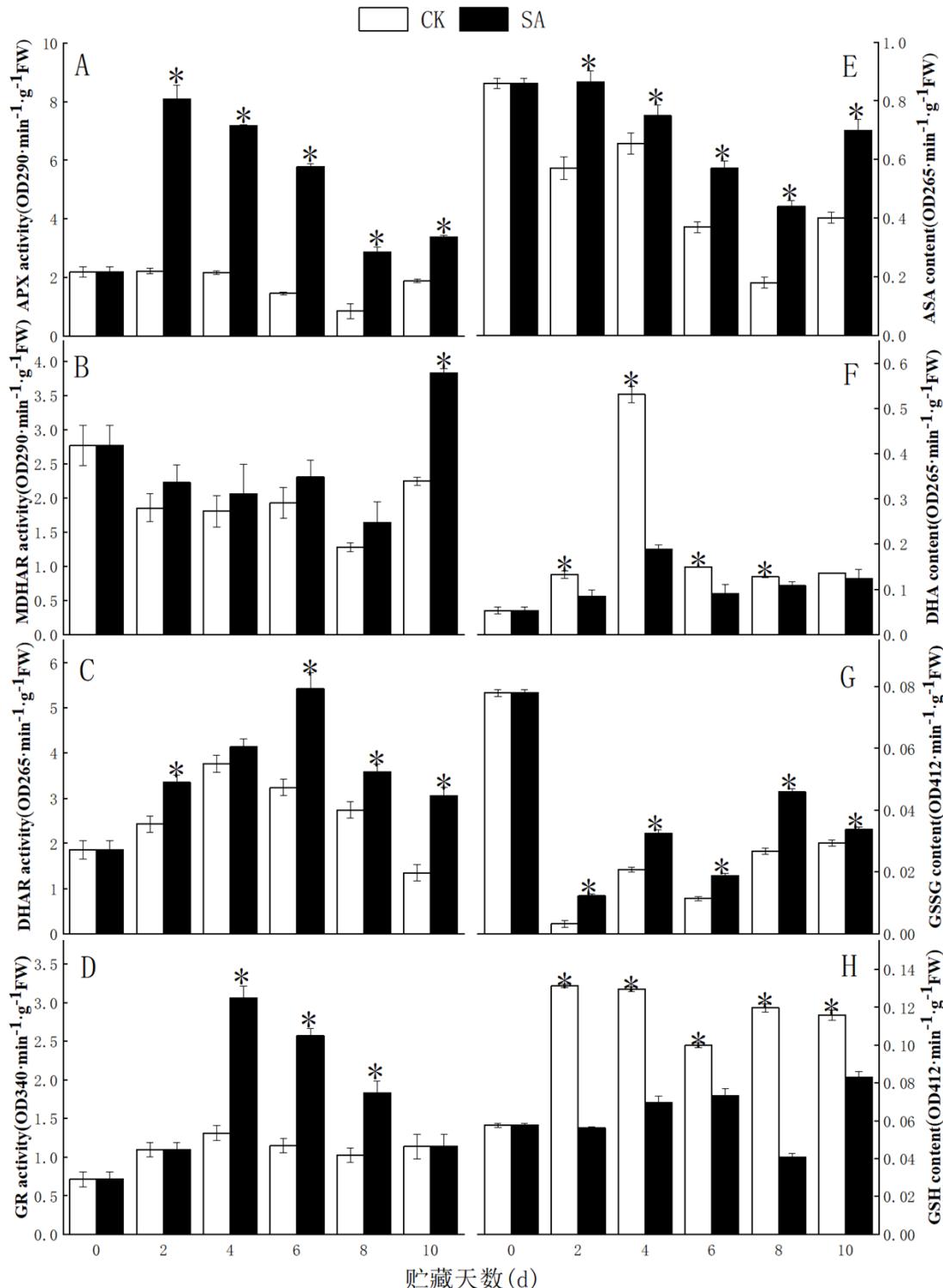


图 4 SA 处理对厚皮甜瓜果实 APX (A)、MDHAR (B)、DHAR (C) 和 GR (D) 活性, 以及 AsA (E)、DHA (F)、GSSG (G) 和 GSH (H) 含量的影响. 图中竖线表示标准误 ( $\pm$ SE). \*代表差异显著 ( $P<0.05$ ) .

Fig.4 Effects of SA treatment on the activity of APX (A), MDHAR (B), DHAR (C) and GR (D), and the content of AsA (E), DHA (F), GSSG (G) and GSH (H) in muskmelons. Bars present standard error ( $\pm$ SE). Asterisks indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

贮藏期间, 处理果实的 APX 活性整体呈先上升后下降的趋势, 对照果实的活性基本保持平稳, 后期缓慢降低。处理果实的 APX 活性明显高于对照, 第 2d 高出对照的 2.6 倍 ( $P<0.05$ ) (图 4A)。

处理和对照果实的 MDHAR 活性在贮藏期间呈先下降后上升的趋势，处理果实的活性明显高于对照，处理后第 10d 高于对照 70.8% ( $P<0.05$ ) (图 4B)。同样，处理和对照果实 DHAR 活性在贮藏期间呈现先上升后下降的趋势，处理果实的活性明显高于对照，第 6d 时高于对照 67.8% ( $P<0.05$ ) (图 4C)。处理果实的 GR 活性在贮藏期间呈现先上升后下降的趋势，对照果实的活性则缓慢上升并趋于平稳，处理果实 GR 活性明显高于对照，处理后第 4d 高于对照果实的 1.3 倍 ( $P<0.05$ ) (图 4D)。

贮藏期间，处理和对照果实中 AsA 含量呈先下降后上升的趋势，但处理果实的 AsA 含量明显高于对照，第 8d 高于对照果实的 1.4 倍 ( $P<0.05$ ) (图 4E)。处理和对照果实 DHA 含量在贮藏期间先上升后下降并趋于平稳，处理果实的 DHA 含量明显低于对照，处理后第 4d 低于对照 64.2% ( $P<0.05$ ) (图 4F)。同样，对照和处理果实中 GSSG 含量在贮藏期间呈缓慢上升的趋势，但处理果实的 GSSG 含量明显高于对照，第 8d 高出对照 71.5% ( $P<0.05$ ) (图 4G)。处理果实的 GSH 含量在贮藏期间呈先上升后降低的趋势，对照果实的 GSH 含量呈先上升后平稳降低的趋势，但处理果实的 GSH 含量明显低于对照，处理后第 8d 低于同期对照 66.1% ( $P<0.05$ ) (图 4H)。上述结果表明，SA 处理激活了厚皮甜瓜果实的 AsA-GSH 循环，促进了  $H_2O_2$  的清除。

### 3 讨论

氧爆是水杨酸及其类似物处理果实后的典型反应<sup>[3]</sup>。所导致的氧爆主要由  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  组成，氧爆期间  $O_2^-$  的主要来源于 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidases, NOX)，NOX 从 NADPH 转移电子给  $O_2$ ，从而产生  $O_2^{[15]}$ ，很快在 SOD 作用下歧化为  $H_2O_2^{[7]}$ 。氧爆早期的少量  $H_2O_2$  可作为信号分子激活相关防御反应，而后期产生的大量  $H_2O_2$  则具有直接抑菌、促进氧化交联等作用<sup>[25]</sup>。有研究表明，BTH 处理可提高苹果果实 NOX 和 SOD 活性，进而导致  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  的积累<sup>[10]</sup>，该结果与本研究我们观察到的结果基本一致。由于活性氧会提高脂氧合酶和磷脂酶 D 的活性，导致多不饱和脂肪酸的降解，从而增加脂质饱和度，改变膜的流动性，形成 MDA 等脂质过氧化物<sup>[26]</sup>。虽然本研究我们观察到 SA 处理导致了厚皮甜瓜果实  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  的显著积累，但抑制了 MDA 产生。由此表明，SA 处理还激活了厚皮甜瓜果实的抗氧化系统，避免了过量活性氧对细胞膜的伤害。

SOD 是生物体内存在的唯一可以歧化  $O_2^-$  的酶，可将  $O_2^-$  歧化生成  $H_2O_2^{[27]}$ 。有研究表明，SA 的类似物 BTH 可作为信号分子可激活 SOD 基因表达<sup>[28]</sup>。本研究我们发现，SA 提高了厚皮甜瓜果实的 SOD 活性，促进了  $O_2^-$  的歧化。该结果与 SA 提高梨果实 SOD 活性的结果类似<sup>[29]</sup>。CAT 是植物抗氧化系统中最重要的  $H_2O_2$  清除酶，可以将  $H_2O_2$  还原成水和  $O_2^{[30]}$ 。CAT 活性的增强或减弱与植物细胞内的氧化还原平衡密切相关<sup>[31]</sup>。但本研究我们观察到，SA 处理抑制了厚皮甜瓜果实的 CAT 活性，该结果与 SA 处理柑橘后观察到的 CAT 活性被抑制结果类似<sup>[8-9]</sup>。由此表明，诱抗剂处理所引发的过量  $H_2O_2$  的清除可能依赖于其他清除系统。

AsA-GSH 循环是存在于植物体内的重要  $H_2O_2$  清除系统，在有效清除  $H_2O_2$  的水平中发挥着重要作用<sup>[32]</sup>。APX 是 AsA-GSH 循环的第一个酶，能专一性地催化 ASA 与  $H_2O_2$  反应形成 MDHA<sup>[31]</sup>。GR 是一种黄素蛋白氧化还原酶，能将谷胱甘肽二硫化物还原为巯基形式<sup>[7]</sup>。GR 也是一种重要的抗

氧化酶，可保护酶蛋白的巯基，GR 还能再生 ASA，进一步降低氧化应激<sup>[33]</sup>。本研究我们发现，SA 处理能通过增强 APX 和 GR 活性来清除过量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，该结果与 BTH 增强草莓和苹果果实 APX 和 GR 活性结果类似<sup>[5,10]</sup>。MDHAR 是一种黄素腺嘌呤二核苷酸酶，以叶绿体和细胞溶质同工酶的形式存在。MDHAR 可以协同 APX 清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[7]</sup>。DHAR 是存在于 ASA 和 DHA 之间的另一种重要的酶，在 GSH 和 NADH 存在的条件下，催化 DHA 向 ASA 转变<sup>[34]</sup>。本研究我们观察到的 SA 提高 DHAR 和 MDHAR 活性的结果与 SA 处理萝卜观察到的结果类似<sup>[35]</sup>。ASA 是植物组织普遍存在的重要的抗氧化剂<sup>[32]</sup>，可去除·OH，淬灭 O<sub>2</sub><sup>·</sup>，降低 O<sub>2</sub><sup>·</sup>产生速率，并催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub><sup>[36]</sup>。AsA 可被 APX 氧化为 MDHA，然后形成 DHA，同时在 MDAR 和 DHAR 存在时，AsA 可由 MDHA 和 DHA 再生<sup>[37]</sup>。此外，AsA 再生也与 GSH 通过 DHAR 氧化为 GSSG 有关<sup>[37]</sup>。有研究表明，SA 是植物应对环境胁迫的重要调节和信号转导物质，可以提高 AsA 含量<sup>[37]</sup>。本研究我们发现，SA 处理明显促进了厚皮甜瓜果实的 AsA 积累，抑制了 DHA 的生成，该结果与 BTH 处理增强苹果果实 ASA 含量<sup>[10]</sup>和 SA 处理抑制柑橘果实 DHA 含量<sup>[9]</sup>观察到的结果相似。谷胱甘肽是具有抗氧化功能的小分子短肽<sup>[9]</sup>。本研究我们观察到，SA 会使厚皮甜瓜果实 GSSG 含量升高，GSH 含量降低，由此表明，GSH 在清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中发挥了重要作用。

#### 4 结论

采后 SA 处理促进了厚皮甜瓜果实 O<sub>2</sub><sup>·</sup>和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生，但抑制了 MDA 产生。SA 处理提高了果实 SOD 活性，但抑制 CAT 活性。SA 处理激活了果实 APX、MDHAR、DHAR 及 GR 活性，提高了 GSSG 和 AsA 含量，降低了 GSH 和 DHA 的水平。由此表明，由 SA 激发的厚皮甜瓜果实过量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要通过 AsA-GSH 循环来清除。

#### 参考文献：

- [1] BI Y, LI Y C, GE Y H, WANG Y. Induced resistance in melons by elicitors for the control of postharvest diseases[M]. In: Prusky D, Gullino M L (eds.), Post-harvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century. Springer, Switzerland, 2009, 2:31-41. DOI: 10.1007/978-1-4020-8930-5\_3.
- [2] LI X, BI Y, WANG J, DONG B, LI H, GONG D, ZHAO Y, TANG Y M, YU X Y, SHANG Q. BTH treatment caused physiological, biochemical and proteomic changes of muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit during ripening[J]. Journal of Proteomics, 2015, 120, 179-193. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.03.006.
- [3] GE Y H, DENG H W, BI Y, LI C Y, LIU Y Y. The role of reactive oxygen species in ASM-induced disease resistance in apple fruit[M]. In: Prusky D, Gullino ML (eds.), Post-harvest Pathology. Plant Pathology in the 21st Century. Springer, Switzerland, 2014, 7: 39-52.
- [4] 毕阳.果蔬采后病害:原理与控制 [M]. 北京: 科学出版社. 2016, 199-201
- [5] CAO S F, HU Z C, ZHENG Y H, YANG Z F, LU B H. Effect of BTH on antioxidant enzymes, radical-scavenging activity and decay in strawberry fruit[J]. Food Chemistry, 2011, 125: 145-149. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.051.
- [6] CZARNOCKA W, KARPIŃSKI S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses[J]. Free Radical Biology and Medicine. 2018, 122: 4-20. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011.

- [7] 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. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- [8] ZHU F, CHEN J J, XIAO X, ZHANG M F, YUN Z, ZENG Y L, XU J, CHENG Y J, DENG X X. Salicylic acid treatment reduces the rot of postharvest citrus fruit by inducing the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, primary metabolites and lipophilic polymethoxylated flavones[J]. *Food Chemistry*, 2016, 207: 68-74. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.03.077.
- [9] HUANG R H, LIU J H, LU Y M, XIA R X. Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of ‘Cara cara’ navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 47: 168-175. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2007.06.018.
- [10] WEI M L, GE Y H, LI C Y, HAN X, QIN S C, CHEN Y R, TANG Q, LI J R. G6PDH regulated NADPH production and reactive oxygen species metabolism to enhance disease resistance against blue mold in apple fruit by acibenzolar-S-methyl[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 148: 228-235. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2018.05.017.
- [11] LI Y L, LIU Y F, ZHANG J G. Advances in the research on the AsA-GSH cycle in horticultural crops[J]. *Frontiers of Agriculture in China*, 2010, 4: 84-90. DOI: 10.1007/s11703-009-0089-8.
- [12] GE Y H, DENG H W, BI Y, LI C Y, LIU Y Y, DONG B Y. Postharvest ASM dipping and DPI pre-treatment regulated reactive oxygen species metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 99: 160-167. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2014.09.001.
- [13] 范存斐, 毕阳, 王云飞, 任亚琳, 杨志敏, 王毅. 水杨酸对厚皮甜瓜采后病害及苯丙烷代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 3: 584-589. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2012.03.022.
- [14] LESTER G E, BRUTON B D. Relationship of netted muskmelon fruit water loss to postharvest storage life[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1986, 111: 727-731.
- [15] REN Y L, WANG Y F, BI Y, GE Y H, WANG Y, FAN C F, LI D Q, DENG H W. Postharvest BTH treatment induced disease resistance and enhanced reactive oxygen species metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit[J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234: 963-971. DOI: 10.1007/s00217-012-1715-x.
- [16] HODGES D M, DELONG J M, PRANGE F R K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. *Planta*, 1999, 207: 604-611. DOI: 10.2307/23385611.
- [17] PROCHAZKOVA D , SAIRAM R K , SRIVASTAVA G C , SINGH D V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves[J]. *Plant Science*, 2001, 161: 0-771. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00462-9.
- [18] LACAN D, BACCOU J. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits[J]. *Planta*, 1998, 204: 377-382. DOI: 10.1007/s004250050269.
- [19] OBERLEY L, SPITZ D. Nitroblue tetrazolium. Handbook of methods for oxygen radical research[M]. In: Greenwald W.A. (ed.), CRC press, Boca Raton, 1985: 217-220.
- [20] CLAIRBONE A. Catalase activity—Handbook of methods for oxygen radical research[M]. In: Greenwald W.A. (ed.), CRC press, Boca Raton., 1985: 283-284.
- [21] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1981, 22: 867-880. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- [22] HALLIWELL B, FOYER C H. Properties and physiological function of a glutathion reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography[J]. *Planta*, 1978, 139: 9-17. DOI: 10.2307/23373245.
- [23] TURASÁNYI E, LYONS T, PIÖCHL M, BARNES J. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 901-910. DOI: 10.1093/jexbot/51.346.901.

- [24] BREHE J E, BURCH H B. Enzymatic assay for glutathione[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 74: 189-197.
- [25] TORRES R, VALENTINES M C, USALL J, I VUIÑAS, LARRIGAUDIERE C. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in ‘Golden Delicious’ apple fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 27(3), 235-242. DOI: 10.1016/s0925-5214(02)00110-2.
- [26] AGHDAM M S, ASGHARI M, KHORSANDI O, MOHAYEJI M. Alleviation of postharvest chilling injury of tomato fruit by salicylic acid treatment[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51:2815-2820. DOI: 10.1007/s13197-012-0757-1.
- [27] GE Y, TANG Q, LI C, DUAN B, LI X, WEI M, LI J. Acibenzolar-S-methyl treatment enhances antioxidant ability and phenylpropanoid pathway of blueberries during low temperature storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 110: 48-53. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.04.069.
- [28] DEEPAK S A, ISHII H, PARK P. Acibenzolar-S-methyl primes cell wall strengthening genes and reactive oxygen species forming/scavenging enzymes in cucumber after fungal pathogen attack[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2006, 69: 52-61. DOI: 110.1016/j.pmpp.2006.12.006.
- [29] IMRAN H, ZHANG Y X, DU G Q, WANG G Y, ZHANG J H. Effect of salicylic acid (SA) on delaying fruit senescence of Huang Kum pear[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2007, 1: 456-459. DOI: 10.1007/s11703-007-0075-y.
- [30] KRANTEV A, YORDANOVA R, JANDA T, SZALAI G, POPOVA L. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165: 920-931. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.11.014.
- [31] IMAHORI Y, BAI J, BALDWIN E. Antioxidative responses of ripe tomato fruit to postharvest chilling and heating treatments[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 198: 398-406. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.12.006.
- [32] PU F, REN X L. Ascorbate levels and activities of enzymes related to the glutathione-ascorbate cycle in fruits of Chinese persimmon cultivars[J]. Horticulture, Environment and Biotechnology, 2014, 55: 315-321. DOI: 10.1007/s13580-014-0177-4.
- [33] CHUMYAM A, SHANK L, FAIYUE B, UTHAIBUTRA J, SAENGNIL K. 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. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.05.022.
- [34] HALLIWELL B. Ascorbic acid and the illuminated chloroplast[J]. Advances in Chemistry, 1982, 263-274. DOI: 10.1021/ba-1982-0200.ch012.
- [35] DEVI J, BHATIA S, ALAM M S, DHILLON T S. Effect of calcium and salicylic acid on quality retention in relation to antioxidative enzymes in radish stored under refrigerated conditions[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55: 1116-1126. DOI: 10.1007/s13197-017-3027-4.
- [36] LIN Y F, LIN Y X, LIN H T, ZHANG S, CHEN Y H, SHI J. Inhibitory effects of propyl gallate on browning and its relationship to active oxygen metabolism in pericarp of harvested longan fruit[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60: 1122-1128. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.10.008.
- [37] JIN Y H, TAO D L, HAO Z Q, Ye J, Du Y J, LIU H L, ZHOU Y B. Environmental stresses and redox status of ascorbate[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45: 795-801. DOI: 10.1038/sj.onc.1206615.