

外源水杨酸和内源 H₂O₂对黄瓜抗冷性的影响

代晓霞 生吉萍 申琳

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 以“赖多星”荷兰小黄瓜为试材,研究了外源水杨酸(SA)处理和用二甲基硫脲(DMTU)抑制内源 H₂O₂ 处理对 2 冷藏条件下黄瓜果皮细胞膜系统的伤害以及对活性氧代谢的影响。SA 处理诱导了冷藏初期果实中 H₂O₂ 含量的升高,延缓了丙二醛(MDA)和膜渗透率的增加,提高了低温下果实过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性,超氧化物歧化酶(SOD)活性冷藏后期有所增加,在冷藏结束时 CAT、APX 和 SOD 活性分别比对照提高 57.1%、92.3%和 23.1%。过氧化物酶(POD)活性冷藏前后没有明显变化,推测 SOD、POD 不是抗冷系统中的关键因子。抑制内源 H₂O₂ 后进行水杨酸处理,MDA 含量和细胞膜渗透率增加,抑制了 CAT、APX 的活性。结果显示,SA 处理可以有效提高黄瓜的耐冷性,减少低温对细胞膜系统的伤害,提高抗氧化酶的活性。抑制内源 H₂O₂ 后显著抑制了由 SA 诱导的黄瓜耐冷性的提高,说明冷藏初期内源 H₂O₂ 在 SA 诱导的果实抗冷性中发挥重要作用。

关键词 黄瓜;水杨酸;H₂O₂;活性氧;冷害

中图分类号 S 609.3; S 642.2

文章编号 1007-4333(2007)01-0068-05

文献标识码 A

Effect of exogenous salicylic acid and endogenous H₂O₂ on physiological parameters in cold stored cucumber

Dai Xiaoxia, Sheng Jiping, Shen Lin

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The effect on the injury of cell membrane and metabolism of dynamic changes of reactive oxygen in a cold-stored cucumber at 2 by salicylic acid (SA) treatment and pretreatment with dimethylthiourea (a trap for H₂O₂) before SA treatment was studied. A SA treatment enhanced the endogenous H₂O₂ content in the beginning of storage, postponed the increases of MDA and relative ratio of electrolyte and increased the activities of CAT and APX. The activity of SOD was increased in the end of storage and the activity of POD had no obvious changes before and after the storage. Compared with the controls, at the end of storage the activities of CAT, APX and SOD of SA treatment increased by 57.1%, 92.3% and 23.1%, respectively, which hinted that they are not the key enzymes in antioxidant enzyme system. The relative ratio of electrolyte and MDA content were remarkably increased by pretreatment with dimethylthiourea before SA treatment and furthermore, the activities of CAT and APX were inhibited, which might aggravate chilling damage. These results indicated that exogenous SA treatment increased cold tolerance of cucumber; pretreatment with dimethylthiourea (a trap for H₂O₂) remarkably inhibited cold tolerance induced by salicylic acid and endogenous H₂O₂ might be required for SA-enhanced cold tolerance.

Key words cucumber; salicylic acid; H₂O₂; reactive oxygen; chilling injury

冷害机理是植物生理界研究的热点,而过氧化氢(H₂O₂)与冷害的关系是近年来研究的焦点。长期以来,H₂O₂被认为是植物细胞具有毒害作用的

代谢产物,然而近年来被作为植物细胞内的一个信号分子而受到关注,其信号转导作用已被越来越多的实验所证实^[1]。植物在亚致死低温下细胞内

收稿日期:2006-04-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571296;30671471)

作者简介:代晓霞,硕士研究生;生吉萍,副教授,通讯作者,主要从事果蔬采后生物技术研究,E-mail:pingshen@cau.edu.cn

H₂O₂ 含量迅速提高^[27-31], 对冬小麦喷施低浓度 H₂O₂ 和过氧化氢酶(CAT)抑制剂(aminotriazole, 可诱导内源 H₂O₂ 累积)可提高其抗寒性。喷施 H₂O₂、脱落酸和低温锻炼等处理成功地诱导了玉米苗的耐冷性^[2], 而低温锻炼与 ABA 处理相应地诱导了细胞 H₂O₂ 含量的提高^[4]。在香蕉幼苗上喷施 H₂O₂ 和 Ca²⁺ 也提高了其抗冷性, 诱导了抗氧化酶活性的提高^[5]。上述研究表明 H₂O₂ 参与了果实采后冷害及耐冷性诱导。韩涛等发现, 外源水杨酸(SA)处理的大久保桃在冷藏期间游离脯氨酸和丙二醛累积都小于对照^[6]; 康国章等在对香蕉幼苗的抗冷性研究中, 用抑制内源 H₂O₂ 的物质二甲基硫脲(DMTU)处理幼苗后再进行 SA 处理, 显著抑制了外源 SA 对幼苗的抗冷作用。虽已发现 SA 和 H₂O₂ 能够提高作物的抗冷性, 但关于其在采后果实冷害方面应用的报道很少。本研究旨在通过对主要外源 SA 处理及处理前抑制内源 H₂O₂ 处理对黄瓜冷害的影响及对活性氧代谢调节差异的研究, 探讨 SA 处理是否能够减轻黄瓜采后冷害, 及这种作用是否需要前期 H₂O₂ 信号的参与。

1 材料与方法

1.1 试材处理

试验选用“赖多星”荷兰小黄瓜, 采自北京顺义区大孙各庄镇无公害标准化蔬菜生产基地大棚, 选择瓜条饱满、顺直、粗细均匀, 无病虫害和机械损伤的黄瓜为试材, 用白色泡沫箱包装即时运回中国农业大学食品科学与营养工程学院果蔬采后冷藏和保鲜实验室进行试验处理测定。试材分 3 组, 第 1 组为对照组(CK), 蒸馏水处理; 第 2 组为 SA 处理, SA 质量浓度 0.002 g/L; 第 3 组用 DMTU 抑制内源 H₂O₂ 产生后再进行 SA 处理(DMTU + SA), 二甲基硫脲处理浓度 10 mmol/L。处理方法: 将黄瓜放入盛有处理溶液(或蒸馏水)的大型干燥器中, 用真空泵抽真空, -0.04 MPa 1 min 20 s, 真空渗透后常压下浸透 5 min, 自然晾干, 置于清洁塑料筐中, 用 0.04 mm 聚乙烯薄膜包装, 冷藏于(2 ± 1) 冷库中。每隔 3 d 取样 1 次, 取黄瓜中部果皮及以下 1 mm 部分, 切碎并迅速用液氮冻存, -20 保存。3 次重复。

1.2 测定方法

1) 细胞膜渗透率的测定。采用电导法 Correllius^[7]略有改进。每次取黄瓜 6 根, 3 次重复。分别

在每根黄瓜的食用部分随机用打孔器取下 2~3 小块, 用不锈钢刀把果皮切下, 制成直径约 1 mm 的圆片。分别用蒸馏水和双蒸水洗涤 1 次, 滤纸吸干, 取 15 个果皮圆片放入 20 mL 双蒸水浸泡 2 h, 用 DDS-11 型电导仪测定渗出电导率 C₀ 后, 沸水中煮 5 min, 冷却至室温, 定容至沸水浴前体积, 测定总电导率 C。果实细胞膜透性 = C₀/C。

2) 丙二醛(MDA)含量测定。采用硫代巴比妥酸法^[8]。

3) H₂O₂ 含量测定。参照 Brennan^[9]方法。

4) 抗氧化酶活性测定。

a. 酶液提取方法。称取果皮 1.0 g, 用 5 mL 样品提取液(pH7.0, 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 1 mmol/L EDTA 和 1% PVP(可溶性聚乙烯吡咯烷酮))冰浴研磨匀浆, 12 000 g(4)离心 10 min, 上清液用于酶活测定。3 次重复。

b. CAT 活性测定。参照 Aebi^[10]方法。

c. 超氧化物歧化酶(SOD)比活性测定。采用 NBT 法(Constantine^[11])略有改进。SOD 反应底物见表 1。取 4 支试管, 向每管中加入 3 mL 底物, 再向其中 3 管中分别加入 0.2 mL 酶液, 日光灯下照射 10 min, 560 nm 波长下比色测量光密度, 蒸馏水为对照。以抑制底物氮蓝四唑光还原相对百分率 50% 为 1 个酶活单位, U; 样品酶比活性, U/g。

$$\text{SOD 酶比活性} = 2(s - a) / (b - a) \times n / m$$

式中: s 为样品照光后的吸光值, a 和 b 分别为未加酶的反应液照光后和照光前的吸光值; n 为酶液稀释倍数, n = 提取酶液体积/所用酶液体积; m 为样品质量, g。

表 1 SOD 反应底物成分

Table 1 Ingredient of SOD reactant

编号	加入物质	浓度/(mol/L)	溶剂体积/mL
1	磷酸缓冲液(pH7.8)	5.0 × 10 ⁻²	
2	甲硫氨酸	1.3 × 10 ⁻²	300
3	氮蓝四唑	6.3 × 10 ⁻⁵	300
4	核黄素	1.3 × 10 ⁻⁶	300
5	乙二胺四乙酸	0.1 × 10 ⁻⁶	300

注: 1、2、3 和 1、4、5 配成 2 种溶液, 各取 1.5 mL 成 3 mL 反应液。

d. 过氧化物酶(POD)活性测定^[7]。采用愈创木酚法。

e. 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定。参照 Nakano^[12]方法。3 mL 反应液中含 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0), 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L

H_2O_2 , 0.5 mmol/L 抗坏血酸, 加入 0.2 mL 酶液启动反应, 连续记录室温、290 nm 波长下吸光值的变化, 以不加 H_2O_2 为对照。以每 min 氧化 $1 \mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸为 1 个酶活单位, U; 酶比活性以鲜质量 (FW) 计, U/g。

2 结果与分析

2.1 黄瓜冷藏期间果实细胞膜渗透率和丙二醛质量摩尔浓度的变化

膜渗透率的变化反映了细胞膜低温下受伤害的程度, MDA 是脂质过氧化的产物, 其浓度高低可在一定程度上反应细胞膜损伤程度的大小。从图 1 (a) 可以看出, 对照果实细胞膜渗透率在整个冷藏期间是一直增加的, 冷藏前 4 d 变化比较缓慢, 第 4 天后迅速增大。SA 处理在冷藏前后 7 d 果实膜渗透率与对照差别不大, 比对照略低, 但之后增加缓慢,

以致明显低于对照, 第 10 天与对照差异达极显著水平 ($P < 0.01$), 第 14 天 SA 处理膜渗透率为 29.4%, 而对照为 45%。DMTU + SA 处理在冷藏前后 7 d 果实膜渗透率与对照无显著性差异, 之后其升高速度有所减慢, 但与 SA 处理差异极显著 ($P < 0.01$)。上述结果表明 SA 处理能够减缓冷藏后期果实膜透性的增大速度, 一定程度上减少冷害的发生; 但 DMTU + SA 处理对于果实膜透性的增大速度没有明显减缓作用。

由图 1 (b) 可见, MDA 质量摩尔浓度的变化与细胞膜透性的变化率有相似性, 在整个冷藏过程中, SA 处理 MDA 质量摩尔浓度一直低于对照和 DMTU + SA 处理, 且冷藏第 4 天后比冷藏前期增加缓慢, 与 DMTU + SA 处理和对照差异显著 ($P < 0.05$)。可见 SA 处理能够抑制膜脂过氧化, 减少冷害的发生。

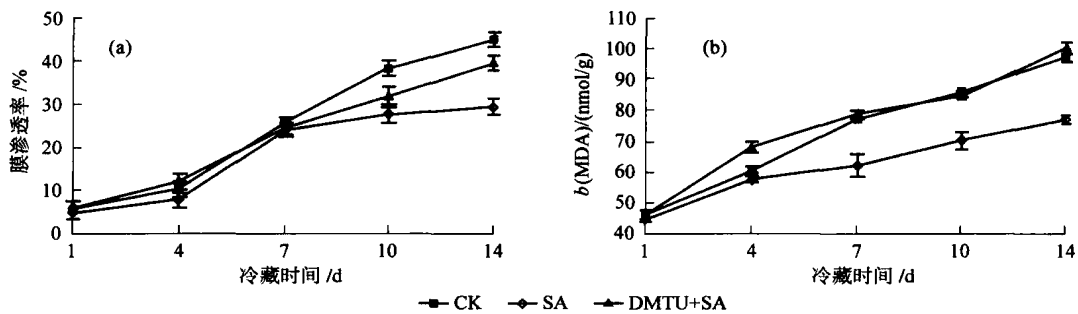


图 1 冷藏期间黄瓜果实细胞膜渗透率 (a) 和丙二醛质量摩尔浓度 $b(\text{MDA})$ (b) 的变化
Fig. 1 Changes of membrane electrolyte leakage (a) and $b(\text{MDA})$ (b) of pericarp of cucumber during storage at 2

2.2 黄瓜冷藏期间果皮 H_2O_2 质量摩尔浓度的变化

冷藏第 1 天 SA 处理黄瓜果皮中 H_2O_2 浓度急剧升高 (图 2), 与对照和 DMTU + SA 处理差异极显著; 在以后的冷藏过程中其 H_2O_2 浓度逐渐降低, 自冷藏第 4 天起直到冷藏结束含量均低于 DMTU +

SA 处理, 且差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。冷藏期间对照黄瓜果皮 H_2O_2 浓度先升高后降低, 在第 7 天达到最大值。DMTU + SA 处理与对照有相同的变化趋势, 最大值在冷藏第 4 天出现, 第 7 天后与对照没有显著性差异。推测 SA 处理这种初期应激的 H_2O_2 增加, 可能引起抗氧化酶系活性的提高。

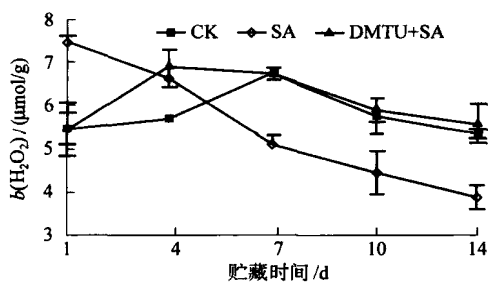


图 2 冷藏期间黄瓜果皮 H_2O_2 质量摩尔浓度 $b(\text{H}_2\text{O}_2)$ 的变化

Fig. 2 Changes in H_2O_2 content in pericarp of cucumber during storage at 2

2.3 黄瓜冷藏期间抗氧化酶活性的变化

抗氧化酶活性的高低与果实的抗冷性密切相关, 由图 3 (a) 可见, 在整个冷藏过程中 SA 处理 SOD 比活性逐渐升高, 但冷藏 7 d 后升高速度较冷藏前期缓慢; 对照和 DMTU + SA 处理在冷藏 7 d 后 SOD 比活性开始降低, 并持续到冷藏结束, 且整个冷藏过程中 DMTU + SA 处理 SOD 比活性一直低于对照; 冷藏 10 d 后 SA 处理 SOD 比活性高于对照。

冷藏过程中对照 CAT 比活性先升高后降低 (图 3 (b)), 在冷藏第 7 天达到最大值, 冷藏后期变化缓

慢。DMTU + SA 处理 CAT 比活性的变化趋势与对照大致相似,但冷藏前 10 d 都低于对照,且差异达显著水平 ($P < 0.05$),冷藏 10 d 后 CAT 比活性略高于对照。SA 处理在冷藏前 7 d CAT 比活性迅速上升,冷藏后期活性变化较小,但一直维持在较高水平,在冷藏第 14 天分别为对照和 DMTU + SA 处理的 1.5 和 1.3 倍。整个冷藏过程中,SA 处理与对照和 DMTU + SA 处理差异极显著 ($P < 0.01$)。

由图 3(c) 可见,冷藏初期 SA 处理和 DMTU + SA 处理均不能提高 POD 比活性,冷藏前 2 d,2 处理 POD 比活性均低于对照。在之后的冷藏过程中,SA 处理 POD 比活性显著提高,到第 4 天达到最大

值,然后逐渐降低;而 DMTU + SA 处理在冷藏第 7 天达到最大值后,冷藏后期 POD 比活性变化不大。冷藏后期对照 POD 比活性一直维持在一个较低水平,低于 SA 和 DMTU + SA 处理。

整个冷藏过程中,各处理 APX 比活性均逐渐降低,但存在差异(图 3(d))。SA 处理并不能在较短的冷藏时间内提高 APX 比活性,在冷藏前 4 d 其 APX 比活性与对照无显著差异;冷藏 4 d 后对照 APX 比活性迅速下降,并持续到冷藏结束;而 SA 处理 APX 比活性下降缓慢。DMTU + SA 处理在整个冷藏过程中 APX 比活性一直低于对照和 SA 处理,且下降较快,与 SA 处理差异显著 ($P < 0.05$)。

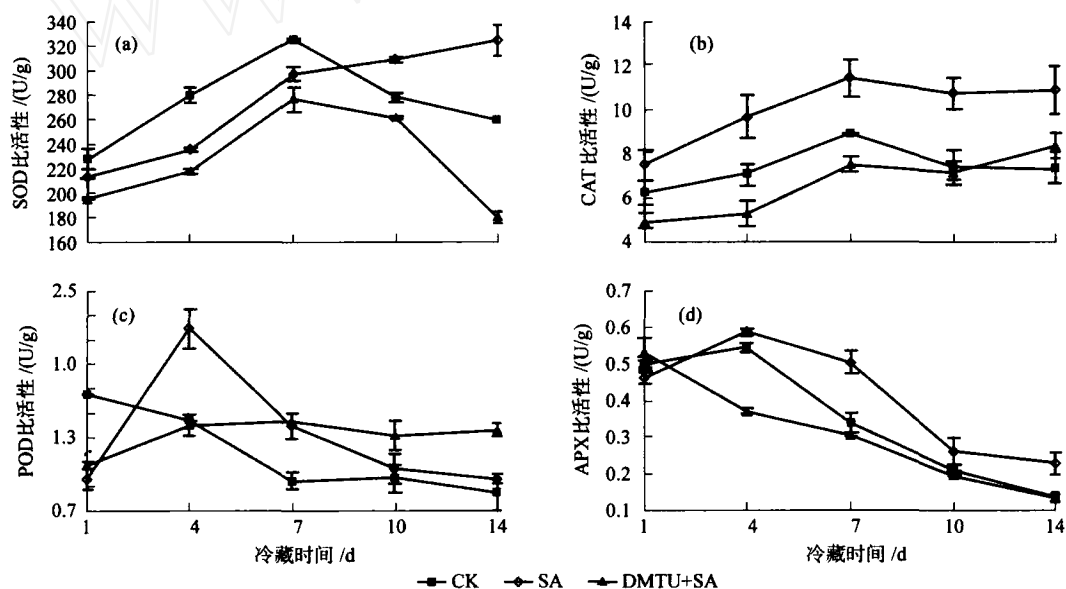


图 3 冷藏期间黄瓜果皮抗氧化酶 SOD、CAT、POD、APX 比活性的变化

Fig. 3 Changes in activities of SOD, CAT, POD and APX in pericarp of cucumber at 2

3 讨论

研究发现,植物抗冷性高低与其抗氧化酶活性高低密切相关,通过提高抗氧化酶活性可以减少低温胁迫下植物体内自由基的积累。研究还发现, H_2O_2 可以作为一种逆境反应中的信号分子^[13]。本试验中发现,SA 处理可以使黄瓜果皮 H_2O_2 含量在冷藏初期显著增加,同时可以显著提高其 CAT、APX 活性。在冷藏初期及后期,SA 处理的 CAT 处于高活性状态,且显著高于对照,而 DMTU + SA 处理在整个冷藏过程中 CAT 都处于低活性状态,这可能与 SA 处理初期 H_2O_2 含量显著提高有关。本试验中 SA 处理诱导的这种短暂的应激升高的 H_2O_2 可能作为一种信号级联中的一分子,传导至抗氧化

酶系统和其他生理生化反应过程,使机体交互耐受能力提高,使黄瓜果实在低温下的抗逆能力增强。

试验中发现,SA 处理不能使黄瓜的 APX 活性立即升高,但却有提高低温下果实 APX 活性的作用,而 DMTU + SA 处理 APX 的活性受到抑制。试验结果表明,DMTU + SA 处理 CAT、APX 活性受到抑制,这可能是造成黄瓜冷害的重要原因。推测 CAT、APX 是 SA 处理响应的一个方面,且是 SA 处理影响抗氧化系统的重要因子,康国章等对香蕉幼苗的冷害研究中也出现类似的现象^[14]。

SA 处理并不能在冷藏前期提高 SOD 活性,仅在冷藏后期 SOD 活性略有升高。推测 SOD 不是 SA 提高抗冷性的关键因子,其活性的增加可能是由于冷藏后期 O_2 的累积而启动的,并且在抑制内源

H₂O₂ 后再进行 SA 处理其活性也不会有所增加。

POD 在活性氧代谢中有双重功能,其功能通常是降解 H₂O₂,但在病毒侵袭的情况下,一种存在于细胞壁中的 POD 却能产生活性氧^[15]。笔者发现持续冷藏的对照果实 POD 活性逐渐下降,而 DMTU + SA 处理 POD 活性在整个冷藏过程中逐渐增加,SA 处理在冷藏前后没有明显变化,冷藏期间出现过 1 次高峰,推测 POD 不是抗氧化系统中的关键因子,其活性的增加可能是内部活性氧产量的增加或降低而启动或抑制的。

SA 处理可有效提高黄瓜耐冷性,减少低温对细胞膜系统的伤害,提高抗氧化酶活性,从而降低由冷害导致的氧化胁迫。抑制内源 H₂O₂ 后显著抑制了由 SA 诱导的黄瓜耐冷性的提高,说明初期内源 H₂O₂ 在 SA 诱导的果实抗冷性中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5: 388-395
- [2] Prasad T K, Martin B A. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 65-74
- [3] Xiong L M, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought and salt stress[J]. *Plant Cell*, 2002 (Supplement): 165-183
- [4] Prasad T K, Anderson M D, Stewart C R. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108: 1597-1605
- [5] 康国章,陶均,孙谷畴,等. H₂O₂ 和 Ca²⁺ 对受低温胁迫香蕉幼苗抗冷性的影响[J]. *园艺学报*, 2002, 29 (2): 119-122
- [6] 韩涛,李丽萍. 外源水杨酸对冷藏桃果实的生理效应[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37 (3): 203-206
- [7] Correlius S B. Differerebtial expression of the 1-aminocyclopropane 1-carboxylate oxidase gene family of tomato [J]. *Plant Journal*, 1996, 9 (4): 525-535
- [8] 肖红梅,周光宏. 热处理对冷藏番茄活性氧代谢的调节[J]. *食品科学*, 2004, 25 (10): 331-335
- [9] Brennan T C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear[J]. *Plant Physiol*, 1977, 59 (2): 411-416
- [10] Aebi I I. Catalase *in vitro* [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 121-126
- [11] Constantine N G, Stanley K R. Superoxide dismutases [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309-314
- [12] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22: 867-880
- [13] Panchuk I I, Volkov R A, Schffl F. Heat stress and heat shock transcription factor dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in arabadopsis[J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 838-853
- [14] Kang G Z, Wang Z X, Sun G C. Rarticipation of H₂O₂ in Enhancement of Cold Chilling by Salicylic Acid in Banana Seedlings [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45 (5): 567-573
- [15] Andrew C A, Robert F. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells [J]. *Plant Cell*, 1997, (9): 1559-1572