

王 斌, 朱世江. 阶段降温对冷藏黄瓜耐冷性的诱导作用[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 1028-1035.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.031

阶段降温对冷藏黄瓜耐冷性的诱导作用

王 斌^{1,2}, 朱世江²

(1. 韶关学院英东生物与农业学院/韶关市芳香植物工程技术研究中心, 广东 韶关 512005; 2. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要: 黄瓜是冷敏型蔬菜, 其果实在冷藏期间容易发生冷害, 从而严重影响采后果实的商品性。为了探究阶段降温处理对冷藏黄瓜耐冷性的诱导作用, 在采后黄瓜冷藏前, 依次于 10 ℃ 处理 24 h、5 ℃ 处理 48 h。结果表明, 阶段降温处理显著降低了冷藏黄瓜的冷害指数、相对电导率、次生病害病情指数, 显著提高了 PS II 原初光能转化效率(F_v/F_m), 表明阶段降温处理有效诱导了冷藏黄瓜的耐冷性, 从而减轻了冷藏黄瓜的冷害程度。阶段降温处理明显增加了冷藏黄瓜的总可溶性固形物含量和总可溶性蛋白质含量, 降低了冷藏黄瓜的丙二醛含量、过氧化氢含量及超氧阴离子自由基产生速率, 显著增强了冷藏黄瓜的超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性和过氧化物酶活性, 提高了相关酶基因的表达量。由研究结果可知, 阶段降温处理诱导的黄瓜耐冷性与渗透调节物质的积累及黄瓜抗氧化系统被激活有关。

关键词: 冷藏黄瓜; 阶段降温; 耐冷性; 抗氧化防御系统

中图分类号: S642.201 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)04-1028-08

Induction of chilling tolerance in cold-stored cucumbers by slowly cooling treatment

WANG Bin^{1,2}, ZHU Shi-jiang²

(1. Henry Fok College of Biology and Agriculture/Shaoquan Aromatic Plant Engineering and Technology Research Center, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China; 2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Cucumber is a kind of cold-sensitive vegetable, the fruits are easy to occur chilling injury during cold storage periods, and the commercial quality of postharvest fruits can be seriously affected. To explore the induction of slowly cooling treatment on chilling tolerance of cold-stored cucumbers, postharvest cucumbers were treated at 10 ℃ for 24 h and 5 ℃ for 48 h successively before cold storage. The results showed that slowly cooling treatment significantly reduced the chilling injury index, relative conductivity, secondary disease index of cold-stored cucumbers, and significantly increased the efficiency of primary light energy of PS II (F_v/F_m), suggesting that slowly cooling treatment effectively induced chilling tolerance of cold-stored cucumbers, thus relieved the degree of chilling injury in cucumbers. Slowly cooling treatment obviously increased the contents of total soluble solids and total soluble proteins, reduced the contents of H_2O_2 and malondialdehyde(MDA), and $O_2^{\cdot-}$ production rate in cold-stored cucumbers, while activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase and relative enzyme gene expression were significantly enhanced. It can be seen from the results that chilling tolerance of cucumbers induced by slowly cooling treatment is related to the accumulation of osmotic adjustment substances and

the activation of antioxidant system in cucumbers.

Key words: cold-stored cucumber; slowly cooling treatment; chilling tolerance; antioxidant defense system

收稿日期: 2020-01-19

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515010068); 广东省教育厅青年创新人才项目(2018KQNCX231); 韶关学院博士科研启动项目(99000602)

作者简介: 王 斌(1991-), 男, 甘肃秦安人, 博士, 讲师, 主要研究方向为采后果蔬分子生物学。(E-mail) b_wang@squ.edu.cn

低温能有效降低采后果蔬的生理活动, 如呼吸强度、乙烯产生速率等, 低温也能抑制病原微生物的

生命活动,因此低温贮运是保持采后果蔬品质、延长果蔬贮藏寿命的最有效的方式之一^[1]。黄瓜(*Cucumis sativus* L.)原产于亚热带地区,由于黄瓜采收后呼吸强度较高,在常温下贮藏保鲜期很短,因此通常采用低温贮运来延长黄瓜的贮藏期和货架期。此外,黄瓜是一种典型的冷敏型蔬菜,在10℃以下温度贮藏时会产生冷害^[2-3],受冷害的黄瓜抗病性下降,在货架期易感病而发生严重的次生病害,从而降低了采后黄瓜的商品性,缩短其货架期^[4]。

通过适当的采后处理诱导黄瓜的耐冷性,是延缓冷藏黄瓜冷害发生的重要方式。目前,诱导冷藏黄瓜耐冷性的采后处理方式主要有物理法、化学药剂法和植物激素法等。其中物理法有热法^[3]、短波紫外照射法^[5]和低温预贮法^[6]等;化学药剂法有一氧化氮法^[7]、褪黑素法^[8]等;植物激素法有茉莉酸甲酯法^[7]、腐胺法^[9]和水杨酸法^[10]等。以上处理方法均可在一定程度上诱导冷藏黄瓜的耐冷性,从而减轻黄瓜在冷藏期间的冷害症状。然而,上述处理方法或者需要使用药剂,或者需要额外增加处理设备,这些均会显著增加生产成本,而增加的生产成本最终会转嫁到消费者身上,不利于采后黄瓜产业的可持续发展,且化学诱抗剂处理可能还会产生食品安全问题。因此,寻求一种既可以有效抑制冷藏黄瓜冷害,又不会显著增加生产成本的处理方式,对于采后黄瓜产业来说具有重要的实际意义。

果蔬采收后一般均需要及时预冷,以快速去除田间热,降低果蔬的生理代谢,抑制果蔬表面微生物活动,从而延长果蔬的贮藏期。因此,预冷在整个果蔬贮运过程中起着极为重要的作用^[11]。目前,关于预冷作用的研究主要集中在对果蔬感官品质和营养品质方面的影响^[12-14],而鲜有关于预冷影响采后果蔬耐冷性方面的报道。此外,大多数研究更侧重于预冷方式、预冷媒介以及预冷时间对果蔬产品品质的影响^[15],对冷库阶段降温预冷的研究较少。本研究分析了阶段降温预冷处理对5℃冷藏黄瓜耐冷性的诱导作用,并从生理、基因表达层面探究其诱导冷藏黄瓜耐冷性的生理和分子机制,以期丰富人们对预冷作用的认识。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所用黄瓜购自当地菜农,品种为津研四

号,黄瓜采收后及时运回实验室。

考马斯亮兰 R250,产自上海碧云天生物技术有限公司;牛血清蛋白,产自美国 Sigma 公司;硫代巴比妥酸,产自上海展云化工有限公司;丙酮、硫酸钛、25%浓氨水、浓硫酸,产自天津市富宇精细化工有限公司;三氯乙酸、盐酸羟胺、对氨基苯磺酸、 α -萘胺、亚硝酸钠、甲硫氨酸、过氧化氢和愈创木酚,产自天津市大茂化学试剂厂;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,产自广州化学试剂厂;还原性抗坏血酸、核黄素和四唑氮蓝(NBT),产自南京奥多福尼生物有限公司;TR-Izol 试剂、iScript cDNA Synthesis kit 试剂盒、SYBR Green RT-PCR kit 荧光染料试剂盒,产自美国 BIAO-RAD 公司。以上所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器设备

UV-1800 紫外分光光度计,产自上海美普达仪器有限公司;PCDX-WJ-10 全自动超纯水仪,产自成都品成科技有限公司;6380R 高速冷冻离心机,产自德国 Eppendorf 公司;DDS-307 型电导率仪,产自上海精密科学仪器有限公司;IMAG-K7 叶绿素荧光测定仪,产自德国 WALZ 公司;PR-101 α 数显折射仪,产自日本爱拓公司;Bio-Rad iCycler iQ™/C1000 荧光定量 PCR 仪,产自美国 Bio-Rad 公司;-80℃超低温冰箱,产自美国 Thermo 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 处理及取样 挑选果形端正、大小基本一致、无机械伤或病虫害的黄瓜为试验材料。将挑选后的黄瓜随机分成2组,处理组先于10℃冷库中预冷24 h,再于5℃冷库中预冷48 h,对照组不经任何低温处理,最后将处理组、对照组同时置于5℃冷库中贮藏。各处理均设3个重复,每个重复设60个黄瓜。贮藏期间每隔2 d 观察黄瓜的冷害状况并取样,果皮用于相关指标的测定,取样后保存于-80℃备用。

1.3.2 冷害指数(CII)和次生病害病情指数(SDI)的计算 参考Liu等^[7]的方法测定冷害指数,将黄瓜冷害指数分为5级:0级,未发生冷害;1级,冷害面积占总面积的比例低于25%;2级,冷害面积占总面积的比例为26%~50%;3级,冷害面积占总面积的比例为51%~75%;4级,冷害面积占总面积的比例大于75%。计算公式:冷害指数 = $\sum(\text{级数} \times \text{相应级数果实的数量}) / \text{总果实数量}$ 。

次生病害病情指数的测定参考Wang等^[4]的方

法,同样将黄瓜次生病害病情指数分为 5 级:0 级,未发生病害;1 级,病害面积占总面积的比例低于 25%;2 级,病害面积占总面积的比例为 26%~50%;3 级,病害面积占总面积的比例为 51%~75%;4 级,病害面积占总面积的比例高于 75%。计算公式:次生病害病情指数 = \sum (级数 \times 相应级数果实数量) / 总果实数量。

1.3.3 相对电导率的测定 相对电导率 (REC) 的测定参考 Xia 等^[16]的方法。用削皮刀削取 1 mm 厚度的黄瓜果皮,每个重复用孔径为 0.5 cm 的打孔器均匀打制 20 个黄瓜果皮小圆片。将小圆片用双蒸水冲洗 3 遍后转移至 50 ml 离心管中,并加入 25 ml 双蒸水,在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 下浸泡 2 h。测定初始电导率 (C_1),之后沸水浴 30 min,自然冷却至室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 后测定终止电导率 (C_2)。计算公式: $REC = C_1 / C_2 \times 100\%$ 。

1.3.4 PS II 原初光能转化效率 (F_v/F_m) 的测定 按照 Wang 等^[17]的方法测定黄瓜果皮的 F_v/F_m ,先将黄瓜在黑暗环境中暗处理 30 min,然后将黄瓜切成均匀的 3 个等份,取中间 1 等份用于测定 F_v/F_m 。

1.3.5 总可溶性固形物含量和总可溶性蛋白质含量的测定 采用数显折射仪测定黄瓜的总可溶性固形物含量,结果用百分比表示。

粗提取液的制备:取 1 g 已研磨好的黄瓜果皮样品,加入 5 ml 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 [pH 值为 7.8,含有 2% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)],冰上涡旋混匀 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。离心后得到的上清液即为粗提取液,用于总可溶性蛋白质含量、超氧阴离子自由基 (O_2^-) 产生速率和抗氧化酶活性的测定。

用考马斯亮蓝法测定总可溶性蛋白质含量^[18],吸取 0.05 ml 粗提取液,加入 5 ml 0.1 mg/ml 考马斯亮蓝溶液,室温下反应 5 min。测定反应液在 595 nm 处的吸光度,以牛血清蛋白为标准品制作标准曲线,根据标准曲线计算黄瓜果皮中的总可溶性蛋白质含量。

1.3.6 过氧化氢含量、超氧阴离子产生速率和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量的测定 过氧化氢 (H_2O_2) 含量的测定参考曹森等^[19]的方法, O_2^- 产生速率的测定参考 Ding 等^[20]的方法,丙二醛含量的测定参考 Wen 等^[21]的方法。

1.3.7 抗氧化酶活性的测定 超氧化物歧化酶

(SOD) 活性的测定参考王静等^[22]的方法,过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定参考 Wang 等^[17]的方法,过氧化物酶 (POD) 活性的测定参考 Liang 等^[23]的方法。

1.3.8 总 RNA 的提取和基因表达分析 先用 TRIzol 试剂提取黄瓜果皮的总 RNA^[17],再用 iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, 美国) 试剂盒合成 cDNA 第一链。用 SYBR Green RT-PCR kit 荧光染料试剂盒 (Bio-Rad)、Bio-Rad iCycler iQTM/C1000 仪器进行实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析,具体步骤参照说明书。所用引物序列等信息见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列等信息

Table 1 Information of primers used in quantitative real-time PCR

基因	NCBI 登录号	引物序列 (5'→3')	扩增产物大小 (bp)
<i>CAT3</i>	FJ609169.1	F: ATCACAGTCACGCCACTCAG R: CGGCCATTCTATCGTCGTAT	143
<i>POD1</i>	NM_001280612.1	F: TCAGCGGACGCCTAAACAAT R: CTGCCTGACCCTGATTGACA	100
<i>SOD (Mn)</i>	XM_011651081.1	F: TTACAGGGCTCTGGATGGGT R: CCAAGCAGAGGCACTAAAGC	122
<i>Actin</i>	AB698859	F: AGGCCGTTCGTCCCTCTAC R: CAGTAAGGTCACGACCAGCA	150

F 表示上游引物, R 表示下游引物。

1.4 数据统计与分析

每个处理设 3 个重复,各指标至少重复测定 3 次,结果以“平均值 \pm 标准偏差”表示。用 Excel 2003 整理试验数据并作图,用 SPSS 13.0 软件对数据进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 阶段降温处理对冷藏黄瓜冷害的影响

从图 1A 可以看出,随着冷藏时间的增加,黄瓜的冷害指数逐渐提高,表明黄瓜所受冷害的严重程度与低温胁迫时间呈正相关,即低温胁迫时间越久,冷害越严重。对照组黄瓜于 5 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏 3 d 时就已经观察到了明显的冷害症状,而阶段降温处理组黄瓜在冷藏 6 d 时才观察到明显的冷害症状。与对照相比,阶段降温处理显著降低了黄瓜的冷害指数,在冷藏 12 d 时,阶段降温处理组黄瓜的冷害指数比对照组低 48.57%。

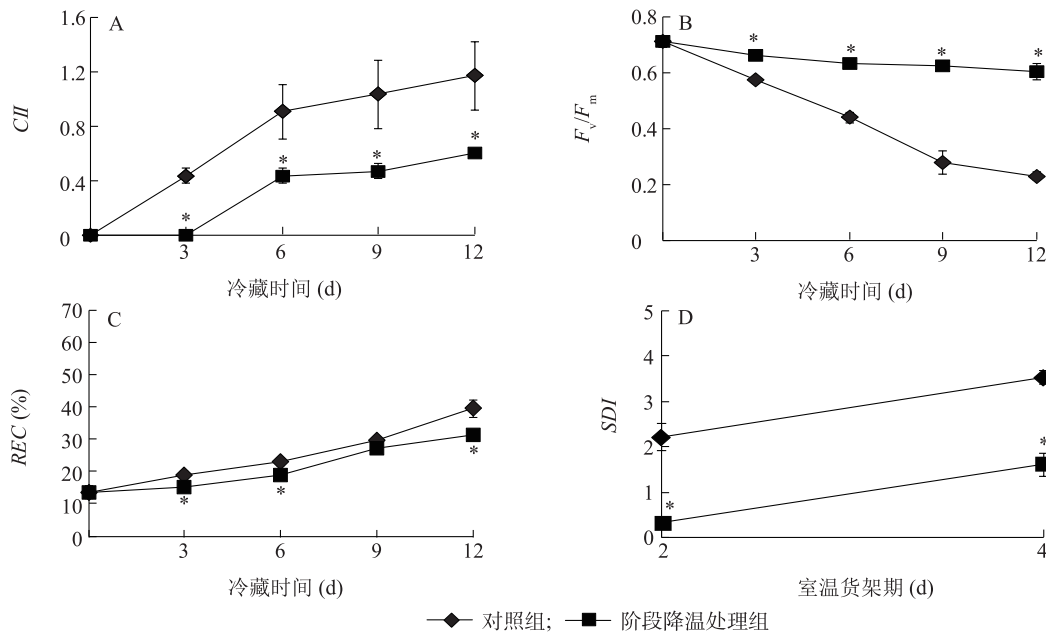
图 1B 结果显示,阶段降温处理组和对照组黄瓜的 F_v/F_m 在整个冷藏期间呈下降趋势,对照组的 F_v/F_m

F_m 在冷藏初期迅速下降,而阶段降温处理组的 F_v/F_m 变化趋势较为平缓。冷藏 12 d 时,阶段降温处理组黄瓜的 F_v/F_m 仍然保持在 0.60 以上,而对照组的 F_v/F_m 却降低至 0.23。与对照相比,阶段降温处理显著提高了 F_v/F_m ;与冷藏起始阶段(0 d)相比,经过 12 d 的冷藏,阶段降温处理组的 F_v/F_m 只降低了 15.32%,而对照组的 F_v/F_m 降低了 67.85%,表明阶段降温处理有利于保持叶绿体形态的完整性。

由图 1C 可见,黄瓜果皮的相对电导率在整个冷藏期间的变化趋势与冷害指数相似,均随着冷藏时间的延长而逐渐提高。与对照组相比,除冷藏

0 d、9 d 外,阶段降温处理组的相对电导率显著低于对照组,比对照组低 7.73%~20.42%。

产生冷害的果实组织往往已经发生了一定程度的损伤,当转移到室温货架后,很容易受到环境中的致病菌侵染,导致冷害果实发生较为严重的次生病害^[4]。因此,通过评价次生病害病情指数,也可以间接反映冷藏果蔬所受冷害的严重程度^[17]。从图 1D 可见,阶段降温处理组的次生病害病情指数显著低于对照组。在室温(25℃)下贮藏 4 d 时,对照组的次生病害病情指数为 3.53,而阶段降温处理组的次生病害病情指数仅为 1.60,比对照组低 54.67%。



A:冷害指数;B:PS II 原初光能转化效率;C:相对电导率;D:次生病害病情指数。*表示阶段降温处理组与对照组之间差异显著($P < 0.05$)。CII 表示冷害指数, F_v/F_m 表示 PS II 原初光能转化效率,REC 表示相对电导率,SDI 表示次生病害病情指数。

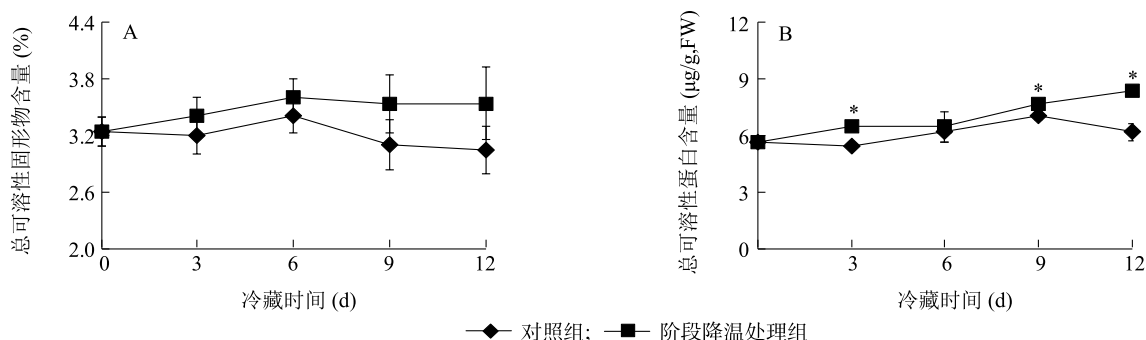
图 1 阶段降温处理对冷藏黄瓜冷害指数、 F_v/F_m 、相对电导率和次生病害病情指数的影响

Fig.1 Effects of slowly cooling treatment on chilling injury index, F_v/F_m , relative conductivity and secondary disease index of cold-stored cucumber

2.2 阶段降温处理对冷藏黄瓜果皮总可溶性固形物含量和总可溶性蛋白质含量的影响

在逆境胁迫下,植物为了减轻由逆境胁迫造成的生理代谢失调,其细胞会大量积累可溶性渗透物质,通过渗透调节来保持较高的渗透压,从而保证细胞的正常生理活动^[24],可溶性糖类和可溶性蛋白质便是重要的渗透物质。由图 2A 可见,尽管阶段降温处理组与对照组的总可溶性固形物含量之间没有显著差异,但是阶段降温处理组的总可溶性固形物含量总体上高于对照组。与 0 d 时相比,阶段降温处理组的总

可溶性固形物含量在整个冷藏期总体呈增加的趋势,而对照组的总可溶性固形物含量总体呈减少的趋势,表明阶段降温处理诱导了可溶性固形物的积累。从图 2B 可见,总可溶性蛋白质含量在整个冷藏期间总体呈上升趋势,表明低温会诱导不溶性蛋白质向可溶性蛋白质转化,这可能是植物自我防御的结果。但是,除冷藏期的 0 d、6 d 外,阶段降温处理组的总可溶性蛋白质含量明显高于对照组,表明阶段降温处理对蛋白质转化具有更强的诱导作用,从而显著提高了总可溶性蛋白质含量。



A: 总可溶性固形物含量; B: 总可溶性蛋白质含量。* 表示阶段降温处理组与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

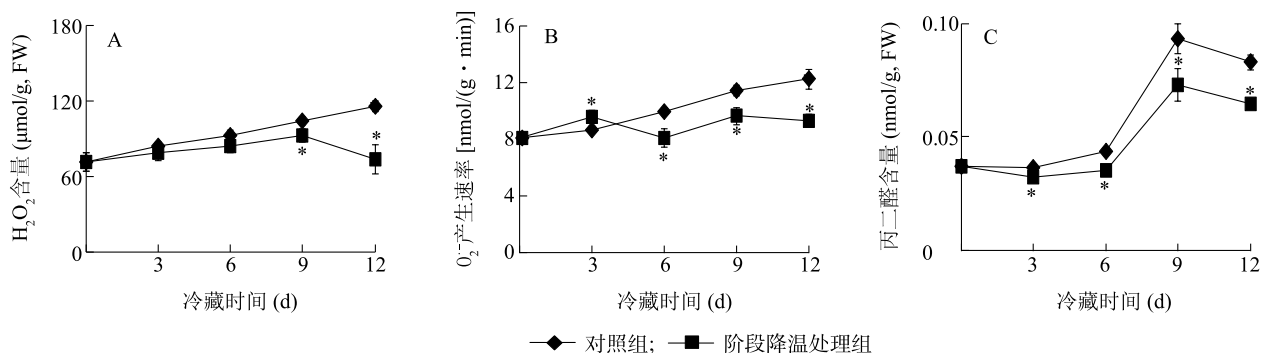
图2 阶段降温处理对冷藏黄瓜果皮总可溶性固形物含量和总可溶性蛋白质含量的影响

Fig.2 Effects of slowly cooling treatment on contents of total soluble solids and total soluble proteins in cold-stored cucumber peel

2.3 阶段降温处理对冷藏黄瓜果皮过氧化氢含量、超氧阴离子自由基产生速率和丙二醛含量的影响

H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 是植物中2种主要的活性氧,低温胁迫会导致活性氧迸发,进而造成细胞的氧化损伤^[25]。从图3A可见,在冷藏的0~9 d, H_2O_2 含量总体呈增加趋势;在冷藏的前6 d,对照组与阶段降温处理组间的 H_2O_2 含量差异不明显,但在冷藏的9 d和12 d,阶段降温处理组的 H_2O_2 含量明显低于对照组。由图3B可见,对照组的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率变化趋势与 H_2O_2 含量变化趋势基本一致,随冷藏时间的延长而逐渐提高,而阶段降温处理组的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率呈

波动上升趋势,并且除冷藏0~3 d外,阶段降温处理组的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率明显低于对照组。活性氧含量增加会使细胞膜脂过氧化,降低细胞膜的流动性,丙二醛是衡量膜脂过氧化的一个重要指标^[26]。从图3C可以看出,丙二醛含量呈先增加后降低的趋势,对照组、阶段降温处理组均在冷藏后9 d达到最高值。在整个冷藏期间,阶段降温处理组的丙二醛含量均显著低于对照组。上述结果一致表明,阶段降温处理有利于减少活性氧的产生,从而缓解了由低温造成的氧化胁迫和氧化损伤。



A: H_2O_2 含量; B: $O_2^{\cdot-}$ 产生速率; C: 丙二醛含量。* 表示阶段降温处理组与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图3 阶段降温处理对冷藏黄瓜果皮 H_2O_2 含量、 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率和丙二醛含量的影响

Fig.3 Effects of slowly cooling treatment on H_2O_2 content, $O_2^{\cdot-}$ production rate and malondialdehyde (MDA) content in cold-stored cucumber peel

2.4 阶段降温处理对冷藏黄瓜果皮抗氧化防御酶活性的影响

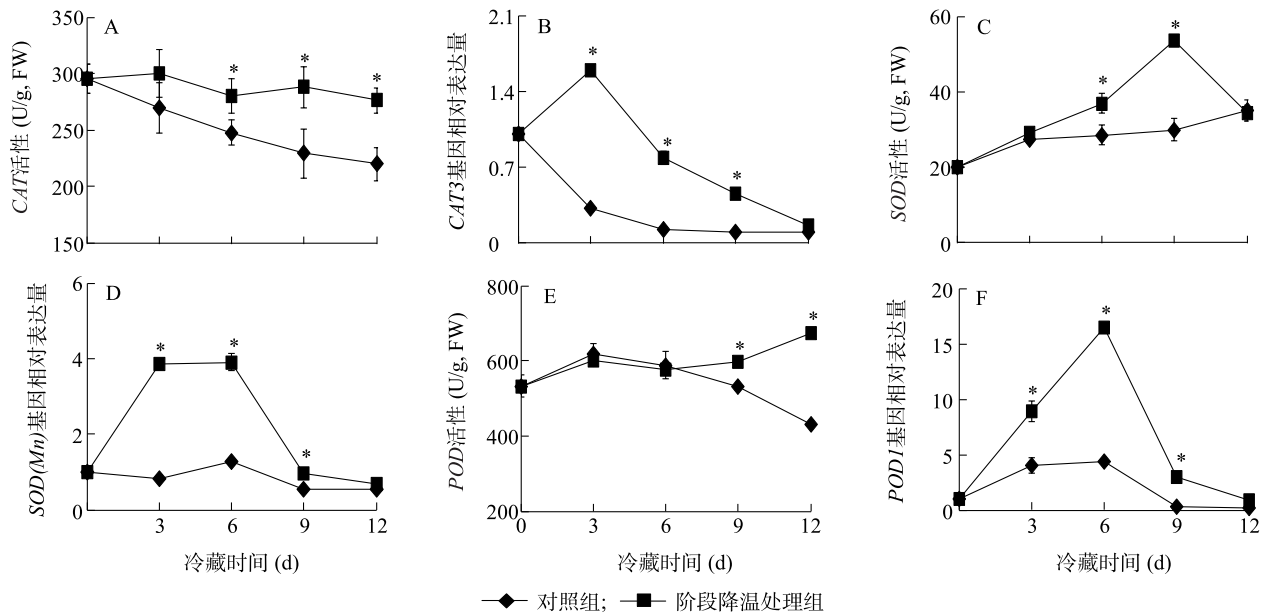
抗氧化系统是植物抵抗逆境胁迫的重要防御系统, SOD 、 CAT 和 POD 是植物清除活性氧的重要抗氧化防御酶^[27]。从图4A可以看出, CAT 活性总体呈下降趋势,阶段降温处理组的 CAT 活性下降趋势明显

低于对照组,且阶段降温处理组的 CAT 活性在冷藏6~12 d时显著高于对照组;冷藏12 d时,阶段降温处理组的 CAT 活性比对照组高25.82%。由图4B可知,对照组 $CAT3$ 基因相对表达量的变化趋势与 CAT 活性变化趋势一致,而阶段降温处理组的 $CAT3$ 基因相对表达量先增加后降低,在冷藏3 d时达到峰值。

除冷藏开始时(0 d)与冷藏最后1 d,阶段降温处理组的 *CAT* 基因相对表达量均显著高于对照组。由图 4C 可知,对照组的 *SOD* 活性缓慢增加,而阶段降温处理组的 *SOD* 活性在冷藏 9 d 达到最大值,随后又降低。除冷藏 3 d 和 12 d 外,阶段降温处理组的 *SOD* 活性均显著高于对照组。由图 4D 可知,阶段降温处理组的 *SOD(Mn)* 基因相对表达量在冷藏前期急剧增加,在冷藏 6 d 达到峰值,但对照组的 *SOD(Mn)* 基因相对表达量在整个冷藏期间变化不大,整体呈下降趋势。阶段降温处理组的 *SOD(Mn)* 基因相对表达量在冷藏 3~9 d 显著高于对照组。由图 4E 可见,阶段降温处理组的 *POD* 活性整体呈上升趋势,而对照组的

POD 活性在冷藏 3 d 达到最大值,之后逐渐降低。在冷藏前期(0 d、3 d、6 d),阶段降温处理组的 *POD* 活性与对照组之间无明显差异,但在冷藏后期(9 d、12 d),阶段降温处理组的 *POD* 活性显著高于对照组。由图 4F 可知,*POD1* 基因相对表达量先增加后降低,在冷藏 6 d 时达到峰值;与对照组相比,除冷藏 0 d、12 d 外,阶段降温处理组的 *POD1* 基因相对表达量均显著高于对照组。

综合上述结果可知,无论是在酶活性层面还是在酶基因表达层面,阶段降温处理均增强了冷藏黄瓜的抗氧化能力,从而缓解了低温胁迫导致的氧化损伤。



A: *CAT* 活性; B: *CAT3* 基因的相对表达量; C: *SOD* 活性; D: *SOD(Mn)* 基因的相对表达量; E: *POD* 活性; F: *POD1* 基因的相对表达量。* 表示阶段降温处理组与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。CAT 表示过氧化氢酶, SOD 表示超氧化物歧化酶, POD 表示过氧化物酶。

图 4 阶段降温处理对冷藏黄瓜果皮 *CAT*、*SOD*、*POD* 活性和相应基因表达的影响

Fig.4 Effects of slowly cooling treatment on activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) and relative gene expression in cold-stored cucumber peel

3 讨论

黄瓜是冷敏型果蔬,在冷藏期间很容易发生冷害,黄瓜的冷害症状表现为果皮表面出现水渍状凹陷斑等^[3],通过统计并计算果皮水渍状凹陷斑面积所占比例可反映黄瓜受到冷害的严重程度。叶绿素在绿色蔬菜中的含量很高,低温胁迫等非生物胁迫通常会导致叶绿体降解,使叶绿素含量降低。因此,通过检测叶绿素含量可间接反映植物受胁迫的严重程度。叶绿素荧光参数——PS II 原初光能转化效

率(F_v/F_m)与叶绿素含量成正比, F_v/F_m 可以用来衡量采后果蔬受到冷害的程度^[28]。相对电导率是衡量细胞膜完整性的重要指标之一,低温胁迫会导致细胞膜丧失完整性,且冷害越严重,细胞膜的透性越大,相对电导率就越高^[29]。将发生冷害的果实转移至室温时,其抗病性降低,往往会出现严重的次生病害,而这种次生病害症状极易被观察,次生病害症状的严重程度可以更直观地反映冷害的严重程度^[30]。热处理可诱导冷藏黄瓜的耐冷性,表现在热处理的黄瓜冷害指数、相对电导率显著降低^[3];贮前冷驯

化也可以诱导冷藏黄瓜的耐冷性,表现在冷驯化能延缓 F_v/F_m 的下降、抑制次生病害病情指数提高^[17]。在本研究中,阶段降温处理显著降低了冷藏黄瓜的冷害指数、相对电导率和次生病害病情指数,显著延缓了 F_v/F_m 的下降。这些结果一致表明,阶段降温预冷处理诱导了冷藏黄瓜的耐冷性,也表明通过单一的温度调节处理可以诱导冷藏黄瓜的耐冷性,这对于采后果蔬产业来说具有重要意义。因为在不增加设备和不使用保鲜剂的情况下,通过阶段降温的方式处理果蔬,既能起到诱导果蔬耐冷性,控制冷害的作用,又能与预冷处理相结合,达到预冷的效果,并且不会增加采后处理的生产成本,有利于提高采后黄瓜的市场竞争力。

渗透调节是植物细胞保持正常生理活动的重要调节机制,低温胁迫会使渗透物质如可溶性糖、可溶性蛋白质的含量增加,渗透调节物质含量高通常意味着采后果蔬对低温的耐受能力强^[31]。NO 处理能够减轻冷藏哈密瓜冷害与总可溶性固形物含量维持在较高水平有关^[32]。在本研究中,阶段预冷处理组的总可溶性固形物含量和总可溶性蛋白质含量高于对照组,与王霞等^[32]的研究结果一致,表明阶段降温处理诱导了渗透调节物质的积累,提高了细胞内的渗透势,这可能是阶段降温处理组黄瓜耐冷性更强的重要原因。

低温胁迫通常会引起活性氧大量产生,随后引发一系列反应,进而导致细胞膜的完整性丧失,丙二醛含量反映了细胞膜的膜脂过氧化程度^[30]。冷害导致冷藏黄瓜活性氧含量突增,造成细胞膜脂过氧化,进而引起丙二醛含量的增加^[33]。腐胺处理降低了香蕉果实活性氧含量和丙二醛含量,提高了细胞膜完整性,降低了膜脂过氧化程度,从而增强了采后香蕉的耐冷性^[34]。在本研究中,阶段降温处理降低了2种主要活性氧(H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$)含量和丙二醛含量,降低了相对电导率,表明阶段降温处理通过降低活性氧含量减轻了冷藏黄瓜细胞膜的氧化损伤,进而保持了细胞膜的完整性。

活性氧积累引起的氧化胁迫是冷藏果蔬发生冷害的重要原因,由于活性氧产生和清除之间的动态平衡被破坏,使冷藏果蔬的冷害程度加剧。CAT、SOD 和 POD 是清除细胞内活性氧的重要抗氧化酶^[27]。已有研究发现,抗氧化防御酶的活性与耐冷性呈正相关,即抗氧化酶活性越高,耐冷性越强^[34]。

本研究得到了相似的结果,即黄瓜耐冷性强的阶段降温处理组 SOD 活性、CAT 活性和 POD 活性都高于对照组,表明阶段降温处理提高了冷藏黄瓜的抗氧化酶活性。较高活性的抗氧化酶能及时清除产生的活性氧,这也解释了阶段降温处理组的 H_2O_2 含量、 $O_2^{\cdot-}$ 含量低于对照组的原因。采后黄瓜经阶段降温处理后,CAT3、SOD(Mn) 和 POD1 基因的相对表达量均出现了1个诱导峰,而对照组却没有,表明阶段降温处理诱导了 CAT3、SOD(Mn) 和 POD1 基因的表达,从基因层面证实了阶段降温处理诱导了冷藏黄瓜的耐冷性;同时,在冷藏3~9 d,阶段降温处理组的 CAT3、SOD(Mn) 和 POD1 基因表达量显著高于对照组。这些结果很好地解释了阶段降温处理组抗氧化酶活性较高的原因。

综上所述,阶段降温处理可诱导采后黄瓜的耐冷性,减轻黄瓜的冷害症状,从而延长黄瓜的贮藏期。阶段降温处理通过诱导渗透物质积累及抗氧化系统相关酶活性,增强了冷藏黄瓜对低温胁迫的耐受性,进而延缓了黄瓜在冷藏期间冷害的发生。

参考文献:

- [1] 朱雁青,胡花丽,胡博然,等. 薄膜包装对石榴采后生理及营养物质含量的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1154-1160.
- [2] NASEF I. Short hot water as safe treatment induces chilling tolerance and antioxidant enzymes, prevents decay and maintains quality of cold-stored cucumbers[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 138: 1-10.
- [3] 许婷婷,张婷婷,姚文思,等. 热处理对低温胁迫下黄瓜活性氧代谢和膜脂组分的影响[J]. 核农学报, 2020, 34(1): 85-93.
- [4] 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.
- [5] 郝佳诗,王 愈,尹建云,等. 短波紫外线结合热处理对黄瓜冷害及抗氧化代谢的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2018, 35(3): 476-482.
- [6] 史君彦,王云香,周念念,等. 低温预贮对黄瓜耐冷性的影响[J]. 食品工业, 2019, 40(12): 5-8.
- [7] LIU Y F, YANG X X, ZHU S J, et al. Postharvest application of MeJA and NO reduced chilling injury in cucumber (*Cucumis sativus*) through inhibition of H_2O_2 accumulation[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 119: 77-83.
- [8] 辛丹丹,司金金,张若曦,等. 外源褪黑素处理对黄瓜采后冷藏期抗冷性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(9): 108-114, 120.

- [9] JIA B, ZHENG Q L, ZUO J H, et al. Application of postharvest putrescine treatment to maintain the quality and increase the activity of antioxidative enzyme of cucumber[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 239: 210-215.
- [10] ZHANG Y Z, ZHANG M L, YANG H Q. Postharvest chitosan-*g*-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage[J]. *Food Chemistry*, 2015, 174:558-563.
- [11] 许青莲,王冉冉,王 丽,等. 不同预冷方式对鲜切紫甘蓝冷链贮运品质变化的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(7): 135-143.
- [12] MIGUEL-PINTADO C, VELARDO B M, LOZANO M R. et al. Forced-air precooling effect on quality of delayed cold stored stone fruit[J]. *Acta Horticulturae*, 2013, 1012:491-496.
- [13] 李 阳,杨文哲,王美霞,等. 差压预冷处理对蒜薹质量损失率和硬度的影响[J]. *包装工程*, 2019, 40(9): 28-35.
- [14] 丁 艳. 预冷时间对生鲜农产品贮藏品质的影响[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(5): 131-136.
- [15] 贺红霞,申 江,朱宗升. 果蔬预冷技术研究现状与发展趋势[J]. *食品科技*, 2019, 44(2): 46-52.
- [16] XIA L, YANG H Q, LU G Q. Low-temperature conditioning combined with cold storage inducing rapid sweetening of sweetpotato tuberous roots [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] while inhibiting chilling injury[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 142:1-9.
- [17] WANG B, WANG G, SHEN F, et al. A glycine-rich RNA-binding protein, CsGR-RBP3, is involved in defense responses against cold stress in harvested cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:540.
- [18] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [19] 曹 森,王 瑞,赵成飞,等. 采前喷施哈茨木霉菌对采后蓝莓贮藏品质及生物活性的影响[J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(2): 424-431.
- [20] DING H D, HE J, WU Y, et al. The tomato mitogen-activated protein kinase SIMPK1 is as a negative regulator of the high-temperature stress response[J]. *Plant Physiology*, 2018, 177: 633-651.
- [21] WEN M, LIN X, YU Y S, et al. Natamycin treatment reduces the quality changes of postharvest mulberry fruit during storage[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(5): e12934.
- [22] 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.
- [23] LIANG D, GAO F, NI Z Y, et al. Melatonin improves heat tolerance in kiwifruit seedlings through promoting antioxidant enzymatic activity and glutathione *S*-transferase transcription[J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 584.
- [24] 姚悦梅,孙德举,李建斌,等. 低温对羽衣甘蓝幼苗氮代谢的影响[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(5): 1191-1196.
- [25] 周靖翔,闵德栋,李娇卓,等. 茉莉酸甲酯在果蔬采后冷害控制中的应用研究进展[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(10): 1419-1426.
- [26] DRAPER H H, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186:421-431.
- [27] ROSALIE R, LÉCHAUDÉL M, DHUIQUE-MAYER C, et al. Antioxidant and enzymatic responses to oxidative stress induced by cold temperature storage and ripening in mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Cogshall') in relation to carotenoid content[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 224/225:75-85.
- [28] WANG B, WANG G, ZHU S J. DNA damage inducible protein 1 is involved in cold adaption of harvested cucumber fruit[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10:1723.
- [29] 潘宝贵,钱恒彦,戈 伟,等. 辣椒应答冷信号转导机制研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(3): 743-748.
- [30] DEELL J R, VIGNEAULT C, LEMERRE S. Water temperature for hydrocooling field cucumbers in relation to chilling injury during storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 18(1): 27-32.
- [31] 陈姝伊,曾筠婷,袁 洋,等. 低温等离子体处理减轻采后香蕉果实冷害作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 41(5): 245-249.
- [32] 王 霞,魏 佳,张 政,等. 一氧化氮(NO)和湿度因子对哈密瓜采后耐冷性的影响[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(7): 66-75.
- [33] VALENZUELA J L, MANZANO S, PALMA F, et al. Oxidative stress associated with chilling injury in immature fruit: postharvest technological and biotechnological solutions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7): 1467.
- [34] 张艳艳,周子钰,白 晨. 腐胺增强香蕉果实低温耐受性的作用机制[J]. *食品科技*, 2019, 44(6): 51-55.

(责任编辑:徐 艳)