

# ‘靖安椪柑’果实发育阶段柠檬酸含量变化及其代谢相关基因的表达分析

高阳<sup>1,2,3a</sup>, 阚超楠<sup>1,2,3a</sup>, 陈楚英<sup>1,2,3</sup>, 陈明<sup>1,2,3</sup>, 陈金印<sup>1,2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>江西农业大学农学院, 南昌 330045; <sup>2</sup>江西省果蔬采后处理关键技术及质量安全协同创新中心, 南昌 330045; <sup>3</sup>江西省果蔬保鲜与无损检测重点实验室, 南昌 330045; <sup>4</sup>萍乡学院, 江西萍乡 337055)

**摘要:**【目的】明确‘靖安椪柑’果实发育过程中柠檬酸含量的变化规律及其与相关基因的表达关系。【方法】以‘靖安椪柑’发育阶段的果实为材料,采用高效液相色谱法(HPLC)测定了盛花后60~200 d果实有机酸含量变化,运用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析柠檬酸代谢相关基因相对表达量,同时分析有机酸含量变化与相关基因表达的关系。【结果】柠檬酸为‘靖安椪柑’果实主要有机酸,在果实中含量最高;在椪柑果实发育期间,柠檬酸含量呈现出先上升后下降的变化规律,奎宁酸、酒石酸和苹果酸含量呈递减的趋势,总有机酸和可滴定酸含量变化与柠檬酸含量变化一致;柠檬酸代谢相关基因表达及相关性分析结果显示,在发育期间,‘靖安椪柑’果实 *CitCS1* 相对表达略有下降, *CitCS2* 和 *CitPEPC1* 相对表达先增加后减少, *CitPEPC2* 和 *CitPEPC4* 的表达量在果实发育后期有所升高,这些柠檬酸合成基因表达均与柠檬酸含量无显著性相关;柠檬酸降解相关基因中, *CitPEPCKs*、*CitAco1* 和 *CitFBPases* 相对表达整体呈缓慢下降的趋势,与柠檬酸含量无显著性相关, *CitAco2/3* 和 *CitACLa1* 相对表达整体呈增长的趋势, *CitIDH1*、*CitACLa1* 和 *CitACLβ* 相对表达呈先下降后上升的趋势, *CitIDH2/3*、*CitGADs* 和 *CitGS2* 相对表达均呈先上升后下降的趋势,其中 *CitAco2/3* 和 *CitACLa1* 相对表达与柠檬酸含量呈显著负相关, *CitIDH1/2* 相对表达与柠檬酸含量呈极显著负相关。【结论】‘靖安椪柑’果实发育阶段有机酸含量主要由柠檬酸含量决定,随着果实发育成熟,柠檬酸和有机酸含量呈先升高后降低的变化,这种变化与柠檬酸合成相关基因表达无直接关联,主要受降解相关基因影响,尤其是 *CitAco2/3*、*CitIDH1/2* 和 *CitACLa1* 的相对表达量的变化可能是调控‘靖安椪柑’发育阶段果实柠檬酸含量下降的主要原因之一。

**关键词:** ‘靖安椪柑’; 果实发育; 柠檬酸; 基因表达; 合成; 降解

中图分类号: S666.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)08-0936-11

## Changes of citric acid content and the related gene expression at different developmental stages of fruits in ‘Jing’an ponkan’

GAO Yang<sup>1,2,3a</sup>, KAN Chaonan<sup>1,2,3a</sup>, CHEN Chuying<sup>1,2,3</sup>, CHEN Ming<sup>1,2,3</sup>, CHEN Jinyin<sup>1,2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China; <sup>2</sup>Collaborative Innovation Center of Post-Harvest Key Technology and Quality Safety of Fruits and Vegetables in Jiangxi Province, Nanchang 330045, Jiangxi, China; <sup>3</sup>Jiangxi Key Laboratory for Post-Harvest Technology and Nondestructive Testing of Fruits & Vegetables, Nanchang 330045, Jiangxi, China; <sup>4</sup>Pingxiang University, Pingxiang 337055, Jiangxi, China)

**Abstract:** 【Objective】 ‘Jing’an ponkan’ is an important citrus fruit in Jiangxi province. The fruits are rich in acids which are related to fruit quality. The study aimed to explore the changes of citric acid content and its relationship with the related gene expression in ‘Jing’an ponkan’ during fruit development. 【Methods】 The fruits of ‘Jing’an ponkan’ were picked up at 60, 80, 100, 120, 140, 180 and 200 days after full blossom (DAFB) respectively from 10 trees in an orchard of Jing’an county, Jiangxi province.

收稿日期: 2018-02-23 接受日期: 2018-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(31360466); 江西省青年自然科学基金(20122BAB214024); 江西省教育厅项目(GJJ12223); 江西省果蔬采后处理关键技术及质量安全协同创新中心项目(JXGS-05)

作者简介: 高阳, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 果蔬采后保鲜技术及生理代谢研究。Tel: 15279156078, E-mail: gyichuan@163.com。a 为共同第一作者。

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0791-83813058, E-mail: jinyinchen@126.com

A sample of 30 fruits were divided into three biological replicates, the flesh portions of the fruit were frozen with liquid nitrogen then stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The titratable acid (TA) was determined by acid-base neutralization titration, and the result was converted by the amount of citric acid. The organic acid content was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The extraction of RNA was carried out by CTAB method. And it was detected by agarose gel electrophoresis. Expressions of genes involved in citric acid biosynthesis and degradation (*CitCSs*, *CitPEPCs*, *CitPEPCKs*, *CitAcos*, *CitIDHs*, *CitGADs*, *CitGS2*, *CitACLs* and *CitFBPases*) were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (Q-PCR). **【Results】**Citric acid was the most important organic acid in ‘Jing’an ponkan’ fruits, followed by quinic acid and tartaric acid. The citric acid accounted for more than 71.15% of the total organic acid content in ponkan fruits. The quinic acid and the tartaric acid content accounted for 14.26% and 26.22% of the total organic acid content, while malic acid content was less than 0.2% of the total organic acid content. The citric acid increased from 60 DAFB to 120 DAFB, then decreased. This was consistent with the variation of TA and total organic acids content. At 120 DAFB, the citric acid content reached the maximum value of  $32.91\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . At 200 DAFB, the citric acid, the total organic acids and the titratable acid content were  $17.20\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $22.49\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  and 1.36%. The content of the quinic acid and the tartaric acid gradually decreased during fruit development and maturation. At 200 DAFB, the quinic acid and the tartaric acid content were  $4.68\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $0.56\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . The malic acid content was very low in the whole developmental stage, and the total content decreased slightly. The results of the gene expressions related to the citric acid metabolism and correlation analysis revealed that the relative expression of *CitCS1* decreased slightly, and the relative expression of *CitCS2* and *CitPEPC1* increased first and then decreased. The relative expression of the *CitPEPC2* and the *CitPEPC4* increased at the late stage in ‘Jing’an ponkan’ fruit, both of them had no significant correlation with the citric acid content. The relative expression of *CitPEPCKs*, *CitAco1* and *CitFBPases* showed a slow decline, which also had no significant correlation with the citric acid content. The relative expression of *CitAco2/3* and *CitACL $\alpha$ 1* rose slowly at early developmental stage then increases rapidly during fruit maturation, which showed a significant negative correlation with the citric acid content. The relative expression of *CitIDH1* and *CitACL $\alpha$ 1/ $\beta$*  decreased firstly then increased, but the relative expression of *CitIDH2/3*, *CitGADs* and *CitGS2* was reverse, which increased firstly and then decreased. The relative expression of *CitIDH1/2* and the citric acid content showed a significant negative correlation. **【Conclusion】**The citric acid was the most important acid in the organic acid of ‘Jing’an ponkan’ fruits during fruit development. With fruit ripening, the citric acid and the organic acid content increased firstly and then decreased. The change of the citric acid content in the fruit was not directly related to the gene expression related to the citric acid synthesis it is mainly influenced by the genes related to degradation. Especially the increase of the relative expression of the *CitAco2/3*, the *CitIDH1/2* and the *CitACL $\alpha$ 1* in the late mid period of fruit development might be an important factor in regulation of organic acid in ‘Jing’an ponkan’ fruit developmental period in the late fall.

**Key words:** ‘Jing’an ponkan’; Fruit development; Citric acid; Gene expression; Synthesis; Degradation

椪柑 (*Citrus reticulata* Blanco) 是宽皮柑橘主要栽培品种之一, 在我国南方地区广泛栽植<sup>[1]</sup>。‘靖安椪柑’是江西省名优特柑橘品种, 具有株型紧凑, 结果期早, 具有果形美、色泽艳、味甜、肉脆、耐贮藏、成熟晚等特点, 是靖安地区果农经济收入的重要来

源<sup>[2]</sup>。酸味是果实风味品质, 其含量高低是果实品质评价的重要指标<sup>[3-6]</sup>。柑橘果实属于柠檬酸型果实, 果实柠檬酸代谢过程极其复杂, 包含柠檬酸积累、降解以及转运等过程<sup>[7-9]</sup>。

柑橘果实有机酸代谢机制的研究报道有很多,

大多以研究有机酸组分含量变化、柠檬酸代谢相关酶活性变化以及相关基因表达为主。杨滢滢等<sup>[10]</sup>对‘纽荷尔’脐橙发育阶段果实有机酸含量进行测定,发现脐橙果实有机酸以柠檬酸为主,之后是奎宁酸,且果实可滴定酸和有机酸含量在发育期间呈逐渐降低的趋势。NOUR等<sup>[11]</sup>运用反相高效液相色谱法测定了10个柑橘品种的有机酸含量,发现柠檬酸含量最高。张规富等<sup>[12]</sup>对不同时期的盆栽椪柑果实进行水分胁迫处理,果实有机酸的含量显著提高,其中柠檬酸合成基因 *Cit CSs* 表达上调及柠檬酸降解基因 *Cit Aco3*、*Cit IDH3*、*Cit GAD4* 和 *Cit GAD5* 表达下调可能是造成这些变化的原因。Sadka等<sup>[13]</sup>研究发现,对盛花后6周的柑橘进行砷处理,35 d后果实柠檬酸合成酶(CS)活性降低,柠檬酸含量显著低于对照。Lin等<sup>[14]</sup>研究发现,‘高橙’和温州蜜柑果实柠檬酸含量均在盛花后90 d达到最高值,温州蜜柑果实发育后期柠檬酸则快速降解,而‘高橙’果实可能存在柠檬酸降解障碍。‘靖安椪柑’前期研究多集中在栽培管理措施对果实品质和产量的影响及其采后贮藏特性上<sup>[15-16]</sup>,关于‘靖安椪柑’果实发育阶段有机酸含量变化规律的研究鲜有报道。

为了研究‘靖安椪柑’果实发育过程柠檬酸变化规律及其与相关基因表达的关系,笔者对‘靖安椪柑’果实发育阶段的有机酸组分及柠檬酸代谢相关基因的表达量进行测定分析,以期揭示其有机酸代谢的分子机制,为‘靖安椪柑’果实的栽培管理及品质调控提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

‘靖安椪柑’于2014年7—11月采自于江西省靖安县果业局下属果园。选定10棵长势相同的健康成年果树,分别在盛花后60、80、100、120、140、160、180、200 d采样取样,当天运回江西农业大学江西省果蔬保鲜与无损检测重点实验室。设置3次重复,每个重复10个果实,取果肉用液氮速冻,于-80℃低温保存,用于测定相关指标。

### 1.2 测定指标及方法

1.2.1 可滴定酸含量 可滴定酸含量采用酸碱中和滴定法测定,结果以柠檬酸的量换算。

1.2.2 有机酸含量的提取与测定 果实有机酸含量的提取参照陈明<sup>[17]</sup>的方法,采用高效液相色谱法

(HPLC)测定其含量。有机酸测定的色谱条件为: C18柱(4.6 mm ×250 mm),柱温为25℃;流动相为0.05 mol L<sup>-1</sup>的磷酸氢二氨水溶液(pH=2.7),流速为0.5 mL min<sup>-1</sup>;二极管阵列检测器检测。

1.2.3 RNA的提取与逆转录 RNA的提取采用CTAB法<sup>[18]</sup>进行。采用琼脂糖凝胶电泳法对提取的RNA进行检测。RNA逆转录采用TaKaRa公司的反转录试剂盒,所得cDNA用于荧光定量分析。

1.2.4 荧光定量 内参基因及柠檬酸代谢相关基因的qRT-PCR引物序列参照陈明<sup>[17]</sup>和Guo等<sup>[19]</sup>的设计,引物序列由华大基因公司合成。使用Bio-RAD荧光定量PCR仪(CFX96TM RealTime System),日本TaKaRa公司的SYBR Premix Ex TaqTM进行Q-PCR基因定量表达分析,数据分析采用2<sup>-ΔΔCT</sup>方法,每个样品设置3次生物学重复。

### 1.3 数据统计与分析

试验采用完全随机设计,使用Excel 2003进行数据统计,用GraphPad Prism 5软件作图,用DPS7.0软件进行相关性分析。

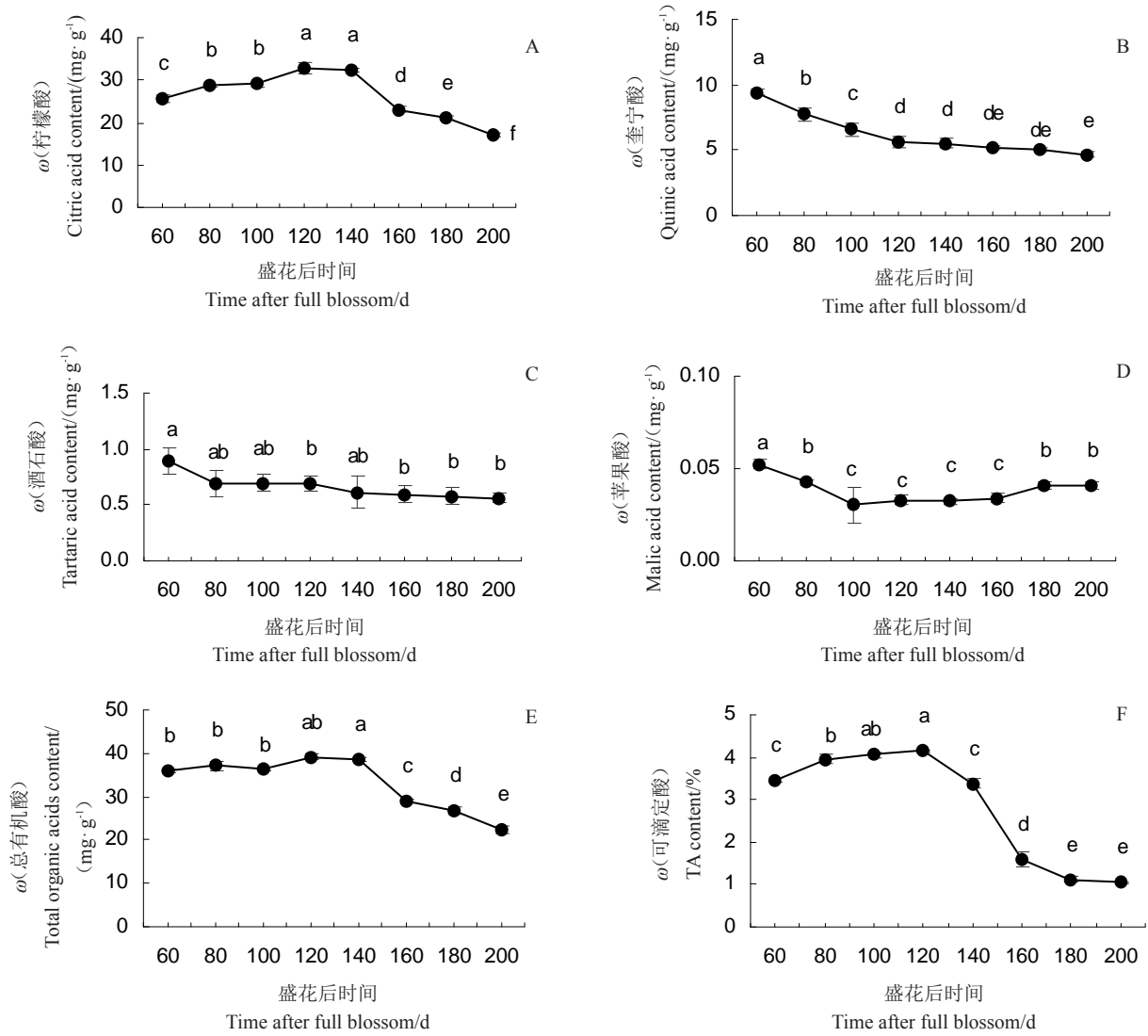
## 2 结果与分析

### 2.1 ‘靖安椪柑’果实发育阶段果实有机酸和可滴定酸含量的变化

图1显示的为‘靖安椪柑’果实发育期间有机酸和可滴定酸含量(ω)的变化,果实柠檬酸含量在发育期间呈先升后降的趋势,在盛花后120 d达到最大值,为32.91 mg·g<sup>-1</sup>,且总有机酸和可滴定酸含量的变化趋势与柠檬酸含量变化趋势相同(图1-A、E、F);在完全成熟时(盛花后200 d)椪柑果实中柠檬酸、总有机酸和可滴定酸含量分别为17.20 mg·g<sup>-1</sup>、22.49 mg·g<sup>-1</sup>和1.36%。奎宁酸和酒石酸含量随着果实发育成熟逐渐降低,在盛花后200 d分别为4.68 mg·g<sup>-1</sup>和0.56 mg·g<sup>-1</sup>(图1-B、C),苹果酸含量在整个发育阶段含量极低,整体呈略微下降的趋势(图1-D)。在整个发育期间,‘靖安椪柑’果实中柠檬酸含量始终最高,占总有机酸含量的71.15%以上;奎宁酸、酒石酸含量次之,占总有机酸含量的14.26%~26.22%;而苹果酸含量最低,不到总有机酸含量的0.2%。

### 2.2 果实 *CitCSs* 基因表达

柑橘柠檬酸的合成受到柠檬酸合成酶(CS)催化,在柑橘基因组有2个CS基因家族成员,分别为*CitCS1*和*CitCS2*。图2为‘靖安椪柑’果实*CitCSs*基



不同小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平差异显著,下同。  
Different small letters indicate significant differences at the level of  $\alpha=0.05$ , the same below.

图1 ‘靖安椪柑’果实发育阶段有机酸和可滴定酸含量的变化

Fig. 1 Changes of total organic acids and titratable acid in ‘Jing’an ponkan’ during fruit development

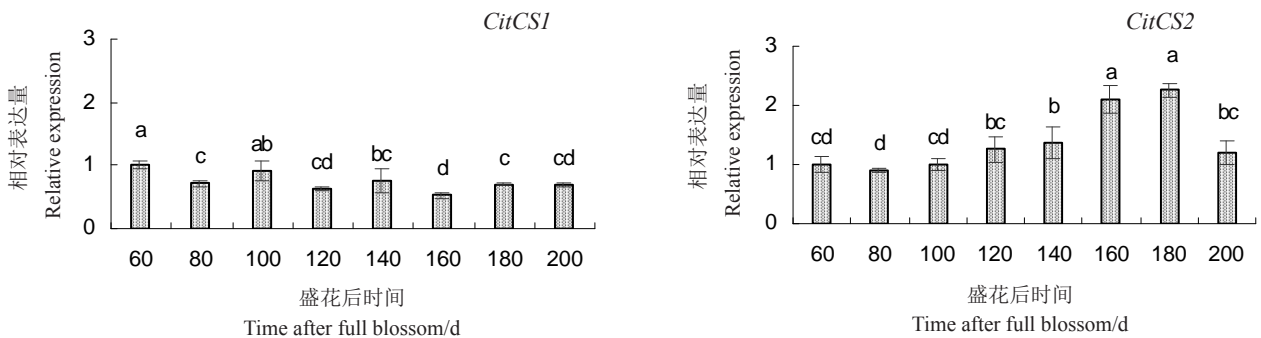


图2 ‘靖安椪柑’果实发育阶段 *CitCSs* 基因表达

Fig. 2 Relative expression levels of *CitCS1* and *CitCS2* in fruits of ‘Jing’an ponkan’ during fruit development

因在发育阶段表达情况,从图2中可知,果实 *CitCSs* 基因表达比较稳定,在整个发育阶段,*CitCS1* 基因相对表达量略有降低,在盛花后 200 d ‘靖安椪柑’ 果实 *CitCS1* 基因相对表达量为 0.69; *CitCS2* 基因相对表达量先增加后减少,在盛花后 180 d 达到最大值 (2.26),在盛花后 200 d 下降为 1.20。

### 2.3 果实 *CitPEPCs* 基因表达

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)羧化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)产生柠檬酸合成的前体物质草酰乙酸(OAA),柑橘基因组有 3 个 *PEPC* 基因家族成员,分别为 *CitPEPC1*、*CitPEPC2* 和 *CitPEPC4*。在 ‘靖安椪柑’ 果实发育过程中,*CitPEPCs* 的表达各异,*CitPEPC1* 表达总体呈先升后降的趋势,*CitPEPC2* 和 *CitPEPC4* 的表达量在果实发育后期有所升高(图3)。

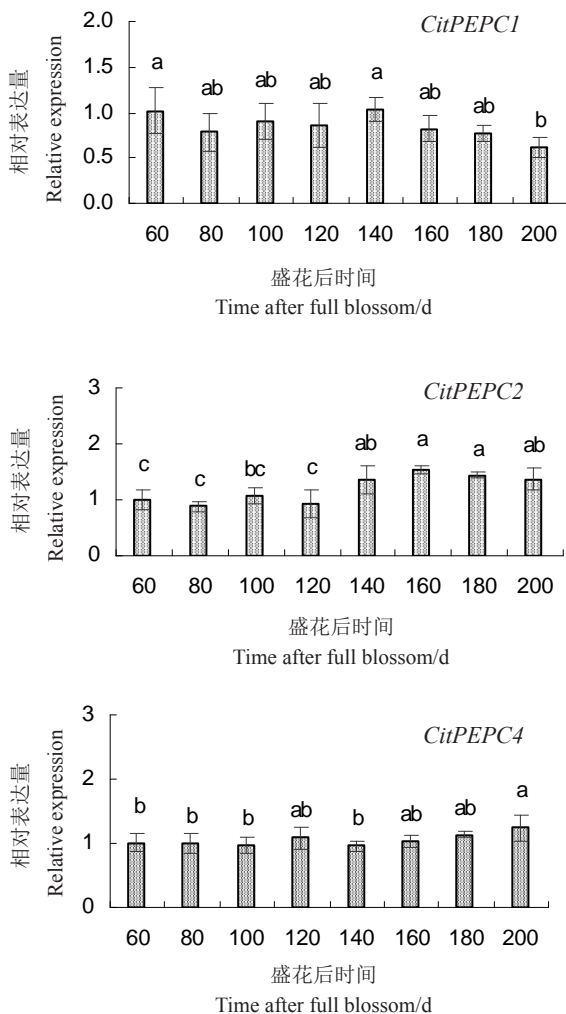


图3 ‘靖安椪柑’果实发育阶段 *CitPEPCs* 基因表达  
Fig. 3 Relative expression levels of *CitPEPCs* in fruits of ‘Jing’an ponkan’ during fruit development

### 2.4 果实 *CitPEPCKs* 基因表达

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)和 PEPC 是一对具有相反功能酶,PEPCK 催化 OAA 向 PEP 的转化,随后转向糖代谢以及黄酮类,脂肪酸等合成代谢过程。在柑橘基因组中分离得到了 2 个 *PEPCK* 基因,分别为 *CitPEPCK1* 和 *CitPEPCK2*。在果实发育阶段,‘靖安椪柑’果实 *CitPEPCK1* 的相对表达量总体呈先下降后上升的趋势。*CitPEPCK2* 的基因表达比较稳定,仅在盛花后 140 d 和 160 d 有所降低(图4)。

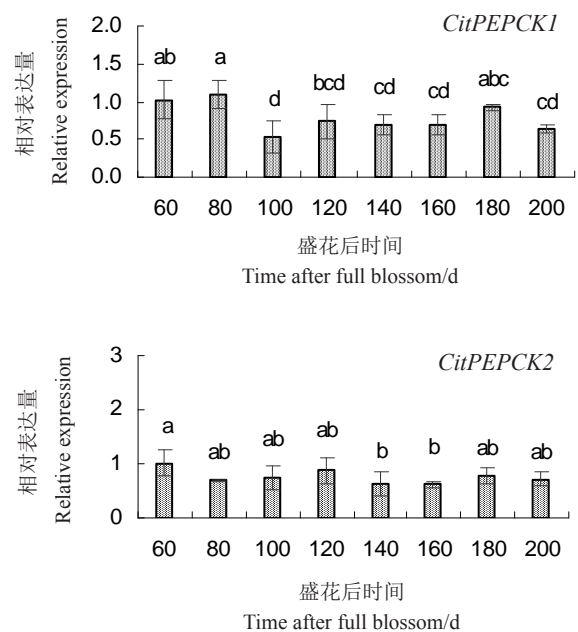
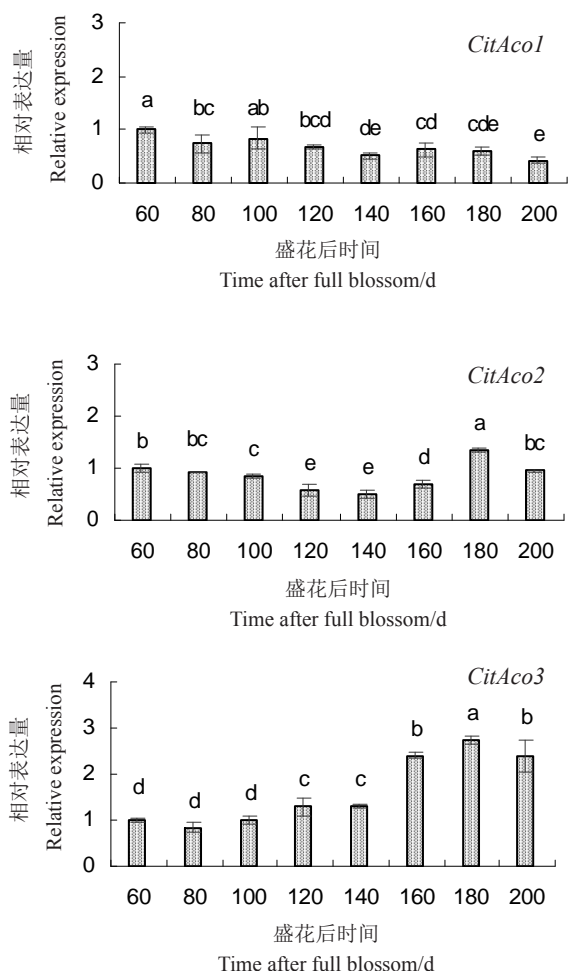


图4 ‘靖安椪柑’果实发育阶段 *CitPEPCKs* 基因表达  
Fig. 4 Relative expression levels of *CitPEPCKs* in fruits of ‘Jing’an ponkan’ during fruit development

### 2.5 果实 *CitAcos* 基因表达

顺乌头酸酶(Aco)是柑橘果实柠檬酸降解的关键酶,它催化柠檬酸转变为异柠檬酸。柑橘 *Aco* 基因有 3 个家族成员,分别命名为 *CitAco1*、*CitAco2* 和 *CitAco3*。‘靖安椪柑’果实发育期间 *CitAcos* 基因表达变化如图5所示。在整个发育阶段,3 个 *CitAcos* 基因表达各不相同。*CitAco1* 基因相对表达量整体呈缓慢下降,盛花后 200 d 为 0.42; *CitAco2* 基因相对表达量整体比较稳定,仅在盛花后 180 d 上升为 1.33; *CitAco3* 基因相对表达量整体呈逐步上升的趋势,在果实发育前期增长缓慢,在盛花后 160 d 急剧增加,在盛花后 180 d 达到最大值(2.74)。

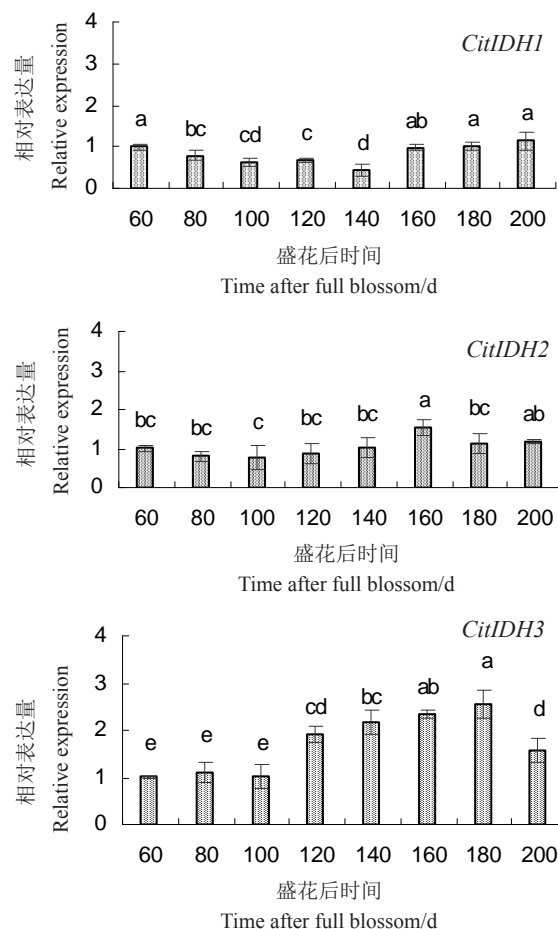
图5 ‘靖安椪柑’果实发育阶段 *CitAcos* 基因表达Fig. 5 Relative expression levels of *CitAcos* in fruits of ‘Jing’an ponkan’ during fruit development

## 2.6 果实 *CitIDHs* 基因表达

异柠檬酸脱氢酶(IDH)参与了柑橘果实柠檬酸的降解,它催化异柠檬酸降解为2-酮戊二酸。柑橘 *IDH* 基因有3个家族成员,分别命名为 *CitIDH1*、*CitIDH2* 和 *CitIDH3*。由图6可知,随着果实生长发育时间延长, *CitIDH1* 基因相对表达量呈先下降后上升的趋势,而 *CitIDH2* 和 *CitIDH3* 基因相对表达量呈先增加后减少的趋势,其中 *CitIDH2* 在盛花后160 d达到最大值(1.54),而 *CitIDH3* 基因相对表达量在盛花后180 d达到最大值(2.56)。

## 2.7 果实 *CitGADs* 和 *CitGSs* 基因表达

在柠檬酸代谢的GABA循环中,谷氨酸脱羧酶(GAD)将谷氨酸催化生成 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA),在柑橘基因组中分离出 *CitGAD4* 和 *CitGAD5* 2个 *GAD* 基因。‘靖安椪柑’果实发育期间 *CitGADs* 基因表达变化如图7所示, *CitGAD4* 基因相对表达量呈

图6 ‘靖安椪柑’果实发育阶段 *CitIDHs* 基因表达Fig. 6 Relative expression levels of *CitIDHs* in fruits of ‘Jing’an ponkan’ during fruit development

先缓慢上升后下降的趋势,在盛花后180 d达到最大值(1.73),在盛花后200 d下降至1.04; *CitGAD5* 基因相对表达量从盛花后60 d到盛花后80 d比较平稳,盛花后100 d急剧上升,并在之后保持较高水平。

谷氨酸除了可以进入GABA途径外,它还能在GS的作用下生成谷氨酰胺进入氨基酸代谢。柑橘果实 *CitGSs* 基因包含 *CitGS1* 和 *CitGS2*, *CitGS1* 基因在柑橘果实内表达极低,无法获取对应的Ct值。 *CitGS2* 基因相对表达量在发育期间的趋势为先上升后下降,在盛花后180 d最大,在盛花后200 d略有下降。

## 2.8 果实 *CitACLs* 基因表达

ATP-柠檬酸裂合酶(ACL)使柠檬酸裂解为草酰乙酸(OAA)和乙酰辅酶A(Ac-CoA),这是柠檬酸降解的另一条途径。在柑橘基因组中分离得3个 *CitACL* 基因,分别为 *CitACL1*、*CitACL2* 和 *CitA-*

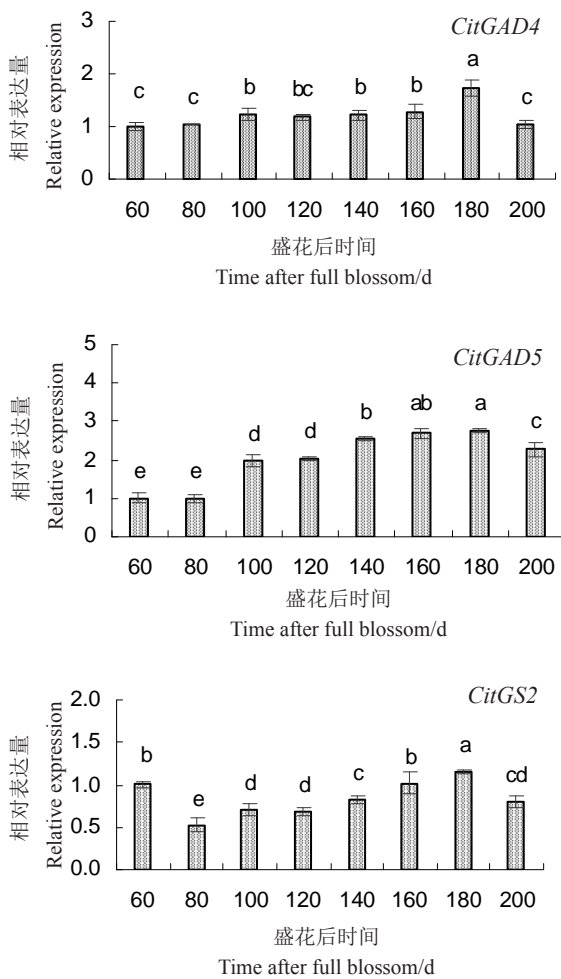


图 7 ‘靖安椪柑’果实发育阶段  
*CitGADs* 和 *CitGS2* 基因表达

Fig. 7 Relative expression levels of *CitGADs* and *CitGS2* in fruits of ‘Jing’ an ponkan’ during fruit development

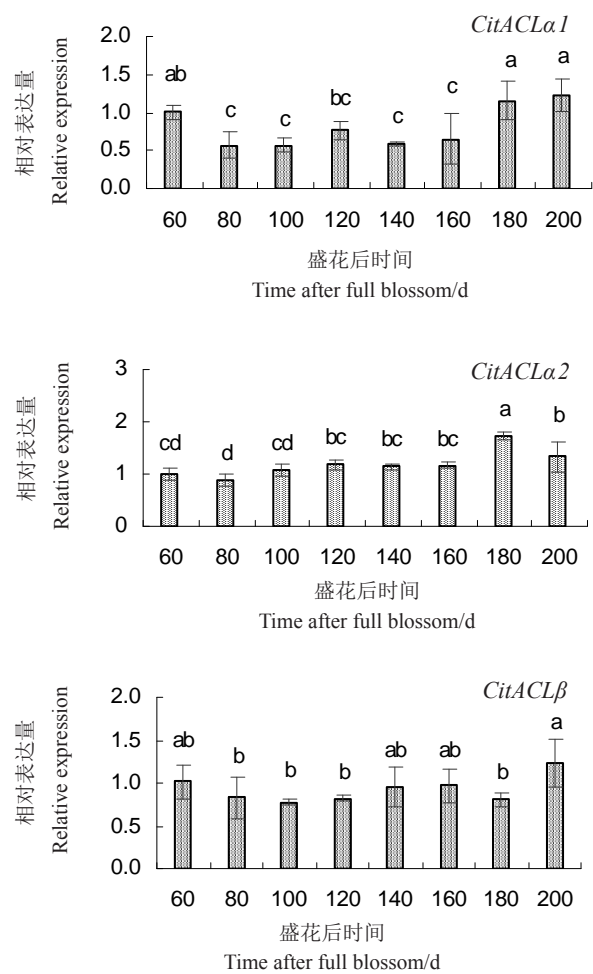


图 8 ‘靖安椪柑’果实发育阶段 *CitACLs* 基因表达

Fig. 8 Relative expression levels of *CitACLs* in fruits of ‘Jing’ an ponkan’ during fruit development

*CLβ*。从图 8 可以看出,在靖安椪柑果实发育阶段,*CitACLα1* 和 *CitACLβ* 的相对表达量整体呈先下降再上升的趋势,且均在盛花后 200 d 达到最大值。*CitACLα2* 的表达在果实发育前期相对稳定,在发育后期升高。

## 2.9 果实 *CitFBPases* 基因表达

果糖-1,6-二磷酸酶(FBPase)催化果糖-1,6-二磷酸(FDP)水解为果糖-6-磷酸(F6P),它也是卡尔文循环和糖异生途径的关键酶。在柑橘基因组中分离得到 2 个 *FBPase* 基因,分别为 *CitFBPase1* 和 *CitFBPase2*。由图 9 可知,‘靖安椪柑’果实 *CitFBPase1* 的相对表达量在发育前期相对稳定,在果实发育后期显著降低。*CitFBPase2* 的表达整体相对稳定,仅在盛花后 80 d 和 120 d 相对降低。

## 2.10 ‘靖安椪柑’果实柠檬酸含量与代谢相关基因表达的相关性分析

将‘靖安椪柑’果实柠檬酸含量和其代谢相关基因表达进行相关性分析,结果如表 1 所示,果实柠檬酸和 *CitCS1* 和 *CitPEPC4* 对表达量呈负相关,但不显著,与 *CitCS2* 和 *CitPEPC1/2* 基因相对表达量呈正相关但不显著;*CitPEPCK1* 和 *CitPEPCK2* 基因相对表达量与柠檬酸含量无显著相关;*CitAcos* 基因中,*CitAco1* 基因相对表达量与柠檬酸含量呈不显著正相关,*CitAco2* 和 *CitAco3* 基因相对表达量都与柠檬酸含量呈显著负相关;果实 *CitIDHs* 基因相对表达量都与柠檬酸含量呈负相关,其中 *CitIDH1/2* 达到极显著相关;*CitGAD4* 和 *CitGAD5* 基因相对表达量与柠檬酸含量无显著相关,*CitGS2* 基因相对表达量与

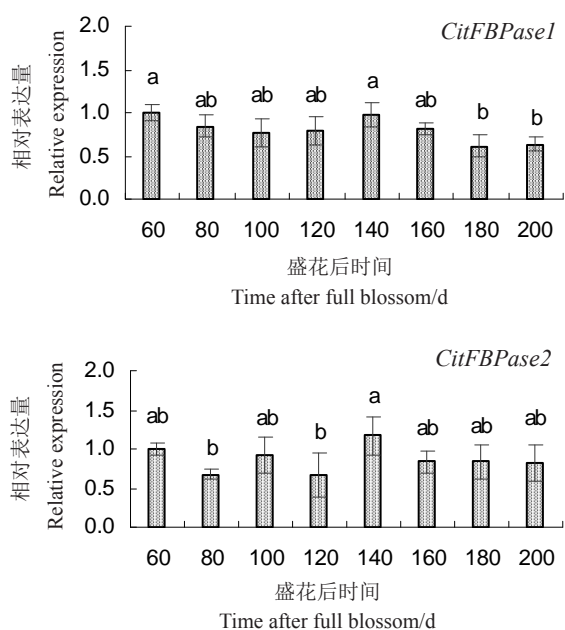


图9 ‘靖安椪柑’果实发育阶段 *CitFBPases* 基因表达  
Fig.9 Relative expression levels of *CitFBPases* in fruits of ‘Jing’ an ponkan’ during fruit development

表1 ‘靖安椪柑’果实发育阶段柠檬酸含量  
与酸代谢相关基因表达的相关系数

Table 1 Correlation coefficient between citric acid content and related acid metabolism gene expression in ‘Jing’ an ponkan’ during fruit development

基因 Gene	柠檬酸含量 Citric acid	基因 Gene	柠檬酸含量 Citric acid
<i>CitCS1</i>	-0.403	<i>CitIDH2</i>	-0.601*
<i>CitCS2</i>	0.157	<i>CitIDH3</i>	-0.149
<i>CitPEPC1</i>	0.693	<i>CitGAD4</i>	-0.183
<i>CitPEPC2</i>	0.584	<i>CitGAD5</i>	-0.268
<i>CitPEPC4</i>	-0.451	<i>CitGS2</i>	-0.315
<i>CitPEPCK1</i>	-0.006	<i>CitACLa1</i>	-0.764*
<i>CitPEPCK2</i>	0.051	<i>CitACLa2</i>	-0.530
<i>CitAco1</i>	0.321	<i>CitACLβ</i>	-0.599
<i>CitAco2</i>	-0.657*	<i>CitFBPase1</i>	0.627
<i>CitAco3</i>	-0.763*	<i>CitFBPase2</i>	0.136
<i>CitIDH1</i>	-0.912**		

注:\*表示显著相关,\*\*表示极显著相关。

Note: \* indicate significant correlation, \*\* indicate highly significant correlation.

柠檬酸含量负相关,不显著;*CitACLs* 家族均与柠檬酸含量呈负相关,其中 *CitACLa1* 呈显著负相关;*CitFBPase1* 和 *CitFBPase2* 基因相对表达量都与柠檬酸

含量呈不显著正相关。

### 3 讨论

柑橘果实有机酸含量在发育期间的一般规律为:在生长发育过程中逐渐积累,进入成熟期后含量下降,且不同品种柑橘果实有机酸组分含量各不相同<sup>[20]</sup>。在果实发育期间,‘靖安椪柑’果实有机酸各组分中柠檬酸含量最高,奎宁酸、酒石酸含量次之,而苹果酸含量最低,总有机酸和可滴定酸含量的变化与柠檬酸含量的变化相同,均是先上升后下降,这与李绍佳<sup>[21]</sup>、Albertini 等<sup>[22]</sup>和高阳等<sup>[23]</sup>研究结果一致。

张小红等<sup>[24]</sup>对琯溪蜜柚的研究发现,琯溪蜜柚果实在成熟期间可滴定酸含量降低,柠檬酸含量减少与CS和PEPC活性下降有关;张规富等<sup>[12]</sup>、肖玉明<sup>[25]</sup>的研究结果表明,水分胁迫诱导 *CitCS* 基因表达是造成柑橘果实发育期间有机酸积累的原因。相反,Chen 等<sup>[26]</sup>、Sadka 等<sup>[13]</sup>研究认为,柑橘果实发育期间有机酸含量与柠檬酸合成基因 *CitCSs* 和 *CitPEPCs* 基因表达无关。本试验结果表明,在整个果实发育期间,‘靖安椪柑’果实 *CitCS1* 基因相对表达量略有下降, *CitCS2* 基因相对表达量先增加后减少, *CitPEPC1* 表达总体呈先升后降的趋势, *CitPEPC2* 和 *CitPEPC4* 的表达量在果实发育后期有所升高,这些基因表达量均与柠檬酸含量无显著性相关,说明 *CitCSs* 和 *CitPEPCs* 的基因表达不是调控‘靖安椪柑’果实柠檬酸含量变化的主要原因。

柑橘果实发育阶段有机酸的积累与柠檬酸降解酶相关,柠檬酸可以通过不同的途径进行降解代谢,包括GS、GABA和乙酰辅酶A(或称ACL途径)等途径。Degu 等<sup>[27]</sup>研究表明, Aco 是柠檬酸代谢的关键酶,抑制 Aco 活性能使果实柠檬酸含量增加。在柑橘中鉴定出 *CitAco1*、*CitAco2* 和 *CitAco3* 这3个编码乌头酸水合酶蛋白的转录单元,实时 RT-PCR 表达分析其在不同柑橘品种果实发育期间的表达发现, *CitAco3* 表达总是低,但 *CitAco1* 和 *CitAco2* 基因一般在果实快速生长阶段随着有机酸含量由最大值开始减少而被诱导<sup>[28]</sup>。Lin 等<sup>[14]</sup>研究认为,温州蜜柑低柠檬酸积累与酸降解途径中的 *CitAco3* 基因相关。龚荣高等<sup>[29]</sup>研究结果表明, IDH 是脐橙果实柠檬酸降解的重要酶,且 IDH 活性与果实有机酸含量呈显著负相关。Cercós 等<sup>[30]</sup>提出 GABA 循环在柑橘果实柠



檬酸降解过程中起着重要作用, Sheng 等<sup>[31-32]</sup>的研究进一步证明, 柑橘果实柠檬酸的积累受 GABA 途径影响。胡小梅<sup>[33]</sup>的研究表明, 在纽荷尔脐橙、温州蜜柑、椪柑、HB 柚等 6 个柑橘果实成熟的过程中都检测到 *CitACL* 家族 3 个基因的表达, 证明在柑橘果实成熟过程中, *ACL* 参与了柠檬酸的代谢过程, 并且在不同品种的柑橘果实中 *CitACLs* 的表达不同, 说明 *ACL* 的作用与不同品种有关。此外, Licciardello 等<sup>[34]</sup>的研究发现, 在 Tarocco Ferreri -TF 果实中 *ACL* 基因表达量随着柠檬酸含量的降低反而降低, 而在 Vaniglia biondo-VB 果实中 *ACL* 基因表达量极低, 基本可以忽略。FBPase 催化 FDP 水解为 F6P, 它也是卡尔文循环和糖异生途径的关键酶, 杨滢滢<sup>[35]</sup>在对赣南脐橙的研究中发现, 热空气处理能够诱导成熟果实 *CitFBPase* 表达, 促进果实柠檬酸通过 *ACL* 和 GABA 途径降解。

笔者比较分析了已分离的柠檬酸降解相关基因在‘靖安椪柑’果实发育阶段的表达规律, 结果表明, ‘靖安椪柑’果实 *CitAco2/3* 基因相对表达量与柠檬酸含量均呈显著负相关, 在发育前期柠檬酸逐渐积累, *CitAco2/3* 基因相对表达量增长缓慢; 果实发育后期柠檬酸降低, *CitAco2/3* 基因相对表达量迅速增加, 这说明‘靖安椪柑’果实有机酸含量与 *CitAco2/3* 基因表达有直接关联。*CitIDH1* 基因相对表达量呈先下降后上升的趋势, 而 *CitIDH2* 和 *CitIDH3* 基因相对表达量呈先增加后减少的趋势且均与果实柠檬酸含量呈负相关, 其中 *CitIDH1* 达到极显著相关, *CitIDH2* 呈显著相关, 这说明 *CitIDH1/2* 基因相对表达是‘靖安椪柑’果实发育期间有机酸积累的重要原因。‘靖安椪柑’果实 *CitGAD4* 基因相对表达量整体缓慢增加, 与柠檬酸含量无相关性, *CitGAD5* 基因相对表达量整体呈上升趋势, 在盛花后 180 d 达到最大值, 与柠檬酸含量无相关性。*CitGS2* 基因相对表达量呈上升的趋势, 与柠檬酸含量呈负相关, 但不显著。这说明了 GABA 途径并不是影响‘靖安椪柑’果实发育期间有机酸积累的主要因素, 这与杨滢滢等<sup>[10]</sup>的研究结果不同, 这可能是品种间的差异造成的。*CitACL* 家族的 3 个基因均与柠檬酸含量呈负相关, 其中 *CitACL $\alpha$ 1* 呈显著负相关, *CitPEPCKs* 和 *CitFBPases* 基因表达各不相同, 但均与柠檬酸含量变化无显著相关, 这说明 *CitACL $\alpha$ 1* 参与‘靖安椪柑’果实发育阶段有机酸的调控。关于‘靖安椪柑’果实柠

檬酸代谢的具体调控机制还有待进一步从柠檬酸转运等多途径进行研究, 并通过转录组、代谢组和蛋白组学等手段进行深入。

## 4 结 论

明确了‘靖安椪柑’果实发育期间有机酸含量的变化规律, 发现果实有机酸含量主要由柠檬酸含量决定; 随着果实发育成熟, 柠檬酸和有机酸含量呈先升高后降低的变化, 这种变化与柠檬酸合成相关基因 *CitCSs* 和 *CitPEPCs* 的表达无直接关联, 主要受降解相关基因影响, 尤其是 *CitAco2/3*、*CitIDH1/2* 和 *CitACL $\alpha$ 1* 的相对表达量在果实发育中后期表达量增加可能是调控‘靖安椪柑’发育阶段果实有机酸在后期下降的重要因素。

## 参考文献 References:

- [1] 罗怿, 吴传明, 罗素兰, 吴开庭, 侯成德, 李金强. 地面覆膜对椪柑品质及产量的影响[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(5): 47-49.  
LUO Yi, WU Chuanming, LUO Sulan, WU Kaiting, HOU Chengde, LI Jinqiang. Effects of plastic mulch on ponkan quality and yield [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2017, 45(5): 47-49.
- [2] 舒桂南, 熊尚知. 靖安椪柑生物学特性观察及栽培技术要点[J]. 现代园艺, 2008(4): 11-12.  
SHU Guinan, XIONG Shangzhi. The observed biological characteristics and cultivation techniques of Jing'an Ponkan [J]. Modern Horticulture, 2008(4): 11-12.
- [3] 卢晓鹏, 李菲菲, 谢深喜. 柑橘果实柠檬酸积累调控基因研究进展[J]. 果树学报, 2018, 35(1): 118-127.  
LU Xiaopeng, LI Feifei, XIE Shenxi. Citrate accumulation in citrus fruit: a molecular perspective [J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(1): 118-127.
- [4] 郑丽静, 聂继云, 闫震. 糖酸组分及其对水果风味的影响研究进展[J]. 果树学报, 2015, 32(2): 304-312.  
ZHENG Lijing, NIE Jiyun, YAN Zhen. Advances in research on sugars, organic acids and their effects on taste of fruits [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(2): 304-312.
- [5] LI S J, YIN X. R, XIE X L, ALLAN C, GE H, SHEN S L, CHEN K S. The citrus transcription factor, *citerf13*, regulates citric acid accumulation via a protein-protein interaction with the vacuolar proton pump, *citvha-c4* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20151.
- [6] HUSSAIN S B, SHI C Y, GUO L X, KAMRAN H M, SADKA A, LIU Y Z. Recent advances in the regulation of citric acid metabolism in citrus fruit [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2017, 36(4): 241-256.
- [7] 林琼. 柠檬酸代谢及转运相关基因对柑橘果实酸度的调控机

- 制 [D]. 杭州:浙江大学,2015.
- LIN Qiong. Regulation of citrus fruit acidity by genes related to citrate metabolism and transportation [D]. Hangzhou: Zhejiang University,2015.
- [8] 赵淼,吴延军,蒋桂华,谢鸣,林毅,蔡永萍. 柑橘果实有机酸代谢研究进展 [J]. 果树学报,2008,25(2): 225-230.
- ZHAO Miao, WU Yanjun, JIANG Guihua, XIE Ming, LIN Yi, CAI Yongping. Advances in research on the metabolism of organic acids in *Citrus* fruits[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25 (2): 225-230.
- [9] KAYZ E, BOO K H, KIM H Y, EIGENHEER R A, PHINNEY B S, SHULAEV, V, NEGRE Z F, SADKA A, BLUNWALD E. Label-free shotgun proteomics and metabolite analysis reveal a significant metabolic shift during citrus fruit development [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 62(15): 5367-5384.
- [10] 杨滢滢,高阳,向妙莲,陈明,陈金印. ‘纽荷尔’脐橙果实发育过程中几种柠檬酸代谢相关基因的表达特征分析 [J]. 果树学报,2016,33(4): 400-408.
- YANG Yingying, GAO Yang, XIANG Miaolian, CHEN Ming, CHEN Jinyin. Expression profile analysis of several citric acid metabolism related genes in the ‘Newhall’ navel orange during fruit development [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(4): 400-408.
- [11] NOUR V, TRANDAFIR I, IONICA M E. Hplc organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions [J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2010, 38(1): 44-48.
- [12] 张规富,卢晓鹏,谢深喜. 不同时期水分胁迫对椪柑果实柠檬酸代谢相关基因表达的影响 [J]. 果树学报,2015,32(4): 525-535.
- ZHANG Guifu, LU Xiaopeng, XIE Shenxi. Influence of water stress in different development stage on the citric acid metabolism-related genes expression in the ponkan fruits [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(4): 525-535.
- [13] SADKA A, ARTZI B, COHEN L, DAHAN E, HASDAI D, TAGARI E, ERNER Y, ARSENITE. Reduces acid content in citrus fruit, inhibits activity of citrate synthase but induces its gene expression [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science American Society for Horticultural Science, 2000, 125(3): 288-293.
- [14] LIN Q, LI S, DONG W, FENG C, YIN X, XU C, SUN C, CHEN K. Involvement of citric acid and citric acid in developmental-related and postharvest-hot-air driven citrate degradation in citrus fruits [J]. Plos One, 2015, 10(3): e0119410-e0119426.
- [15] 王小东,贺磊,高璜. 竹醋液叶面肥对靖安椪柑生长、品质及产量的影响[J]. 南方林业科学, 2015, 43(4):22-24.
- WANG Xiaodong, HE Lei, GAO Huang. Application effect of bamboo vinegar liquid fertilizer on growth of Jing’ an Ponkan mandarin orange and its quality and yield [J]. South China Forestry Science, 2015, 43 (4): 22-24.
- [16] 陈小红. 采收期、贮藏温度和热水处理对靖安椪柑果实贮藏保鲜效果的研究[D]. 南昌:江西农业大学,2015.
- CHEN Xiaohong. Effect of harvest date, storage temperature and hot water treatment on preservation of Jing’an Ponkan [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2015.
- [17] 陈明. 椪柑和脐橙果实柠檬酸合成与降解相关基因表达及其调控研究[D]. 杭州:浙江大学,2013.
- CHEN Ming. Expression and its regulation of citric acid synthesis and degradation related genes in the fruits of ponkan and Navel Orange [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [18] CHANG S J, PURYEAR J, CAIMEY J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2):113-116.
- [19] GUO L X, SHI C Y, LIU X, NING D Y, JING L F, YANG H, LIU Y Z. Citrate accumulation-related gene expression and/or enzyme activity analysis combined with metabolomics provide a novel insight for an orange mutant [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29343.
- [20] CLEMENTS R L. Organic acids in citrus fruits. I. Varietal differences [J]. Journal of Food Science, 2006, 29(3): 276-280.
- [21] 李绍佳. Citerf13 与 citvha-c4 协同调控柑橘果实柠檬酸代谢研究[D]. 杭州:浙江大学,2016.
- LI Shaojia. Research on regulation of the citric acid metabolism in citrus fruits by Citerf13 and citvha-c4 [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [22] ALBERTINI M V, CARCOUET E, PAILLY O, GAMBOTTI C, LURO F, BERTI L. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(21): 8335-8339.
- [23] 高阳,杨滢滢,郑嘉鹏,张明娟,刘向阳,罗莎莎,陈明,陈金印. 靖安椪柑果实发育阶段糖、酸组分含量变化[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38 (4): 631-636.
- GAO Yang, YANG Yingying, ZHENG Jiapeng, ZHANG Mingjuan, LIU Xiangyang, LUO Shasha, CHEN Ming, CHEN Jinyin. Change of sugar and organic acid compositions during fruit development in Jing’ an Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit [J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 2016, 38 (4): 631-636.
- [24] 张小红,赵依杰,潘东明,林航. 琯溪蜜柚果实采后有机酸代谢 [J]. 果树学报,2010,27(2): 193-197.
- ZHANG Xiaohong, ZHAO Yijie, PAN Dongming, LIN Hang. Pummelo fruit postharvest organic acid metabolism [J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(2): 193-197.
- [25] 肖玉明. 干旱胁迫对温州蜜柑果实品质及柠檬酸代谢相关基因表达的影响[D]. 长沙:湖南农业大学,2014.
- XIAO Yuming. Effects of drought stress on fruit quality and citrate metabolism related gene expression of *Citrus unshiu* Marc [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014.
- [26] CHEN M, XIE X, LIN Q, CHEN JI, GRIERSON, DONALD, YIN X, SUN C, CHEN K. Differential expression of organic ac-

- id degradation-related genes during fruit development of navel oranges (*Citrus sinensis*) in two habitats [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(5): 1131-1140.
- [27] DEGU A, HATEW B, NUNES-NESE N A, SHLIZERMAN L, ZUR N, KATZ E, FERNIE AR, BLUMWALD E, SADKA A. Inhibition of aconitase in citrus fruit callus results in a metabolic shift towards amino acid biosynthesis [J]. *Planta*, 2011, 234(3): 501-513.
- [28] TEROL J, SOLER G, TALON M, CERCOS M. The aconitate hydratase family from citrus [J]. *Bmc Plant Biology*, 2010, 10(1): 58-59.
- [29] 龚荣高, 吕秀兰, 张光伦, 梁国鲁. 不同脐橙品种果实有机酸代谢相关酶的研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2011, 29(4): 499-502. GONG Ronggao, LÜ Xiulan, ZHANG Guanglun, LIANG Guolu. Enzymes related to organic acid-metabolizing in Navel orange with different varieties [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2011, 29(4): 499-502.
- [30] CERCÓS M, SOLER G, IGLESIAS D J, GADEA J, FORMENT J, TALON M. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62(4/5): 513-527.
- [31] SHENG L, SHEN D, LUO Y, SUN X, WANG J, LUO T, ZENG Y, XU J, DENG X, CHENG Y. Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid treatment affects citrate and amino acid accumulation to improve fruit quality and storage performance of postharvest citrus fruit [J]. *Food Chemistry*, 2017, 216: 138.
- [32] SHENG L, SHEN D, YANG W, ZHANG M, ZENG Y, XU J, DENG X, CHENG Y. GABA pathway rate-limit citrate degradation in postharvest citrus fruit evidence from hb pumelo (*Citrus grandis*)  $\times$  fairchild (*Citrus reticulata*) hybrid population [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2017, 65(8): 1669.
- [33] 胡小梅. 柑橘 ATP-柠檬酸裂解酶基因的挖掘与其在柠檬酸代谢中的作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015. HU Xiaomei. Genome-wide identification of ATP-citrate lyase genes in citrus, and its role in the metabolism of citric acid [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [34] LICCIARDELLO C, CASAS G L, CARUSO M, CARUSO P, RUSSO M P, PAOLO D P, RUSSO G. The evolution of citrate metabolism in acidic and acidless citrus genotypes during fruit development and ripening [J]. *Acta Horticulturae*, 2016, 1135: 53-60.
- [35] 杨滢滢. ‘纽荷尔’脐橙果实柠檬酸合成与降解机理的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2017. YANG Yingying. Research on synthesis and degradation of citric acid in ‘Newhall’ navel orange fruit [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2017.