

套袋对‘马家柚’果肉主要类胡萝卜素积累及相关基因表达的影响

邱丽^a, 杨莉^a, 旦世浩, 刘德春, 胡威, 张王妮, 刘勇^{*}

(江西农业大学农学院, 南昌 330045)

摘要:【目的】通过对江西特色品种‘马家柚’进行套袋处理, 了解套袋对其果肉主要类胡萝卜素积累及相关基因表达的影响。【方法】以不套袋处理为对照, 分析套袋处理后‘马家柚’果肉色泽、果肉主要类胡萝卜素(番茄红素和 β -胡萝卜素)含量以及类胡萝卜素代谢相关基因的表达水平变化。【结果】‘马家柚’果肉 a^* 值、 H 值和CCI值从套袋后15 d开始显著高于不套袋处理果肉, 表现为套袋后果肉颜色更红, 综合性状更好。番茄红素含量自套袋后15 d开始, 及 β -胡萝卜素含量从套袋后30 d开始显著高于不套袋处理。进一步分析类胡萝卜素代谢相关基因表达情况发现: 与不套袋相比, 套袋前中期, 番茄红素和 β -胡萝卜素合成的大部分相关基因表现为上调表达, 其中与番茄红素和 β -胡萝卜素合成相关的 $PSY2$ 、 PDS 、 β - $LCY1$ 、 β - $LCY2$ 上调显著, 分别上调17.23、1.72; 8.15、16.36; 4.56、1.57; 31.78、1.17倍, 而与 β -胡萝卜素降解相关的 BCH 基因在套袋前期显著高于不套袋处理, 但在套袋中期显著低于不套袋处理, 下调3.07倍。【结论】因此推测套袋与促进番茄红素和 β -胡萝卜素的积累与二者合成相关基因 $PSY2$ 、 PDS 、 β - $LCY1$ 、 β - $LCY2$ 的上调表达有关, 而 β -胡萝卜素降解相关基因 BCH 在中期时的下调表达可能也起到一定作用。

关键词: ‘马家柚’; 套袋; 类胡萝卜素; 基因表达

中图分类号: S666.3

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)02-0153-11

Effects of bagging on the accumulation of main carotenoids and the related gene expression in ‘Majiayou’ pomelo

QIU Li^a, YANG Li^a, DAN Shihao, LIU Dechun, HU Wei, ZHANG Wangni, LIU Yong^{*}

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

Abstract: 【Objective】‘Majiayou’ pomelo [*Citrus maxima* (L.) Osbeck] is an excellent variety in Jiangxi province. A bagging treatment was carried out in this study to determine the effects of bagging on the accumulation of main carotenoids (lycopene and β -carotene), and the expression change of carotenoids metabolism relevant genes and to further understand the relationship between light and pulp carotenoid metabolism. 【Methods】The double paper bags with yellow color on the outside layer and black color on the inside layer were used for bagging experiment on the fruits of ‘Majiayou’ pomelo, no bagging treatment was used as the control. The bagging time was July 25, 2017. And the bagged fruits were harvested on August 10, August 25, September 10, September 25, October 10, October 25, and November 10, respectively. The color difference index of the pulp in the equatorial part of ‘Majiayou’ pomelo fruit was measured by “CIELab” color system in Chromatic meter. Both the point near the middle column and the point far from the middle column were selected from each juice vesicles for measurement. The items measured included the L^* , a^* , b^* , and H and CCI value. The contents of main

收稿日期: 2019-07-22 接受日期: 2019-11-13

基金项目: 国家自然科学基金(31660563, 31860544); 江西省柑橘产业技术体系项目(JXARS-07-栽培岗位); 江西省高等学校科技落地计划项目(KJLD13025)

作者简介: 邱丽, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 果树发育生理, E-mail: 1476212539@qq.com. a为共同第一作者。杨莉, 女, 讲师, 博士, E-mail: yangli526526@126.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: liuyongjxau@163.com

carotenoids (lycopene and β -carotene) in ‘Majiaoyou’ pomelo pulp were measured as follow: The extraction of the lycopene and β -carotene from pulp was performed by acetone-petroleum ether method. 2 g sample cutting from the ‘Majiaoyou’ pomelo pulp was added into 10 mL mixed solution of acetone-petroleum ether (1:1), Configured samples were set in a ultrasonic cleaner at 50 °C for 15 min for sonicate treatment, then the samples were centrifuged at 8 000 r · min⁻¹ for 10 min. The supernatant was filtered and extracted repeatedly until it was colorless. Extracted sample was transferred to a separately funnel, and was allowed to stand for stratification. The upper organic phase was passed through a funnel containing anhydrous sodium sulfate, and the lower layer was extracted again with petroleum ether and evaporated to dryness at 35 °C. Finally, the sample was ready for HPLC analysis after being dissolved in 3 mL of dichloromethane and filtered through a 0.45 μ m filter. HPLC analysis was carried out by Shimadzu LC-20A Prominence High Performance Liquid Chromatograph using Waters Symmetry Shield RP18 reversed phase column (4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 μ m) and diode array detector with a detection wavelength of 450 nm and a column temperature of 30 °C. The mobile phase was acetonitrile-dichloromethane-methanol (20 - 75 - 5) (*V: V: V*) and flow rate was 1 mL · min⁻¹. The β -carotenoid and lycopene contents were finally detected by using relevant standard. The expression level of carotenoids metabolism relevant genes were analyzed by Q-PCR as follow: the total RNA of ‘Majiaoyou’ pomelo pulp was extracted by modified CTAB method, and reverse transcription of total RNA into cDNA was executed by PrimeScript™ RT reagent Kit. Then, specific primers of carotenoids metabolism relevant genes were designed by Primer 5.0 software according to its gene sequence. Q-PCR was performed with three biological replications per sample on a bio-rad CFX 96-pcr instrument using a SYBR®Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) kit. And its data were analyzed using a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.【Results】The results showed that the a^* value, H value and CCI value of the pulp of the ‘Majiaoyou’ pomelo were significantly higher than those of the CK which indicated that the bagging treatment could improve fruit color and comprehensive properties. The lycopene content in the pulp of the bagging treated fruits was significantly higher than that of the CK and the significant increase of the β -carotene content began on August 25 (30 d after bagging). Further analysis of the expression of carotenoid metabolism-related genes revealed that most of the related genes involved in the synthesis of lycopene and β -carotene were up-regulated at the middle and early stages of bagging. The up-regulation of *PSY2*, *PDS*, β -*LCY1* and β -*LCY2* related to carotenoid synthesis was significantly up-regulated by 17.23, 1.72; 8.15, 16.36; 4.56, 1.57; 31.78, 1.17 times, respectively, and the *BCH* gene was associated with β -carotene degradation. At the early stage of bagging, *BCH* gene was significantly higher than that of the CK, but it was 3.07 times lower than that the non-bagging treatment at the middle stage of the bagging treatment.【Conclusion】The bagging treatment could promote the accumulation of the lycopene and the β -carotene due to the up-regulated expression of the synthetic genes *PSY2*, *PDS*, β -*LCY1* and β -*LCY2*, at the same time the downward expression of the β -carotene degradation-related gene *BCH* at the medium stage of the bagging might also partially play a role in the promotion of the increase of the lycopene and the β -carotene.

Key words: ‘Majiaoyou’ pomelo; Bagging; Carotenoid; Gene expression

类胡萝卜素是柑橘的主要呈色色素,其代谢水平受多种外界因子和自身生长发育的影响,大量研究表明光照是影响植物类胡萝卜素积累的关键调控因素之一^[1-4]。果实套袋是现代果品优质生产中的一项关键技术,通过创造黑暗环境,在改善梨^[5]、

苹果^[6]、龙眼^[7]、脐橙^[8]、桃^[9]和葡萄^[10]等果实外观品质和提高果实质量方面取得了显著的效果。目前套袋对类胡萝卜素积累影响的研究多集中在果皮上,王武等^[11]的研究表明,套袋能加快‘北碚 447 锦橙’果皮褪绿,提高果面亮度,有利于色泽呈现,但同时

也抑制了类胡萝卜素的积累,果实色泽偏黄。陶俊等^[1]对柑橘进行的套袋研究也表明,套袋引起果实转色提早,但各种类胡萝卜素含量及总量显著下降。Lopez 等^[12]发现,辣椒果实在花后经过 60 d 的遮光处理,其类胡萝卜素总量下降。Huang 等^[13]的研究发现,套袋会显著降低红皮沙梨果实类胡萝卜素含量,将套袋果实采摘前 2~3 周去袋可使果实重新合成大量类胡萝卜素。董新甜^[14]在研究套袋对黄桃果肉类胡萝卜素积累的影响时发现,套袋显著提高了‘金童 6 号’和‘金童 8 号’成熟果实的果肉类胡萝卜素含量,并发现在果实幼果期和果实膨大期等未成熟时期套袋会降低类胡萝卜素的积累,而在果实成熟期套袋则会促进类胡萝卜素的积累。程春振等^[15]的研究表明,套袋会降低‘不知火’柑橘果皮类胡萝卜素的积累,并且套袋‘不知火’果皮中 *CRTISO*、*LCYb*、*LCYe*、*PDS*、*PSY*、*ZDS* 和 *ZEP* 基因的表达均显著低于未套袋果实。Kato^[16]的研究发现,类胡萝卜素在柑橘果实成熟过程中的积累受到类胡萝卜素生物合成基因协同表达的高度调控,且 *CitPSY*、*CitPDS*、*CitZDS*、*CitLCYb*、*CitHYb* 和 *CitZEP* 基因的表达均随着果实的成熟而增加。

‘马家柚’ [*Citrus maxima* (L.) Osbeck ‘Majiyayou’] 是江西省上饶市广丰区的一种地方特色红心柚,现已成为当地的主要栽培树种和农民的重要经济来源^[17-19]。‘马家柚’果皮粗糙不平,自然条件下容易出现果面损伤和病斑,通过果实套袋技术改善果实外观品质,对‘马家柚’的生产及发展具有重要意义。例如吴方方等^[20]的研究表明,套袋可降低广丰‘马家柚’的果皮厚度,促进果皮转色,改善果面外观品质,还能提高果实内在品质。但套袋后对果肉色泽及类胡萝卜素含量的影响还未有深入研究,所以笔者拟以不套袋为对照,了解套袋对果肉主要类胡萝卜素积累及相关基因表达的影响,为‘马家柚’果实套袋技术提供实践参考,也为进一步研究光照与果肉类胡萝卜素代谢之间的关系提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

试验选在江西省上饶市广丰区排山镇‘马家柚’示范果园进行,在果园中随机选取树势和结果量基本一致的 10 a(年)生健壮‘马家柚’植株 20 株,采用双层外黄内黑纸袋,并以不套袋作为对照。

套袋时间为 2017 年 7 月 25 日,样品分别于 8

月 10 日、8 月 25 日、9 月 10 日、9 月 25 日、10 月 10 日、10 月 25 日和 11 月 10 日采摘,每个处理均分别随机选择 5 株长势良好的果树,从东西南北四个方位,每个方位采集 2 个健康、无病虫害果实,每个处理于每个时期共采摘 8 个果实,当天运回实验室进行下一步处理。

1.2 方法

1.2.1 果肉色泽的测定 随机选取 10 个果实,用色差计测定果实赤道部一圈的果肉色差指数,采用“CIELab”表色系统,每个果实的果肉色差在四个方向的囊瓣近中柱和远中柱端各测一次。测定 10 个果实果肉的 L^* (明亮度)、 a^* (红绿偏差)、 b^* (蓝黄偏差)、 H (色调角)值。色差综合指标 $CCI=1\ 000\times a^*/(L^*\times b^*)$ 。

1.2.2 果肉番茄红素和 β -胡萝卜素的提取和测定 ‘马家柚’果肉番茄红素和 β -胡萝卜素使用丙酮-石油醚的方法进行提取。先将果肉和囊衣分离(幼果使用全部果肉,大果采用赤道部位 1 cm 宽处果肉),把果肉用液氮速冻,然后用低温研磨仪充分粉碎,置于超低温冰箱在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 环境下保存备用。称取果肉 2 g,加入 10 mL 丙酮-石油醚(1:1)没过样品, $50\ ^\circ\text{C}$ 水浴超声 15 min,再 $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液过滤收集,重复离心并过滤数次,直至上清液无色。转移至分液漏斗,静置分层。取上层有机相液体过装有无水硫酸钠的漏斗,下层以石油醚再次萃取, $35\ ^\circ\text{C}$ 旋转蒸发至干。以 3 mL 二氯甲烷溶解,并经过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜进行过滤后,通过 HPLC 检测。每个处理 3 次重复。

采用岛津 LC-20A Prominence 高效液相色谱仪, Waters Symmetry Shield RP18 反相色谱柱 ($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}\times 5\ \mu\text{m}$)。二极管阵列检测器,检测波长 $450\ \text{nm}$,柱温 $30\ ^\circ\text{C}$ 。流动相为 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}=20:75:5$ 。流速 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。上样体积为 $10\ \mu\text{L}$,采用 β -类胡萝卜素标准品(购自 Sigma 公司)和番茄红素标准品(购自 Sigma 公司)进行分析。应用仪器自带软件进行结果处理,并用 Excel 软件和 SPSS 软件进行结果分析。

1.2.3 类胡萝卜素代谢相关基因表达分析 (1) RNA 的提取及 cDNA 合成。使用改良 CTAB 法^[21]提取果肉总 RNA,用 TaKaRa 公司生产的 Prime-Script RT reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒反转录合成 cDNA。

(2) 引物合成。首先通过 NCBI 数据库搜索柑橘类胡萝卜素代谢途径的相关基因片段,并通过

blast 获得甜橙相关基因的同源序列,根据其基因序列通过 Primer 5.0 软件分别在 3' 和 5' 端设计特异性引物,通过 Real-time PCR 进行检测,并制作标准

曲线,以检测扩增效率(E)是否在 90%~110% 范围内。选用柚 *Actin* 作为内参基因^[22],引物序列委托上海生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测引物

Table 1 The primers used for Real-Time Quantitative PCR analysis

基因 Gene		引物序列 Primer sequence (5'-3')	基因序号 Gene locus ID
<i>DXS1</i>	Forward	TTCCGGGATTGCTATTGGAG	<i>Cs1g20530</i>
	Reverse	AAATCAATTTTCCAGCCGCC	
<i>DXR</i>	Forward	GAAGTTAAAGTGGCTGATGC	<i>Cs5g05440</i>
	Reverse	GAAGAATCCTGTGTTTCGAC	
<i>PSY1</i>	Forward	CTACAATGCAGCATTGGCAC	<i>Cs6g15910</i>
	Reverse	CATGAAGTTTCTCCATTTAATGG	
<i>PSY2</i>	Forward	TTACAATGCAGCATTGGCCT	<i>Orange1.1t00657</i>
	Reverse	CATGAAGTTTCTCCATTATTAAT	
<i>PDS</i>	Forward	TTCAGCCGATTGATTTTCC	<i>Orange1.1t02361</i>
	Reverse	ACACCCTGCTTCTCATCCA	
<i>ZDS</i>	Forward	TCATCCCAAGGTTTAGAAG	<i>Orange1.1t06069</i>
	Reverse	TACCAGACAAAGTTGCTCC	
β - <i>LCY1</i>	Forward	GAACCAGGAGCTTAGGTCTG	<i>Orange1.1t00772</i>
	Reverse	GCTAGGTCTACAACAAGGCC	
β - <i>LCY2</i>	Forward	CCCTATTTCATTAGGCCGC	<i>Cs1g04120</i>
	Reverse	CACGTCATATCGAATACGATC	
<i>LCYE</i>	Forward	AACCCATCTTGATTGGTCGT	<i>Cs4g14850</i>
	Reverse	AGAAGCAACAGTAGCAAGCCT	
<i>BCH</i>	Forward	GTTTGCCATAATCAACGC	<i>Cs9g19270</i>
	Reverse	CTCTCCGGAATAAGGCA	
<i>ZEP</i>	Forward	ACTTGTTACTGGAATTGCAG	<i>Orange1.1t04051</i>
	Reverse	CCCATATTTGGCTGCATAGCATG	
<i>NCED2</i>	Forward	CCATGGCCTTGGACATGGCG	<i>Cs2g03270</i>
	Reverse	TGATGCATTGGGGATGGAG	
<i>Actin</i>	Forward	CATCCCTCAGCACCTTCC	<i>Cs1g05000</i>
	Reverse	CCAACCTTAGCACTTCTCC	

(3)实时定量 PCR。利用实时荧光定量 PCR 技术检测不套袋‘马家柚’和套袋‘马家柚’果肉中类胡萝卜素代谢相关基因的表达水平差异。实时荧光定量 PCR 在 Bio-Rad CFX 96-PCR 仪上进行,试剂使用 TaKaRa 生物公司的 SYBR®Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒,体系总共为 25 μ L: SYBR®Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 12.5 μ L, Forward Primer(10 μ mol·L⁻¹)0.5 μ L, Reverse Primer(10 μ mol·L⁻¹)0.5 μ L, cDNA 模板(<100 ng)2.0 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。程序如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,40 个循环。每个样品设置 3 次生物学重复,利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 套袋对‘马家柚’果肉色泽动态变化的影响

从图 1 可知,套袋和不套袋‘马家柚’的果肉颜色变化差异很大。套袋时间为 7 月 25 日,此时果肉均为淡黄色,随着果实发育,套袋和不套袋处理‘马家柚’果肉颜色都慢慢由黄转红。而套袋后的‘马家柚’从 8 月 25 日开始随果实发育至成熟采摘,果肉变红的速率明显高于不套袋‘马家柚’,二者颜色差异逐渐明显。

由图 2 可知,随果实发育进程,套袋‘马家柚’果肉 *a**、*b**、*L**、*H* 以及 CCI 值的变化趋势与不套袋表现基本一致。套袋和不套袋处理果肉 *a** 值在 7 月 25 日都呈现为负值,然后逐渐上升,分别在 8 月 25 日(套袋)和 9 月 10 日(不套袋)转变成正值,直至 10 月 10 日达到最大值后又缓慢下降。从 8 月 10 日开始,套袋‘马家柚’果肉 *a** 值全都表现为极显著高于不套袋‘马家柚’,从 7 月 25 日开始,套袋



A. 不套袋; B. 套袋; 标尺=5 cm。

A. No bagging; B. Bagging; Ruler for 5 cm.

图1 套袋对‘马家柚’果肉色泽的影响

Fig. 1 Effect of Bagging on pulp color of ‘Majiyau’ pomelo

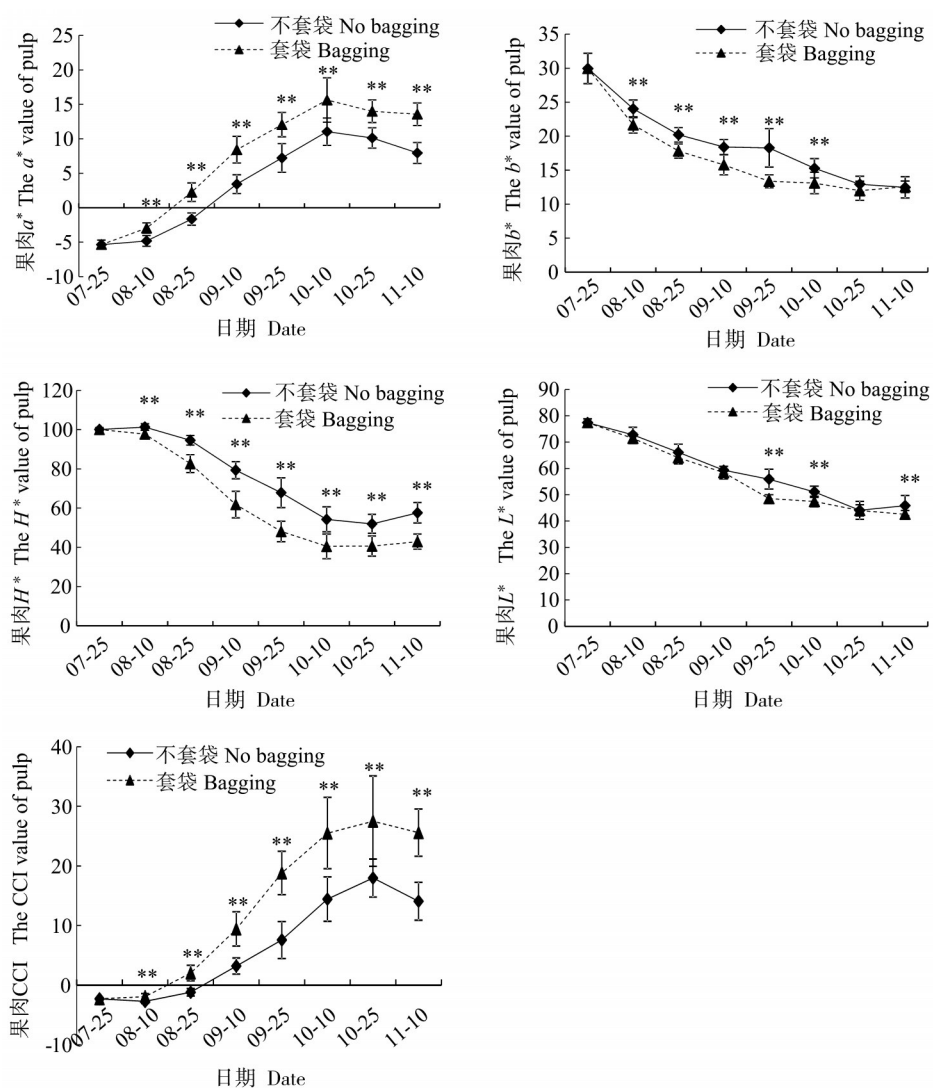
*代表差异显著($p < 0.05$), **代表差异极显著($p < 0.01$). 下同。* means significant difference ($p < 0.05$), ** means significant difference ($p < 0.01$). The same below.

图2 不同处理‘马家柚’果肉色泽的变化

Fig. 2 Changes of chromatism value in pulp of ‘Majiyau’ pomelo under different treatments

和不套袋‘马家柚’果肉 b^* 值整体呈现下降趋势,但套袋‘马家柚’果肉 b^* 值相比不套袋处理下降更快。8月10日至10月10日期间两者存在极显著差异,但在接近成熟时两个处理果肉 b^* 值差异不大;套袋和不套袋‘马家柚’果肉的 H 值随果实发育大致表现为下降趋势,二者最低值分别出现在10月10日(套袋)和10月25日(不套袋)。从8月10日开始,套袋‘马家柚’果肉 H 值极显著低于不套袋处理;套袋和不套袋两个处理‘马家柚’果肉 L^* 值变化趋势与 b^* 和 H 值相似,都随果实发育表现为整体下降,但大部分时期二者果肉 L^* 值较为接近,只在9月25日、10月10日和11月10日存在明显差异;CCI 值在套袋和不套袋‘马家柚’果肉中都表现出逐渐上升的趋势,且最大值都出现在10月25日,从8月10日直至成熟,套袋‘马家柚’果肉 CCI 值都明显高于不套袋‘马家柚’。显然,套袋处理并没有影响果肉色泽随果实发育的变化趋势,但加速了果肉变红,并提高了果肉总体色泽品质。

2.2 套袋对‘马家柚’果肉番茄红素和 β -胡萝卜素含量动态变化的影响

由图3可知,不套袋和套袋‘马家柚’果肉番茄红素含量随果实发育进程都基本呈上升的趋势,从8月10日开始,套袋处理‘马家柚’的果肉番茄红素含量(w ,后同)极显著高于不套袋‘马家柚’,直至采收。二者均在10月25日达到最大值,分别为 $17.63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (不套袋)和 $29.86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (套袋)。套袋处理的‘马家柚’在10月10日后变化趋于缓慢,不套袋‘马家柚’在10月25日后有小幅下降,表明‘马家柚’番茄红素在接近采收的期间积累较少甚至有所降解。以上结果表明,套袋处理并没有改变果肉番茄红素随果实发育的动态变化趋势。但显然,遮光性处理从开始不久后就已经促进了番茄红素的积累。

由图4可知,套袋和不套袋处理‘马家柚’果肉 β -胡萝卜素含量变化趋势差异不大。二者果肉 β -胡萝卜素含量从7月25日开始上升,并且在8月25日至9月10日期间增加显著,分别增加了 $7.23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (不套袋)和 $7.86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (套袋)。9月25日时二者果肉 β -胡萝卜素含量下降,但随后继续上升,不套袋处理在10月10日达到最大值 $12.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,套袋处理在10月25日达到最大值 $21.14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。与番茄红素相似,在接近采收期间,‘马家柚’果肉 β -胡萝卜素积累较少甚至有所降解。比较套袋和不套袋‘马家柚’果肉 β -胡萝卜素含量发现,前者从8

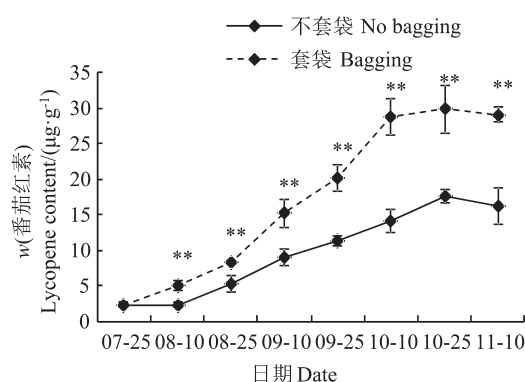


图3 不同处理‘马家柚’果肉番茄红素含量的变化

Fig. 3 Changes of lycopene content in pulp of ‘Majiaoyou’ pomelo under different treatments

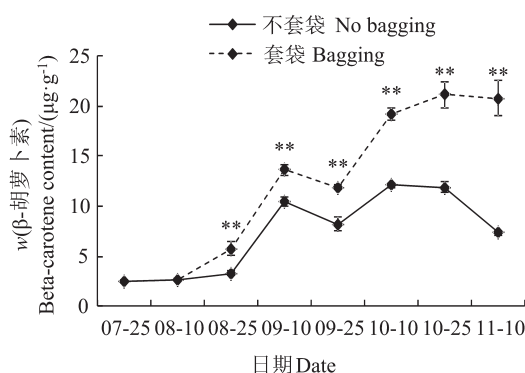


图4 不同处理‘马家柚’果肉 β -胡萝卜素含量的变化

Fig. 4 Changes of beta-carotene content in pulp of ‘Majiaoyou’ pomelo under different treatments

月25日开始就明显高于后者。显然,遮光性套袋有利于‘马家柚’果肉 β -类胡萝卜素的积累。

2.3 套袋对‘马家柚’果肉类胡萝卜素代谢相关基因表达的影响

由图5和图6分析可知,MEP途径中,不套袋和套袋处理果肉中关键基因 *DXS1* 在8月10日(前期)套袋处理极显著高于不套袋处理,上调倍数达到2.32倍。但9月10日(中期)则出现相反情况,11月10日(后期)二者表达无显著差异;另一个关键基因 *DXR* 表达量在9月10日(中期)套袋‘马家柚’极显著高于不套袋处理,上调倍数达到11.06倍,但在前期和后期出现相反情况。

八氢番茄红素合成酶基因 *PSY*、八氢番茄红素脱饱和酶基因 *PDS* 和 ζ -胡萝卜素脱饱和酶基因 *ZDS* 都与番茄红素上游合成有关。*PSY1* 和 *PSY2* 基因表达在二者中表达模式存在差异,*PSY1* 基因在前期和后期时,不套袋处理都极显著高于套袋处理,上调倍数分别达到1.37和3.30倍,而中期出现下调;*PSY2* 基因在三个时期里,套袋处理都高于不套袋处理,并在前中期表现出极显著差异,上调倍

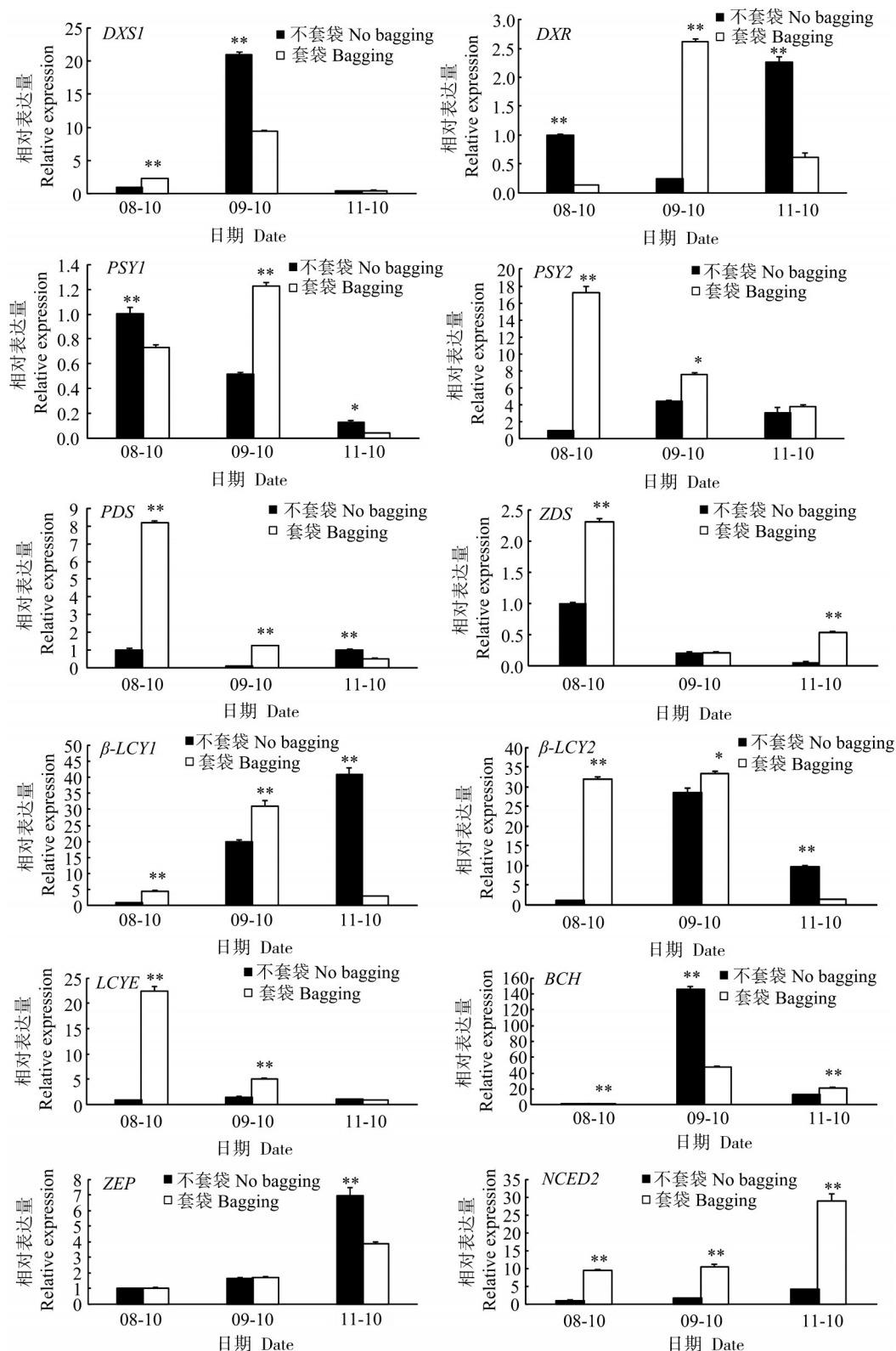


图5 不同处理‘马家柚’果肉类胡萝卜素代谢相关基因的表达

Fig. 5 Expression of carotenoid metabolism related genes in pulp of 'Majiayou' pomelo under different treatments

数分别为 17.23 和 1.72 倍; *PDS* 基因在前期和中期表达时, 套袋处理明显高于不套袋, 上调倍数分别为 8.15 和 16.36 倍, 但后期低于不套袋; *ZDS* 基因

在前期和后期套袋处理果肉中表达量极显著高于不套袋‘马家柚’, 上调倍数分别为 2.30 和 8.89 倍, 中期二者差异不大。

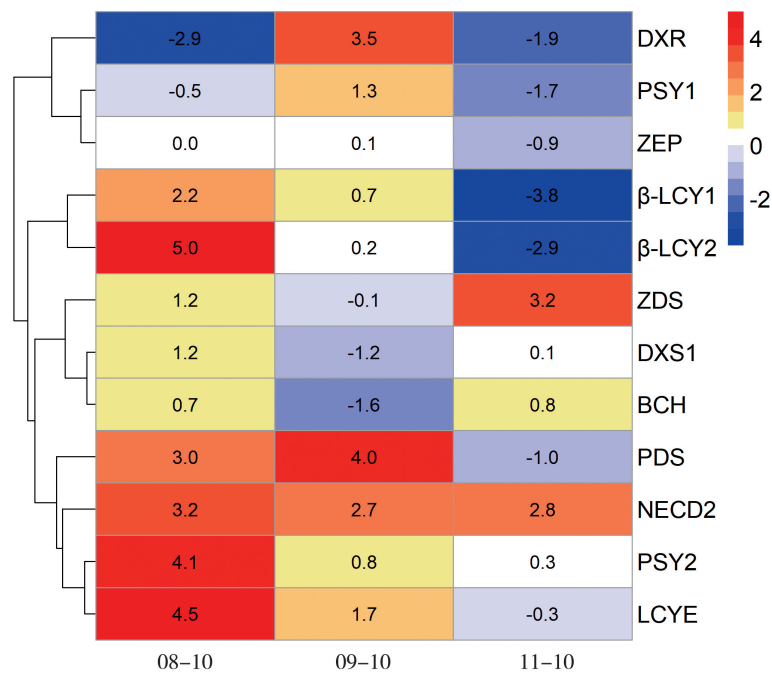


图6 不同处理下果肉类胡萝卜素代谢相关基因差异表达聚类图

Fig. 6 Clustering diagram of differential expression of carotenoid metabolism related genes in pulp under different treatments

番茄红素的环化表现为番茄红素的线性末端在番茄红素β环化酶(β -LCY1、 β -LCY2)和番茄红素ε环化酶(LCYE)催化下合成β-胡萝卜素和α-胡萝卜素。套袋‘马家柚’ β -LCY1和 β -LCY2基因表达量在前期和中期都明显高于不套袋处理,其中 β -LCY1上调倍数分别为4.56和1.57倍, β -LCY2上调倍数分别为31.78和1.17倍,但二者在后期表达量下调显著(13.55倍和7.35倍);套袋‘马家柚’果肉中LCYE基因在前期和中期都极显著高于不套袋处理,上调倍数分别为22.31和3.33倍,后期不套袋处理高于套袋处理,但不存在显著差异。

β-胡萝卜素羟化酶BCH基因与β-胡萝卜素降解有关,β-胡萝卜素在BCH的催化下生成玉米黄素。套袋‘马家柚’BCH基因表达量在前期和后期高于不套袋‘马家柚’,但值得注意的是,在中期不套袋‘马家柚’BCH基因表达量非常高,并极显著高于套袋‘马家柚’,在所检测的基因当中其中期下调比例最大(达到3.07倍)。

玉米黄素进一步在玉米黄素环氧酶(ZEP)作用下继续降解,而类胡萝卜素裂解加双氧酶(NCDE)与类胡萝卜素降解成脱落酸(ABA)有关。ZEP基因在不套袋和套袋‘马家柚’果肉中的表达量呈现为:在前期和中期无明显区别,在后期套袋处理后ZEP基因出现下调表达;NCED2基因表达量在三个

时期里,套袋处理NCED2表达量都极显著高于不套袋处理,分别上调9.37倍、6.55倍和7.14倍。

图6的基因差异表达聚类分析结果显示,DXR、PSY1以及ZEP基因聚为一类,表现为中期表达上调,而其他两个时期表达下调或差异不大。除此之外其他基因聚为一大类,都在前期明显上调表达。进一步进行分类,发现β-LCY1和β-LCY2基因聚为一类,表现为前期上调表达显著,中期有所上调,后期下调表达显著;ZDS、DXS1和BCH基因聚为一类,表现为前期和后期上调表达,中期下调表达;PDS、NCED2、PSY2和LCYE基因聚为一类,表现为三个时期都上调表达或前期和中期上调表达显著。

3 讨 论

3.1 套袋对‘马家柚’番茄红素和β-胡萝卜素含量变化的影响

类胡萝卜素是柑橘的主要呈色色素,其代谢水平受多种外界因子和自身生长发育的影响,大量研究表明光照是影响植物类胡萝卜素积累的关键调控因素之一^[2]。套袋对果实类胡萝卜素积累的影响,主要依靠对光照的影响来创造一个遮光环境,但不同物种类胡萝卜素对遮光条件的响应存在差异,在辣椒和杏果实上的遮光处理会导致类胡萝卜素含量降低^[12,23]。本试验中,‘马家柚’果肉主要以

积累番茄红素和 β -胡萝卜素为主,通过果肉色泽和主要类胡萝卜素含量检测发现,‘马家柚’从套袋后15 d开始,其果肉 a^* 值、 H 值、 CCI 值和番茄红素含量,及套袋后30 d开始 β -胡萝卜素含量一直显著高于不套袋处理,由此表明遮光性套袋通过改变了‘马家柚’果实生长发育的外界环境,加速了套袋果肉组织中主要类胡萝卜素(番茄红素和 β -胡萝卜素)的积累,使套袋后果肉颜色更红,果肉总体色泽品质更佳。黑暗处理也在其他物种中被发现可以提高类胡萝卜素的含量。如刘维塘等^[24]发现番茄套袋后类胡萝卜素总量上升,主要是因为番茄红素的大量积累。Fraser等^[25]证实在黑暗条件下,只要保持通气和适宜的温度,番茄红素仍能形成,表明番茄红素形成不一定必须需要光照。杨宁等^[26]通过胡萝卜素愈伤组织的避光研究,发现黑暗更有利于 β -胡萝卜素的积累。王贵元等^[27]认为套袋处理对红肉脐橙果肉番茄红素和 β -胡萝卜素的积累具有阶段性,两种色素的积累主要发生在果实膨大期,最终在采收时,套袋处理果肉番茄红素和 β -胡萝卜素含量低于不套袋处理。

3.2 套袋对‘马家柚’类胡萝卜素代谢相关基因表达的影响

植物类胡萝卜素的代谢途径主要由四步构成。首先通过MEP途径合成前体IPP,然后将前体转化为直链态类胡萝卜素,接着进行氧化分流,最后降解成其他物质,而调控类胡萝卜素的代谢途径的相关基因目前已经明确^[28]。通过分子表达检测和聚类分析,笔者发现套袋处理后大部分基因在前期和中期出现上调表达,其中与番茄红素上游合成有关的八氢番茄红素合成酶基因 $PSY2$ 和八氢番茄红素脱饱和酶基因 PDS ,上调倍数分别达到了17.23倍和8.15倍,并且 $PSY2$ 在3个检测时间点都表现上调, PDS 在中期上调倍数达到16.36倍,二者与套袋后‘马家柚’果肉番茄红素在前中期快速积累的趋势一致。同样,董新甜^[29]在套袋处理类胡萝卜素增加的黄桃果肉中也检测到了 $PSY2$ 和 PDS 基因的上调表达。前人通过转录组测序、克隆及功能验证发现苹果 $Md\ PSY2$ 与类胡萝卜素积累关系显著^[30-31],María-Jesús等^[32]也证实 PDS 基因表达上调是导致果实形成时类胡萝卜素含量增加的主要原因。在番茄果实上对 $PSY1$ 和 PDS 的表达研究也表明:果实成熟期间这些基因表达显著增强,特别是 $PSY1$ 表达增强20多倍,导致总类胡萝卜素含量上升10多倍^[33-34];同样,柑橘果实成熟期间类胡萝

卜素合成基因的表达呈现出相同的趋势,如‘伏令夏橙’果实成熟时果皮类胡萝卜素总量上升,是由于 PSY 、 PDS 和 ZDS 等基因表达协同增强而造成的^[16]。因此,推断遮光性套袋处理后果实中积累更多番茄红素与番茄红素上游合成相关基因 $PSY2$ 和 PDS 表达量的升高有关。此外,分子表达检测和聚类分析结果表明,番茄红素环化相关基因 β - $LCY1$ 和 β - $LCY2$ 表达模式一致,在前期和中期套袋处理的表达量明显高于不套袋处理,特别是前期上调比例分别达到4.56倍和31.78倍。但在前期时,套袋和不套袋处理果肉 β -胡萝卜素含量二者差异不明显,其可能与 β -胡萝卜素下游代谢基因 BCH 以及 $NCDE2$ 在前期也表现出上调表达有关。但值得注意的是,在套袋中期只有三个基因表达下调,而 β -胡萝卜素羟化酶 BCH 基因下调比例最大(达到3.07倍)。Kim等^[35]发现,大多数柑橘品种果实和叶片等组织中不能积累较多 β -胡萝卜素的原因可能与 $BCH1$ 和 $BCH2$ 基因在组织中的组成型表达有关。所以, β -胡萝卜素的积累除上游合成基因表达增高外,还可能与下游降解基因 BCH 表达量的减少有关。

参考文献 References:

- [1] 陶俊,张上隆,安新民,赵智中.光照对柑橘果皮类胡萝卜素和色泽形成的影响[J].应用生态学报,2003,14(11):1833-1836.
TAO Jun, ZHANG Shanglong, AN Xinmin, ZHAO Zhizhong. Effects of light on carotenoid biosynthesis and color formation of citrus fruit peel[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(11): 1833-1836.
- [2] 彭建宗,韦程勇,陈碧韶,王小菁.植物类胡萝卜素生物合成和积累的光调控[J].华南师范大学学报(自然科学版),2013,45(6):165-170.
PENG Jianzong, WEI Chengyong, CHEN Bishao, WANG Xiaojing. Light regulation of plant carotenoid biosynthesis and accumulation[J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2013, 45(6): 165-170.
- [3] ZHANG L C, MA G, YAMAWAKI K, IKOMA Y, MATSUMOTO H, YOSHIOKA T, OHTA S, KATO M. Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice sacs[J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 188: 58-63.
- [4] CAZZONELLI C I, POGSON B J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 266-274.
- [5] 李倩,李铭桐,王彩虹,王玉玲,杨绍兰.套袋促进在梨果实色素的合成及上调PbctZ基因的表达[J].现代食品科技,2018,34(4):102-106.

- LI Qian, LI Mingtong, WANG Caihong, WANG Yuling, YANG Shaolan. Bagging promotes the synthesis of avocado fruit pigment and up-regulates the expression of PbcrtZ gene [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 102-106.
- [6] SHARMA R R, PAL R K, ASREY R, SAGAR V R, DHIMAN M R, RANA M R. Pre-harvest fruit bagging influences fruit color and quality of apple cv. Delicious[J]. Agricultural Sciences, 2013, 4(9): 443-448.
- [7] YANG W H, ZHU X C, BU J H, HU G B, WANG H C, HUANG X M. Effects of bagging on fruit development and quality in cross-winter off-season longan[J]. Scientia Horticulturae, 2008, 120(2): 200.
- [8] 何应对, 王必尊, 林妃, 刘永霞, 丁哲利, 井涛, 王丽霞. 套袋对海南福橙果实品质的影响[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(4): 30-31.
- HE Yingdui, WANG Bizun, LIN Fei, LIU Yongxia, DING Zheli, JING Tao, WANG Lixia. Effect of bagging on fruit quality of Hainan Fu orange[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2019, 25(4): 30-31.
- [9] JIA H, ARAKI A, OKAMOTO G. Influence of fruit bagging on aroma volatiles and skin coloration of 'Hakuho' peach (*Prunus persica* Batsch.)[J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35(1): 61-68.
- [10] 郭亮, 郑辉艳, 曾蓓, 白描, 刘昆玉, 徐丰, 金燕, 杨国顺. 套袋对葡萄果实品质的影响[J]. 湖南农业科学, 2015(5): 65-67.
- GUO Liang, ZHENG Huiyan, ZENG Bei, BAI Miao, LIU Kunyu, XU Feng, JIN Yan, YANG Guoshun. The effect of bagging on the quality of grape fruit [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2015(5): 65-67.
- [11] 王武, 邓烈, 何绍兰, 易时来. 不同套袋处理对北碚 447 锦橙果实色泽的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 31(2): 71-75.
- WANG Wu, DENG Lie, HE Shaolan, YI Shilai. Effects of different bagging treatments on the coloration in 'Beibei 447 Jincheng' Orange Fruit [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2009, 31(2): 71-75.
- [12] LOPEZ M, CANDELA M E, SABATER F. Carotenoids from *Capsicum* annum fruits: Influence of spectral quality of radiation[J]. Biologia Plantarum, 1986, 28(2): 100-104.
- [13] HUANG C, YU B, TENG Y, SU J, SHU Q, CHENG Z, ZENG L. Effects of fruit bagging on coloring and related physiology, and qualities of red Chinese sand pears during fruit maturation [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 121(2): 150-158.
- [14] 董新甜. 遮光性套袋对黄桃果实类胡萝卜素积累等品质性状及相关基因表达的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
- DONG Xintian. Effects of opaque bagging on carotenoid accumulation and other quality traits in yellow peach fruit[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015.
- [15] 程春振, 黄勇, 张永艳, 吴波, 闫树堂, 钟云. 套袋对不知火果实品质和果皮类胡萝卜素代谢的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(9): 20-25.
- CHENG Chunzhen, HUANG Yong, ZHANG Yongyan, WU Bo, YAN Shutang, ZHONG Yun. Effects of bagging on fruit quality and carotenoid metabolism of pericarp[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2017, 39(9): 20-25.
- [16] KATO M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit[J]. Plant Physiology, 2004, 134(2): 824-837.
- [17] 杨莉, 张涓涓, 刘德春, 刘山蓓, 徐炳星, 周施清, 毛卫平, 刘勇. 马家柚粗皮果形成过程的解剖学观察[J]. 经济林研究, 2017, 35(3): 152-155.
- YANG Li, ZHANG Juanjuan, LIU Dechun, LIU Shanbei, XU Bingxing, ZHOU Shiqing, MAO Weiping, LIU Yong. Anatomical observation on the formation process of Majiayou's rough fruit[J]. Economic Forest Researches, 2017, 35(3): 152-155.
- [18] 张涓涓, 杨莉, 刘德春, 刘山蓓, 徐炳星, 周施清, 毛卫平, 刘勇. 马家柚果实品质与土壤、叶片、果实矿质养分的相关性分析[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(5): 811-818.
- ZHANG Juanjuan, YANG Li, LIU Dechun, LIU Shanbei, XU Bingxing, ZHOU Shiqing, MAO Weiping, LIU Yong. Correlation analysis between fruit quality of Majiayou and mineral nutrients in soil, leaves and fruits[J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 2015, 37(5): 811-818.
- [19] 杨莉, 张涓涓, 刘德春, 春永强, 刘勇. 马家柚及变异品系果实发育期间矿质营养变化及与果实内含物的相关性研究[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(3): 479-486.
- YANG Li, ZHANG Juanjuan, LIU Dechun, CHUN Yongqiang, LIU Yong. Study on the changes of mineral nutrition and the correlation with fruit inclusions during the development of Majiayou and Mutant strains[J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 2018, 40(3): 479-486.
- [20] 吴方方, 程玉芬, 谢金长, 韦柳成, 黄昌新, 毛祥青. 套袋对广丰马家柚果实品质的影响[J]. 中国南方果树, 2015, 44(4): 35-37.
- WU Fangfang, CHENG Yufen, XIE Jinchang, WEI Liucheng, HUANG Changxin, MAO Xiangqing. Effects of bagging on fruit quality of Guangfeng Majia pomelo[J]. South China Fruits, 2015, 44(4): 35-37.
- [21] 夏春兰, 闻志彬, 张玉芳. 新疆野苹果果实总 RNA 提取方法的筛选[J]. 干旱区研究, 2019, 36(2): 437-443.
- XIA Chunlan, WEN Zhibin, ZHANG Yufang. Screening of total RNA extraction methods from Xinjiang wild apple fruit[J]. Arid Zone Research, 2019, 36(2): 437-443.
- [22] 王春艳. 红肉脐橙和普通脐橙果肉类胡萝卜素差异积累机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- WANG Chunyan. Differential accumulation mechanism of carotenoids in red meat navel orange and common navel orange [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [23] SMITH L L W, SMITH O. Light and the carotinoid content of certain fruits and vegetables[J]. Plant Physiology, 1931, 6(2):

- 265.
- [24] 刘维塘,李曙轩.光照处理番茄果实对其发育及生化成分的影响[J].园艺学报,1992,19(4):341-346.
- LIU Weitang, LI Shuxuan. Effects of light treatment on the development and biochemical composition of tomato fruit[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1992, 19(4):341-346.
- [25] FRASER P D, TRUESDALE M R, BIRD C R, SCHUCH W, BRAMLEY P M. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: evidence for tissue-specific gene expression[J]. Plant Physiology, 1994, 105(1):405-413.
- [26] 杨宁,郭勇.胡萝卜细胞培养产胡萝卜素的研究[J].广西植物,1999(1):84-88.
- YANG Ning, GUO Yong. Study on carotenoid production by carrot cell culture[J]. Guihaia, 1999(1):84-88.
- [27] 王贵元,夏仁学,曾祥国,胡利明.套袋对红肉脐橙果肉中色素、糖及内源激素的影响[J].应用生态学报,2006,17(2):256-260.
- WANG Guiyuan, XIA Renxue, ZENG Xiangguo, HU Liming. Effects of bagging on pigment, sugar and endogenous hormone contents of Cara Cara orange flesh [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(2):256-260.
- [28] 金晓琴.蜜柚类胡萝卜素代谢相关基因的分离及功能分析[D].金华:浙江师范大学,2015.
- JIN Xiaoqin. Isolation and functional analysis of carotenoid metabolism related genes in honey pomelo [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2015.
- [29] 董新甜.遮光性套袋对黄桃果实类胡萝卜素积累等品质性状及相关基因表达的影响[J].园艺学报,2015,42(4):633-642.
- DONG Xintian. Effects of opaque bagging on carotenoid accumulation and other related traits in yellow peach fruit[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(4):633-642.
- [30] 宋成秀,张利义,张彩霞,田义,丛佩华.黄肉苹果转色期前后类胡萝卜素合成相关差异表达基因鉴定[J].园艺学报,2017,44(2):205-214.
- SONG Chengxiu, ZHANG Liyi, ZHANG Caixia, TIAN Yi, CONG Peihua. Identification of differentially expressed genes related to carotenoid synthesis in yellow meat apple before and after color change[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(2):205-214.
- [31] AMPOMAH- DWAMENA C, DRIEDONKS N, LEWIS D, SHUMSKAYA M, CHEN X Y, WURTZEL E T, ESPLEY R V, ALLAN A C. The phytoene synthase gene family of apple (*Malus domestica*) and its role in controlling fruit carotenoid content[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1):185.
- [32] MARÍA-JESÚS R, MARCOS J F, ZACARÍAS L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(22):6724-6731.
- [33] GIULIANO G, TAVAZZA R, DIRETTO G, BEYER P, TAYLOR M A. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants[J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(3):139-145.
- [34] LOIS L M, RODRIGUEZ- CONCEPCION M, GALLEGO F, CAMPOS N, BORONAT A. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase[J]. The Plant Journal, 2000, 22(6):503-513.
- [35] KIM I J, KO K C, KIM C S, CHUNG W I. Isolation and characterization of cDNAs encoding β -carotene hydroxylase in Citrus[J]. Plant Science, 2001, 161(5):1005-1010.