

二氧化硫对葡萄采后有机酸含量及苹果酸代谢途径的调控作用

闫波雯¹, 袁宇尧², 魏佳³, 张政², 张健³, 吴斌²

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052) (2. 新疆农业大学林学与园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

(3. 新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要: 为探究二氧化硫(sulfur dioxide, SO₂)对木纳格葡萄采后果实中有机酸含量及苹果酸代谢调控的影响。基于高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定果实贮藏过程中酒石酸、L-苹果酸、L-抗坏血酸和柠檬酸含量的变化,采用转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)分析 SO₂ 调控果实苹果酸代谢的主要途径。并通过测定苹果酸脱氢酶基因(*malate dehydrogenase*, MDH)、细胞质苹果酸脱氢酶基因(*cytoplasmic malate dehydrogenase*, *cytMDH*)、线粒体苹果酸脱氢酶基因(*mitochondrial malate dehydrogenase*, *mtMDH*)、乳酸脱氢酶基因(*L-lactate dehydrogenase*, LDH)、NADP-苹果酸酶基因(*NADP-dependent malic enzyme*, NADP-ME)、丙酮酸脱羧酶1基因(*pyruvate decarboxylase1*, PDC1)、丙酮酸脱羧酶2基因(*pyruvate decarboxylase2*, PDC2)和乙醇脱氢酶基因(*alcohol dehydrogenase*, ADH)的表达差异性,进一步验证转录组测序的结果。结果表明:贮藏第60 d, SO₂处理组果实中酒石酸、L-抗坏血酸和柠檬酸分别比CK组高0.13 mg/g、0.34 mg/100 g、0.02 mg/g; L-苹果酸比CK组低0.64 mg/g。SO₂可以维持木纳格葡萄果实中的酒石酸、L-抗坏血酸和柠檬酸含量,通过上调 *mtMDH*、*LDH*、*NADP-ME*、*PDC1* 和下调 *MDH*、*cytMDH*、*PDC2*、*ADH* 的相对表达量,促进果实中L-苹果酸含量的分解,保持果实的风味特征。本研究为研究 SO₂对鲜食葡萄采后果实有机酸代谢的调控作用提供理论依据。

关键词: 二氧化硫; 葡萄; 高效液相色谱; 转录组测序; 有机酸; 苹果酸代谢

文章编号: 1673-9078(2020)07-133-141

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.0037

Regulation of Sulfur Dioxide on Organic Acids Content and Malate Metabolism Pathway of Grapes in Postharvest

YAN Bo-wen¹, YUAN Yu-yao², WEI Jia³, ZHANG Zheng², ZHANG Jian³, WU Bin²

(1.Xinjiang Agricultural University, College of Food Science and Pharmaceutical Science, Urumqi 830052, China)

(2.Xinjiang Agricultural University, College of Forestry and Horticulture, Urumqi 830052, China) (3.Xinjiang Academy of Agricultural Science, Institute of Agro-products Storage and Processing, Urumqi 830091, China)

Abstract: The effects of sulfur dioxide (SO₂) on the content of organic acids and the regulation of malate metabolism of 'Munage' grapes during postharvest storage were investigated. The changes in the contents of tartaric acid, L-malic acid, L-ascorbic acid and citric acid during fruit storage were measured by high performance liquid chromatography (HPLC), and RNA sequencing (RNA-Seq) was used to analyze the main pathways of SO₂ to regulate malate metabolism. The differences in the expression of *malate dehydrogenase* (MDH), *cytoplasmic malate dehydrogenase* (*cytMDH*), *mitochondrial malate dehydrogenase* (*mtMDH*), *lactate dehydrogenase* (LDH), *NADP-dependent malic enzyme* (NADP-ME), *pyruvate decarboxylase 1* (PDC1), *pyruvate decarboxylase 2* (PDC2), and *ethanol dehydrogenation enzyme dehydrogenase*

引文格式:

闫波雯,袁宇尧,魏佳,等.二氧化硫对葡萄采后有机酸含量及苹果酸代谢途径的调控作用[J].现代食品科技,2020,36(7):133-141

YAN Bo-wen, YUAN Yu-yao, WEI Jia, et al. Regulation of sulfur dioxide on organic acids content and malate metabolism pathway of grapes in postharvest [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 133-141

收稿日期: 2020-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860460, 31560473)

作者简介: 闫波雯 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与综合利用

通讯作者: 吴斌 (1973-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品贮藏与加工

(ADH) genes were determined to verify further the results of RNA-Seq. The results showed that on the 60th day of storage, the contents of tartaric acid, *L*-ascorbic acid and citric acid in the fruits of the SO₂-treatment group were 0.13 mg/g, 0.34 mg/100g, and 0.02 mg/g (which were all higher than those of the CK group), with the content of *L*-malic acid lower than that of the CK group by 0.64 mg/g. SO₂ can maintain the contents of tartaric acid, *L*-malic acid, *L*-ascorbic acid and citric acid in 'Munage' grapes, through up-regulating the expressions of *mtMDH*, *LDH*, *NADP-ME* and *PDC1*, while down-regulating the expressions of *MDH*, *cytMDH*, *PDC2* and *ADH*, to promote the decomposition of *L*-malic acid and preserve the flavor characteristics of the fruit. The study can provide a theoretical basis for the investigations on the regulatory role of SO₂ in malate metabolism of grapes.

Key words: sulfur dioxide; grape; high-performance liquid chromatography; transcriptome sequencing; organic acid; malate metabolism

木纳格葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 是新疆主要特色葡萄品种之一, 深受消费者的欢迎^[1]。木纳格葡萄的成熟期集中在 8~10 月, 随着生产基地的不断扩大, 产量不断提高, 但由于木纳格葡萄果皮薄, 极易受到葡萄孢属腐烂的影响, 失水并导致落粒, 严重影响了木纳格葡萄的贮运和外销, 采后贮运保鲜技术已成为鲜食葡萄产业可持续性发展急需解决的技术瓶颈。

研究表明, 壳聚糖-葡萄糖复合涂层^[2]、钙^[3]、水杨酸^[4]和茉莉酸甲酯^[5]、乙醇^[6]、多胺^[7]等处理能够维持葡萄果实贮藏品质, 抑制果实采后腐烂, 提高果实的抗病性。但在鲜食葡萄商业化保鲜中, 二氧化硫 (sulfur dioxide, SO₂) 和亚硫酸盐保鲜剂的应用最为广泛。迄今为止, 还没有更有效的 SO₂ 或亚硫酸盐替代品。SO₂ 在葡萄保鲜中的应用研究多集中在抗病性方面。有研究表明, SO₂ 对灰霉病菌孢子萌发^[8]和食源性致病菌存活有抑制作用^[9]。SO₂ 处理可以上调苯丙氨酸解氨酶、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因的表达^[10], 提高果实抗氧化酶 (超氧化物歧化酶、过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽 S 转移酶) 活性^[11], 增强葡萄果实的防御机制。

有机酸是决定果实风味和品质不可或缺的重要因素之一, 葡萄中以酒石酸、*L*-苹果酸和柠檬酸为主。苹果酸是一种四碳二羧酸, 参与许多细胞代谢, 还作为碳素和还原力载体在细胞质与细胞器以及细胞器之间传递碳素和还原力。

L-苹果酸是水果中天然存在的有机酸, 口感柔和, 风味独特, 具有重要的代谢意义和生理功能^[12]。目前, 众多研究关注葡萄果实发育过程中有机酸的形成和代谢途径^[13,14], 以及有机酸在不同品种或者不同生长状态下的葡萄果实中的差异^[15,16]。关于 SO₂ 对鲜食葡萄采后苹果酸代谢调控方面的影响鲜有报道。仅从抗病和防御机制方面不能阐明 SO₂ 是如何长时间保持鲜食葡萄采后品质, SO₂ 在鲜食葡萄采后生物学作用机制有待进一步研究。本文以木纳格葡萄为试材, 结合 RNA-Seq 数据探讨 SO₂ 对葡萄采后有机酸代谢途径的影响, 并探讨其调控木纳格葡萄苹果酸代谢的途径,

以为 SO₂ 调控鲜食葡萄采后有机酸代谢的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

木纳格葡萄商业成熟期 (TSS $\geq$ 18%) 于 10 月 10 日在新疆阿图什市商业果园采收。采收后用冷藏车运输至新疆农业科学院, 在 0 $\pm$ 2 °C 预冷 24 h, 挑选颜色均一、无机械损伤的果实 40 筐, 每个聚乙烯 (PE) 筐中 (35 cm $\times$ 25 cm $\times$ 20 cm) 装约 7 kg 葡萄。将 40 筐葡萄随机分为两组: (1) SO₂ 处理 (20 筐), 顶部内衬吸水纸 2 张和 SO₂ 保鲜纸 1 张 (355 mm $\times$ 235 mm, 主要成分为焦亚硫酸钠, 新疆乌鲁木齐格瑞德保鲜科技有限公司提供); (2) 对照组 (CK, 20 筐), 顶部内衬吸水纸 2 张。处理后, 用 0.03 mm 厚 PE 袋分别将每筐样品包裹, 置于 0 $\pm$ 0.5 °C, 相对湿度 (RH) 为 90% $\pm$ 5%, 保存 60 d。每隔 10 d 从每组重复样本中随机取 50 个完整果粒, 在液氮下研磨成细粉, 置于 -80 °C 冰箱保存, 共 13 组样品。

1.2 试验设备及仪器

Altus A-10 液相色谱, 美国 PerkinElmer 公司; Altus A-10 UV 检测器, 美国珀 PerkinElmer 公司; DELTA320 分析天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; SIM-F140ADL 制冰机, 日本松下电器; DW-86L626 超低温冰箱, 青岛海尔特种电器有限公司; LDZX-50KBS 压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械有限公司; D-78532 微型离心机, 德国 Hettich 公司; DYY-6D 电泳仪, 北京市六一仪器厂; SERIAL N 凝胶成像系统, 英国 Uvitec Firereader 公司; DK-8D 电热恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器厂; LightCycler® 96 荧光定量 PCR 仪, 美国罗氏公司; BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪, 德国 Eppendorf 公司; OSE-MP25 TGear Plate 微孔板离心机, 天根生化科技有限公司。

1.3 试验主要试剂

磷酸、甲醇、氯仿、异戊醇,天津市致远化学试剂有限公司;酒石酸标品(99.3%)、L-苹果酸标品(99.0%)、L-抗坏血酸标品(99.9%)、柠檬酸标品(99.7%),德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;Trizma Base、DEPC、LiCl, Sigma 公司;CTAB、SDS、酚仿、琼脂糖,北京索莱宝科技有限公司。甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

1.4 指标测定方法

1.4.1 高效液相色谱法(HPLC)测定酒石酸、L-苹果酸、L-抗坏血酸、柠檬酸含量

1.4.1.1 样品预处理

将 2.0000 g 葡萄粉加入 10 mL 超纯水中超声 30 min, 4 ℃, 12000×g 离心 30 min。滤液通过 MCE 水系滤膜(0.22 μm)过滤后,进行 HPLC 分析。

1.4.1.2 色谱条件

有机酸含量测定按 Jena Bhabani S.等人的方法^[17]进行 HPLC 分析,并进行了少量修改。色谱柱为 PE C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:0.1%磷酸:甲醇=98:2(v/v),流速 0.8 mL/min,紫外检测波长 210 nm,进样量 10 μL,柱温 30 ℃。

1.4.1.3 回收率实验

采用加标样回收法,选取贮存 30 d 的 CK 组葡萄样品,每样取 2 份,一份加入有机酸的标样,一份不加,按实验方法重复测定五次,根据下面公式计算回收率取平均值。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{添加标样样品的测出量} - \text{样品测出量}}{\text{加入标样量}}$$

1.4.2 Nevogene 测序及转录组测序(RNA-Seq)数据分析

分别取对照组(0、10、30、60 d)和 SO₂ 处理组(10、30、60 d)7 组冷冻样品各 10 g,为保证数据的可靠性,每组样品 3 个重复,将其包裹在箔纸中并分别贴上标签,冷藏条件下送北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序,测序结果在诺禾致源平台工具(<https://magic.novogene.com/public/customer/main/home>),利用 $p < 0.05$ 和 $\log_2\text{FoldChange} \leq 1$ 筛选条件,对差异基因进行分析。

1.4.3 RNA 提取及 cDNA 合成

1.4.3.1 CTAB 法提取 RNA

基因表达分析采用 Chang 等人的方法^[18],从葡萄果肉(200 mg)中提取总 RNA。有机酸代谢相关特异引物采用 DNAMAN 6.0 根据 GeneBank 中的氨基酸保守序列设计引物,由国家生物技术信息中心(NCBI)鉴定,送往生工生物(上海)有限公司合成。所用引物均用 DEPC-H₂O 溶解,稀释至 10 mmol/L。

表 1 木纳格葡萄有机酸代谢相关基因引物序列

Table 1 Primer sequence of organic acid metabolism related genes of 'Munage' grape

基因	登录号	引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/℃
MDH	NM_001281166.1	MDH-F	AATCCTCTTGCTCCTCGCTCTC	59
		MDH-R	ATCACCAATCTGCTCCCTCCAA	
cytMDH	XM_002278676.4	cytMDH-F	TTCTTCCCTGTAACCTGCTGTG	59
		cytMDH-R	CTCCTGTGCGGTCAAGTCCAA	
mtMDH	XM_002285320.4	mtMDH-F	CCGTTGCTACTGCTCAGAGTCA	59
		mtMDH-R	AGAGTGCGAGATTAGAGACCAGAG	
LDH	XM_019224877.1	LDH-F	TCCATCCTGTCTCAGTCCTTGC	59
		LDH-R	TTGTGCCTCCTCGTCAGTTAGAT	
NADP-ME	XM_010649976.2	NADP-ME-F	ATGCCGAGCTTCTACATGAGTT	61
		NADP-ME-R	CTATGCCAGTTCCAGCCTCTC	
PDC1	XM_010652582.2	PDC1-F	ACATTCTCTTCCAGCACATACAG	60
		PDC1-R	GCAACACCAACCACATCCTT	
PDC2	XM_002272579.4	PDC2-F	TGCTTGCGTCGTCACCTTCA	59
		PDC2-R	TCTGCTCATGTGCGTCTTCCA	
ADH	XM_002268589.3	ADH-F	CTTACGAAATCTGGTGCTGTAGGG	59
		ADH-R	TGATATGCCTTGCCAACCTCCT	

1.4.3.2 琼脂凝胶电泳检测 RNA 完整性

取 8 μL RNA 溶液加入 2 μL 6×loading buffer, 混

匀。点入 1.0%琼脂糖凝胶中, 120 V, 25 min 电泳条件下鉴定 RNA 完整性。电泳的检测结果如图 1 所示,

图中可清晰看出 18 s 和 28 s 两条带, 且 28 s 的亮度是 18 s 的 2 倍, 可用于后续实验。

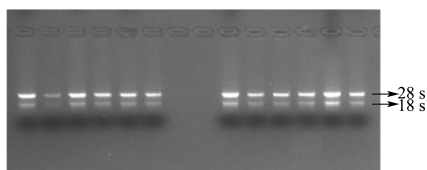


图1 木纳格葡萄总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of flesh total RNA of 'Munage' grape

1.4.3.3 总 RNA 的完整性检测

取 1 μL RNA 溶液稀释 50 倍, 置于核酸蛋白测定仪中, 分别测定 RNA 在 230、260 和 280 nm 处的吸光值。提取 RNA 的 A260/A280 在 1.81~1.98, A260/A230>2.0, 说明所提取的 RNA 没有杂质的污染和降解, 可以用于后续试验。

1.4.3.4 cDNA 合成

以总 RNA 为模板, 采用“TIAN Script RT Kit”试剂盒合成第一链 cDNA (所有试剂添加均在冰浴条件下进行)。

(1) 在离心管中依次加入下列药品, 混匀;

表2 反转录体系

Table 2 Reverse transcription reaction system

试剂	用量/ μL
RNA 溶液	4
Spure Pure dNTP (2.5 mM each)	2
Oligo (dT) ₁₅ (10 μM)	2
RNase-Free ddH ₂ O	6.5
70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 冰上冷却 2 min	
5 $\times$ First-Strand Buffer	4
RNasin (40 U/ μL)	0.5
TIANScript II RTase (200U/ μL)	1
总计	20

(2) 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 50 min, 转入 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 终止反应。将合成的第一链 cDNA 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.4 实时荧光定量 (qRT-PCR) 验证 RNA-Seq 数据

以适当稀释后的各贮藏天数 cDNA 为模板, 反应体系 (25 μL) 如下: FastStart Essential DNA Green

Master 12.5 μL ; 荧光 H₂O 9.5 μL ; 正反向引物各 0.5 μL ; cDNA 2 μL 。将点好的 96 孔板, 放入荧光定量 PCR 仪中: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 退火温度, 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 s。每个样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法^[19], 将第 0 d 样品数据定义为 1, 其它取样时间点基因表达均与第 0 d 比较, 计算出相对表达量, *Actin* 为管家基因。

1.5 数据分析

使用 Sigma Plot 12.0 软件作图, SPSS 19.5 进行数据方差分析并利用 Duncan 法对 SO₂ 处理和对照组数据进行均值比较。 $p<0.01$ 表示差异极显著, $0.01<p<0.05$ 表示差异显著, $p>0.05$ 表示无显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 果实中酒石酸、L-苹果酸、L-抗坏血酸和柠檬酸含量的测定

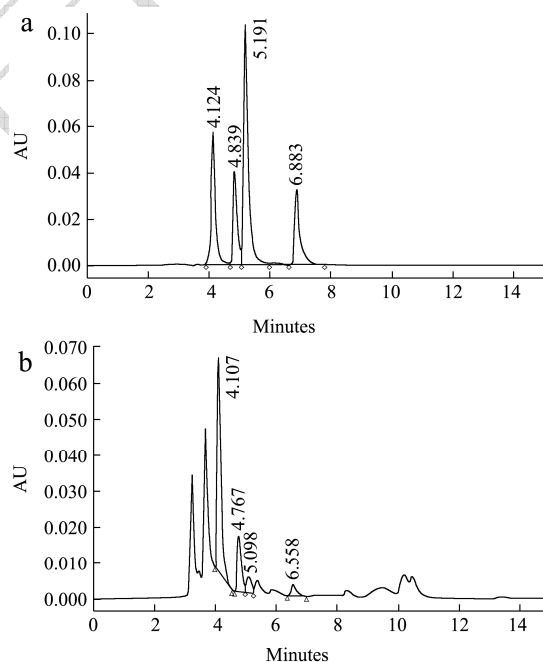


图2 HPLC 色谱图-标准品 (a) 和样品 (b)

Fig.2 HPLC chromatograms- Standard (a) and Sample (b)

表3 HPLC 法测定葡萄中有机酸的验证参数

Table 3 Validation parameters for determination of organic acids in grape by HPLC

有机酸	出峰时间/min	回归方程	相关系数 R^2	回收率/%	相对标准偏差
酒石酸	4.124	$Y=8.05e^{+5}X+1.97e^{+4}$	0.9965	95.06	0.017
L-苹果酸	4.839	$Y=4.00e^{+5}X-7.20e^{+3}$	0.9902	90.33	0.008
L-抗坏血酸	5.101	$Y=5.95e^{+6}X-1.23e^{+5}$	0.9968	89.62	0.032
柠檬酸	6.883	$Y=4.83e^{+5}X-4.47e^{+3}$	0.9906	103.18	0.020

图 2a 为标准品色谱图, 图 2b 为样品色谱图; 表 3 为有机酸相应的验证参数, 有机酸的平均回收率为 89.62%~103.18%, 表明该方法具有较高的准确度。

2.2 SO₂ 对木纳格葡萄酒石酸、L-苹果酸、L-抗坏血酸和柠檬酸含量的影响

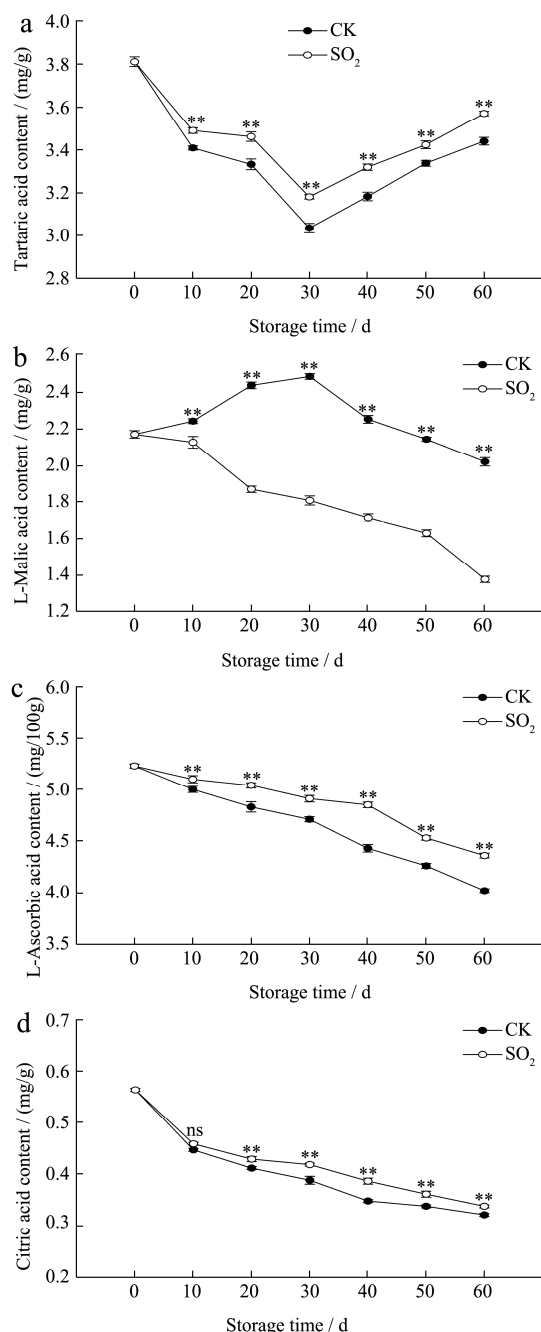


图 3 SO₂对木纳格葡萄酒石酸、L-苹果酸、L-抗坏血酸和柠檬酸含量的影响

Fig.3 Effect of SO₂ treatment on Tartaric acid, L-Malic acid, L-Ascorbic acid and Citric acid of 'Munage' grape

注: **表示 $p < 0.01$, 差异极显著; *表示 $0.01 < p < 0.05$, 差异显著; ns 表示 $p > 0.05$, 差异不显著。

贮藏第 0 d 果实中的酒石酸、L-苹果酸、L-抗坏血酸和柠檬酸含量分别为 3.81 mg/g、2.17 mg/g、5.23 mg/100 g、0.56 mg/g。与酿酒葡萄一致^[20], 在采收贮藏期间, 木纳格葡萄果实以酒石酸和 L-苹果酸含量为主。SO₂ 处理组与 CK 酒石酸含量变化趋势一致 (图 3a), 呈先下降 (0~30 d) 后上升 (30~60 d) 趋势, 第 30 d 达到最低值, CK、SO₂ 处理果实中酒石酸含量分别为 3.04 mg/g、3.18 mg/g。在贮藏前期, SO₂ 处理显著抑制果实酒石酸的降解, 后期 SO₂ 处理显著促进了果实中酒石酸的积累, SO₂ 处理组酒石酸含量始终高于 CK ($p < 0.01$)。酒石酸前期含量变化与马会勤等人^[21]在巨峰葡萄中的研究相似。

CK 组 L-苹果酸含量在 0~30 d 呈上升趋势, 第 30 d 达到最高值 2.48 mg/g, 30~60 d 呈下降趋势 (图 3b); SO₂ 处理组 L-苹果酸始终呈下降趋势。SO₂ 处理组 L-苹果酸含量显著低于 CK 组 ($p < 0.01$), 第 60 d 降低至 1.38 mg/g。CK 组苹果酸含量变化与巨峰浆果中的变化趋势相同^[21]。

随着贮藏时间的延长, 果实中的 L-抗坏血酸 (图 3c) 和柠檬酸 (图 3d) 逐渐减少。贮藏第 10 d SO₂ 处理组与 CK 柠檬酸含量无显著性差异 ($p > 0.05$); 贮藏前期, L-抗坏血酸含量下降速度缓慢, 柠檬酸含量下降迅速, 后期则相反, L-抗坏血酸含量下降迅速, 柠檬酸含量下降缓慢; 贮藏第 60 d, CK 与 SO₂ 处理组 L-抗坏血酸含量分别降低至 4.02 mg/100 g、4.36 mg/100 g。SO₂ 处理可以显著维持葡萄果实 L-抗坏血酸和柠檬酸含量, 这与葛毅强等人^[22]的研究结果一致。SO₂ 对木纳格葡萄 L-抗坏血酸含量的影响与一氧化氮处理结果一致^[23]。

2.3 Nevogene 测序及 RNA-Seq 数据分析

RNA-Seq 技术能够有效地分析全局基因表达水平。采用聚类分析法将 CK 组和 SO₂ 处理组两组中共同且连续表达的 13511 个差异基因进行聚类, 结果如图 4 所示。SO₂ 处理组和 CK 组组间的差异基因表达量存在明显的差异, 说明 SO₂ 处理在木纳格葡萄不同贮藏时间所启动的响应基因不同, 防御机制也有所不同。与前人研究一致, SO₂ 对葡萄果实多种基因的表达具有调控作用, 进而引起葡萄果实转录组数据大规模重组^[24]。为了研究特定时间点差异表达的基因, 对不同贮藏时间差异表达基因进行了统计 (图 5)。与 CK 组相比, 贮藏第 10 d, SO₂ 处理组果实差异基因中上调 589 个, 下调 1067 个; 第 30 d, 差异基因上调 554 个, 下调 329 个; 第 60 d, 差异基因上调 517 个, 下调 868 个。SO₂ 在贮藏前期就开始调控木纳格葡萄

基因的表达。

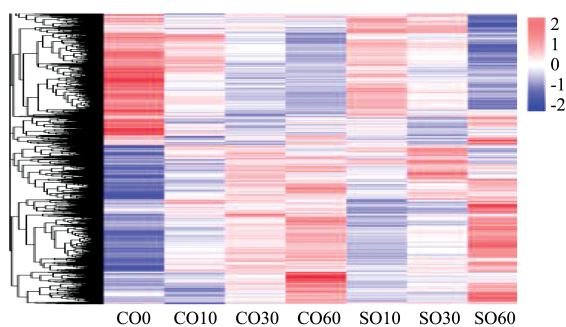


图4 转录组数据分析差异基因热图

Fig.4 Heat map of differential genes by transcriptome data analysis

注: 'SO'代表SO₂处理; 红色代表上调表达, 蓝色代表下调表达。

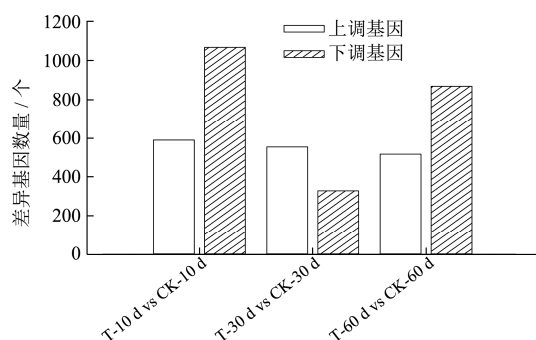


图5 SO₂对木纳格葡萄不同贮藏时期差异基因的调控

Fig.5 Regulation of differentially expressed genes of 'Munage' grape by SO₂ during different storage periods

注: 'T'代表SO₂处理。

2.4 SO₂对苹果酸代谢相关基因PCA分析

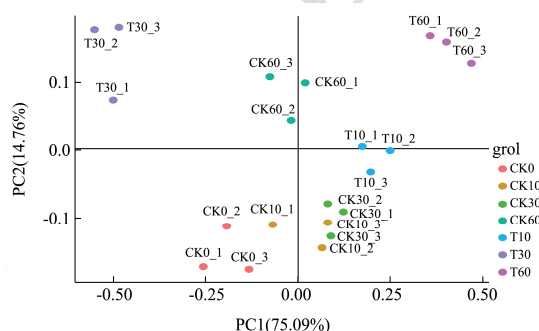


图6 SO₂对木纳格葡萄苹果酸代谢相关基因主成分分析 (PCA)

Fig.6 Principal component analysis (PCA) of malate metabolism related genes of 'Munage' grape by SO₂

注: 'T'代表SO₂处理; '0、10、30、60'代表贮藏天数; '1、2、3'代表平行样本。

SO₂处理组苹果酸含量变化与CK组数据变化趋势差异显著(图3b)。采用RNA-Seq数据苹果酸代谢相关基因的FRKM值进行主成分分析(PCA), 探究苹果酸代谢过程中相关基因的差异性(图6)。同一处

理的3个平行样本在图6中集中呈现, 说明送测序平行样本间个体差异较小, 数据分析具有一定的准确性。不同贮藏时间SO₂处理的木纳格葡萄苹果酸代谢相关基因表达量沿PC1和PC2方向变化, 分布在图中的不同位置。CK组苹果酸代谢相关基因表达量集中在PC1轴0刻度线左右两侧, 沿PC2方向变化。表明不同贮藏时间SO₂处理组与CK组木纳格葡萄苹果酸代谢相关基因的表达量存在显著差异。

2.5 SO₂调控苹果酸代谢的转录组图谱

通过RNA-Seq数据分析SO₂对苹果酸代谢相关基因表达量的影响。图7为苹果酸代谢相关基因的转录组图谱, 贮藏过程中苹果酸在葡萄果实中的转化途径与鲍威尔橙(*Citrus sinensis*)相似^[25]。

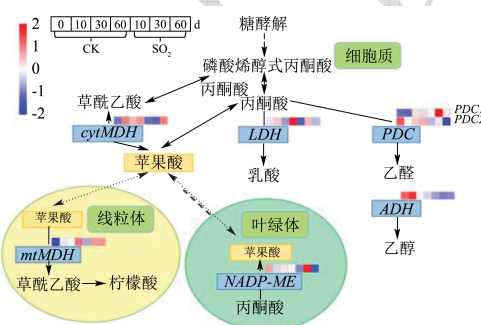


图7 SO₂对木纳格葡萄采收贮藏过程中苹果酸代谢相关基因的转录组分析

Fig.7 Transcriptomic mapping of genes associated with malate metabolism during postharvest storage of 'Munage' grape by SO₂

注: 虚线代表跨膜运输; 实线代表物质转化; 箭头方向代表转化方向(双向箭头代表可逆转化)。

在细胞质中, 苹果酸与草酰乙酸在cytMDH作用下可逆转化, 细胞质中苹果酸含量由草酰乙酸、丙酮酸转化和线粒体、叶绿体提供。细胞质中一部分丙酮酸在PDC作用下转化为乙醛, 乙醛在ADH作用下转化为乙醇, 另一部分在LDH作用下转化为乳酸。在线粒体中, 苹果酸在mtMDH作用下转化为草酰乙酸, 随后转化为柠檬酸。在叶绿体中, 丙酮酸在NADP-ME作用下转化为苹果酸。由转录组图谱可以看出, 贮藏第10 d, SO₂处理组PDC1表达水平高于CK, cytMDH、mtMDH、LDH、PDC2、ADH、NADP-ME表达水平低于CK; 贮藏第30 d, SO₂处理组mtMDH、LDH、PDC1、NADP-ME表达水平高于CK, cytMDH、PDC2、ADH表达水平低于CK; 贮藏第60 d, SO₂处理组cytMDH、mtMDH、LDH、PDC1表达水平高于CK, PDC2、ADH、NADP-ME表达水平低于CK。

2.6 SO₂ 对苹果酸代谢相关基因相对表达量的影响

影响

采用 qRT-PCR 测定苹果酸代谢相关基因的相对表达量,验证转录组数据。*MDH* 为细胞内总苹果酸脱氢酶基因,其相对表达量见图 8a; *cytMDH* (图 8b)、*mtMDH* (图 8c)、*LDH* (图 8d)、*NADP-ME* (图 8e)、*PDC1* (图 8f)、*PDC2* (图 8g)、*ADH* (图 8h) 的相对表达量结果与转录组图谱中对应基因的表达水平变化趋势一致。

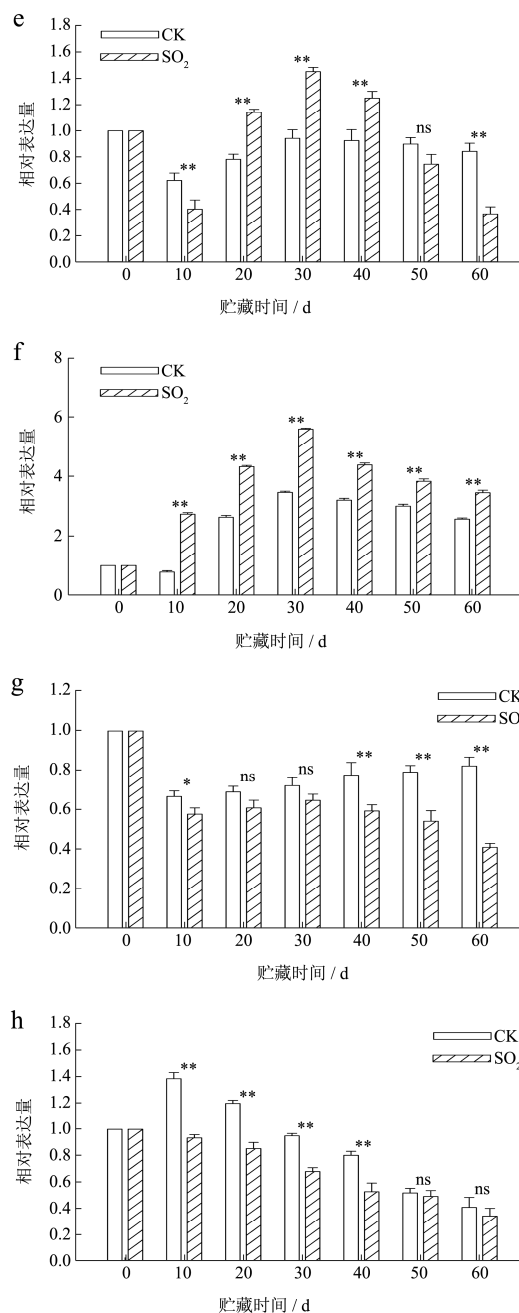
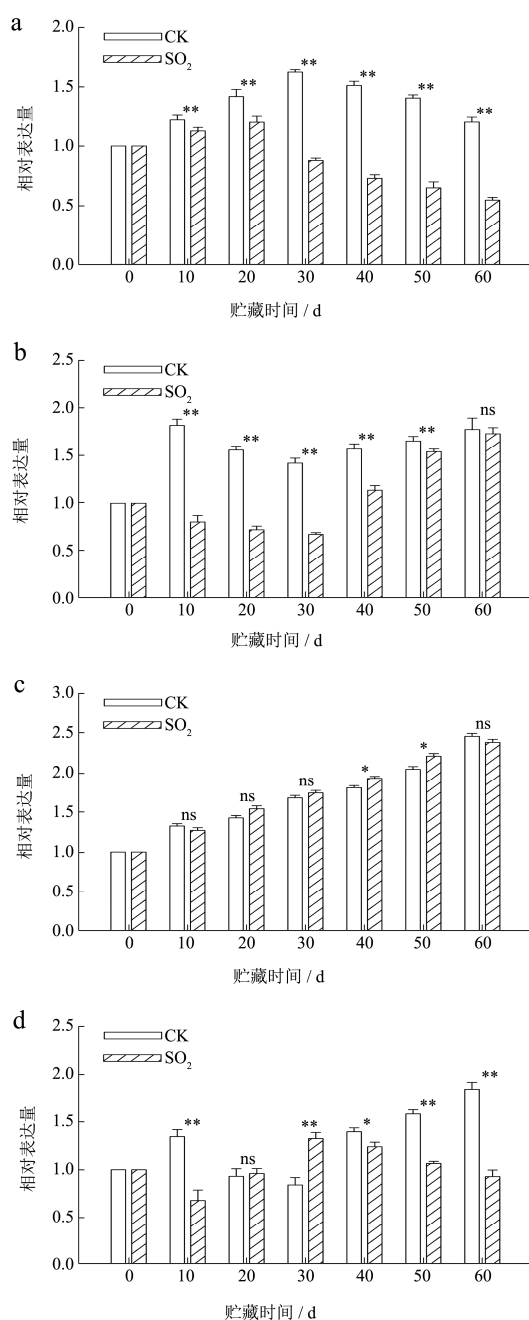


图 8 SO₂ 对木纳格葡萄苹果酸代谢相关基因相对表达量的影响

Fig.8 The effects of SO₂ on relative expression quality of genes related to malate metabolism

注: a: *MDH*; b: *cytMDH*; c: *mtMDH*; d: *LDH*; e: *NADP-ME*; f: *PDC1*; g: *PDC2*; h: *ADH*. **表示 $p < 0.01$, 差异极显著; *表示 $0.01 < p < 0.05$, 差异显著; ns 表示 $p > 0.05$, 差异不显著。

MDH 存在于不同的细胞间,在代谢途径中起着重要的作用,其功能多样,包括线粒体中的能量提供和植物的活性氧代谢等^[26]。贮藏期间,SO₂ 处理组 *MDH* 表达水平显著低于 CK,第 60 d 相对表达量最低,

为 0.55 ± 0.02 ; CK 组 *MDH* 表达水平呈先上升后降低趋势,第 30 d 达到最大值,为 1.63,比 SO_2 处理组相对表达量高 46.01%。*L*-苹果酸含量与 *MDH* 表达水平的变化趋势一致。参与三羧酸(TCA)循环的细胞质 *MDH* 不容易发生氧化还原反应^[27],贮藏中期, SO_2 处理组 *cytMDH* 的表达水平显著低于 CK ($p < 0.01$),第 30 d 相对表达量最低,为 1.42,比 CK 组低 52.82%。果实中 *mtMDH* 的相对表达量呈上升趋势,第 60 d, CK 与 SO_2 处理 *mtMDH* 相对表达量分别为 2.46、2.39; 40~50 d, SO_2 处理组 *mtMDH* 的相对表达量显著高于 CK 组 ($0.01 < p < 0.05$),使 SO_2 处理组线粒体内苹果酸含量降低,分解为草酰乙酸。叶绿体中 *NADP-ME* 活性受光的氧化还原调控^[28],第 10 d、60 d, SO_2 处理组 *NADP-ME* 的相对表达量显著低于 CK ($p < 0.01$),分别比 CK 组低 35.48%、57.14%; 20~40 d, SO_2 处理组 *NADP-ME* 的相对表达量显著高于 CK ($p < 0.01$),第 30 d *NADP-ME* 的相对表达量是 CK 的 1.54 倍。有研究表明, *NADP-ME* 表达水平的提高与 SO_2 调节光合作用活性的能力有关^[29], SO_2 处理仅能提高叶绿体内苹果酸含量的积累,果实内总苹果酸含量仍呈下降趋势。第 30 d CK 组 *NADP-ME* 表达水平的提高可能是果实内 *L*-苹果酸含量的升高的关键。

SO_2 处理组 *LDH* 的相对表达量呈降低-升高-降低趋势; CK 组 *LDH* 的相对表达量呈升高-降低-升高趋势,第 60 d 达到最大值 1.85; 在 10, 40, 50, 60 d, SO_2 处理组 *LDH* 的表达水平显著低于 CK; 第 30 d, SO_2 处理组 *LDH* 的表达水平显著提高 ($p < 0.01$),是 CK 的 1.57 倍,促进细胞质内的丙酮酸还原为乳酸,导致细胞质内转化为苹果酸的底物(丙酮酸)含量降低,间接降低细胞质内的苹果酸含量。

PDC 是一种胞内酶,是焦磷酸硫胺素依赖性的非氧化酶,是由辅酶焦磷酸硫胺素、 Mg^{2+} 和蛋白质构成的全酶,在辅助因子焦磷酸硫胺素和 Mg^{2+} 参与下作用于丙酮酸而产生乙醛和 CO_2 ^[30]。*PDC* 是丙酮酸合成乙醇的关键酶。*PDC1* 呈先上升后下降趋势,在整个贮藏过程中 SO_2 处理组 *PDC1* 的相对表达量显著高于 CK ($p < 0.01$),第 30 d 达到最大值 5.59 ± 0.03 ,是 CK 的 1.62 倍,导致细胞质内丙酮酸含量降低,转化为乙醛,间接减少细胞质内苹果酸的合成。 SO_2 处理组 *PDC2* 和 *ADH* 的相对表达量显著低于 CK; 贮藏后期 CK 组 *PDC2* 的相对表达量基本保持水平,而 SO_2 处理组 *PDC2* 的相对表达量呈下降趋势,第 60 d 达到最低值 0.41,比 CK 组低 50.00%; 第 20、30 d *PDC2* 的相对表达量无显著性差异 ($p > 0.05$)。贮藏第 10 d, CK 组 *ADH* 的相对表达量达到最大值 1.39,比 SO_2 处理组高

32.37%; 第 50、60 d, *ADH* 的相对表达量无显著性差异 ($p > 0.05$)。在采后贮藏过程中,苹果酸代谢相关基因表达及代谢途径在葡萄果实的研究中尚未见报道。

3 结论

SO_2 能够维持木纳格葡萄果实中酒石酸、*L*-抗坏血酸和柠檬酸含量,加速 *L*-苹果酸含量的减少。贮藏第 60 d, SO_2 处理组果实中酒石酸、*L*-抗坏血酸和柠檬酸分别比 CK 组高 0.13 mg/g、0.34 mg/100g、0.02 mg/g; *L*-苹果酸比 CK 组低 0.64 mg/g。通过对差异基因的汇总分析,表明 SO_2 能够引起木纳格葡萄采后转录组数据大规模重组,在贮藏前期就开始调控基因的表达; PCA 分析表明 SO_2 显著影响了苹果酸代谢相关基因的表达量; 经 qRT-PCR 验证,苹果酸代谢相关基因的相对表达量与转录组图谱对应基因的表达量变化趋势具有一致性; *L*-苹果酸含量与 *MDH* 表达水平的变化趋势一致; SO_2 通过上调 *mtMDH*、*LDH*、*NADP-ME*、*PDC1*, 下调 *MDH*、*cytMDH*、*PDC2*、*ADH* 的相对表达量来调控果实内苹果酸含量合成和降解,促进木纳格葡萄中 *L*-苹果酸的分解,保持果实良好的风味特征,为 SO_2 在果实采后有机酸代谢方面的研究提供理论参考。

参考文献

- [1] 夏邦庆,吴少鹏.木纳格葡萄[J].西北园艺:果树专刊,1998,4: 42-43
XIA Bang-qing, WU Shao-peng. "Munage" grapes [J]. Northwest Horticulture: Fruit Trees, 1998, 4: 42-43
- [2] Al-Qurashi A D, Awad M A. Postharvest chitosan treatment affects quality, antioxidant capacity, antioxidant compounds and enzymes activities of El-Bayadi table grapes after storage [J]. Scientia Horticulturae, 2015, 197: 392-398
- [3] Miceli A, Ippolito A, Linsalata V, et al. Effect of preharvest calcium treatment on decay and biochemical changes of table grape during storage [J]. Phytopathologia Mediterranea, 1999, 38(2): 47-53
- [4] Champa W A H, Gill M I S, Mahajan B V C, et al. Preharvest salicylic acid treatments to improve quality and postharvest life of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. flame seedless [J]. Journal of Food Science & Technology, 2015, 52(6): 3607-3616
- [5] Flores G, Blanch G P, Castillo M L R. Postharvest treatment with (-) and (+)-methyl jasmonate stimulates anthocyanin accumulation in grapes [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(1): 807-812

- [6] Candir E, Ozdemir A E, Kamiloglu O, et al. Modified atmosphere packaging and ethanol vapor to control decay of 'Red Globe' table grapes during storage [J]. Postharvest Biology & Technology, 2012, 63(1): 98-106
- [7] Mirdehghan S H, Rahimi S. Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (*Vitis vinifera* L.) quality during postharvest period [J]. Food Chemistry, 2016, 196: 1040-1047
- [8] Smilanick J L. Inhibitory activity of sulfur dioxide on the germination of spores of *Botrytis cinerea* [J]. Phytopathology, 1990, 80(2): 3-14
- [9] Carter M Q, Chapman M H, Gabler F, et al. Effect of sulfur dioxide fumigation on survival of foodborne pathogens on table grapes under standard storage temperature [J]. Food Microbiology, 2015, 49: 189-196
- [10] Duarte-Sierra, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I, et al. Quality and PR gene expression of table grapes treated with ozone and sulfur dioxide to control fungal decay [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 96(6): 2018-2024
- [11] Li L, Yi H. Differential expression of Arabidopsis defense-related genes in response to sulfur dioxide [J]. Chemosphere, 2012, 87(7): 718-724
- [12] 吴军林,吴清平,张菊梅.*L*-苹果酸的生理功能研究进展[J]. 食品科学,2008,29(11):692-695
WU Jun-lin, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei. Advances in studies on the physiological functions of *L*-malic acid [J]. Food Science, 2008, 29(11): 692-695
- [13] P J Hardy. Metabolism of sugars and organic acids in immature grape berries [J]. Plant Physiology, 1968, 43(2): 224-228
- [14] Lamikanra O, Inyang I D, Leong S. Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red muscadine grapes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry (USA), 1995, 43: 3026-3028
- [15] Pavloušek P, Michal K. Profiling of primary metabolites in grapes of interspecific grapevine varieties: sugars and organic acids [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2011, 29(4): 361-372
- [16] Keller M, Shrestha P M, Hall G E, et al. Arrested sugar accumulation and altered organic acid metabolism in grape berries affected by berry shrivel syndrome [J]. AJEV Papers in Press, 2016, 67(4): 398-406
- [17] Jena B S, Jayaprakasha G K, Sakariah K K. Organic acids from leaves, fruits, and rinds of *Garcinia cowa* [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(12): 3431-3434
- [18] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 113-116
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [20] 赵悦,韩宁,孙玉霞,等.不同产地酿酒葡萄“赤霞珠”果实中有机酸差异性研究[J].食品工业科技,2016,345(1):256-260
ZHAO Yue, HAN Ning, SUN Yu-xia, et al. Study on the difference of organic acids in cabernet sauvignon fruit from different producing areas [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 345(1): 256-260
- [21] 马会勤,罗国光.巨峰浆果生长过程中的酒石酸,苹果酸变化[J].葡萄栽培与酿酒,1997,2:1-3
MA Hui-qin, LUO Guo-guang. Changes in tartaric acid and malic acid during the growth of giant peak berries [J]. Viticulture and Oenology, 1997, 2: 1-3
- [22] 葛毅强,叶强.SO₂对采后葡萄某些生理生化特性的影响(简报)[J].植物生理学报,1998,34(3):185-187
GE Yi-qiang, YE Qiang. Effects of SO₂ on certain physiological and biochemical characteristics of postharvest grapes (presentation) [J]. Plant Physiology Journal, 1998, 34(3): 185-187
- [23] 张政,王倩,吴斌,等.一氧化氮间歇熏蒸对木纳格葡萄贮藏品质的影响[J].食品科技,2016,8:28-33
ZHANG Zheng, WANG Qian, WU Bin, et al. Effects of nitric oxide intermittent fumigation on quality of 'munage' grapes during storage [J]. Food Science and Technology, 2016, 8: 28-33
- [24] Giraud E, Ivanova A, Gordon C S, et al. Sulphur dioxide evokes a large scale reprogramming of the grape berry transcriptome associated with oxidative signalling and biotic defence responses [J]. Plant Cell & Environment, 2012, 35(2): 405-417
- [25] Tang N, Deng W, Hu N, et al. Metabolite and transcriptomic analysis reveals metabolic and regulatory features associated with Powell orange pulp deterioration during room temperature and cold storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 112: 75-86

(下转第 41 页)