

doi:10.12301/spxb202300071

文章编号:2095-6002(2023)06-0075-13

引用格式:张皓月,侯娇,杨相政,等.基于广泛靶向代谢组学的血橙桔水时柠檬酸降解途径研究[J].食品科学技术学报,2023,41(6):75-87.



ZHANG Haoyue, HOU Jiao, YANG Xiangzheng, et al. Study on citric acid degradation pathways of blood orange during segment drying based on widely targeted metabolomics[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(6):75-87.

基于广泛靶向代谢组学的血橙桔水时柠檬酸降解途径研究

张皓月¹, 侯娇¹, 杨相政², 李健³, 曾凯芳¹, 姚世响^{1,*}

(1. 西南大学食品科学学院/国家柑桔工程技术研究中心/川渝共建特色

食品重庆市重点实验室, 重庆 400715;

2. 中华全国供销合作总社 济南果品研究所, 山东 济南 250204;

3. 北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048)

摘要: 桔水是影响柑橘果实品质的主要生理性病害,果实发病后风味寡淡,不堪食用。桔水主要类型为汁胞粒化型桔水和汁胞萎缩型桔水,后者研究较少。以汁胞萎缩型桔水的塔罗科血橙为实验材料,运用广泛靶向代谢组学分析汁胞萎缩型桔水的初生代谢物及代谢途径变化,并进一步结合氨基酸含量、关键酶活性及基因表达分析解析桔水时柠檬酸降解机制。研究表明:有193种初生代谢物的含量在汁胞桔水时显著变化,其中柠檬酸含量显著下降了53.1%,乙酰辅酶A途径代谢产物丝氨酸、亚油酸及其他脂类物质的含量显著升高;脂代谢基因在桔水时上调表达;编码ATP-柠檬酸裂解酶的基因 *CsACLs* 的表达没有变化;谷氨酰胺合成酶活性在桔水时增加了75.3%; γ -氨基丁酸含量没有变化,谷氨酰胺脱羧酶活性没有变化,编码谷氨酰胺脱羧酶的基因 *CsGADs* 在桔水时下调表达。研究表明,乙酰辅酶A合成途径是血橙汁胞萎缩型桔水时柠檬酸快速降解的主要机制,结果旨在为明确柑橘桔水机制提供一定的参考。

关键词: 塔罗科血橙; 桔水; 柠檬酸降解; 乙酰辅酶A合成途径; GABA支路

中图分类号: TS255.3

文献标志码: A

桔水是柑橘果实常见的生理性病害,主要发生于采前成熟阶段或采后贮藏阶段^[1]。大部分柑橘栽培品种均有桔水发生的报道,如三红蜜柚和琯溪蜜柚等柚类^[2-3]、丰脐和伦晚脐橙等甜橙类^[4-5]、椪柑和沙糖桔等宽皮柑橘类^[6-7]、尤力克(Eureka)和里斯本(Lisbon)等柠檬类^[8]、黄果柑和大雅柑等杂柑类^[9-10],以及胡柚和葡萄柚等^[1,11]。柑橘桔水后,果实糖酸风味寡淡,严重时丧失食用品质和商品

价值。柑橘果实桔水时,汁胞呈高度异质化状态,粒化和萎缩是主要的2种类型^[1]。汁胞桔水类型与柑橘品种有一定关系,比如柚类通常以粒化为主,宽皮柑橘和甜橙则粒化和萎缩均比较常见^[1]。粒化汁胞呈膨大硬化表型,萎缩汁胞呈萎缩塌陷表型,2种汁胞具有相似的糖酸风味寡淡表型。

相关学者在揭示汁胞桔水时糖酸快速消耗机制方面做了大量工作。张百超等^[12]提出“果皮过度衰

收稿日期:2023-02-03

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31972131);国家自然科学基金青年基金项目(31601520)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China(31972131); National Natural Science Foundation Youth Fund Project(31601520)。

第一作者:张皓月,硕士研究生,研究方向为果蔬贮藏与保鲜。

*通信作者:姚世响,副教授,博士,主要从事果蔬贮藏与保鲜领域的研究。

老诱导枯水”假说,果皮过度衰老导致汁胞糖酸急剧消耗和枯水。陈昆松等^[13]提出“果皮相对再生长诱导枯水”假说,果皮相对再生长诱发汁胞糖酸耗竭和枯水。这2种假说均有一定的生理数据支撑,同时这2种假说相互存在矛盾,这反映了柑橘枯水这一生理性病害高度复杂的特点。Huang等^[1,4,6,14-15]基于汁胞的大量生理证据提出“细胞壁代谢紊乱诱导枯水”假说,果胶代谢紊乱和细胞壁物质大量合成诱导汁胞糖酸物质耗竭和枯水,该假说为柑橘枯水的分子机制研究提供了概念性基础^[1,11,16]。此外,汁胞枯水时有机酸(主要组分为柠檬酸)的急剧消耗更为显著,其降解途径也开始被阐明^[3]。其中,柑橘果实成熟时柠檬酸降解有2条主要途径——乙酰辅酶A合成途径和GABA支路,第1条途径在枯水时被显著激活^[3]。目前枯水进程中糖酸消耗机制的研究主要是在粒化型汁胞中进行的,对萎缩型汁胞关注较少。

塔罗科血橙(*Citrus sinensis* cv. Tarocco)在我国主要栽培于三峡库区(万州等地),是晚熟柑橘的重要品种,在1月底至2月中旬成熟,通过留树保鲜技术延长至3~5月上市,在冬季极端低温的年份易发生采前枯水^[17]。本团队前期研究发现,塔罗科血橙枯水时汁胞呈萎缩状态,是典型的萎缩型枯水。近期研究揭示血橙汁胞萎缩型枯水进程中,果胶代谢紊乱和木质素合成途径激活是柑橘枯水的主要诱因,为本研究分析汁胞柠檬酸消耗机制奠定了基础^[14-15]。本研究以塔罗科血橙为实验材料,采用广泛靶向代谢组学技术系统分析汁胞枯水时初生代谢物质的变化,进一步综合运用生理、生物信息学和基因分析技术对枯水时柠檬酸消耗的机制进行解析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

塔罗科血橙(*C. sinensis* cv. Tarocco)果实采于2021年4月中旬重庆三峡库区的柑橘果园,当天运回位于重庆市西南大学的实验室,选择成熟度和大小一致的果实(约200个)用于实验,正常汁胞和枯水汁胞分别取自正常和枯水血橙果实,用液氮速冻后,-80℃储存备用。

次氯酸钠,分析纯,成都市科隆化学品有限公司;甲醇、乙腈,色谱纯,美国Merck公司;磺基水杨

酸,分析纯,北京索莱宝生物科技公司;PBS溶液(磷酸盐缓冲液),分析纯,重庆跃翔化工有限公司。

BC0915 谷氨酰胺合酶(glutamine synthetase, GLN)活性检测试剂盒,北京索莱宝生物科技公司;BS-E1878802 植物谷氨酰胺脱羧酶(glutamine decarboxylase, GAD)ELISA试剂盒,江苏博深生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Scientz-100F型冻干机,宁波新芝生物科技股份有限公司;MM400型研磨仪,德国Retsch公司;TGL-18MS型冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;Nexera X2型系列超高效液相色谱仪,日本岛津公司;SB-C18液相色谱柱,美国Agilent公司;4500 QTRAP型串联质谱仪,美国Applied Biosystems公司;L-8900型全自动氨基酸分析仪,日本日立公司;SYNERGY H1型多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 代谢组学样本制备及超高效液相色谱串联质谱分析

参考Zhu等^[18]的方法进行代谢组学样品制备及超高效液相色谱串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)分析。将汁胞样本用冻干机冷冻干燥,使用研磨仪充分研磨(30 Hz, 1.5 min)成粉末;称取100 mg粉末,溶解于体积分数70%甲醇提取液中,振荡30 s,每30 min振荡1次,共振荡6次,样品置于4℃过夜提取。12 000 r/min离心10 min后,用直径0.22 μm的微孔滤膜过滤上清液,然后存于进样瓶中。正常汁胞样本记为N组,枯水汁胞样本记为VC组,质控样本记为mix组,3组样本均设置3个生物学重复,用于UPLC-MS/MS分析。

液相条件:样品进样量为4 μL,流速为0.35 mL/min,每个样品分析时间约为15 min。液相色谱柱2.1 mm × 100 mm × 1.8 μm,柱温40℃;流动相A相为水(含体积分数0.1%甲酸),B相为乙腈(含体积分数0.1%甲酸);洗脱梯度为0 min时B相体积比例为5%,在9 min内B相体积比例线性增加至95%,并在95%维持1 min,然后在1.1 min内B相比例降至5%,并在5%维持3 min。

质谱条件:电喷雾离子源温度为550℃;离子喷雾电压分别为5 500 V(正离子模式)和4 500 V(负离子模式);离子源气体I压力为344.75 kPa、离子

源气体Ⅱ压力为413.69 kPa、气帘气(curtain gas)压力为172.37 kPa;碰撞诱导电离参数设置为高;三重四极杆(triple quadrupole)扫描使用多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式。

1.3.2 代谢物质定性定量分析

将二级质谱信息与MWDB数据库信息比对鉴定代谢物质;用MRM模式进行代谢物质定量分析。使用软件Analyst 1.6.3处理获得的样本质谱分析数据,对物质质谱峰进行峰面积积分,并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱峰进行积分校正。代谢组数据使用MetaX进行正交偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis),VIP(variable important in projection) ≥ 1 、fold change ≥ 2 (或 ≤ 0.5)和 $P < 0.05$ 作为代谢物质含量具有显著性差异的判断标准。

1.3.3 氨基酸定量分析

氨基酸定量分析参考Wang等^[3]的方法并略有修改。称取0.5 g汁胞粉末,加入1.5 mL体积分数为6%磺基水杨酸,40 kHz超声提取30 min;4 °C,12 000 r/min离心15 min,收集上清液后用微孔滤膜(孔径0.22 μm)过滤,用全自动氨基酸分析仪测定氨基酸含量($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$),设置4个生物学重复。

1.3.4 柠檬酸降解相关酶活性测定

GLN和GAD活性分别用相应活性检测试剂盒测定。粗酶液分别在540 nm和450 nm处测定吸光度,酶活表示为U/mg,GLN活性设置3个生物学重复,GAD活性设置4个生物学重复。

1.3.5 脂代谢相关基因的生物信息学分析

基因的生物信息学鉴定参考Wang等^[3]的方法。从TAIR11数据库(Arabidopsis Information Resource)下载拟南芥脂代谢基因家族序列,用本地Blast软件比对甜橙基因组(*C. sinensis* V1)数据库,得到的基因序列用Pfam分析验证蛋白质是否存在保守结构域,最终鉴定甜橙的相关基因家族成员。

将甜橙脂代谢基因家族序列用TBtools软件分析其基因家族成员的染色体定位,并根据定位及拟南芥同源基因名称命名基因。用ExPasy工具分析基因编码蛋白的长度、分子质量和等电点等理化特性。用基因结构显示工具(gene structure display server, GSDS)分析基因的外显子和内含子结构信息,用Pfam软件鉴定及显示蛋白质结构域。

1.3.6 基因转录水平分析

基因表达分析参考Wang等^[3]的方法。提取血

橙汁胞总RNA后构建cDNA文库,用Illumina HiSeq平台测序。用TopHat v2.0.12软件将测序数据比对甜橙基因组(*C. sinensis*),用FPKM(fragments per kilobase per million mapped reads)表示基因表达水平。差异基因用DESeq2 R package软件分析($P < 0.05$),设置4个生物学重复。

1.4 数据处理

除代谢物质和基因表达数据,其他实验数据均用Graphpad Prism 9.0(美国GraphPad Software公司)进行统计分析,用 t 检验($P < 0.05$)判别显著性差异。用Adobe Illustrator 2021软件(美国Adobe公司)绘图。

2 结果与分析

2.1 气温与血橙枯水相关性的观察

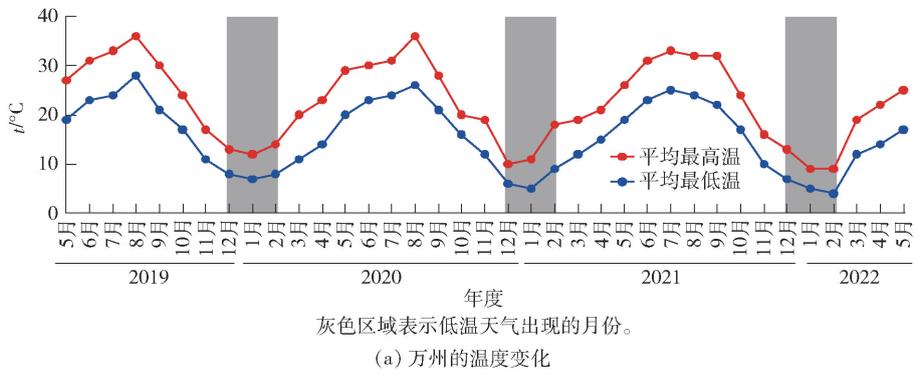
柑橘采前成熟阶段的气温是影响果实品质的重要因素。以三峡库区主要城市万州为例,三峡库区血橙采前阶段的气温变化和果实枯水表型见图1。低温天气在12月至次年2月出现,部分年份甚至会低于0 °C[图1(a)]。在2020年冬季,万州血橙果园出现一段时间-8~0 °C的寒潮,次年果实出现大面积枯水现象。本研究对枯水果实进行深入观察后发现,枯水汁胞呈萎缩塌陷表型,为典型的汁胞萎缩型枯水[图1(b)]。

2.2 血橙枯水时汁胞的广泛靶向代谢组学分析结果

2.2.1 样本主成分分析及代谢物质鉴定结果

为了判断组间样本总体差异和组内样本变异度,对代谢组学数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA),见图2。第一主成分PC1和第二主成分PC2的解释率分别为62.73%和9.53%,提示正常和枯水血橙组样本存在明显差异[图2(a)]。组内样本的皮尔逊相关系数均大于0.95,提示重复样本间相关性强,变异小[图2(b)]。这些数据表明代谢组学的可信度高,可用于后续分析。

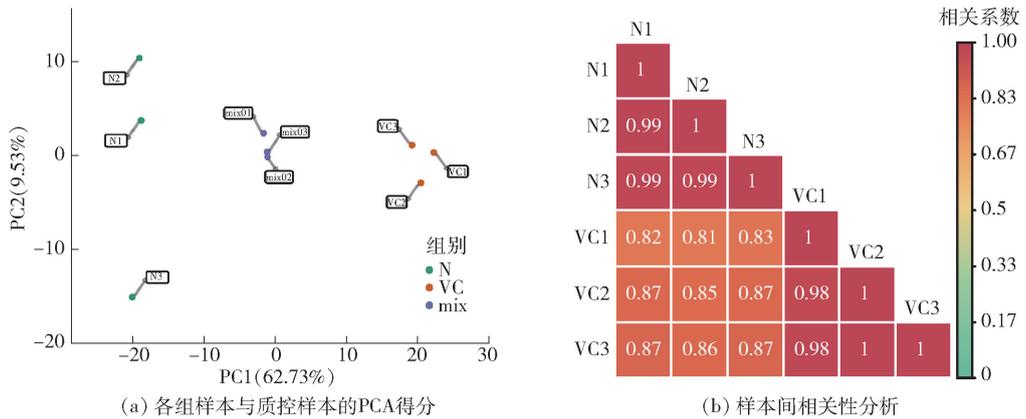
广泛靶向代谢组学从血橙汁胞中共鉴定到480种初生代谢物。这些代谢物质可分为11类,包括110种氨基酸及其衍生物、93种有机酸、76种糖及醇类、60种游离脂肪酸、55种核苷酸及其衍生物、29种溶血磷脂酰胆碱、21种维生素、23种溶血磷脂酰乙醇胺、9种甘油酯、3种鞘脂及1种磷脂酰胆碱。



(b) 正常和枯水血橙表型差异

图 1 三峡库区血橙采前阶段的气温变化和果实枯水表型

Fig. 1 Temperature variation of blood orange preharvest in Three Gorges Reservoir area and phenotype of fruit affected by segment drying



N 表示正常汁胞样本, VC 表示枯水汁胞样本, mix 表示质控样本。

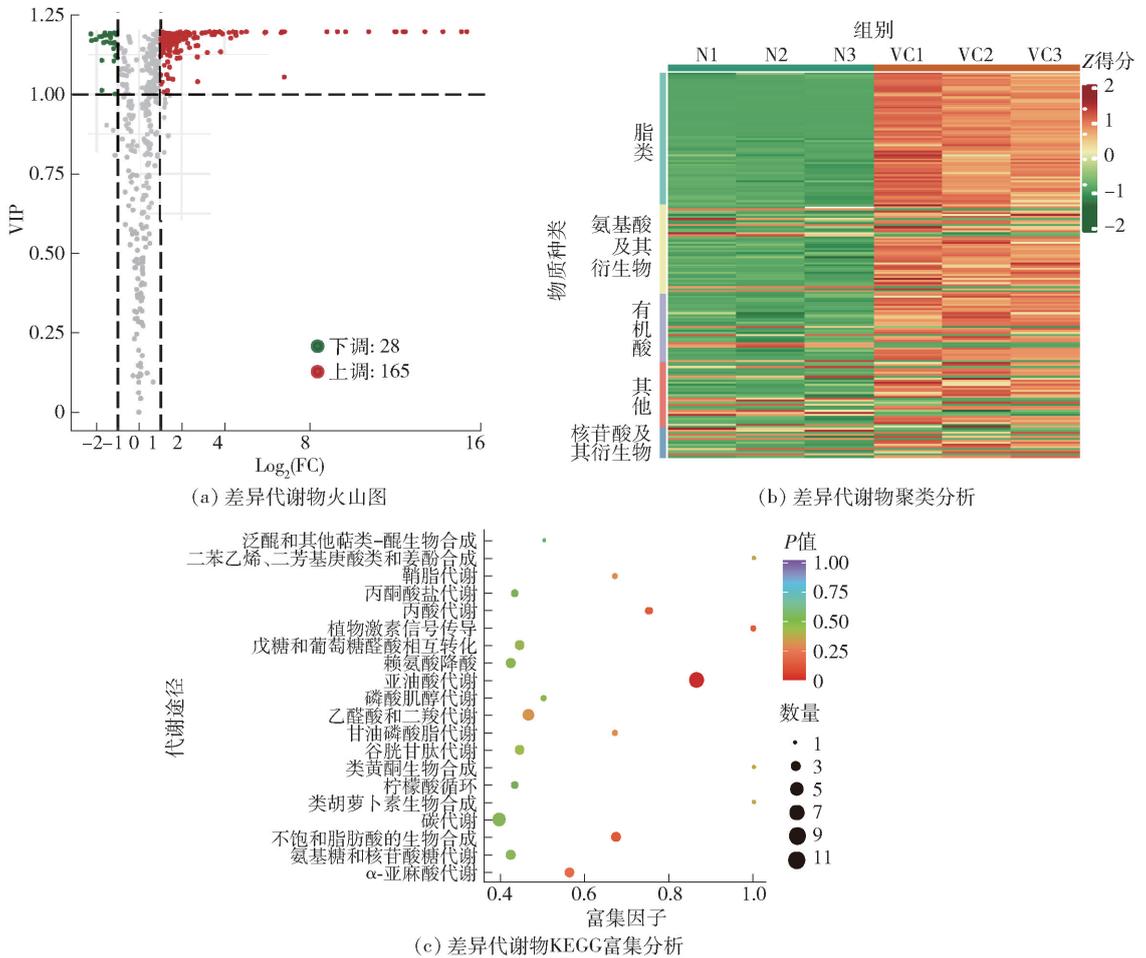
图 2 血橙正常和枯水样本的主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of normal and segment drying samples of blood orange

2.2.2 代谢物质的定量分析结果

代谢物质的定量分析结果见图 3。广泛靶向代谢组学共鉴定了 193 种代谢物质在血橙枯水时差异积累[图 3(a)]。其中, 165 种上调, 28 种下调。差异代谢物质的聚类结果显示, 脂类和氨基酸等多类物质含量在枯水时上调[图 3(b)]。将差异代谢物质与 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库比对, 用 KOBAS (KEGG orthology based annotation system) 分析差异代谢途径。结果发现, 亚油酸代谢通路是唯一的显著富

集通路 ($P < 0.05$) [图 3(c)]。进一步对亚油酸代谢相关脂类物质的组成及枯水时的含量变化特征进行分析, 66 种脂类代谢物质在枯水时都显著富集, 包括 39 种游离脂肪酸、11 种溶血磷脂酰胆碱、9 种溶血磷脂酰乙醇胺、6 种甘油酯和 1 种鞘脂。这些结果表明, 亚油酸代谢可能是血橙枯水时汁胞代谢物质变化的主要特征。亚油酸合成是柑橘果实柠檬酸降解关键途径——乙酰辅酶 A 合成途径的主要部分, 说明该途径是血橙果实枯水时柠檬酸降解的主要途径。



Z 得分表示差异代谢物相对含量归一化处理后的数值,反映含量的高低(红色为高含量,绿色为低含量)。N 表示正常汁胞样本,VC 表示桔水汁胞样本。

图3 血橙汁胞桔水时的差异代谢物分析

Fig. 3 Differential metabolite analysis in juice vesicles of blood orange during segment drying

2.2.3 柠檬酸降解途径相关代谢物质的含量变化

为系统了解血橙桔水时柠檬酸的消耗机制,本研究对代谢组学揭示的柠檬酸降解相关代谢物质进行了深入挖掘。血橙汁胞桔水时柠檬酸降解途径相关代谢物质的变化见图4。血橙桔水时,柠檬酸含量下降了53.1% ($P < 0.05$) [图4(a)]。乙酰辅酶A合成途径是通过将柠檬酸裂解生成乙酰辅酶A,再参与合成亚油酸、氨基酸及次生代谢物质。桔水时,亚油酸及脂类物质含量显著上调 ($P < 0.05$) [图4(b)],丝氨酸含量显著上调 ($P < 0.05$) [图4(c)]。结果证实乙酰辅酶A合成途径是血橙桔水时降解的主要途径。

异柠檬酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸等三羧酸(TCA)循环的中间代谢物质在桔水时呈现出不一致的变化特征。其中,异柠檬酸含量下降了61% ($P < 0.05$) [图4(d)], α -酮戊二酸含量没有显著变

化 ($P > 0.05$) [图4(e)],琥珀酸含量则增加了120% ($P < 0.05$) [图4(f)]。这些结果表明,TCA循环在血橙桔水时发生了变化,但其活性不是简单的增加关系。 α -酮戊二酸一方面可通过生成谷氨酸,进一步合成谷氨酰胺从而进入氮循环;另一方面也可通过生成 γ -氨基丁酸(GABA),进入GABA支路。血橙桔水时,谷氨酸和GABA含量没有显著变化 ($P > 0.05$) [图4(g)至图4(h)],说明GABA支路没有被激活。

2.3 血橙桔水时氨基酸的变化

为全面了解氨基酸组分在桔水时的变化,判断柠檬酸的降解途径,本研究分析了16种常见氨基酸桔水时的变化,见图5。其中,15种氨基酸(异亮氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、酪氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、丙氨酸、赖氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸)在血橙桔水时含量显著增加

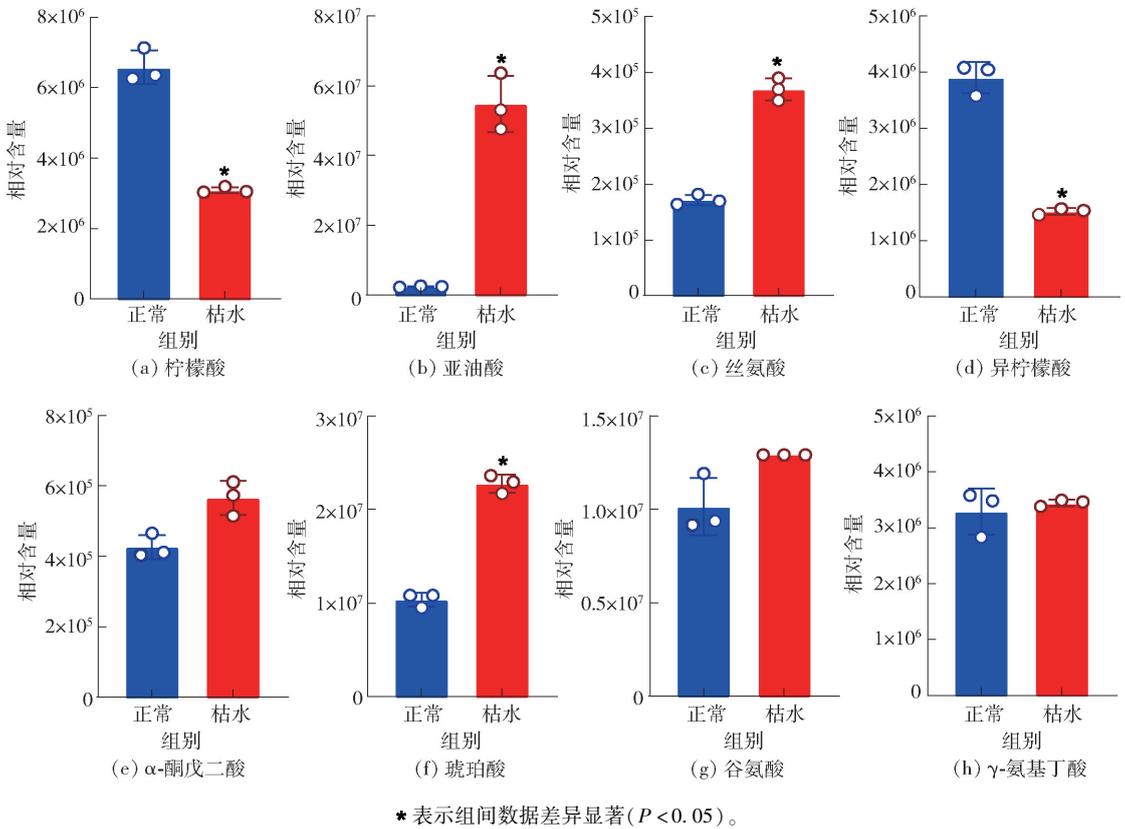
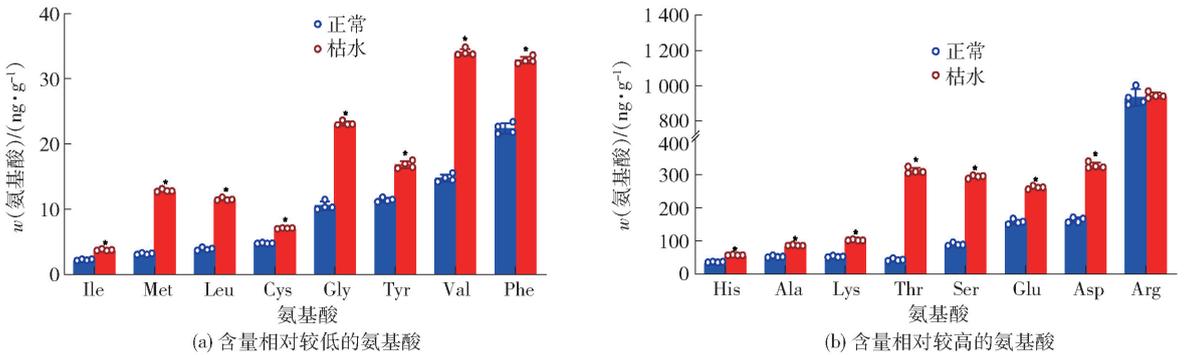


图4 血橙汁胞脱水时柠檬酸降解途径相关代谢物质变化

Fig. 4 Changes of metabolites relating to citric acid degradation in juice vesicles of blood orange during segment drying



Ile: 异亮氨酸; Met: 蛋氨酸; Leu: 亮氨酸; Cys: 半胱氨酸; Gly: 甘氨酸; Tyr: 酪氨酸; Val: 缬氨酸; Phe: 苯丙氨酸; His: 组氨酸; Ala: 丙氨酸; Lys: 赖氨酸; Thr: 苏氨酸; Ser: 丝氨酸; Glu: 谷氨酸; Asp: 天冬氨酸; Arg: 精氨酸。*表示正常和枯水汁胞的游离氨基酸含量具有显著性差异($P < 0.05$)。

图5 血橙汁胞脱水时氨基酸质量比

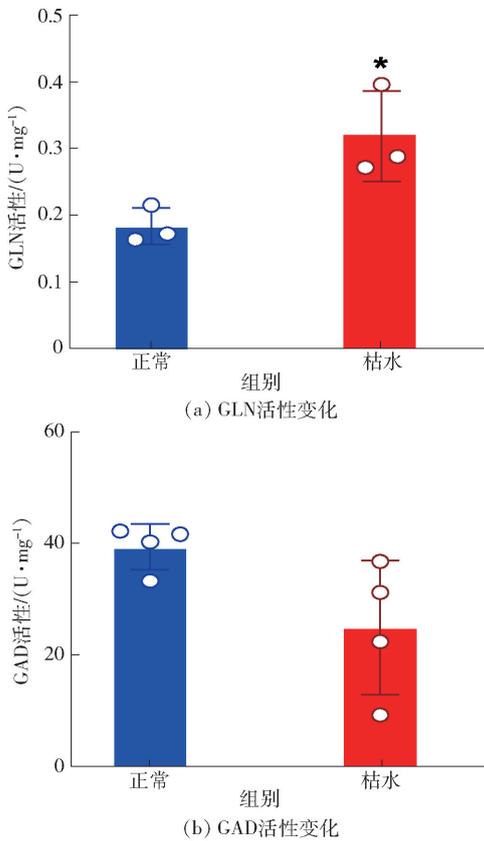
Fig. 5 Amino acid mass ratio in juice vesicles of blood orange during segment drying

($P < 0.05$)。血橙脱水时,含量最高的前5种氨基酸分别是精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸,除精氨酸没有显著($P > 0.05$)变化外,其余4种氨基酸在脱水时分别增加了101.3%、66.2%、229.7%和634.3%。天冬氨酸可以通过催化生成草酰乙酸进一步合成柠檬酸,脱水时天冬氨酸含量的升高提示氨基酸裂解合成柠檬酸途

径的活性受抑制。乙酰辅酶A合成途径可以将柠檬酸降解为乙酰辅酶A和草酰乙酸,乙酰辅酶A进一步生成赖氨酸,同时草酰乙酸可以催化合成甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸,这些氨基酸的含量在脱水时均显著增加,由此进一步证实乙酰辅酶A合成途径在血橙脱水时被显著激活,是汁胞柠檬酸降解的主要途径。

2.4 血橙枯水时柠檬酸降解关键酶活性变化

为探讨血橙枯水时柠檬酸降解途径是否在酶活水平受调控,本研究分析了柠檬酸降解的2个关键酶(谷氨酰胺合酶 GLN 和谷氨酰胺脱羧酶 GAD)活性,见图6。其中,GLN 催化谷氨酸生成谷氨酰胺,其活性在枯水时增加了 75.3% ($P < 0.05$) [图6(a)]。表明谷氨酰胺合成途径在酶活性水平被激活。GAD 催化谷氨酸脱羧生成 GABA,其活性在枯水时没有显著变化($P > 0.05$) [图6(b)],说明 GABA 支路的酶活水平在枯水时没有激活,与代谢物质变化规律一致。



*表示正常和枯水汁胞酶活性具有显著差异($P < 0.05$)。

图6 血橙汁胞枯水时柠檬酸降解关键酶的活性

Fig. 6 Key enzymes activities of citric acid degradation in juice vesicles of blood orange during segment drying

2.5 血橙枯水时柠檬酸降解途径相关基因表达分析

综合代谢组学、氨基酸定量分析及 GLN、GAD 酶活数据,乙酰辅酶 A 合成途径是血橙枯水时柠檬酸降解的主要途径。

2.5.1 脂代谢相关基因在甜橙中的生物信息学鉴定结果

脂代谢是本研究代谢组学揭示的枯水时相关主

要差异代谢途径,是柠檬酸通过乙酰辅酶 A 合成途径降解后的重要去向。乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACCase) 作用下催化生成丙二酰辅酶 A,硬脂酰-ACP 去饱和酶 (stearyl-ACP desaturase, FAB) 催化硬脂酸生成油酸,然后油酸被脂肪酸去饱和酶 (fatty acid desaturase, FAD) 催化成亚油酸和 α -亚麻酸,最后由脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 催化合成 13-氢过氧化亚麻酸。甜橙脂代谢相关基因的生物信息学鉴定与分析见图7。生物信息学方法从甜橙基因组鉴定了 2 个编码 ACCase 的基因 (命名为 *CsaccA* 和 *CsaccC*)、6 个编码 FAB 的基因 (命名为 *CsFAB 1~6*)、8 个编码 FAD 的基因 (命名为 *CsFAD 1~8*) 和 12 个编码 LOX 的基因 (命名为 *CsLOX 1~12*)。这些基因分布在 8 条染色体上,包括 chr1、3、4、6、7、8、9 及 Un [图7(a)]。对脂代谢基因编码的氨基酸序列进行分析,见表1。由表1可知,6 个 *CsFAB* 编码的蛋白质包含 322 ~ 396 个氨基酸,8 个 *CsFAD* 编码的蛋白质包含 306 ~ 447 个氨基酸,12 个 *CsLOX* 编码的蛋白质包含 603 ~ 932 个氨基酸。

甜橙脂代谢相关基因的基因结构和蛋白质结构分析结果见图7(b)、图7(c)。结果发现,同一基因家族内不同成员的外显子数量有明显差异 [图7(b)]。*CsaccA* 和 *CsaccC* 分别有 16 个和 10 个外显子;除 *CsFAB4* 含有 2 个外显子外,其余 *CsFABs* 均有 3 个外显子;*CsFAD 1~2* 和 *CsFAD 6~8* 没有内含子,*CsFAD3* 含有 7 个外显子,*CsFAD4* 有 10 个外显子,*CsFAD5* 有 8 个外显子;对于 *CsLOX* 家族,*CsLOX8* 有 5 个外显子,其余成员则含有 8 ~ 9 个外显子 [图7(b)]。甜橙脂代谢基因家族编码的蛋白质结构域分析显示,同一家族的蛋白质结构域高度保守 [图7(c)]。

2.5.2 脂代谢基因在血橙枯水时的表达规律分析

血橙汁胞枯水时脂代谢相关基因的表达见图8。28 个脂代谢基因的 19 个成员在血橙汁胞中有表达 (FPKM > 1),包括 2 个 *CsACCCase*、5 个 *CsLOX*、7 个 *CsFAD* 和 5 个 *CsFAB*。其中,*CsaccA* 在枯水时表达量显著上调 ($P < 0.05$) [图8(a)];*CsLOX* 家族有 4 个基因差异表达,表达量变化最大的成员为 *CsLOX2*,在枯水时上调了 206.4%,另外,*CsLOX1* 在枯水时表达量增加了 179% ($P < 0.05$) [图8(b)];*CsFAB* 家族中,共有 3 个枯水差异表达基因,其中 *CsFAB2* 和 *CsFAB6* 在枯水时表达量显著上调 ($P < 0.05$) [图8(c)];共有 7 个 *CsFAD* 家族成

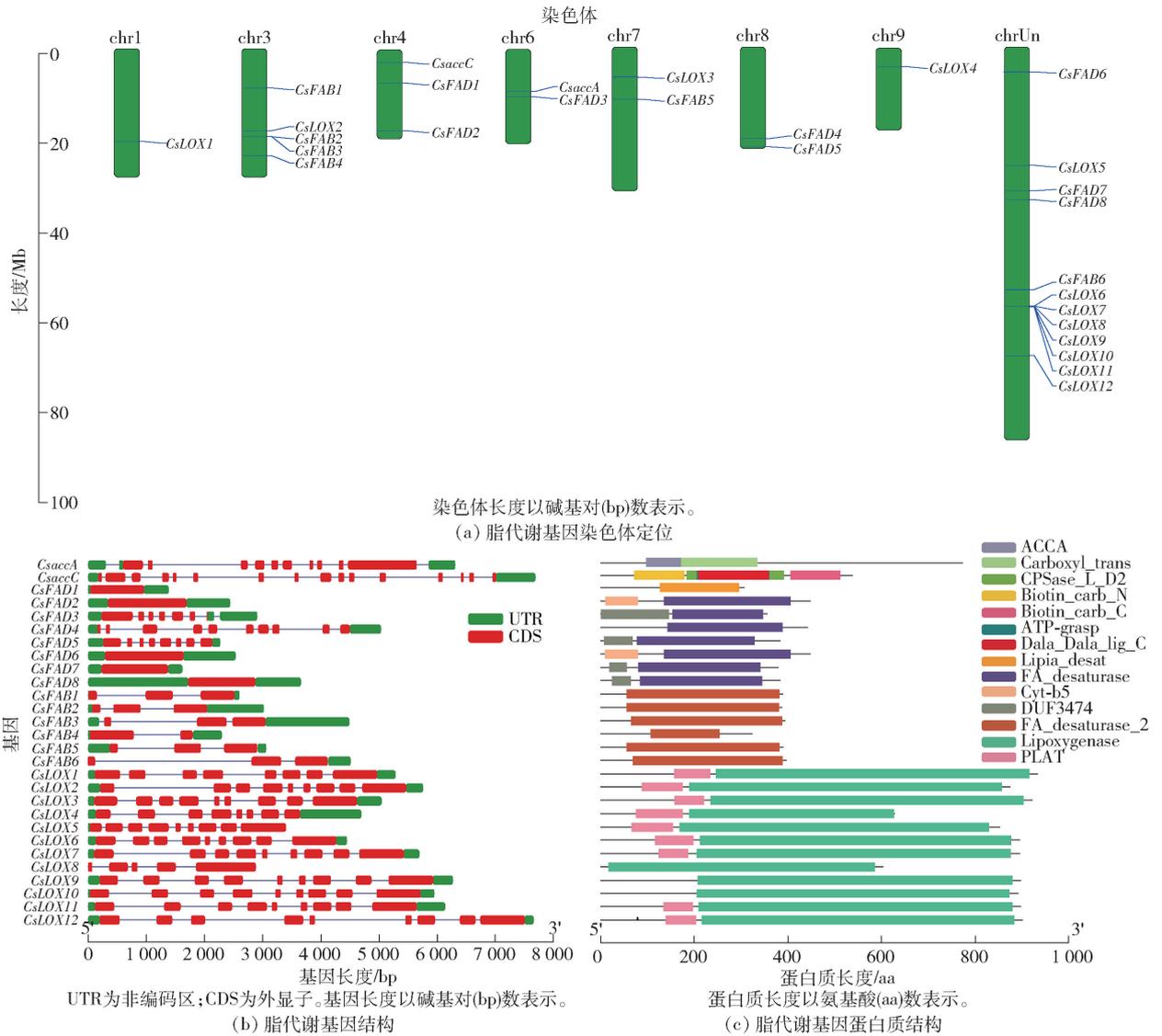


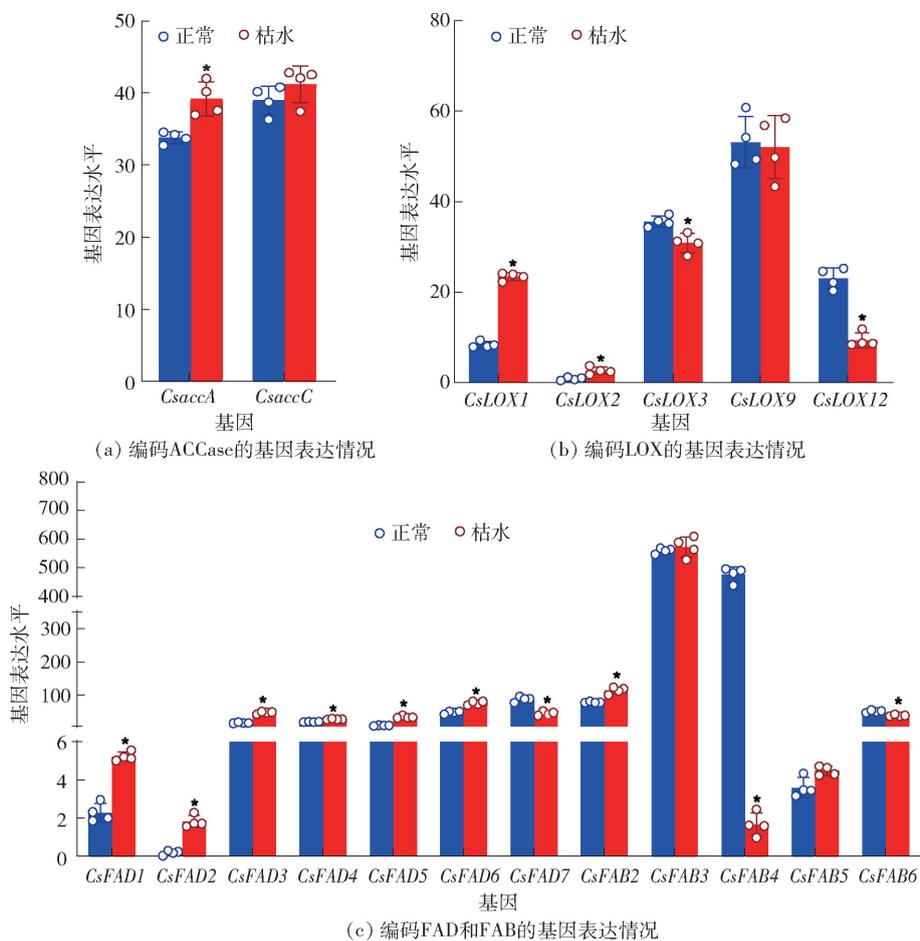
图7 甜橙脂代谢相关基因的生物信息学鉴定与分析

Fig. 7 Identification and analysis of bioinformatics of lipid metabolism related genes in sweet orange

表1 脂代谢基因编码蛋白的基本特性

Tab. 1 Basic characteristics of protein encoded by lipid metabolism genes

基因名称	基因 ID	氨基酸	M_w /kDa	等电点	基因名称	基因 ID	氨基酸	M_w /kDa	等电点
<i>CsACCaseA</i>	Cs6g07610	773	85.90	8.88	<i>CsFAD7</i>	orange1.1t02024	379	43.83	8.68
<i>CsACCaseC</i>	Cs4g04540	537	58.37	7.16	<i>CsFAD8</i>	orange1.1t02241	383	44.02	8.01
<i>CsFAB1</i>	Cs3g06370	388	44.39	6.58	<i>CsLOX1</i>	Cs1g17380	932	104.61	8.11
<i>CsFAB2</i>	Cs3g15530	387	44.25	8.34	<i>CsLOX2</i>	Cs7g10360	921	103.75	7.02
<i>CsFAB3</i>	Cs3g15540	393	44.99	6.12	<i>CsLOX3</i>	orange1.1t03769	894	103.18	5.88
<i>CsFAB4</i>	Cs3g20840	322	36.42	10.03	<i>CsLOX4</i>	orange1.1t03770	894	101.17	5.76
<i>CsFAB5</i>	Cs7g16060	389	44.52	7.71	<i>CsLOX5</i>	orange1.1t03772	603	70.34	5.31
<i>CsFAB6</i>	orange1.1t03533	396	45.39	6.05	<i>CsLOX6</i>	orange1.1t03773	896	101.52	6.00
<i>CsFAD1</i>	Cs4g10710	306	33.81	8.85	<i>CsLOX7</i>	orange1.1t03774	890	100.28	5.68
<i>CsFAD2</i>	Cs4g18420	447	51.35	8.85	<i>CsLOX8</i>	orange1.1t03775	897	101.86	6.03
<i>CsFAD3</i>	Cs6g08600	354	40.15	8.68	<i>CsLOX9</i>	orange1.1t04376	900	102.27	5.88
<i>CsFAD4</i>	Cs8g17450	441	50.76	9.27	<i>CsLOX10</i>	orange1.1t03774	890	100.28	5.68
<i>CsFAD5</i>	Cs8g20310	383	44.45	8.69	<i>CsLOX11</i>	orange1.1t03775	897	101.86	6.03
<i>CsFAD6</i>	orange1.1t00436	447	51.52	8.38	<i>CsLOX12</i>	orange1.1t04376	900	102.27	5.88



*表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图8 血橙汁胞桔水时脂代谢相关基因的表达

Fig. 8 Expression of genes related to lipid metabolism in juice vesicles of blood orange during segment drying

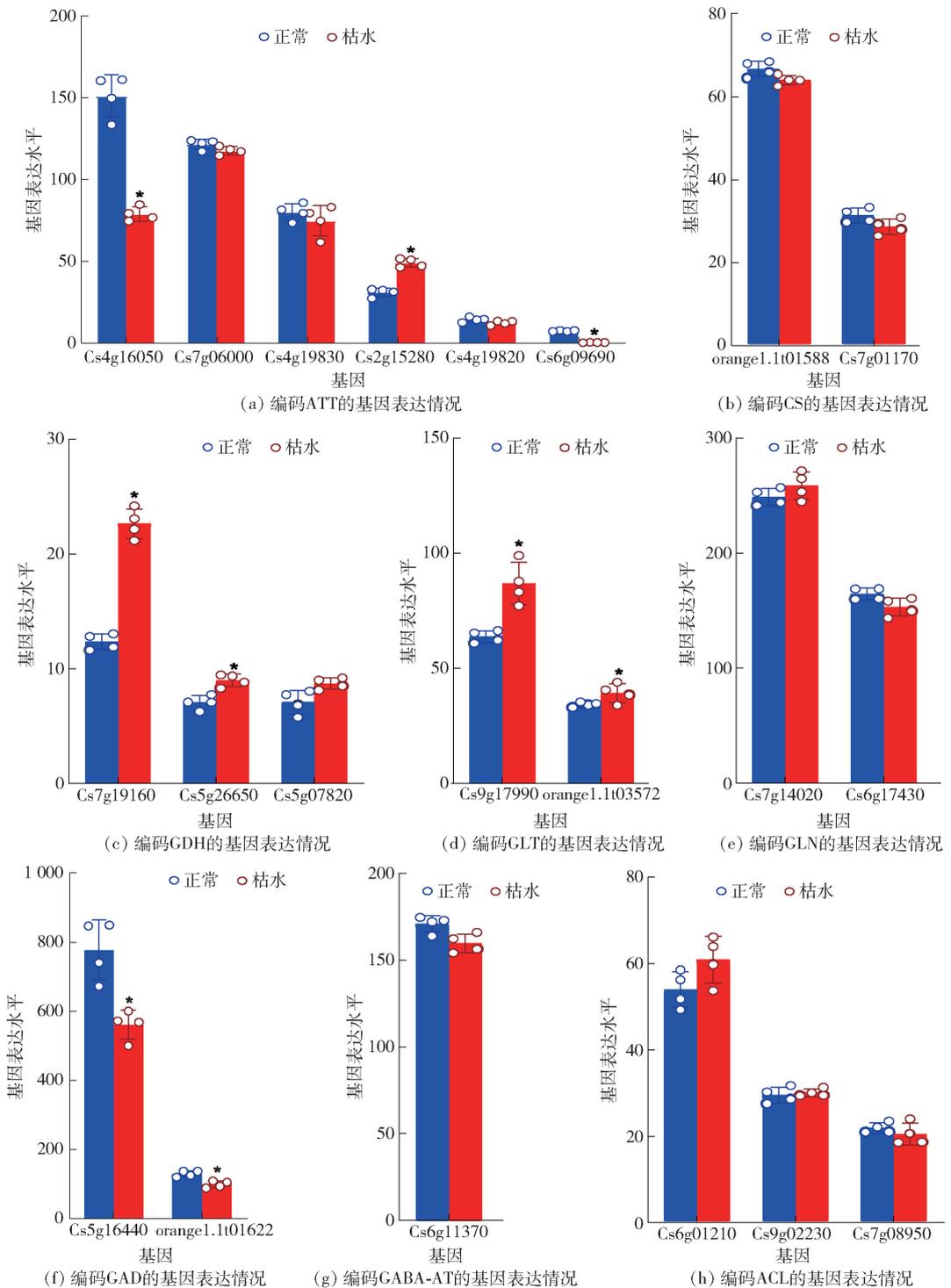
员在桔水时差异表达,其中 *CsFAD 1 ~ 6* 显著上调 ($P < 0.05$)。尽管有部分 *CsLOX*、*CsFAD* 和 *CsFAB* 家族成员在桔水下调,但脂代谢基因家族在桔水时整体呈上调趋势,提示脂代谢的转录被激活。

2.5.3 其他柠檬酸代谢相关基因在血橙桔水时的表达规律分析

血橙汁胞桔水时柠檬酸代谢相关基因的表达见图9。柑橘果实柠檬酸合成主要包括天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AAT)和柠檬酸合成酶(citrate synthase, CS)2个关键酶;其中丰度最高的 *CsAATs* 成员 *Cs4g16050* 在桔水时表达量降低了47.9% ($P < 0.05$) [图9(a)];2个 *CsCSs* 成员在血橙桔水时表达均没有显著差异 ($P > 0.05$) [图9(b)]。综合 *CsAATs* 和 *CsCSs* 家族成员在桔水时的表达量可以判断,血橙桔水时柠檬酸合成途径的转录整体呈被抑制的状态。

谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)、

谷氨酰胺合酶(glutamine synthetase, GLN)、谷氨酸合酶(glutamate synthase, GLT)和谷氨酰胺脱羧酶(glutamine decarboxylase, GAD)是柑橘果实柠檬酸降解途径中的4个关键酶。*CsGDHs* 家族成员共2个差异表达基因均在桔水时显著上调 ($P < 0.05$) [图9(c)];2个 *CsGLTs* 家族成员在桔水时均显著上调表达 ($P < 0.05$) [图9(d)];*CsGLNs* 在桔水时无显著变化 ($P > 0.05$) [图9(e)]。这些结果提示谷氨酸合成途径在桔水时被激活,这也可能是汁胞谷氨酸含量增加的原因。2个 *CsGADs* 家族成员在桔水时均显著下调 ($P < 0.05$) [图9(f)],*CsGABA-AT* 在桔水没有显著变化 ($P > 0.05$) [图9(g)]。这说明GABA途径的转录在桔水时被抑制。乙酰辅酶A合成途径关键酶——ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACL)编码基因 *CsACLs* 家族共有3个成员,在桔水时没有显著差异表达 ($P > 0.05$) [图9(h)]。推测ACL的调控可能主要不是发生在



*表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

图9 血橙汁胞枯水时柠檬酸代谢相关基因的表达

Fig. 9 Expression of genes related to citric acid metabolism in juice vesicles of blood orange during segment drying

转录水平,有待于进一步深入研究。

3 讨论

柠檬酸是柑橘果实的主要有机酸,在成熟和衰

老阶段缓慢降解,而在枯水时则快速降解^[1,19-21]。柠檬酸耗竭是柑橘枯水的典型特征,本研究发现乙酰辅酶A途径在血橙汁胞萎缩型枯水时被激活,而GABA支路活性在枯水时相对稳定。

乙酰辅酶 A 合成途径是柑橘果实成熟和衰老时柠檬酸消耗的主要途径^[20-21]。柠檬酸经 ACL 催化降解为草酰乙酸和乙酰辅酶 A, 其中乙酰辅酶 A 进一步进入氨基酸、脂肪酸和次生代谢物合成等途径^[20]。本研究的代谢组学数据(包括代谢物质变化及代谢途径变化规律)和氨基酸含量结果提供了强有力的证据, 支持乙酰辅酶 A 合成途径是血橙汁胞萎缩型枯水时柠檬酸降解的主要机制。转录水平的证据提示, 尽管乙酰辅酶 A 合成途径关键酶 ACL 的表达在枯水时没有被激活, 但脂代谢相关基因整体呈上调趋势。Wang 等^[3]对蜜柚汁胞粒化型枯水的糖酸代谢进行了系统研究, 结果发现乙酰辅酶 A 合成途径是其柠檬酸降解的主要途径。在椪柑中也发现乙酰辅酶 A 合成途径是其枯水时柠檬酸降解的主要机制^[6]。可以推测, 乙酰辅酶 A 合成途径是汁胞萎缩型和粒化型枯水中都存在的保守降酸途径。

目前对柑橘果实乙酰辅酶 A 合成途径的转录水平等调控机制研究较少。本研究揭示该途径关键酶 ACL 在转录过程中没有被激活, 暗示枯水时存在其他水平的调控机制。动物实验研究结果揭示, ACL 在转录后特别是翻译后表达被调控^[22-23], 这进一步证实了本研究的猜想。在粒化型枯水中, 蜜柚编码 ACL 的基因 *CgACL* 表达量显著上调^[3], 椪柑中也有类似的结果^[6]。这说明乙酰辅酶 A 合成途径的调控机制或许在 2 种枯水类型中不同, 2 种枯水类型在形态及生理方面存在差异, 需要进一步深入研究。

GABA 支路是近年被发现的柑橘柠檬酸降解途径, 主要发生在果实成熟和衰老阶段^[24-25]。本研究的代谢组学数据、酶活数据和转录水平证据均表明, GABA 支路在枯水时没有被激活, 甚至可能被抑制。这意味着 GABA 支路不是血橙枯水时柠檬酸快速降解的主要途径。该结果与蜜柚粒化型枯水中的结果一致^[3], 说明在 2 种枯水类型中, GABA 支路都不是主要的降酸途径。柠檬酸降解内在的调控机制还不清楚, 但考虑到柑橘枯水时, 细胞壁合成途径的异常激活同样也导致柠檬酸的快速消耗, 研究推测细胞壁代谢途径和 GABA 支路可能存在某种拮抗关系, 有待未来深入研究。

4 结 论

本研究以塔罗科血橙为实验材料, 研究了汁

胞萎缩型枯水的柠檬酸降解机制。结果表明: 血橙在采前遭遇低温时易发生汁胞萎缩型枯水, 枯水汁胞中的柠檬酸含量显著下降, 丝氨酸、亚油酸及其他脂类物质等乙酰辅酶 A 途径代谢产物的含量显著升高, 同时脂代谢基因在枯水时呈上调表达趋势, 编码 ACL 的基因 *CsACLs* 的表达没有明显变化。GABA 含量和 GAD 活性在枯水时变化不明显, 编码 GAD 的基因 *CsGADs* 的表达呈下调趋势。GLN 活性在血橙枯水进程中显著升高。结果表明, 血橙枯水时柠檬酸快速降解的主要机制是乙酰辅酶 A 合成途径, 而不是 GABA 支路, 此外, 谷氨酰胺合成及 TCA 循环可能也参与血橙枯水时柠檬酸降解。本研究揭示了柑橘萎缩型枯水进程中柠檬酸降解机制, 对于理解柑橘枯水的生理基础具有一定的意义。

参考文献:

- [1] HUANG C L, HOU J, HUANG M Z, et al. A comprehensive review of segment drying (vesicle granulation and collapse) in citrus fruit: current state and future directions[J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 309: 111683.
- [2] LI Q Y, YAO S X, DENG L L, et al. Changes in biochemical properties and pectin nanostructures of juice sacs during the granulation process of pomelo fruit (*Citrus grandis*)[J]. *Food Chemistry*, 2022, 376: 131876.
- [3] WANG W, ZHANG H Y, ZENG K F, et al. New insights into vesicle granulation in *Citrus grandis* revealed by systematic analysis of sugar- and acid-related genes and metabolites[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 194: 112063.
- [4] YAO S X, WANG Z M, CAO Q, et al. Molecular basis of postharvest granulation in orange fruit revealed by metabolite, transcriptome and methylome profiling [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 166: 111205.
- [5] WU L M, WANG C, HE L G, et al. Transcriptome analysis unravels metabolic and molecular pathways related to fruit sac granulation in a late-ripening navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck)[J]. *Plants*, 2020, 9(1): 95.
- [6] YAO S X, CAO Q, XIE J, et al. Alteration of sugar and organic acid metabolism in postharvest granulation of Ponkan fruit revealed by transcriptome profiling[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 139: 2-11.
- [7] CAO J P, KANG C CHEN Y L, et al. Physicochemical changes in *Citrus reticulata* cv. Shatangju fruit during

- vesicle collapse[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 165: 111180.
- [8] SHARMA R R, SINGH R, SAXENA S K. Characteristics of citrus fruits in relation to granulation[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 111(1): 91–96.
- [9] SHARMA R R, AWASTHI O P, KUMAR K. Pattern of phenolic content, antioxidant activity and senescence-related enzymes in granulated vs non-granulated juice-sacs of ‘Kinnow’ mandarin (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, 53(3): 1525–1530.
- [10] HOU J, YAN D D, LIU Y C, et al. Global changes in metabolic pathways in endocarp of ‘Dayagan’ hybrid citrus fruit during segment drying revealed by widely targeted metabolomics and transcriptomics analysis [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 198: 112255.
- [11] KANG C, JIANG A Z, YANG H, et al. Integrated physicochemical, hormonal, and transcriptomic analysis revealed the underlying mechanisms for granulation in Huyou (*Citrus changshanensis*) fruit [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 923443.
- [12] 张百超, 陈秀伟, 庞杰. 红桔果实粒化机理与控制途径的研究[J]. *西南农业大学学报*, 1992, 14(5): 82–84.
- ZHANG B C, CHEN X W, PANG J. Studies on the mechanism of granulation and its prevention in ‘Hongju’ fruit [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1992, 14(5): 82–84.
- [13] 陈昆松, 张上隆, 李方, 等. 胡柚果实采后枯水的研究[J]. *园艺学报*, 1995, 22(1): 35–39.
- CHEN K, ZHANG S L, LI F, et al. A study on the postharvest granulation of ‘Huyou’ fruit [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1995, 22(1): 35–39.
- [14] HOU J, YAN D D, HUANG M Z, et al. Alteration of pectin metabolism in blood orange fruit (*Citrus sinensis* cv. Tarocco) in response to vesicle collapse [J]. *Food Quality and Safety*, 2022, 6: 1–9.
- [15] WANG J J, HOU J, HUANG C L, et al. Activation of the phenylpropanoid pathway in *Citrus sinensis* collapsed vesicles during segment drying revealed by physicochemical and targeted metabolomics analysis [J]. *Food Chemistry*, 2023, 409: 135297.
- [16] SHI M Y, LIU X, ZHANG H P, et al. The IAA- and ABA-responsive transcription factor CgMYB58 upregulates lignin biosynthesis and triggers juice sac granulation in pummelo [J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1): 139.
- [17] 隆昌忆. 三峡库区玫瑰香橙产业发展的现状及对策: 以重庆市万州区为例 [J]. *中国农业信息*, 2016, 28(7): 154–155.
- LONG C Y. Present situation and countermeasures of rose orange industry development in the Three Gorges Reservoir area: take Wanzhou district of Chongqing as an example [J]. *China Agricultural Information*, 2016, 28(7): 154–155.
- [18] ZHU G T, WANG S C, HUANG Z J, et al. Rewiring of the fruit metabolome in tomato breeding [J]. *Cell*, 2018, 172(1): 249–261.
- [19] CHEN M, XIE X L, LIN Q, et al. Differential expression of organic acid degradation-related genes during fruit development of navel oranges (*Citrus sinensis*) in two habitats [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(5): 1131–1140.
- [20] HUSSAIN S B, SHI C Y, GUO L X, et al. Recent advances in the regulation of citric acid metabolism in citrus fruit [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2017, 36(4): 241–256.
- [21] 梁芳菲, 王小容, 邓丽莉, 等. 采后柑橘果实糖酸代谢研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 268–274.
- LIANG F F, WANG X R, DENG L L, et al. Research advances in sugar and acid metabolism of postharvest citrus fruit [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(10): 268–274.
- [22] WELLEN K E, HATZIVASSILIOU G, SACHDEVA U M, et al. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1076–1080.
- [23] GUO L, GUO Y Y, LI B Y, et al. Enhanced acetylation of ATP-citrate lyase promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(31): 11805–11816.
- [24] SHENG L, SHEN D D, YANG W, et al. GABA pathway rate-limit citrate degradation in postharvest citrus fruit evidence from HB pumelo (*Citrus grandis*) × fairchild (*Citrus reticulata*) hybrid population [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(8): 1669–1676.
- [25] SHENG L, SHEN D D, LUO Y, et al. 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(1): 138–145.

Study on Citric Acid Degradation Pathways of Blood Orange During Segment Drying Based on Widely Targeted Metabolomics

ZHANG Haoyue¹, HOU Jiao¹, YANG Xiangzheng², LI Jian³, ZENG Kaifang¹, YAO Shixiang^{1,*}

(1. College of Food Science/National Citrus Engineering Research Center/Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-Built by Sichuan and Chongqing, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Jinan Fruit Research Institute, All China Federation of Supply & Marketing Cooperatives, Jinan 250204, China;

3. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Segment drying is the major physiological disorder that deteriorates fruit quality and results in loss of flavor and edible value of fruits, including mainly granulation-type segment drying and collapse-type segment drying. Few research had been focused on the latter. Using Tarocco blood orange upon collapse-type segment drying as study material, widely targeted metabolomics was used to analysis primary metabolite and metabolic pathway changes of collapse-type segment drying, amino acid content analysis, enzyme activity assay, and gene expression analysis were utilized to elucidate the mechanism underlying the rapid deterioration of citric acid during segment drying. The results showed that a total of 193 differentially primary metabolites were identified in juice vesicles upon segment drying, citric acid content significantly decreased by 53.1%, the metabolites relative to the acetyl-CoA synthesis pathway (such as serine, linoleic acid and other lipids) increased significantly, the gene expression of lipid metabolism was up-regulated upon segment drying, while the expression of gene *CsACLs* encoding ATP-citrate lyase remained unchanged. Glutamine synthetase activity increased by 75.3% in vesicles upon segment drying. γ -Aminobutyric acid content remained unchanged, glutamine decarboxylase activity was not changed, the expression of gene *CsGADs* encoding glutamine decarboxylase was down-regulated upon segment drying. In conclusion, the acetyl coenzyme A synthesis pathway was the main pathway for the rapid degradation of citric acid in vesicles of blood orange during collapse-type segment drying. The results aimed to provide a reference for clarifying the mechanism of collapse-type segment drying in citrus fruit.

Keywords: *Citrus sinensis* cv. Tarocco; segment drying; citric acid degradation; acetyl-CoA synthesis pathway; GABA shunt

(责任编辑:张逸群)