

• 食品生物技术 •

转录组和代谢组联合解析苹果采后高浓度 CO₂ 伤害机制

徐晓艳, 刘港帅, 李泓利, 田慧琴, 傅达奇

中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083

徐晓艳, 刘港帅, 李泓利, 等. 转录组和代谢组联合解析苹果采后高浓度 CO₂ 伤害机制. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2856-2869.
Xu XY, Liu GS, Li HL, et al. Analysis of apple postharvest damage under high CO₂ concentration by transcriptome combined with metabolome. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2856-2869.

摘要: 环境气体浓度影响果蔬的贮藏保鲜期和品质, 高浓度 CO₂ 长时间处理会造成果实的伤害, 但具体的分子机制不清楚。本研究以高浓度 CO₂ 处理采后富士苹果为材料, 利用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序技术和非靶向代谢技术分别对苹果内部褐变果肉组织和对照组正常果肉组织进行转录组测序和代谢组学分析, 解析苹果 CO₂ 伤害产生的机制。结果如下: 转录组测序共获得 6 332 个差异基因, 包括 4 187 个上调基因和 2 145 个下调基因。差异基因进行功能性分析初步确定苹果 CO₂ 伤害的发生与氧化还原过程、脂类代谢、激素信号转导过程、能量代谢过程有关, 并成功筛选出 20 个候选褐变基因, 其中 *grxcr1* (MD14G1137800)、*gpx* (MD06G1081300) 参与活性氧清除过程, *pld1_2* (MD15G1125000) 和 *plcd* (MD07G1221900) 参与磷脂酸合成, 影响膜代谢, *mdh1* (MD05G1238800) 参与 TCA 循环, 影响能量代谢。代谢组分析共获得 77 个差异代谢物, 主要是有机酸、脂类、糖类和多酮类化合物, 其中包括 35 个与褐变相关的代谢物质。将差异基因和差异代谢物进行联合分析, 结果显示, 类黄酮生物代谢过程参与了苹果的褐变过程, 褐变组织与对照组织比较发现儿茶素、槲皮素等黄酮类含量明显下降, 细胞抗氧化能力下降, 氧化还原状态失衡, 细胞结构破坏, 造成褐变。本研究结果进一步丰富了 CO₂ 伤害产生的理论基础, 同时为高浓度 CO₂ 保鲜技术的实际应用提供理论指导。

关键词: 富士苹果, 高浓度 CO₂ 伤害, 转录组, 代谢组

Analysis of apple postharvest damage under high CO₂ concentration by transcriptome combined with metabolome

Xiaoyan Xu, Gangshuai Liu, Hongli Li, Huiqin Tian, and Daqi Fu

College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: The environmental gas concentration affects the storage period and quality of fruits and vegetables. High concentration CO₂ treating for a long time will cause damage to fruits. However, the specific molecular mechanism is unclear. To analyze the mechanism of CO₂ injury in apple, high-throughput sequencing technology of Illumina HiSeq 4000 and non-targeted metabolism technology were used to analyze the transcriptome sequencing and metabolomics analysis of browning flesh tissue of damage fruit and normal pulp tissue of the control group. A total of 6 332 differentially expressed

Received: August 28, 2020; **Accepted:** November 19, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0401304).

Corresponding author: Daqi Fu. Tel: +86-10-62737538-102; E-mail: daqifu@126.com

国家重点研发计划 (No. 2017YFD0401304) 资助。

genes were obtained, including 4 187 up-regulated genes and 2 145 down regulated genes. Functional analysis of the differentially expressed genes confirmed that the occurrence of CO₂ injury in apple was related to redox process, lipid metabolism, hormone signal transduction process and energy metabolism process. Twenty candidate browning genes were successfully screened, among which *gxcr1* (md14g1137800) and *gpx* (md06g1081300) participated in the reactive oxygen species scavenging process, and *pldl_2* (md15g1125000) and *plcd* (md07g1221900) participated in phospholipid acid synthesis and affected membrane metabolism. *mdh1* (md05g1238800) participated in TCA cycle and affected energy metabolism. A total of 77 differential metabolites were obtained by metabolomic analysis, mainly organic acids, lipids, sugars and polyketones, including 35 metabolites related to browning. The metabolism of flavonoids was involved in the browning process of apple. Compared with the control tissue, the content of flavonoids such as catechin and quercetin decreased significantly in the damaged apple tissue, the antioxidant capacity of cells decreased, the redox state was unbalanced, and the cell structure was destroyed, resulting in browning. The results of this study further enrich the theoretical basis of CO₂ damage, and provide reference for the practical application of high concentration CO₂ preservation technology.

Keywords: Fuji apple, high concentration of CO₂ injury, transcriptome, metabolome

苹果 *Mauls domestica* 是一种常见水果, 具有较高的营养价值, 深受广大消费者的青睐^[1]。苹果的贮藏方式主要包括冷藏和气调贮藏, 高浓度 CO₂ 保鲜技术是一种气调方法, 通过调节贮藏环境中气体比例, 抑制果实乙烯和呼吸强度, 达到保鲜效果。但高浓度 CO₂ 容易引发果实内部产生 CO₂ 伤害, 损害果实品质, 造成经济损失。CO₂ 伤害可以分为两种: 外部伤害和内部伤害。外部伤害呈现黄褐色, 果肉会下陷起皱; 内部伤害则发生在果实的内部或是果心部分, 果肉组织局部褐变或是产生褐色空腔^[2-3]。CO₂ 伤害研究很早就已经开始进行, 大部分认为伤害的产生是由酶促褐变引发的, 但是具体的伤害机理目前仍然不清楚^[4]。

Mathooko 等^[5]研究表明高 CO₂ 处理抑制细胞内琥珀酸脱氢酶的活性, 进而导致三羧酸 (TCA) 循环无法正常运行, 造成丙酮酸的大量积累并转化成乙醛和乙醇, 破坏组织结构, 引发褐变。Argenta 等^[6]则认为乙醇和乙醛不是造成褐变的直接原因, 他们测定了在 20 kPa CO₂ 贮藏环境中富士苹果的乙醇和乙醛的含量, 结果发现, 虽然乙醇和乙醛含量的增加和 CO₂ 伤害的严重程度有关系, 但是两者之间的相关性没有显著关系。也有研究表示 CO₂ 伤害产生的原因可能与氧化应激反应有关。Lum 等^[7]发现在高浓度 CO₂ 环境中, 组织中的氧化应激代谢物会发生明显的变化, 这表明 CO₂ 伤害可能与细胞内抗氧化状态有关。有

部分学者认为 CO₂ 伤害与膜结构的破坏和通透性增加有关。陈昆松等^[8]研究了鸭梨的 CO₂ 伤害, 发现 CO₂ 伤害破坏了细胞内膜结构, 导致酚类物质和氧化酶反应, 造成果肉的褐变。郝利平等^[9]的研究也证实这个观点。Foyer 等^[10]认为高浓度 CO₂ 导致细胞内自由基和活性氧增多, 氧化还原系统失衡, 造成膜脂的氧化, 破坏内膜结构, 造成褐变。

近年来, 随着转录组和代谢组技术的不断发展, 在果蔬病害方面的应用研究已有报道。Liu 等^[11]对梨外果皮的表面棕斑的产生机制进行转录组分析, 发现梨表面棕斑的产生与酚类化合物、氧化磷酸化、多酚氧化酶以及次要代谢物基因的抑制有关, 并且钙离子可能参与了表面棕斑生成的信号转导过程中。Leisso 等^[12]采用 RNA-seq 技术分析苹果软烫伤 (一种果皮坏死斑的寒害) 产生过程中基因表达情况, 结果发现, 脂类过氧化、酚类代谢以及细胞壁和脂质转运等途径的相关基因表达量在软烫伤果实中升高, 表明这些基因可能参与苹果软烫伤这种病害的产生。有研究利用了非靶向代谢组学的方法对经过 1-甲基环丙烯 (1-MCP) 处理苹果产生的表面烫伤进行代谢物质分析, 结果显示在苹果表皮烫伤的组织中存在 3 组代谢物质, 其中 6-甲基-5-庚烯-2-酮 (6-methyl-5-hepten-2-one, MHO) 与这种生理疾病相关性显著^[13]。Rudell 等^[14]采用代谢组学的方法研究苹果在 UV-

白光环境中果皮代谢物质的变化情况,发现与果实结构、类黄酮和色素合成、乙烯合成以及酸代谢等相关代谢过程在辐照过程中发生了明显的改变。

本研究以富士苹果为研究材料,对其进行高浓度 CO₂ 处理,利用转录组学和代谢组学联合的方法,探究苹果 CO₂ 伤害产生的调控网络,丰富二氧化碳伤害理论的研究,为高浓度 CO₂ 保鲜技术的实际应用提供了技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

以富士苹果为试验材料,采摘于北京市顺义区大孙各庄村果园(北京嘉美源生态农业科技有限公司),挑选大小均一、果色均匀、成熟度一致且无机械损伤、无病虫害的果实,在果园立即装箱,当天运回冷库(温度为 4±0.5 °C,湿度为 85%–90%)备用。从冷库中挑选 400 个富士苹果并随机分成对照组和处理组,放置于气调保鲜箱中,在室温条件(20±1 °C)下贮藏 15 d。其中处理组苹果每天通入已配置好的 20% CO₂ 气体(内含 20% CO₂, 21% O₂, N₂平衡),对照组苹果则暴露于空气中。

每隔 3 d 沿果实赤道部分横切果实(30 个),观察果实内部褐变情况,选取合适的果肉褐变状态作为测序样本,并将同一时期的对照组苹果和 CO₂ 处理组苹果的褐变部分切成小块,迅速液氮

冻样,生物学重复 3 次,置于–80 °C 冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取及转录组测序

使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取样本的总 RNA,通过分光光度计 NanoDrop ND-1000(NanoDrop, Wilmington, DE, USA)对总 RNA 的量与纯度进行质控。再通过生物芯片分析系统(Agilent 2100 Bioanalyzer, USA)对 RNA 的完整性进行检测,以 RIN number>7.0 为合格的标准。总 RNA 质检合格后,将 RNA 样本送至联川生物科技有限公司构建文库,利用 Illumina Hiseq 4000(LC Bio, China)进行双端测序,得到测序数据。

1.3 差异基因功能分析及 qRT-PCR 验证

测序数据进行质量评估后得到质控数据,在 HISAT2 软件上与苹果参考基因组对比^[15-16],得到样本基因。利用 DESeq2 软件进行差异表达分析,通过 GO(Gene Ontology)数据库和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行基因功能注释分析,分析差异基因参与的代谢途径。

随机选取|log₂ Fold Change|≥1 的 3 个显著差异基因,利用 Plant RNA Kitq(OMEGA bio-tek, USA)进行 RNA 提取,TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司)进行反转录和 qRT-PCR。qRT-PCR 引物序列见表 1,用 qRT-PCR 技术验证相关差异基因的表达量变化情况。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequence

Gene	Primer	Sequence (5'–3')
MD09G1029300	For	ATTGACGAAGGCGAAGGAGC
	Rev	TCCGTCACTTTCAGAGTCCA
MD05G1112000	For	CAGAACGGCAGTTTTGTTCCG
	Rev	GCTGCAACAGCTCACCAAC
MD13G1235500	For	AAGCTCAGAGTGCAGCCAAA
	Rev	ACAACATCCTCGACATGGCA
<i>Actin (mdact)</i>	For	GATGGCTACTCATTTCTCATCTT
	Rev	TTCTCCTTGATTTCCCTAACAGTC

1.4 代谢物提取及检测

将选取的 6 个生物学重复褐变样本送至联川生物科技有限公司利用非靶向代谢技术 (LC-MS/MS) 进行代谢物质的定性定量分析。将果肉样本液氮研磨后, 放入提取液中进行提取, 将代谢样品经过 UPLC-MS 系统 (超高效液相色谱-串联质谱系统) 分析检测代谢物, 根据二级质谱信息定性代谢物。

1.5 代谢组数据分析

对所获得的质谱信息进行主成分分析 (PCA) 和样本的相关性分析来判断样本的重复性和差异度, 通过正交最小偏二乘判别分析 (OPLS-DA) 方法进行代谢物的分析并筛选显著差异代谢物, 利用 KEGG 数据库和 HMDB (Human metabolome database) 数据库对差异代谢物进行功能性研究分析, 获得代谢物质参与的具体生物学通路情况。

1.6 代谢组与转录组关联分析

结合差异基因和差异代谢物在各个样品中的 TPM 表达量, 分别对显著性差异基因和差异代谢

物进行 KEGG Pathways 注释, 获得同一个生物过程中发生显著性变化的基因和代谢物, 锁定代谢途径, 结合分子生物学解析调控机理。

1.7 数据统计与分析

使用 Microsoft Excel 2007 进行数据分析并作图, IBM SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析 (ANOVA) 及统计学显著性分析, *代表在 $P<0.05$ 水平上差异显著, **代表在 $P<0.01$ 水平上差异显著, ***代表在 $P<0.001$ 水平上差异显著。

2 结果与分析

2.1 测序及质控数据分析

经过检测 RNA 质量, 结果如表 2 所示, $OD_{260/280}$

表 2 RNA 质量表

Table 2 Mass table of RNA

Sample	ck	cd_b
$OD_{260/280}$	1.86	2.16
$OD_{260/230}$	0.85	0.49
Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.07	0.08
Amount (μg)	2.37	2.48

表 3 测序数据及参考基因组对比统计表

Table 3 Comparative statistics of sequencing data and reference genomes

Sample	ck	cd_b	
Sequencing data	Raw reads	44 074 600	38 113 649
	Raw bases	6 570 211 029	50 693 654
	Clean reads	43 870 982	37 932 488
	Clean bases	6 532 934 800	5645 274 117
	Error rate (%)	0.03	0.03
	Q20 (%)	97.99	97.94
	Q30 (%)	94.03	93.86
Reference genomes	GC content (%)	47.54	47.11
	Total reads	43 870 982	37 932 488
	Total mapped	39 191 580 (87.01%)	3 323 453 (87.61%)
	Multiple mapped	794 205 (1.84%)	604 866 (1.59%)
	Uniquely mapped	37 163 354 (84.68%)	32 629 671 (86.01%)

Note: (1) Raw reads: count the number of bars of the original sequence data; (2) Raw bases: the number of bars of raw reads is multiplied by the length and converted to G; (3) Clean reads: the calculation method is the same as raw reads, but the statistical files are the filtered sequencing data; (4) Clean bases: the number of bars of clean reads is multiplied by the length and converted into units in G; (5) Error rate: sequencing error rate (clean data); (6) Q20 and Q30: calculate the percentage of bases with Phred value greater than 20 and 30 in the total base (clean data); (7) GC content: calculate the percentage of the total number of bases G and C in the total number of bases (clean data).

值在 1.8–2.2 范围内, 总量满足标准建库需求, 可以进行转录组测序。通过 Illumina 平台对对照组 (ck)、CO₂ 处理富士苹果褐变组织 (cd_b) 进行测序, ck 和 cd_b 组分别获得 44 074 600、38 113 649 个包含低质量读段、长度过短序列、N (N 表示不确定碱基信息) 率较高序列及测序接头序列等原始读序列, 经过严格相关质量评估之后分别获得 43 870 982、37 932 488 个高质量的 Clean reads。将 Clean data (Reads) 使用二代测序对比软件 HISAT2 与苹果参考基因组进行比对^[17]。比对结果如表 3 所示, 能够比对到基因组上的 Clean reads 数 (Total mapped) 均大于 65%, 说明本次实验参考基因组选择合适并且能够满足信息分析需求。

2.2 高浓度 CO₂ 处理相关差异基因表达分析

根据 $p\text{-adjust} < 0.05$ 和 $|\log_2\text{FC}| > 1$ 标准筛选样本的差异表达基因 (Differentially expressed gene, DEG), 测定对照组 (ck) 与 CO₂ 处理褐变组 (cd_b) 基因的表达变化。图 1 显示了对照组与 CO₂ 处理褐变组对比有 6 332 个差异基因, 其中有 4 187 个是上调基因, 2 145 个是下调基因。

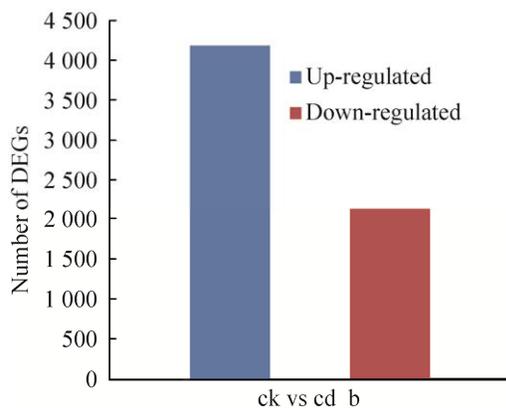


图 1 差异表达基因统计图

Fig. 1 Statistical of differentially expressed genes.

2.3 高浓度 CO₂ 处理相关差异基因功能分析

将差异基因进行 KEGG Pathway 富集分析, 如图 2A 所示。结果表明, 对照组与 CO₂ 处理褐变组 (ck vs cd_b) 大部分的差异基因富集到植物激素信号转导途径、苯丙素生物合成、糖酵解/糖异生、类黄酮生物合成、亚油酸生物合成等代谢途径。差异基因进行 GO 功能富集分析, 图 2B 展示的是对照组和 CO₂ 处理褐变组 (ck vs cd_b) 的差异基因 GO 富集情况, 从图中可以看出差异基因在生物过程 (Biological process, BP)、细胞组分 (Cellular component, CC) 和分子功能 (Molecular function, MF) 三大类上均有所富集, 但是在细胞组分这个功能分类上富集的差异基因数目是最多的, 并且大多数差异基因集中在膜部分、膜固有成分、膜整体组分等与内膜成分相关的功能; 差异基因在生物过程中主要富集到小分子生物合成过程, 而在分子功能中则主要富集到氧化还原酶活性、碳水化合物结合。

2.4 褐变候选基因筛选及 qRT-PCR 验证

根据差异基因的 GO 功能富集分析和 KEGG Pathway 富集分析的结果, 可知 20% CO₂ 处理富士苹果产生的内部褐变主要可能是跟氧化还原过程、脂类代谢、激素信号转导过程等代谢过程相关, 所以从这几个方面进行候选褐变基因的筛选, 结果如表 4 所示。

苹果的内部褐变涉及多个氧化还原过程, 以应对过量的活性氧 (ROS) 生成。硫氧还蛋白 (MD09G1029300)、谷氧还蛋白 (MD14G1137800)、谷胱甘肽过氧化物酶 (MD06G1081300) 作为活性氧清除剂, 参与活性氧清除过程^[18], 其中谷胱甘肽氧化酶基因上调, 谷胱甘肽转移酶 (MD14G1232100) 表达量下降, 导致细胞中还原性谷胱甘肽减少, 进而导致细胞中抗氧化剂的生成减少, 不能及时清除细胞中的活性氧, 造成褐变的产生。

磷脂是细胞膜的主要成分之一, 并且还起着信号转导作用。在褐变组织中磷脂酶 A2 (MD13G1235500)

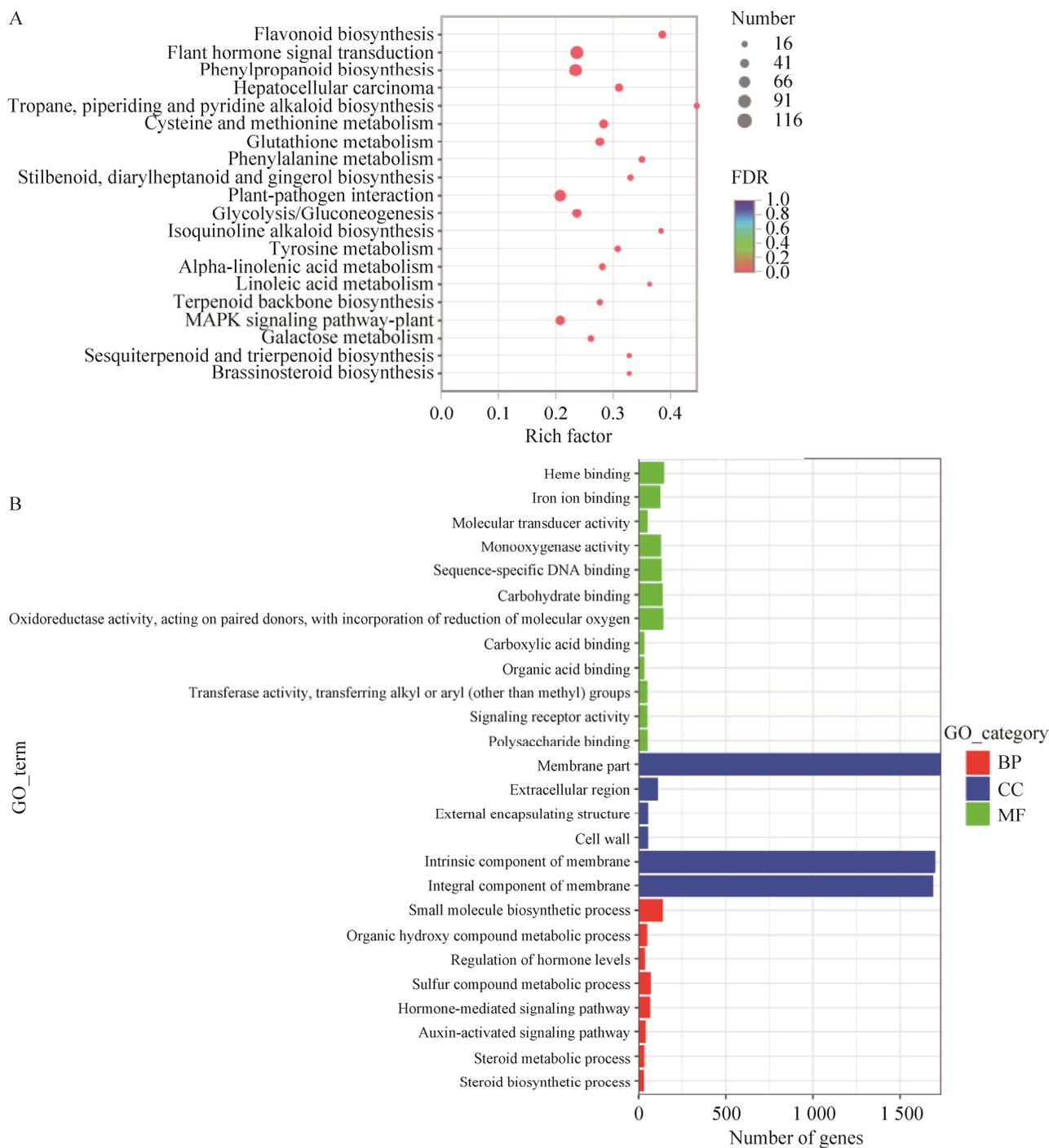


图 2 差异基因 KEGG 和 GO 功能富集分析

Fig. 2 Enrichment analysis of differentially expressed genes KEGG and GO. (A) Enrichment analysis of differentially expressed genes KEGG. (B) GO enrichment analysis diagram of differentially expressed genes.

的基因表达明显升高，酶活性升高，导致甘油磷脂的降解。磷脂酸 (Phosphatidic acid, PA) 是细胞膜上分子量最小的磷脂，对膜代谢具有重要意

义^[19]。磷脂酸合成途径中两个关键酶磷脂酶 D (MD15G1125000) 和磷脂酶 C (MD07G1221900) 基因下调，导致酶活性降低，磷脂酸合成受阻，

影响膜代谢,破坏细胞膜结构。TCA 循环在能量代谢中具有重大的贡献,TCA 循环中的关键酶苹果酸脱氢酶 (MD05G1238800) 催化苹果酸生成 TCA 循环的重要底物草酰乙酸,苹果酸脱氢酶基因的表达量在处理组褐变组织中下调,草酰乙酸的生成降低,抑制 TCA 循环的正常运行,导致细胞能量供应缩减,维持细胞膜完整性的能量减少,导致细胞膜结构不稳定,容易受到破坏。细胞膜遭到破坏,细胞内酚类物质和多酚氧化酶结合,发生褐变。

从筛选的褐变候选基因中随机挑选 3 个显著差异基因 (MD09G1029300、MD05G1112000、MD13G1235500) 进行 qRT-PCR 检测分析,结果

如图 3 所示。图中 3 个褐变候选基因的表达情况与 RNA-seq 结果一致。

2.5 高浓度 CO₂ 处理差异代谢物表达分析

利用正交最小偏二乘判别分析 (OPLS-DA) 方法进行样本组件差异区分,筛选差异代谢物。据 OPLS-DA 模型的变量重要性投影 VIP (Variable importance in project) 和差异倍数 (VIP>1; FC>2 或 FC<0.5) 进行差异代谢物的筛选。差异代谢物的筛选结果如图 4 所示,CO₂ 处理褐变组 (cd_b) 与对照组 (ck) 共筛选出 77 个差异代谢物,其中上调表达的差异代谢物有 36 个,下调表达的差异代谢物有 41 个。

表 4 褐变候选基因统计表

Table 4 Statistics of browning candidate genes

	Gene ID	Gene name	Description	Log ₂ Fold change	P-adjust	Regulate
	MD09G1029300	<i>glrx</i>	Thioredoxin superfamily protein	-7.02	7.29e-7	Down
	MD14G1137800	<i>grxcr1</i>	Glutaredoxin family protein	4.98	0.018	Up
	MD01G1219500	<i>glt1</i>	NADH-dependent glutamate synthase 1	2.36	1.23e-30	Up
Redox	MD06G1081300	<i>gpx</i>	glutathione peroxidase	4.58	7.30	Up
	MD05G1112000	<i>erg1</i>	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	10.53	2.73	Up
	MD13G1235500	<i>pla2g</i>	Phospholipase A2 family protein	6.12	0.00022	Up
	MD15G1139400	<i>dgk</i>	Diacylglycerol kinase1	4.08	4.08e-13	Up
Lipid	MD14G1058300	<i>fad2</i>	Fatty acid desaturase 2	10.56	8.99e-17	Up
	MD15G1125000	<i>pld1_2</i>	Phospholipase D alpha 1	-2.25	0.017	Down
	MD07G1221900	<i>plcd</i>	Phospholipase C 2	-2.51	2.92e-17	Down
	MD14G1232100	<i>gst</i>	Glutathione S-transferase TAU 8	15.62	4.66e-36	Up
	MD14G1111500	<i>acs1_2_6</i>	ACC synthase 6	12.78	6.03e-10	Up
Signal	MD05G1109100	<i>pr1</i>	CAP (cysteine-rich secretory proteins)	12.64	2.29e-14	Up
	MD11G1110100	<i>epn</i>	ENTH/VHS family protein	10.93	1.23e-17	Up
	MD12G1194200	<i>cml</i>	Calmodulin like 42	9.93	7.60e-13	Up
	MD05G1238800	<i>mdh1</i>	Lactate/malatedehydrogenase family protein	-2.97	5.30e-21	Down
	MD17G1096700	<i>acna</i>	Aconitase 3	1.60	3.88e-15	Up
Energy	MD15G1091000	<i>maeb</i>	NADP-malic enzyme 3	12.53	2.86e-77	Up
	MD13G1095200	<i>acly</i>	ATP-citrate lyase A-2	3.81	1.71e-23	Up
	MD15G1050100	<i>ckx</i>	Cytokinin oxidase 7	9.63	2.52e-38	Up

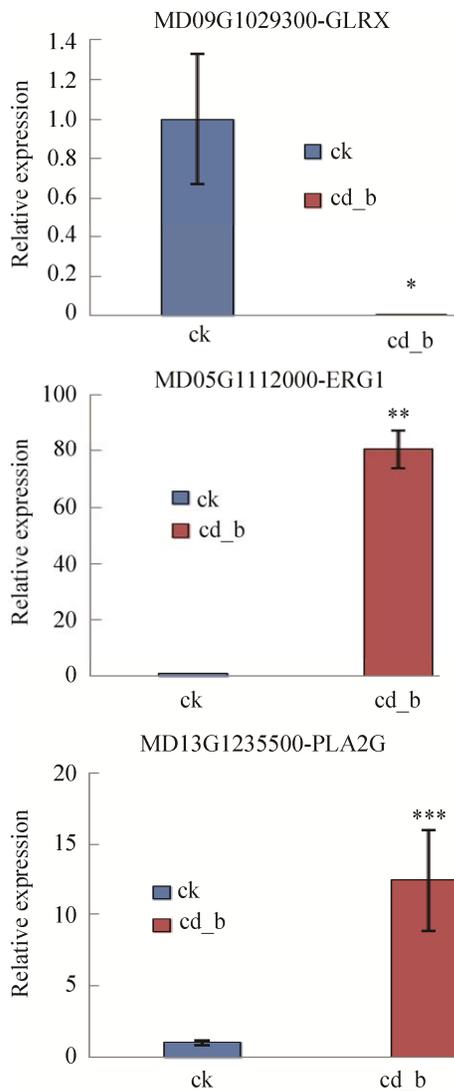


图3 RNA-seq 数据的 qRT-PCR 验证
Fig. 3 qRT-PCR validation of RNA-seq data.

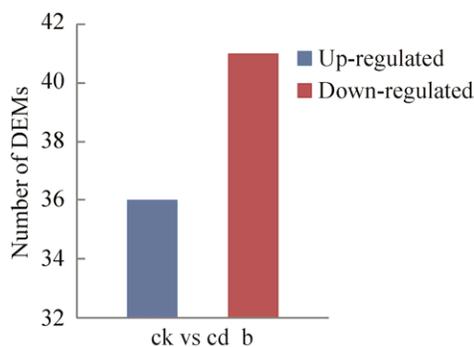


图4 差异代谢物统计图
Fig. 4 Statistical diagram of differential metabolites.

2.6 高浓度 CO₂ 处理差异代谢物功能性分析

将筛选出的差异代谢物与 HMDB (Human metabolome database) 数据库进行对比分析,可以获得差异代谢物质的分类信息,结果如图 5A 所示。对照组与 CO₂ 处理褐变组 (ck vs cd_b) 的差异代谢物大部分集中在脂类及类脂分子这一类上,占比为 40%,其他占比较大的类别分别是有机酸及其衍生物 (24.44%)、有机氧化合物 (13.33%) 糖类和多酮类化合物 (6.67%),这说明 20% CO₂ 处理富士苹果产生褐变是连续的过程,在此过程中发生变化的代谢物质主要是脂类及类脂分子、有机酸及其衍生物、有机氧化合物、糖类和多酮类化合物。

将筛选到的差异代谢物质对比到 KEGG Pathway 数据库中,根据对比的信息,可以获得差异代谢物参与的代谢通路信息。本次筛选到的氨基酸代谢、翻译、次级代谢和膜运输等代谢通路,这说明褐变过程中产生的差异代谢物质主要参与到氨基酸代谢、翻译、次级代谢和膜运输等代谢通路。

2.7 褐变候选差异代谢物筛选

根据差异代谢物 HMDB 化合物分类分析和 KEGG 功能通路分析的结果,可知 20% CO₂ 处理富士苹果产生褐变是代谢物质不断积累、连续的过程,造成果肉褐变的相关代谢物主要是有机酸、脂类分子、糖类和多酮类化合物等物质。共筛选 35 个差异代谢物可能与褐变相关,其中有机酸、脂类、糖类和多酮类化合物分别是 12、18、5 个。筛选的与褐变相关的部分差异代谢物质如表 5 所示。

多酚类物质的抗氧化性可以消除细胞内过多的氧自由基,维持细胞氧化还原平衡。褐变组织中儿茶素 (HMDB0002780)、槲皮素 (HMDB0005794)、根皮素 (HMDB0003306) 等多酚类化合物的表达量均下降,细胞内参与清除活性氧的抗氧化物质减少,不能消除因高浓度 CO₂ 处理产生的活性氧,破坏氧化还原状态,细胞过氧化,对细胞

产生损伤。苯丙氨酸 (HMDB0000159)、谷氨酸 (HMDB0000148)、天冬氨酸 (HMDB0000168) 等

氨基酸含量下降,影响氨基酸代谢,从而会影响到脂质代谢和糖代谢等其他的代谢途径。

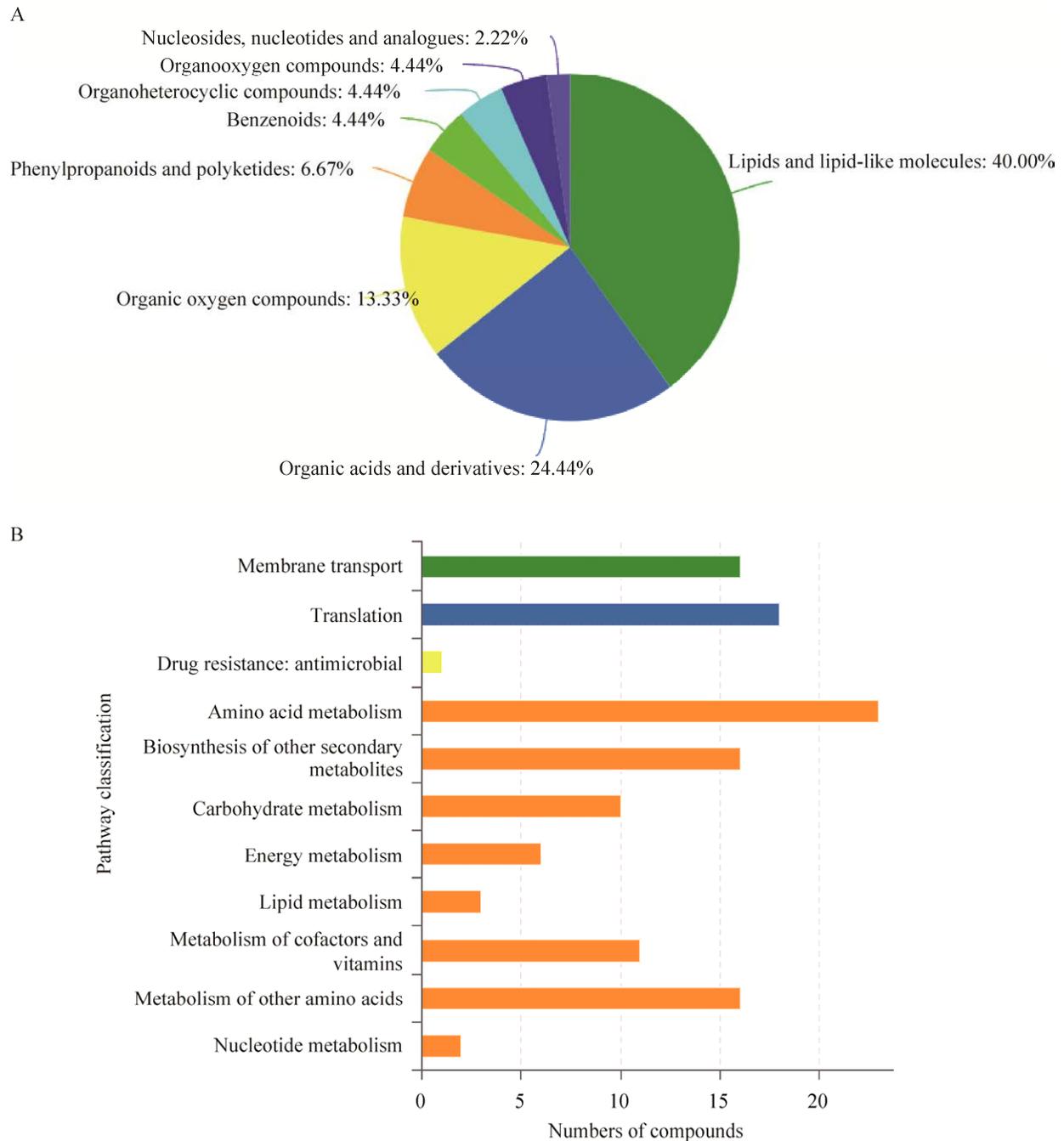


图 5 高浓度 CO_2 处理差异代谢物 HMDB 化合物分类和 KEGG 功能通路统计图

Fig. 5 Classification of differential metabolites HMDB and KEGG functional pathway in high concentration CO_2 treatment. (A) Differential metabolites HMDB compound classification diagram. (B) Statistical diagram of different metabolites KEGG functional pathway.

表 5 候选褐变相关差异代谢物

Table 5 Candidate browning related differential metabolites

	Library link	Metabolite	VIP	FC	Type	
Lipid	HMDB0035751	Ganolucidic acid B	19.4	122	Up	
	HMDB0037607	Ganolucidic acid E	17.1	111	Up	
	HMDB0040772	Isothankunic acid	10.1	174	Up	
	HMDB0041043	3 alpha-corosolic acid	6.4	75	Up	
	HMDB0034551	Medicagenic acid	3.9	86	Up	
	HMDB0036652	(2xi,20beta)-2,20-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid	11.5	67	Up	
	HMDB0040711	16 beta-16-hydroxy-3-oxo-1,12-oleanadien-28-oic acid	9.6	154	Up	
	HMDB0035260	Delta-maslinic acid	7.9	58	Up	
	HMDB0062288	12(13)-epoxy-6Z,9Z-octadecadienoic acid	7.6	5	Up	
	HMDB0030995	(2'E,4'Z,8E)-colneleic acid	7.0	8	Up	
	HMDB0034639	Esculentic acid (Phytolacca)	6.2	143	Up	
	HMDB0040667	3-trans-p-coumaroylrotundic acid	6.2	163	Up	
	HMDB0036961	(3beta,6alpha,19alpha)-3,6,19-trihydroxy-12-ursen-28-oic acid	3.1	42	Up	
	HMDB0041039	21beta-hydroxyhederagenin	3.0	49	Up	
	HMDB0040618	16-hydroxy-3-oxo-12-oleanen-28-oic acid	2.6	101	Up	
	Organic acid	HMDB0000933	Traumatic acid	1.4	0.7	Down
		HMDB0040495	Cis-p-coumaroylcorosolic acid	1.2	9.7	Up
HMDB0000784		Azelaic acid	0.2	0.9	Down	
HMDB0000168		L-asparagine	12.5	0.089	Down	
HMDB0000254		Succinic acid	3.5	24	Up	
HMDB0000159		L-phenylalanine	1.5	0.14	Down	
HMDB0000148		L-glutamic acid	2.2	0.38	Down	
HMDB0001645		L-norleucine	1.4	0.1	Down	
HMDB0000191		L-aspartic acid	6.4	0.05	Down	
HMDB0000187		L-serine	1.3	0.16	Down	
HMDB0001263		Allysine	1.2	0.4	Down	
HMDB0000237		Propionic acid	1.2	16	Up	
HMDB0033923		(±)-erythro-Isoleucine	0.9	0.05	Down	
HMDB0000070		Pipecolic acid	0.4	0.3	Down	
HMDB0000267		Pyroglutamic acid	0.3	0.4	Down	
Polysaccharide		HMDB0039167	2-O-p-coumaroyl-D-glucose	4.9	0.027	Down
		HMDB0003306	Phloretin	0.7	0.11	Down
	HMDB0002780	Catechin	1.6	0.03	Down	
	HMDB0005794	Quercetin	1.1	0.099	Down	
	HMDB0037335	Sudachitin	1.6	0.048	Down	

2.8 差异基因和差异代谢物联合分析

根据上文对各差异基因和各差异代谢物进行的 KEGG 通路注释的信息,将在同一个 KEGG 通路下的各差异基因和差异代谢物进行关联,了解

褐变过程基因与代谢物质之间的联系。

图 6A 为差异代谢物和差异基因关联的类黄酮生物代谢过程的部分图,6B 是类黄酮生物代谢过程的完整图。类黄酮生物代谢的起始底物是来

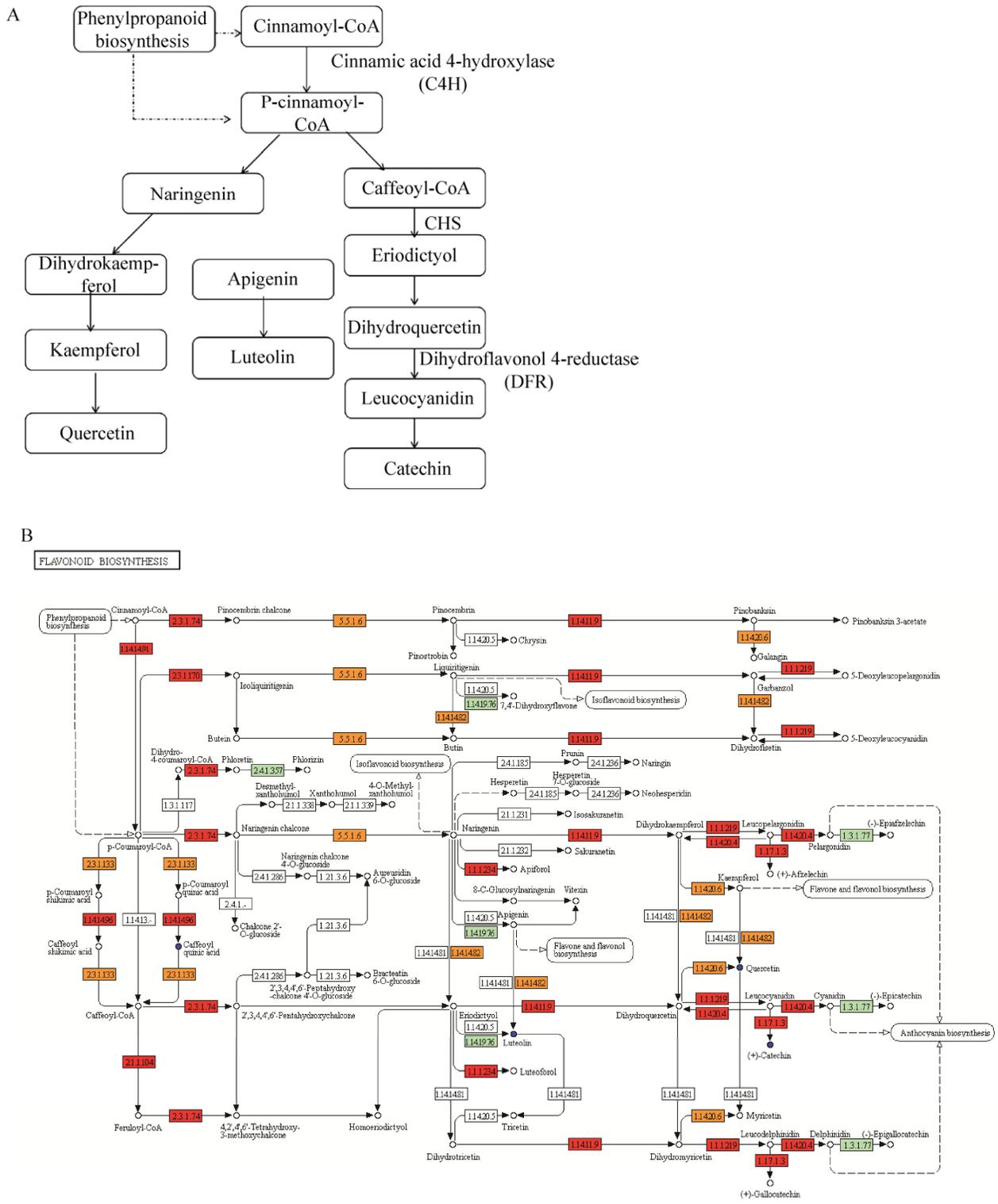


图 6 类黄酮生物代谢过程
Fig. 6 Biological metabolic process of flavonoids.

源于苯丙烷类代谢途径产生的香豆酰辅酶 A (Coumaroyl-CoA), 在各种酶的作用下生成查尔酮, 最终合成柚皮素, 由柚皮素作为主要的代谢产物, 进行其他类黄酮化合物的合成途径^[20]。类黄酮生物合成过程中存在多种关键酶, 如查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)、花色素合成酶(Anthocyanidin synthase, ANS)、二氢黄酮醇还原酶(Dihydroflavonol 4-reductase, DFR)等, 这些关键酶基因受到调控, 对类黄酮的合成会产生影响。从图 6 中可以看出, 类黄酮生物代谢过程中的关键基因受到了调控, 导致儿茶素的含量明显降低, 其他黄酮醇类化合物如槲皮素、木犀草素的含量也明显降低。经过 20% CO₂ 处理后, 果肉中黄酮类物质的含量下降, 会导致果肉组织内部抗氧化功能的下降, 造成整体的氧化还原状态失衡, 细胞内抗氧化性能减弱, 自由基增多, 破坏细胞膜结构和功能, 这是果肉产生褐变的一个重要原因。

3 讨论

有报道对梨果实进行研究, 发现抗氧化系统的生化和转录调控影响了梨的褐变^[21]。本研究差异基因主要富集在氧化还原过程、脂类代谢、激素信号转导、能量代谢等过程中, 这与 Mellidou 等^[18]的研究一致。在本研究中筛选到的与氧化还原相关的大部分差异基因如谷氧还蛋白 *grxcr1* (MD14G1137800)、FAD/NAD(P)结合氧化还原酶 *erg1* (MD05G1112000)、NADH 依赖型谷氨酸合酶 *glt1* (MD01G1219500) 等表达量上调, 促进氧化还原酶活性或提高氧化还原系统的抗氧化能力, 这说明苹果在经过 20% CO₂ 处理后, 果肉组织内部氧化还原状态遭到破坏, 产生过多的氧自由基造成细胞膜结构和功能破坏, 进而导致果肉组织褐变。

对于与脂类相关的差异基因如磷脂酶蛋白 *pla2g* (MD13G1235500)、二酰甘油激酶 *dgg* (MD15G1139400) 等表达量均上调, 这两种酶的活性增加, 促进脂肪酸的合成。这说明经过 20% CO₂ 处理苹果的脂类物质消耗较大, 细胞中氧自

由基含量增多, 易造成膜脂的氧化, 对细胞的结构造成伤害, 打破内膜屏障, 膜内不同区域的酚类物质与多酚氧化酶结合产生褐变。

Franck 等^[22]利用代谢组学方法研究发现梨的褐变组织中苹果酸和琥珀酸含量降低但延胡索酸含量升高, 而 Pedreschi 等^[23]发现梨褐变组织中苹果酸含量下降但琥珀酸和延胡索酸含量升高, 王云香^[4]利用代谢组学方法发现苹果褐变组织中苹果酸、延胡索酸、琥珀酸与对照组没有明显的变化, 同时发现柠檬酸含量显著降低, 本研究中代谢组结果显示, 苹果酸和延胡索酸含量未发生明显变化, 但是琥珀酸含量明显升高, 而乳酸/苹果酸脱氢酶蛋白 *mdh1* (MD05G1238800)、顺乌头酸酶 (MD17G1096700)、柠檬酸裂解酶 (MD13G1095200) 直接或间接参与 TCA 循环, 苹果酸脱氢酶蛋白基因的表达量下调, 细胞内苹果酸脱氢酶降低, 抑制苹果酸转化草酰乙酸, 而顺乌头酸酶和柠檬酸裂解酶的基因表达量上调, 这两种酶活性上升, 推进 TCA 循环的进行, 但是草酰乙酸的来源受阻, 最终也会导致 TCA 循环受阻, 细胞内能量减少, 可能会对细胞的整个机体环境产生不利的影 响, 其中可能包括氧化还原状态以及细胞结构的正常维持。

Tanaka 等^[24]研究发现富士苹果的褐变严重程度与甲酯的产生有关, 但是在本研究差异代谢物中没有筛选到甲酯, 原因可能是贮藏时间较短, 甲酯在褐变的组织中还没有发生明显的改变, 未能在检测中成功捕获。本研究从有机酸、脂类分子以及糖类和多酮类化合物等代谢物分类上进行筛选差异代谢物物质, 这与王云香^[4]筛选的 CO₂ 处理苹果的代谢物质类别是一致的, 这说明 20% CO₂ 处理富士苹果后产生褐变与这三大类的代谢物的变化是有关的, 而 Lee 等^[25]的研究结果则表示, 组织褐变与有机酸含量没有直接关系。苹果在高浓度 CO₂ 处理中产生褐变可能是因为果肉内部能量供应的缺少, 氧化还原失衡, 导致组织内部活性氧含量增多, 脂肪酸的降解加速, 破坏细胞膜结构, 使原处于细胞不同区域的酚类物质和

多酚氧化酶结合，产生了褐变。

转录组数据发现在信号转导过程中，乙烯信号转导受体蛋白(Ethylene receptor, ETR)和转录因子ERF(Ethylene responsive transcription Factor)均受到调控(图7)，表明高浓度CO₂影响苹果的乙烯代谢，本研究重点关注CO₂伤害的产生机制，故没有深入

探究高浓度CO₂对乙烯代谢和呼吸作用的影响。

综上，在苹果贮藏过程中，通过在贮藏中施加人工合成的抗氧化剂，能够诱使苹果机体内部产生抗氧化物质，平衡氧化还原系统；或施加促进机体能量生成的物质，调节机体能量代谢，减缓褐变的产生，控制CO₂伤害产生，提高高浓度CO₂保鲜的效果。

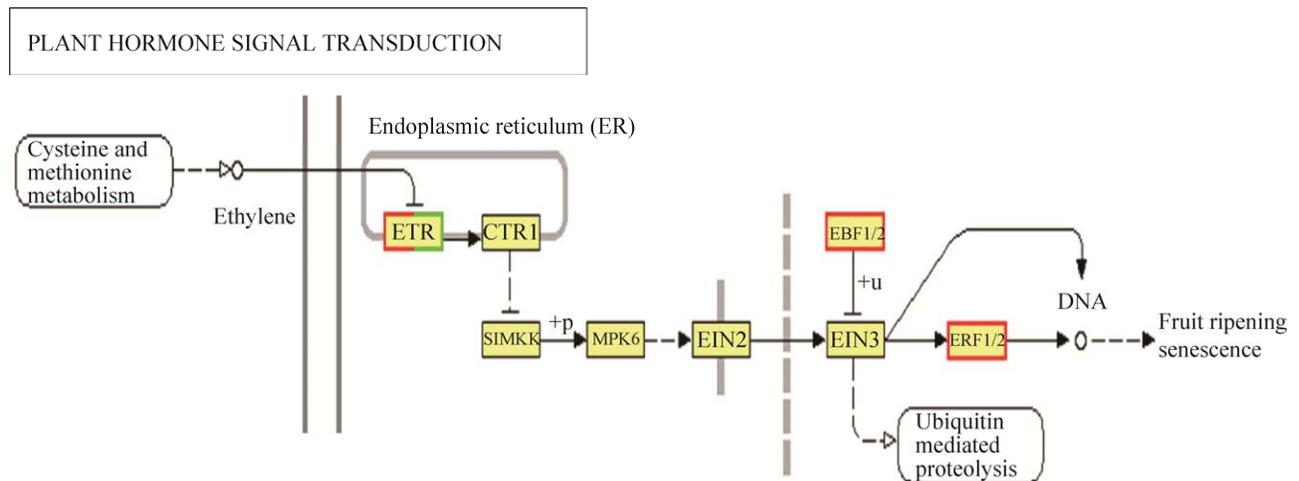


图7 乙烯信号转导过程图

Fig.7 Ethylene signal transduction process diagram.

4 结论

本研究主要探讨了苹果CO₂伤害产生的机制，结果表明，高浓度CO₂处理导致苹果大量基因的表达水平出现显著变化并影响多种代谢途径。将20% CO₂处理后苹果褐变组织和对照组正常果肉组织进行转录组测序分析，获得6332个差异基因，对差异基因进行功能性分析初步确定苹果CO₂伤害的发生与氧化还原过程、脂类代谢、激素信号转导过程、能量代谢过程有关，并成功筛选出20个候选褐变基因，发现*grxcr1* (MD14G1137800)、*gpx* (MD06G1081300) 参与活性氧清除过程，*pld1_2* (MD15G1125000) 和 *plcd* (MD07G1221900) 参与磷脂酸合成，影响膜代谢，*mdh1* (MD05G1238800) 参与TCA循环，影响能量代谢，进一步丰富CO₂伤害的基因调控网络。代谢组分析共获得77个差异代谢物，对差异代谢物进行功能性分析可以初

步确定差异代谢物的种类主要是有机酸、脂类、糖类和多酮类化合物，筛选出35个与褐变相关的代谢物质，并将差异基因和差异代谢物进行联合分析，找到两者共同参与了类黄酮生物代谢过程，调控儿茶素、槲皮素等黄酮类含量明显下降，细胞抗氧化能力下降，进一步丰富褐变产生的机制。

REFERENCES

- [1] 徐艳艳. 苹果冰点温度贮藏品质及质构变化研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
Xu YY. Study on the storage quality and texture of apple in freezing-point storage[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014 (in Chinese).
- [2] Elgar HJ, Lallu N, Watkins CB. Harvest date and srop load effects on a carbon dioxide-related storage injury of 'Braeburn' apple. Hortscience, 1999, 34(2): 305-309.
- [3] 张培培. 富士苹果高CO₂伤害敏感性与贮藏安全性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.

- Zhang PP. Studies on sensitivity to high CO₂ injury and storage safety of Fuji apple[D]. Tianjin: Tianjin University of Science&Technology, 2010 (in Chinese).
- [4] 王云香. 基于代谢组学的苹果保鲜机理及减损技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
Wang YX. Study on apple preservation mechanism and detracton technology based on metabonomics[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [5] Mathooko FM. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biol Technol*, 1996, 7(1): 1-26.
- [6] Argenta LC, Fan X, Mattheis JP. Responses of 'Fuji' apples to short and long duration exposure to elevated CO₂ concentration. *Postharvest Biol Technol*, 2002, 24(1): 13-24.
- [7] Lum GB, Shelp BJ, DeEll JR, et al. Oxidative metabolism is associated with physiological disorders in fruits stored under multiple environmental stresses. *Plant Sci*, 2016, 245: 143-152.
- [8] 陈昆松, 于樑, 周山涛. 鸭梨果实气调贮藏过程 CO₂ 伤害机理初探. *中国农业科学*, 1991(5): 83-88.
Chen KS, Yu L, Zhou ST. A preliminary study on the damage mechanism of CO₂ during the air regulated storage of Pear fruit. *Sci Agric Sin*, 1991(5): 83-88 (in Chinese).
- [9] 郝利平, 寇晓虹. 梨果实采后果心褐变与细胞膜结构变化的关系. *植物生理学通讯*, 1998(6): 471-474.
Hao LP, Kou XH. The relationship between heart browning and cell membrane structure in pear fruit after harvest. *Plant Physiol Commun*, 1998(6): 471-474 (in Chinese).
- [10] Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant*, 2003, 119(3): 355-364.
- [11] Liu P, Xue C, Wu TT, et al. Molecular analysis of the processes of surface brown spot (SBS) formation in pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd. Cv. Dangshansuli) by *de novo* transcriptome assembly. *PLoS One*. 2013, 8(9): e74217.
- [12] Leisso RS, Gapper NE, Mattheis JP, et al. Gene expression and metabolism preceding soft scald, a chilling injury of 'Honeycrisp' apple fruit. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 798.
- [13] Farneti B, Busatto N, Khomenko I, et al. Untargeted metabolomics investigation of volatile compounds involved in the development of apple superficial scald by PTR-ToF-MS. *Metabolomics*, 2015, 11(2): 341-349.
- [14] Rudell DR, Mattheis JP, Curry EA. Prestorage ultraviolet-white light irradiation alters apple peel metabolome. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(3): 1138-1147.
- [15] Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genet*, 2010, 42(10): 833-839.
- [16] Pertea M, Kim D, Pertea GM, et al. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, stringTie and ballgown. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1650-1667.
- [17] Rice P, EMBOSS. The european molecular biology open software suite. *Trends Genet*, 2016, (6): 276-7.
- [18] Mellidou I, Buts K, Hatoum D, et al. Transcriptomic events associated with internal browning of apple during postharvest storage. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 328.
- [19] 袁苑, 武玉叶, 李德全. 植物甘油二酯激酶(DGK)信号转导作用. *植物生理学通讯*, 2007(6): 1009-1014.
Yuan Y, Wu YY, Li DQ. Plant diglyceride kinase (DGK) signal transduction. *Plant Physiol Commun*, 2007(6): 1009-1014 (in Chinese).
- [20] 乔小燕, 马春雷, 陈亮. 植物类黄酮生物合成途径及重要基因的调控. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(2): 354-360, 207.
Qiao XY, Ma CL, Chen L. Biosynthetic pathway and regulation of important genes of flavonoids in plants. *Nat Prod R&D*, 2009, 21(2): 354-360, 207(in Chinese).
- [21] Deuchande T, Carvalho SMP, Giné-Bordonaba J, et al. Transcriptional and biochemical regulation of internal browning disorder in 'Rocha' pear as affected by O₂ and CO₂ concentrations. *Postharvest Biol Technol*, 2017, 132: 15-22.
- [22] Franck C, Lammerteyn J, Nicolai B. Metabolic profiling using GC-MS to study biochemical changes during long-term storage of pears. *Acta Hort*, 2005: 682, 1991-1998.
- [23] Pedreschi R, Franck C, Lammerteyn J, et al. Metabolic profiling of 'Conference' pears under low oxygen stress. *Postharvest Biol Technol*, 2009, 51(2): 123-130.
- [24] Tanaka F, Tatsuki M, Matsubara K, et al. Methyl ester generation associated with flesh browning in 'Fuji' apples after long storage under repressed ethylene function. *Postharvest Biol Technol*, 2018, 145: 53-60.
- [25] Lee J, Rudell DR, Davies PJ, et al. Metabolic Changes in 1-methylcyclopropene (1-MCP)-treated 'Empire' apple fruit during storage. *Metabolomics*, 2012, 8(4): 742-753.

(本文责编 陈宏宇)