

芒果果实响应 1-MCP处理的数字基因表达谱分析

张 兰¹, 李节法², 陈香玲¹, 李果果¹, 刘要鑫¹, 苏伟强^{1,*}

(¹广西农业科学院园艺研究所, 南宁 530007; ²上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘 要: 以‘台农1号’芒果为试材, 用1-甲基环丙烯(1-MCP, 1 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$)常温下处理12 h和未处理的果实为对照, 通过数字基因表达谱(DGE)技术, 寻找1-MCP处理对芒果贮藏影响的潜在关键基因。DGE数据分析结果表明, 1-MCP处理与对照样品文库相比, 共检测到7 350个差异表达基因。其功能主要涉及细胞壁代谢, 激素调节, 逆境胁迫应答, 氧化损伤保护, 能量代谢, 蛋白质折叠, 泛素化和蛋白酶体途径介导的细胞程序性死亡, 成熟与衰老调控等。利用实时定量PCR(qRT-PCR)技术对DGE部分数据进行验证, 检测了其中6个较有代表性的应答基因的差异表达。通过基因本体(Gene Ontology, GO)通路功能富集分析表明, 1-MCP处理增加果实对逆境胁迫的抵抗能力, 抑制物质和能量代谢, 减少细胞内钙的流失并保护果实细胞。qRT-PCR技术数据支持RNA-Seq的检测结果。

关键词: 芒果; 基因表达谱; RNA-Seq; 1-MCP; 采后

中图分类号: S 667.7

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 10-2031-08

Transcriptome Profiling of Ripening Mango Fruit Treated with 1-MCP Using Digital Gene Expression (DGE) Sequencing

ZHANG Lan¹, LI Jie-fa², CHEN Xiang-ling¹, LI Guo-guo¹, LIU Yao-xin¹, and SU Wei-qiang^{1,*}

(¹Horticulture Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; ²School of Agriculture & Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: 1-methylcyclopropene (1-MCP) is usually applied to extend shelf life of mango (*Mangifera indica* Linn ‘Tainong 1’) fruits and reduce post-harvest deterioration. In order to explore the influence of 1-MCP on the fruit storage, the harvested Tainong 1 mango fruits were treated with 1-MCP (1 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$) under room temperature for 12 hours, fruits without 1-MCP treatment served as the control. Transcriptome profiling of mature mango fruits was conducted by digital gene expression (DGE) sequencing method. Seven thousand three hundred and fifty differentially expressed genes (DEGs) were identified between 1-MCP treated and control fruits. The DEGs involved in many pathways including cell wall metabolism, hormone regulation, stress and defense, oxidative damage protection, energy and metabolism, protein folding, programmed cell death mediated by the ubiquitination and proteasome pathways, as well as ripening and senescence processes. To validate the DGE data, six genes were selected for real-time

收稿日期: 2015-06-02; **修回日期:** 2015-09-06

基金项目: 广西农业科学院科技发展基金青年基金项目(桂农科 2014YQ28); 广西芒果创新团队桂南综合试验站项目(桂农发[2011]33号)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: nkyswq@sina.com)

quantitative PCR (qRT-PCR) analysis. Gene ontology (GO) term enrichment analysis of DEGs revealed that 1-MCP treatment could protect fruit cells by enhancing the stress resistance, inhibiting substance and energy metabolism and reducing the intracellular calcium loss. The qRT-PCR analysis confirmed the accuracy of DGE results.

Key words: *Mangifera indica*; gene expression profile; RNA-Seq; 1-MCP; postharvest

芒果属于呼吸跃变型水果,对乙烯非常敏感。夏季高温多湿,芒果采后生理活动加快,乙烯和呼吸速率加大,加速后熟衰老。每年中国芒果的采后损失率高达 20%~30% (杨杨 等, 2014)。减少芒果果实乙烯的产生、延缓呼吸高峰,是延长货架期的主要途径。国际上对呼吸跃变型水果采后贮藏保鲜常用的措施包括热处理 (Jiang et al., 2014)、控制温度、湿度、气压、气体组成 (Nordey et al., 2014) 或通过外施乙烯抑制剂 (Ziliotto et al., 2008) 等。1-甲基环丙烯 (1-MCP) 是有效的乙烯受体的竞争性抑制剂 (Watkins, 2006),能够抑制乙烯诱导的果实后熟,已经在苹果 (Bizjak et al., 2012)、桃 (Jiang et al., 2014)、番木瓜 (Huerta-Ocampo et al., 2012) 和香蕉 (Botondi et al., 2014) 中广泛应用。不过,目前对 1-MCP 处理的果实在分子水平上引起的变化及其应答机制研究还有很多不清楚的地方。

众所周知,果实的成熟衰老是一系列基因选择性表达的结果。近年来兴起的数字基因表达谱 (DGE) 技术使得大规模检测基因表达的变化变得简单可行。DGE 适合研究样品中差异表达的基因,并且具有费用低、效率高的优势,能够灵敏准确地得到更接近生物体内真实状态的转录组谱。Wu 等 (2014) 通过 Illumina RNA-seq 技术获得 ‘吉禄’ 芒果完整的转录组数据,为 DGE 技术的应用打下了基础。现在芒果采后保鲜研究还主要集中在延缓衰老的生理指标或者对某个关键基因克隆的研究上 (Nordey et al., 2014),在转录组学层面的研究相对较少。

本研究中通过 DGE 法,从分子水平揭示芒果果实乙烯受体抑制剂 1-MCP 处理后的应答机制,通过对影响果实软化、品质、衰老相关基因的分析,为在分子水平设计提高芒果货架期,延长果实贮藏时间的技术措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和处理

2014 年 7 月在广西农业科学院园艺研究所园艺实验站采摘成熟 (Andrade et al., 2012) 的 ‘台农 1 号’ 芒果,挑选质量、颜色、大小一致无机械损伤的果实,立即运回实验室。1-MCP 由上海交通大学提供。

在 10 L 保鲜盒内用浓度为 $1\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 1-MCP 熏蒸 (25 °C) 处理 12 h。对照果实不采用任何处理,密封于同样条件的保鲜盒内。每组处理 10 个芒果,每个处理 3 次重复。

1.2 芒果果实数字表达谱数据库构建及实时荧光定量 PCR 验证

按照李节法等 (2010) 的改良 CTAB-LiCl 法提取处理和对照的芒果果实的总 RNA 各 1 mg 左右,分别用于冰保存。

DGE 测序工作由深圳华大基因研究院采用 Illumina HiSeqTM 2000 完成。每个样品重复 2 次。在对表达谱数据库进行整理和去杂后,以 Wu 等 (2014) 公布的芒果转录组序列作为转录组数据库进

行基因注释。

按照标准 qRT-PCR 引物设计原则设计引物 (表 1)。实时荧光定量反应体系为 20 μL , 含有 10 μL SYBR Premix Ex *Taq* II (TaKaRa), 2.0 μL cDNA, 6.4 μL ddH₂O, 上、下游引物各 0.8 μL (引物浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 次循环。每次 qRT-PCR 试验均设阴性对照, 每个样品重复 3 次, 实时定量 RT-PCR 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对含量计算。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列及产物大小
Table 1 Fluorescence quantitative PCR primers and product sizes

蛋白名称 Protein name	上游引物 (5'→3') Forward primer sequence	下游引物 (5'→3') Reverse primer sequence	片段大小/bp Fragment size
ACC 氧化酶 ACC oxidase	TGGCCAGTAAAGGCCTAGAA	TCCCTTCTCCAGCCCTAGAT	218
小热激蛋白 Small heat-shock protein	CGAAGGCGATATGTTTCAGGT	AGAAGTCCAGGCTGTTTCCA	164
木葡聚糖内糖基转移酶 Xyloglucan glycosyltransferase	AGTGAATTCCTTGCGCAGAT	ACCGCTCTCCTTAGGTCCTC	175
细胞质铜/锌超氧化物歧化酶 Cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase	TGCTGGTGATTTGGGTAACA	CTGGCTCCAGCATTACCAGT	189
钙调素结合蛋白 Calmodulin-binding protein	ATACGCGGAAGGGCTACTT	AAAAAGATGGGCACCTAATTCC	150
果胶酯酶 ppe8b 前体 Pectinesterase ppe8b precursor	CTGCTTGGAAGCATTGACA	TTCATCCGACCAAGAAAAC	181
肌动蛋白 Actin	CAGCCGAGCGTGAAATTGTA	CAGCAGCCTCCATTCCAATC	210

1.3 生物信息学分析

为了分析比较各样品组的差异表达基因 (Different express genes, DEGs), 以 $P\text{-value} < 0.005$ 、 $\text{FDR} \leq 0.001$ 、 $|\log_2\text{Ratio}| \geq 1$ 为标准, 把筛选出来的 DEGs 通过 NCBI 进行 BLASTnr 注释。

用 RPKM 方法计算每一条 unigene 的表达量 (Mortazavi et al., 2008), 具体步骤参照 Audic 和 Claverie (1997) 的方法。采用 FDR (Benjamini & Yekutieli, 2001) 多重检验对 $P\text{-value}$ 的阈值进行校正, RPKM 法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响, 计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异 (Audic & Claverie, 1997)。

拼接获得的 Unigenes 通过 Blast2GO (Conesa et al., 2005) 数据库进一步对其代谢通路进行注释。

2 结果与分析

2.1 测序质量评估

用 1-MCP 处理及对照的样品分别构建数字基因表达谱文库, 利用 Illumina HiSeq™ 2000 测序, 测序结果统计如表 2。在处理与对照样品中获得 12 553 046 和 12 089 705 个 Clean 读序 (Clean reads), 分别占原始读序 (Raw reads) 总数的 98.77%和 99.33%, 表明测序数据质量较高, 且所得 Clean 读序数量满足试验需要。

进一步分析结果 (表 2) 显示, 1-MCP 处理和对照的果实样品文库分别有高达 90.86%和 88.92% 的 reads 可以比对到杧果的参考转录组上, 其中 81.17%和 73.65%的 Clean 读序能被唯一定位在杧果参考转录组序列上。这些被唯一定位的序列中很可能存在着杧果果实响应 1-MCP 处理的关键基因。

表 2 DGE 序列统计
Table 2 Statistics of DGE sequencing

样品 Sample	序列数量 Total reads	碱基数量 Total base Pairs	比对到参考基因 序列的 Reads 数 Total mapped reads	精确比对到参 考基因序列的 reads 数 Perfect match	≤2 bp 的误配 ≤2 bp mismatch	唯一匹配 Unique match	多位点匹配 Multi-position match	未匹配 Total unmapped reads
1-MCP	12 553 046 (100%)	615 099 254 (100%)	11 406 098 (90.86%)	8 491 843 (67.65%)	2 914 255 (23.22%)	10 189 069 (81.17%)	1 217 029 (9.70%)	1 146 948 (9.14%)
对照 Control	12 089 705 (100%)	592 395 545 (100%)	10 750 654 (88.92%)	8 198 479 (67.81%)	2 552 175 (21.11%)	8 904 578 (73.65%)	1 846 076 (15.27%)	1 339 051 (11.08%)

注：括号中为 Clean 读序占原始读序的比例。

Note: () Clean reads vs Raw Reads.

2.2 1-MCP处理与对照的基因表达谱分析

根据 DGE 差异基因检测方法，将 1-MCP 处理与对照的 DGE 文库进行差异表达基因的检测。对比分析发现，在 1-MCP 处理与对照间共检测到 7 350 个基因的表达量发生显著性变化，其中 726 个上调表达，6 624 个下调表达（图 1）。选择了 6 个基因进行 qRT-PCR 验证，表明 qRT-PCR 的结果与 DGE 的数据一致（图 2），说明本次 DGE 结果具有较高的准确性和可信度。

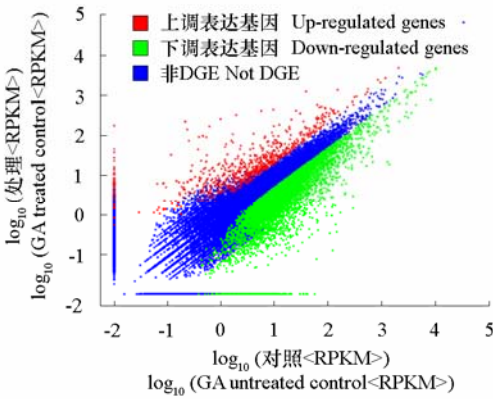


图 1 1-MCP 处理后差异基因表达丰度分布图
Fig. 1 Distribution of gene expression abundance after 1-MCP treatment

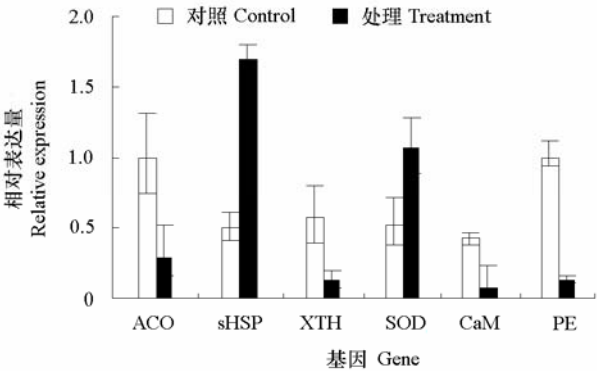


图 2 采用荧光定量 PCR 技术验证 RNA-Seq 数据
Fig. 2 Validation of the expression data from RNA-seq analysis via real-time RT-PCR analysis

在表达量显著上调的 726 个基因中有涉及参与防御反应的小热激蛋白（Small heat-shock protein, sHSP）、甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）、异柠檬酸脱氢酶（Isocitrate dehydrogenase, IDH）及参与活性氧代谢的超氧化物歧化酶（Superoxide simulated dismutase, SOD）、抗坏血酸过氧化物酶（Ascorbate peroxidase, APX）等；在表达量下调的 6 624 个基因中主要涉及 1 - 氨基环丙烷 - 1 - 羧酸氧化酶（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO）、泛素连接酶（Ubiquitin-conjugating enzyme, UBC）、钙调素结合蛋白（Calmodulin-binding protein, CaM）、细胞壁代谢的和成熟相关的果胶裂解酶（Ripening-related pectate lyase, PL）、木葡聚糖内糖基转移酶（Xyloglucan glycosyltransferase, XTH）、果胶酯酶（Pectinesterases, PE）、乙烯受体基因（Ethylene receptor, ETR）等（表 3）。

表 3 杧果果实 1-MCP 响应基因表达情况
Table 3 Differently expressed genes in mango fruits after 1-MCP treatment

基因 ID Gene ID	基因长度/bp Gene length	log ₂ ratio	表达 Regulation	P	错误发现率 False discovery rate	Blast 数据库注释 Blast nr
CL3400.Contig2	856	8.22	上调 Up	8.7E-08	5.4E-07	I 型热激蛋白 Class I heat shock protein
CL2009.Contig2	1 789	8.20	上调 Up	0.0E+00	0.0E+00	热激蛋白 70 Heat-shock protein 70
Unigene14234	540	4.39	上调 Up	3.8E-06	2.0E-05	热激蛋白 30 亚型 Heat shock factor protein HSF30-like isoform
CL7197.Contig1	764	3.57	上调 Up	0.0E+00	0.0E+00	热激蛋白 Heat-shock protein
Unigene11690	717	2.70	上调 Up	4.0E-63	1.3E-61	细胞质铜/锌超氧化物歧化酶 Cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase
Unigene22825	824	2.62	上调 Up	1.5E-18	1.8E-17	小热激蛋白 Small heat-shock protein
CL4481.Contig2	2 346	2.58	上调 Up	3.72E-69	1.29E-67	乙烯抑制转录因子 3 Ethylene insensitive 3
Unigene22724	1 156	1.89	上调 Up	1.09E-206	1.03E-204	脱氢抗坏血酸还原酶 Dehydroascorbate reductase
CL4692.Contig1	1 374	1.51	上调 Up	1.1E-188	9.0E-187	锰超氧化物歧化酶 Manganese superoxide dismutase-like protein
Unigene15927	1 089	1.24	上调 Up	2.2E-60	6.6E-59	热激蛋白 83 Heat shock protein 83-like
CL6717.Contig1	840	1.06	上调 Up	1.2E-05	5.9E-05	细胞质抗坏血酸氧化酶 Cytosolic ascorbate peroxidase
CL9071.Contig1	1 576	- 1.26	下调 Down	1.6E-42	3.7E-41	辣根过氧化物酶 L-ascorbate peroxidase
CL510.Contig3	1 977	- 1.32	下调 Down	5.05E-21	6.49E-20	甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate ehydrogenase
CL445.Contig3	282	- 1.55	下调 Down	6.73E-14	6.31E-13	泛素连接酶 Ubiquitin-conjugating enzyme
Unigene21982	4 003	- 1.87	下调 Down	2.90E-37	5.86E-36	纤维素合酶催化亚基 3 Cellulose synthase A catalytic subunit 3
CL1880.Contig1	682	- 2.01	下调 Down	5.64E-17	6.16E-16	异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase
CL6562.Contig2	1 415	- 2.09	下调 Down	2.59E-115	1.45E-113	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase
Unigene22740	1 176	- 2.34	下调 Down	6.62E-22	8.77E-21	质子泵 ATP synthase
CL8952.Contig1	3 762	- 2.75	下调 Down	5.92E-153	4.18E-151	纤维素合酶催化亚基 6 Cellulose synthase A catalytic subunit 6
Unigene22483	492	- 2.78	下调 Down	1.07E-13	9.93E-13	纤维素合酶 Cellulose synthase
CL500.Contig1	1 459	- 3.10	下调 Down	5.26E-84	2.15E-82	纤维素合酶 G2 Cellulose synthase-like protein G2
CL9328.Contig	2 953	- 3.36	下调 Down	1.86E-64	6.06E-63	乙烯受体基因 Ethylene receptor
CL8683.Contig1	501	- 3.73	下调 Down	2.02E-14	1.95E-13	ACC 氧化酶 ACC oxidase
CL9328.Contig3	1 118	- 3.64	下调 Down	2.13E-37	4.33E-36	乙烯受体 Ethylene receptor
Unigene10527	2 187	- 4.07	下调 Down	0.0E+00	0.0E+00	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase
Unigene13388	890	- 4.10	下调 Down	1.71E-08	1.12E-07	木葡聚糖内糖基转移酶 Xyloglucan glycosyltransferase
CL6380.Contig1	2 738	- 4.58	下调 Down	0.00E+00	0.00E+00	成熟相关的果胶酸裂解酶 Ripening-related pectate lyase
Unigene19613	1 949	- 6.12	下调 Down	0.00E+00	0.00E+00	果胶酯酶 PPE8B 前体 Pectinesterase PPE8B precursor
CL8782.Contig2	422	- 6.53	下调 Down	2.36E-75	8.95E-74	磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxylase
Unigene1187	1 293	- 6.93	下调 Down	2.1E-05	1.02E-04	钙调素结合蛋白 Calmodulin-binding protein
CL5576.Contig1	431	- 8.87	下调 Down	1.02E-06	5.69E-06	果胶酯酶 2 前体 Pectinesterase-2 precursor

2.3 差异表达基因的功能分析

通过 GO 基因功能分类体系对 1-MCP 处理与对照间差异表达的基因进行注释后,发现共涉及 1 816 个 GO 分类条目,其中生物过程、分子功能和细胞组分过程相关的 GO 条目分别为 1 133、495 和 188 条,分别占 62.4%、27.2%和 10.4%,所涉及的差异基因数分别为 3 240、3 755 和 3 443 条。差异基因涉及的生物学过程包括代谢过程(占 70.0%)、细胞过程(占 65.4%)、有机物代谢过程(占 54.5%)、细胞代谢过程(占 51.0%)和初级代谢过程(50.1%)等。与分子功能相关的差异基因主要涉及催化活性(占 67.7%)、结合活性(占 63.9%)、有机环状化合物结合活性(32.2%)、杂环化合物结合活性(32.1%)和转移酶活性(25.9%)等功能,其中参与催化活性相关的基因 2 544 条,参与有机环状化合物结合活性的基因 1 208 条(表 4)。与细胞组分相关的基因主要涉及细胞(占 83.9%)、细胞组分(占 83.9%)、细胞内组分(占 73.9%)和细胞器(占 66.4%)等。参与细胞、细胞组分、细胞器的基因均在 2 000 个以上。差异基因 GO 功能富集结果表明,1-MCP 诱导芒果果实的电子传递通路、激素信号转导通路,以及芳香族氨基酸的生物合成。另一方面,1-MCP 处理也影响泛素化和蛋白酶体通路参与细胞程序性死亡等相关通路。

表 4 1-MCP 处理后芒果差异表达基因 GO 功能分类
Table 4 GO functional categories of mango fruits differentially expressed genes under 1-MCP treatment

GO 本体 GO ontology	类别 Class	涉及的差异表达基因数 Number of differential expression genes	校正后的 P 值 Corrected P-value
分子功能 Molecular function	催化活性 Catalytic activity	2 544	4.79E-02
	结合活性 Binding	2 398	1.39E-10
	有机环状化合物结合 Organic cyclic compound binding	1 208	1.41E-10
生物过程 Biological process	杂环化合物结合 Heterocyclic compound binding	1 205	3.12E-10
	转移酶活性 Transferase activity	972	1.49E-09
	代谢过程 Metabolic process	2 410	1.71E-09
	细胞过程 Cellular process	2 303	1.52E-07
	有机物代谢 Organic substance metabolic process	1 917	2.90E-07
	细胞代谢 Cellular metabolic process	1 802	5.68E-07
	初级代谢 Primary metabolic process	1 764	5.85E-06
	细胞芳香化合物代谢 Cellular aromatic compound metabolic process	583	7.76E-06
	细胞程序性死亡 Programmed cell death	11	1.56E-05
	激素信号转导 Hormone-mediated signaling pathway	70	1.40E-04
	电子传递 Electron transport chain	39	2.90E-04
	细胞程序性死亡 Programmed cell death	11	3.50E-04
	细胞 Cell	2 718	5.30E-04
细胞组分 Cellular component	细胞组分 Cell part	2 718	8.70E-04
	细胞内 Intracellular	2 401	7.30E-04
	细胞内组分 Intracellular part	2 393	3.50E-04
	细胞器 Organelle	2 152	1.40E-04

3 讨论

1-MCP 处理呼吸跃变型果实能够安全无损地延迟呼吸跃变高峰,保持果实的品质,此特点常被用来解释乙烯诱导果实成熟与衰老的基本机制(Watkins, 2006; Bizjak et al., 2012; Huerta-Ocampo et al., 2012)。目前,研究热点聚焦在 1-MCP 如何在转录水平和蛋白质水平选择性地调控特定基因

和蛋白的表达水平从而调控果实的成熟。数字基因表达谱 (DGE) 分析技术比芯片技术能检测出更多的差异基因信息, 更能准确全面反映整个转录水平的基因表达的变化 (Fu et al., 2009)。Ziliotto 等 (2008) 通过基因芯片技术研究 1-MCP 处理对油桃后熟的影响, 共获得 106 条差异基因。本研究通过 DGE 文库, 筛选出 7 350 条响应 1-MCP 处理的差异表达基因, 发现 1-MCP 处理后杧果果实中仅有 9.9% 基因出现上调表达, 其中以 HSP 家族, SOD 等相关基因为代表, 而有 90.1% 的基因呈现下调表达, 如 ACO、CaM 和 PE 等。GO 功能富集分析提示 1-MCP 处理影响杧果果实成熟过程中的碳水化合物代谢、能量代谢、蛋白质的合成与分解代谢、氨基酸的合成代谢、细胞结构和逆境胁迫响应等功能。

Ziliotto 等 (2008) 发现 1-MCP 能够有效维持油桃果肉的硬度, 并不阻碍乙烯在体内的合成过程。不过, 本研究中通过 DGE 技术检测到 1-MCP 处理显著降低乙烯合成途径中的最后一个关键酶基因, 即 ACC 氧化酶的表达丰度, 暗示 1-MCP 可能会抑制乙烯在杧果果实内的生物合成。此外, 1-MCP 处理后显著提高 HSP、SOD 和 APX 等在转录水平的表达丰度, 暗示 1-MCP 处理后可能提高杧果果实抵抗逆境胁迫的能力。值得注意的是, 热激蛋白的调控是发生在转录和翻译水平上 (Jiang et al., 2014)。1-MCP 处理在转录水平显著提高热激蛋白家族成员包括 sHSP、I 型热激蛋白、热激蛋白 83、热激蛋白 70、热激蛋白 30 等在转录水平上的表达量, 降低杧果果实在贮藏期蛋白质的错误折叠率。很多文献报道表明, 呼吸跃变型果实的采后处理, 如 55 °C 热水、55 °C 空气、茉莉酸甲酯 (Ding et al., 2001) 等处理都是通过提高 sHSP 等分子伴侣的表达丰度, 来降低蛋白质的错误折叠率的分子机制来延长果实的货架保鲜期 (Huerta-Ocampo et al., 2012)。参与活性氧代谢的差异基因表达丰度上调暗示 1-MCP 处理有利于清除体内的氧自由基, 延迟杧果果实的成熟与衰老。Jiang 等 (2014) 分析 1-MCP 处理对桃后熟的影响, 发现 sHSP 及参与活性氧代谢的酶被诱导, 本研究结果与之相同。

苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase, MDH) 是糖酵解途径中的关键酶, 质子泵 (ATP synthase) 和 GAPDH 均在糖酵解途径中的氧化磷酸化阶段发挥重要作用。1-MCP 处理显著下调糖酵解途径关键酶基因的表达丰度, 说明 1-MCP 处理可能会抑制杧果果实后熟过程中的糖酵解和三羧酸循环。Zhang 等 (2012) 同样也发现 1-MCP 处理可以抑制桃果实中的物质和能量代谢过程。此外, 本研究中鉴定的 MDH、IDH、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEP) 均是植物有氧呼吸过程中的关键酶, 1-MCP 显著下调呼吸作用关键酶的表达丰度, 暗示其可显著抑制果实的呼吸作用, 降低能量的消耗。本研究中共检测到 37 条基因参与乙烯信号转导通路, 其中 32 条下调表达, 仅有 5 条上调表达。推测这 32 条基因可能参与了 1-MCP 在受体水平上抑制植物对乙烯反应。其中, CaM 是钙的感受器和信号转导分子 (Huerta-Ocampo et al., 2012)。1-MCP 显著下调 CaM 蛋白的转录水平表达量, 减弱细胞内钙离子的活性, 进而减少细胞内钙离子的流失。呼吸跃变型果实后熟过程的硬度下降和细胞壁相关酶的修饰有密切关系, XTH 和 PE 均与果实软化相关 (Prasanna et al., 2007), 能够引起细胞壁软化 (陈昆松 等, 1999)。1-MCP 处理显著抑制与细胞壁软化相关酶在转录水平的表达量, Huerta-ocampo 等 (2012) 在蛋白水平的研究也表明, 1-MCP 显著抑制番木瓜果实中的 PE 和其它与细胞壁软化相关酶。根据本研究结果推测 1-MCP 处理可能通过降低 XTH、PE 等与细胞壁相关的基因表达丰度来推迟杧果的后熟及软化进程。综上所述, 1-MCP 处理通过增强杧果果实的抗氧化酶能力和对逆境胁迫的抵抗能力, 减少物质与能量的代谢, 推迟细胞壁软化, 来延缓果实的成熟与衰老。

References

- Andrade Jde M, Toledo T T, Nogueira S B, Cordenunsi B R, Lajolo F M, do Nascimento J R. 2012. 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening. *Journal of Proteomics*, 75 (11): 3331 – 3341.
- Audic S, Claverie J M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 7 (10): 986 – 995.
- Benjamini Y, Yekutieli D. 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics*, 29: 1165 – 1188.
- Bizjak J, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. 2012. Changes in quality and biochemical parameters in ‘Idared’ apples during prolonged shelf life and 1-MCP treatment. *Food Science and Technology International*, 18 (6): 569 – 577.
- Botondi R, De Sanctis F, Bartoloni S, Mencarelli F. 2014. Simultaneous application of ethylene and 1-MCP affects banana ripening features during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (11): 2170 – 2178.
- Chen Kun-song, Li Fang, Zhang Shang-long. 1999. The expression pattern of xylooluan edotransglycosylase gene in fruit ripening of *Actinidia chinensis*. *Acta Botanica Sinica*, 41 (11): 1231 – 1234. (in Chinese)
- 陈昆松, 李 方, 张上隆. 1999. 猕猴桃果实成熟进程中木葡聚糖内糖基转移酶 mRNA 水平的变化. *植物学报*, 41 (11): 1231 – 1234.
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez J M, Terol J, Talon M, Robles M. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21 (18): 3674 – 3676.
- Ding C K, Wang C Y, Gross K C, Smith D L. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science*, 161(6): 1153 – 1159.
- Fu X, Fu N, Guo S, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Chen W, Li Y, Zeng R. 2009. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC Genomics*, 10: 161 – 170.
- Huerta-Ocampo J A, Osuna-Castro J A, Lino-Lopez G J, Barrera-Pacheco A, Mendoza-Hernandez G, De Leon-Rodriguez A, Barba de la Rosa A P. 2012. Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. *Journal of Proteomics*, 75 (7): 2160 – 2169.
- Jiang L, Zhang L, Shi Y, Lu Z, Yu Z. 2014. Proteomic analysis of peach fruit during ripening upon post-harvest heat combined with 1-MCP treatment. *Journal of Proteomics*, 98: 31 – 43.
- Li Jie-fa, Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Tian Wei, Song Wei, Yin Hao. 2010. Cloning and bioinformatics analysis of *ent*-Kaurene oxidase gene *PpKO* in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (10): 1575 – 1582. (in Chinese)
- 李节法, 田义轲, 王彩虹, 田 伟, 宋 伟, 殷 豪. 2010. 梨贝壳杉烯氧化酶基因 *PpKO* 的克隆及生物信息学分析. *园艺学报*, 37 (10): 1575 – 1582.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5 (7): 621 – 628.
- Nordey T, Lechaudel M, Genard M, Joas J. 2014. Spatial and temporal variations in mango colour, acidity, and sweetness in relation to temperature and ethylene gradients within the fruit. *Journal of Plant Physiology*, 171 (17): 1555 – 1563.
- Prasanna V, Prabha T N, Tharanathan R N. 2007. Fruit ripening phenomena – an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (1): 1 – 19.
- Watkins C B. 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24 (4): 389 – 409.
- Wu H X, Jia H M, Ma X W, Wang S B, Yao Q S, Xu W T, Zhou Y G, Gao Z S, Zhan R L. 2014. Transcriptome and proteomic analysis of mango (*Mangifera indica* Linn) fruits. *Journal of Proteomics*, 105: 19 – 30.
- Yang Yang, Fan Bei, Shen Lin, Sheng Ji-ping. 2014. Advances in technologies for the control of chilling injury in postharvest mango. *Food Science*, 35 (7): 292 – 297. (in Chinese)
- 杨 杨, 范 蓓, 申 琳, 生吉萍. 2014. 芒果采后冷害发生及控制技术进展. *食品科学*, 35 (7): 292 – 297.
- Zhang L, Jiang L, Shi Y, Luo H B, Rang R Y, Yu Z F. 2012. Post-harvest 1-methylcyclopropene and ethephon treatments differently modify protein profiles of peach fruit during ripening. *Food Research International*, 48 (2): 609 – 619.
- Ziliotto F, Begheldo M, Rasori A, Bonghi C, Tonutti P. 2008. Transcriptome profiling of ripening nectarine (*Prunus persica* L. Batsch) fruit treated with 1-MCP. *Journal of Experimental Botany*, 59 (10): 2781 – 2791.