

# 脐橙晚熟突变体及其野生型果实柠檬酸代谢基因表达分析

付莉莉, 吴巨勋, 伊华林\*

(华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** ‘奉节晚橙’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) 是来源于 ‘奉节 72-1’ 脐橙的晚熟芽变。采用 qRT-PCR 方法测定了 ‘奉节 72-1’ 与其晚熟突变体果实 4 个发育时期柠檬酸代谢相关基因的表达。结果表明, 糖酵解途径中 ‘奉节 72-1’ 脐橙基因的表达高于 ‘奉节晚橙’; 但是柠檬酸合成相关基因 *CsCS4*、*CsPEPC1*、*CsPEPC2*、*CsPEPC4*、*CsME1*、*CsME4* 的表达水平低于 ‘奉节晚橙’。果实发育后期, ‘奉节 72-1’ 脐橙中 *CsACO1*、*CsGAD4*、*CsGSI* 等柠檬酸降解相关基因表达水平逐渐升高, 且表达量高于 ‘奉节晚橙’。两者间柠檬酸含量的差异是代谢途径中多种基因共同作用的结果。通过相关性分析, 推断 *CsME1*、*CsME4* 可能是影响柠檬酸含量差异的关键基因。

**关键词:** 脐橙; 晚熟芽变; 柠檬酸; 实时定量 PCR; 糖酵解; TCA 循环

**中图分类号:** S 666

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2016) 01-0038-09

## Expression Analysis of Citrate Metabolic Related Genes in Late-ripening Mutant of Navel Orange and Its Wild Type

FU Li-li, WU Ju-xun, and YI Hua-lin\*

(College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, the Education Ministry Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** ‘Fengwan’ orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) is the spontaneous late-ripening mutant of ‘Fengjie 72-1’. The expression of citrate metabolic related genes during fruit four developmental stages of Fengwan and its wild type Fengjie 72-1 orange was analyzed by qRT-PCR and the results revealed that key genes of glycolysis metabolism in Fengjie 72-1 expressed higher than that in Fengwan. However, citrate biosynthesis genes, such as *CsCS4*, *CsPEPC1*, *CsPEPC2*, *CsPEPC4*, *CsME1* and *CsME4* expressed lower than that in Fengwan. Moreover, transcript levels of genes, such as *CsACO1*, *CsGAD4* and *CsGSI* involved in citrate degradation pathways were increased gradually during fruit late development, and the expression levels in Fengjie 72-1 were higher than that in Fengwan orange. Genes involved in synthesis and degradation metabolic pathways coordinately contribute to the different content of citric acid. Correlation analysis revealed that *CsME1* and *CsME4* may be key genes affecting the different content of citric acid between Fengwan orange and its wild type.

**收稿日期:** 2015-11-02; **修回日期:** 2016-01-06

**基金项目:** 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-27); 国家科技支撑计划课题 (2013BAD021302); 教育部创新团队发展计划项目 (IRT13065)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yihualin@mail.hzau.edu.cn)

**Key words:** navel orange; late-ripening bud mutant; citric acid; quantitative real-time PCR; glycolysis metabolism; TCA cycle

柑橘果实中的有机酸以柠檬酸为主 (Sadka et al., 2000; Shimada et al., 2006), 其含量取决于早期的合成及后期的降解 (Terol et al., 2010)。Haffker 和 Wallace (1959) 提出果实柠檬酸的合成途径, 认为磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 催化下, 固定  $\text{CO}_2$  形成草酰乙酸 (OAA), 后者在柠檬酸合成酶 (CS) 作用下结合乙酰辅酶 A 生成柠檬酸。柠檬酸合成途径还涉及磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)、苹果酸合酶 (ME) 等关键酶, 如磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 与磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 功能相反, 催化草酰乙酸 (OAA) 向磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的转化 (Sweetman et al., 2009); 苹果酸合酶 (ME) 通过参与苹果酸的合成影响柠檬酸代谢 (Bogin & Wallace, 1966)。研究表明, 柑橘果实发育后期促进蔗糖向有机酸代谢的转变, 导致糖酵解及三羧酸循环途径不断增强 (Lin et al., 2015)。糖酵解作为糖分解的重要途径, 其代谢产生的丙酮酸通过氧化脱羧后形成乙酰辅酶 A 进而参与柠檬酸的合成 (Schwender & Ohlrogge, 2002); 己糖激酶 (HXK)、磷酸果糖激酶 (PFK)、丙酮酸激酶 (PKP) 为糖酵解途径的关键酶 (Sheen et al., 1999; Weber, 2004)。柠檬酸在线粒体中合成后被运输到细胞质, 并通过  $\text{H}^+$  泵主动运输到液泡中储存起来。当积累过高时, 液泡中的柠檬酸通过主动或被动运输至细胞质, 在 Fe 离子作用下由胞质顺乌头酸酶 (ACO) 催化为异柠檬酸 (Sadka et al., 2000), 之后经异柠檬酸脱氢酶 (IDH)、谷氨酸脱氢酶 (GDH) 降解为谷氨酸。谷氨酸一方面在谷氨酰胺合成酶 (GS) 作用下生成谷氨酰胺, 一方面在谷氨酸脱羧酶 (GAD) 作用下进入 GABA 途径 (Cercos et al., 2006)。

目前相关研究主要是针对不同柑橘种类及品种、不同环境 (龚荣高 等, 2006; Chen et al., 2013) 及柑橘果实贮藏期柠檬酸含量及相关基因的表达 (熊晶晶, 2007; Sun et al., 2013), 但是对熟期突变品种柠檬酸代谢方面的研究报道较少。研究发现 ‘奉节 72-1’ 及其晚熟芽变 ‘奉节晚橙’ 果实柠檬酸差异极大, 主要表现为 ‘奉节 72-1’ 中柠檬酸含量自花后 150 d 逐渐下降, 而 ‘奉节晚橙’ 柠檬酸含量下降较晚, 并且柠檬酸含量明显高于 ‘奉节 72-1’, 170 ~ 210 d 差异达极显著 (Wu et al., 2014b)。为了探究晚熟脐橙突变体柠檬酸差异产生的原因, 比较分析了 ‘奉节晚橙’ 及其野生型 ‘奉节 72-1’ 在脐橙果实发育过程中糖酵解、三羧酸循环及柠檬酸降解途径中相关基因的表达, 为脐橙晚熟芽变柠檬酸生理代谢研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材及其取样

‘奉节晚橙’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) 是来源于 ‘奉节 72-1’ 脐橙的晚熟芽变。‘奉节 72-1’ 及其晚熟芽变材料均于 2011 年采自重庆奉节县同一果园, 采样时间为花后 150、170、190、210 和 240 d。样品采自树势一致的果树, 每个品种各选 3 株作为生物学重复。每株树每次随机采取 12 个具有代表性的果实, 将果肉与果皮分离, 分别切碎, 液氮速冻。所有样品均保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 1.2 果肉RNA的提取及实时定量PCR

分别取 ‘奉节 72-1’ 及 ‘奉节晚橙’ 花后 150、170、190 及 210 d 的果肉, 参照 (刘永忠, 2006) 的方法提取RNA。采用TaKaRa PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st strand cDNA Synthesis Kit进行RNA反转录, 严格

按照试剂盒的使用说明进行操作。采用Primer Express 3.0 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 设计基因特异性引物, Real-time PCR反应采用ABI公司的Power SYBR Green PCR Master Mix在ViiA™ 7 Real-time PCR System上进行。反应体系 (10 μL): 0.5 μL稀释的cDNA, 0.5 μL上游引物, 0.5 μL下游引物, Mix为 5 μL, 灭菌双蒸水 3.5 μL。每个样品 4 个技术重复, 热循环反应程序如下: 50 °C 2 min, 95 °C 5 min; 40 个循环, 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 30 s。柑橘内参基因*GAPDH* (Wu et al., 2014a) 及柠檬酸代谢相关基因Real-time PCR的引物序列见表 1。定量结果采用SAS软件 (SAS System Release 8.1) 进行差异显著性分析。柠檬酸含量与相关基因的关联性采用R语言包WGCNA进行分析。

表 1 柠檬酸代谢相关基因及其 Real-time PCR 引物

Table 1 Citrate metabolic related genes and primer sequences for quantitative Real-time PCR

基因名 Gene abbreviation	拟南芥同源基因 <i>A. thaliana</i> ortholog locus	甜橙数据库 ID Genome code of <i>Citrus sinensis</i>	正向引物 5'至 3' Forward primer 5' to 3'	反向引物 5'至 3' Reverse primer 5' to 3'
<i>CsH XK1</i>	AT4G29130	Cs4g15520	TCTTTGTCCTGATTATCTTCTCTCATG	TTGGAGGGCAAAGGCATTTA
<i>CsH XK3</i>	AT1G47840	Cs3g26050	GGCAGTGACGGAGCTTCTG	CAAGAGAGCAGCACCAATGC
<i>CsP FK3</i>	AT4G26270	Cs4g13070	CGAGTTCGTGTTCCGATTTTC	TCGCTGTGAGTTTCCATTGTTG
<i>CsP FK5</i>	AT2G22480	Cs1g20200	CAAAGCCTTCTAAATTATCCCAAATAG	AGCCTAGCCTACAAGGAGAAAGC
<i>CsP FK6</i>	AT4G32840	Cs4g18980	CGCTTGTCGCTTCGGTTAA	CATCCCTTCCTCCCTTCACTCT
<i>CsENO1</i>	AT1G74030	Cs7g26180	TCCCACACTTCCTCACCAACT	TGACTGAAGAGCGTGTTTGGA
<i>CsENO2</i>	AT2G36530	Cs6g15540	AGTTCGCTGCCCCCTGTTG	TAAACCTCCATTGCTCAAATCCA
<i>CsPKP1</i>	AT3G22960	Cs9g07880	GTTTCAGCACTTCCCCAATAGC	GACTACCTGCTGTTTGCTTCGA
<i>CsPKP2</i>	AT5G52920	Cs9g18710	AGCCTTCTAGCTTCGCTTCGA	GATTTTAGTGCTTTTGCGAACAAGT
<i>CsPKP3</i>	AT1G32440	Cs7g22750	GCTGTCTAGCAACTGTATATTTTCCA	AGCTTTATCAGTTCACCAATCCTTTC
<i>CsCS2</i>	AT3G58750	orange1.1t01588	GCGCCAAGCGTAGAATCATC	TGAGCCTGCCTTGATTGACT
<i>CsCS4</i>	AT2G44350	Cs7g01170	TAGAAATTGAAAGGGTGGGTGTA	ACACAAACTCTCCATCCATCACTAAT
<i>CsPEPC1</i>	AT1G53310	Cs8g09580	GCCGATGAGCTGGTGAAACT	TCTGCAAGCCAGCAGCAATA
<i>CsPEPC2</i>	AT2G42600	Cs2g15520	ACTCGTGAGTCGTCTAAATCTTCTG	TCCCCCGCTCTCTCTT
<i>CsPEPC4</i>	AT1G68750	Cs7g12630	GATTGAGACAGGATGATGATAACCA	GTGTTCTCTATACCAGCAGCTATTC
<i>CsPEPCK</i>	AT4G37870	Cs1g20920	TTACAAGGAGACACTGCTGAAGCT	TGTCCTTGCCAATCTTGAGTTTG
<i>CsME1</i>	AT2G19900	Cs4g15270	TTTGGTGTGTTATGGTGGCTTT	TGGGTCCAACACCTTCATTTGA
<i>CsME4</i>	AT1G79750	Cs1g15720	TCTCTTCTTTCTTTTCTCCGATTTTC	TCTTCCCTCTTCCCTTTTCTC
<i>CsACO1</i>	AT4G35830	Cs1g26040	TGATTCCGCAAGAACCAACTG	ACGTCGGCTGAATCTGCTAAA
<i>CsACO2</i>	AT4G26970	Cs4g10280	TGTTTCGTCAACTTCTTCCAATAGG	GCCAAAAGAAAAATGAAGTGAAAAAT
<i>CsACO3</i>	AT2G05710	Cs2g21430	CGTTTTGTGTGAATGCGTGAT	AGCTGCTGAGGTGGAGGTTGT
<i>CsICDH</i>	AT1G65930	orange1.1t04187	ACCTCCGCTCTGACCTATTATC	CCATTTTCTTCTTTGTTTCAGTTTCG
<i>CsIDH3</i>	AT5G14590	Cs2g27720	AGGCCGTCTCTTTCTTTCCAA	TAATACGCCGTGACTCTGCTTTC
<i>CsGDH1</i>	AT5G18170	Cs5g26650	CCAGCGGCATGGAAGTG	CAGGACAAGATAATGACCAAGCA
<i>CsGDH2</i>	AT5G07440	Cs5g07820	AGAAGAGCAATAAAAGCCTGAATGAT	CGCATTTCATGGACAAGTAAGTCA
<i>CsGAD4</i>	AT2G02010	orange1.1t01622	GCCGCTTCAACATTGTGTCA	TTCATCGTGGCGTTTGTTGT
<i>CsGAD5</i>	AT3G17760	Cs5g16440	GGAAAGACTCATCTCACACATCGA	GGGCAGTTTTCGTGGATACAC
<i>CsGS1</i>	AT5G37600	Cs6g17430	TTCACGAGTTCACGACAGAATTG	GGGCAGAGATTGAAACAAGACAA
<i>CsGS2</i>	AT5G35630	Cs9g05680	TGGTTTCAGGTTTACGCATGTT	GCGATAGCATTGATGAAGTGGTAT
<i>GAPDH</i>	AT3G04120	Cs5g06870	TGTGTTTCTATGTAGAGGGTCTGAGTTT	TCTAAGACAACCTGCATGAG

## 2 结果与分析

### 2.1 糖酵解途径相关基因的表达

从图 1 中可以看到, 糖酵解途径中多数基因在‘奉节 72-1’及其晚熟芽变之间的表达模式基本一致, 如 *CsP FK3*、*CsP FK5*、*CsENO1*、*CsENO2* 及 *CsPKP1* 等, 其中 *CsP FK5*、*CsENO2*、*CsPKP1* 基因在花后 150 ~ 190 d 表达水平逐渐下降, 之后迅速增加。*CsPKP2* 基因在花后 150 ~ 170 d 两个材

料中表达基本一致, 但花后 190~210 d ‘奉节 72-1’ 远高于晚熟芽变。己糖激酶 (HXK) 是糖酵解途径的关键酶并调节着糖酵解的入口。分析发现, 芽变材料中 *CsHXK1*、*CsHXK3* 表达模式及转录水平基本一致, 而在 ‘奉节 72-1’ 中两者差异较大, 表现为 *CsHXK3* 在果实发育 4 个时期表达十分稳定, 而 *CsHXK1* 基因则呈逐渐上升的趋势。分析基因转录水平发现, 多数基因在 ‘奉节 72-1’ 中的表达水平明显高于芽变, 花后 210 d 尤为突出, 如 *CsPFK3*、*CsENO1* 表达量约为芽变的 4 倍。此外还发现, 同一家族成员中基因表达模式不尽相同, 如 *CsPFK6* 与 *CsPFK3*、*CsPFK5* 存在明显差异。

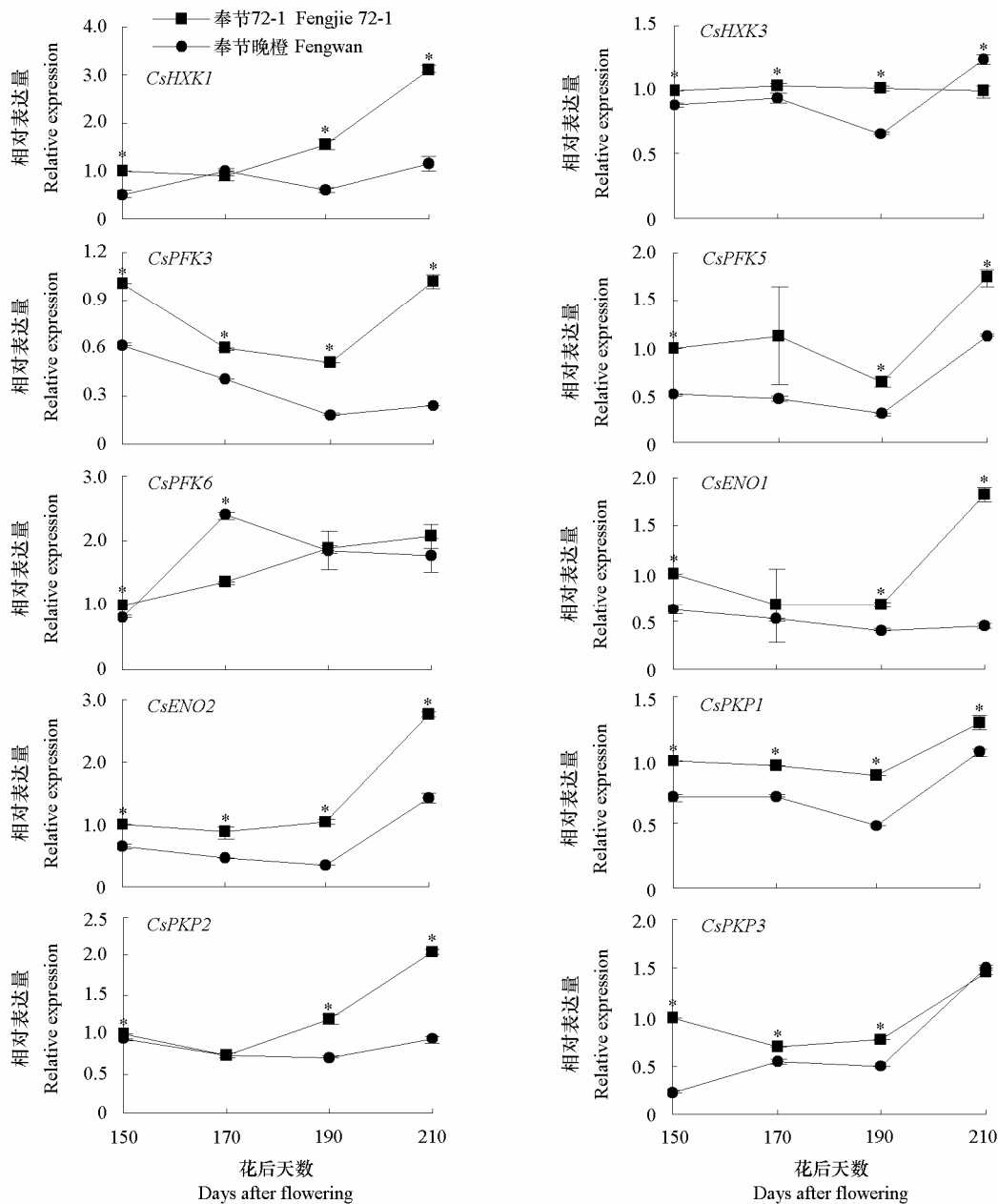


图 1 脐橙果实发育过程中糖酵解途径相关基因表达分析

误差线表示标准差 ( $n=3$ ), \* 表示显著差异 ( $P<0.05$ ). 下同。

Fig. 1 Expression analysis of glycolysis metabolism related genes during orange fruit development

Bars represent the standard error ( $n=3$ ), \* represent statistically significant differences ( $P<0.05$ ). The same below.

## 2.2 柠檬酸合成关键基因的表达

从图2中发现,柠檬酸合成相关基因在晚熟芽变中表达模式基本一致,呈现上升—下降—上升的趋势,而‘奉节72-1’中多数基因(*CsPEPCK*除外)在花后150~190 d表达量逐渐下降,花后190~210 d表达量明显升高。*CsPEPCK*作为与*CsPEPC*功能相反的酶,其在‘奉节72-1’中表达趋势与*CsPEPC1*、*CsPEPC2*、*CsPEPC4*截然相反,但是在芽变中表达趋势与*CsPEPC1*、*CsPEPC2*、*CsPEPC4*相对一致。通过比较相关基因在两者间的表达水平,发现‘奉节72-1’中仅柠檬酸合酶基因*CsCS2*在脐橙果实发育3个时期表达量高于芽变,而*CsCS4*、*CsME1*、*CsME4*、*CsPEPC1*、*CsPEPC2*等基因在芽变中表达水平在花后170~210 d均高于‘奉节72-1’,花后170~190 d差异最为明显,如*CsPEPC*的3个成员,花后170~190 d芽变中表达量明显高于‘奉节72-1’,晚熟芽变*CsPEPC1*的表达量约为‘奉节72-1’的2倍,*CsPEPC2*为3倍。结合柠檬酸含量发现,*CsME1*、*CsME4*与柠檬酸变化趋势较吻合,在‘奉节72-1’与晚熟芽变中表达量分别于花后150 d和170 d达到最高值。

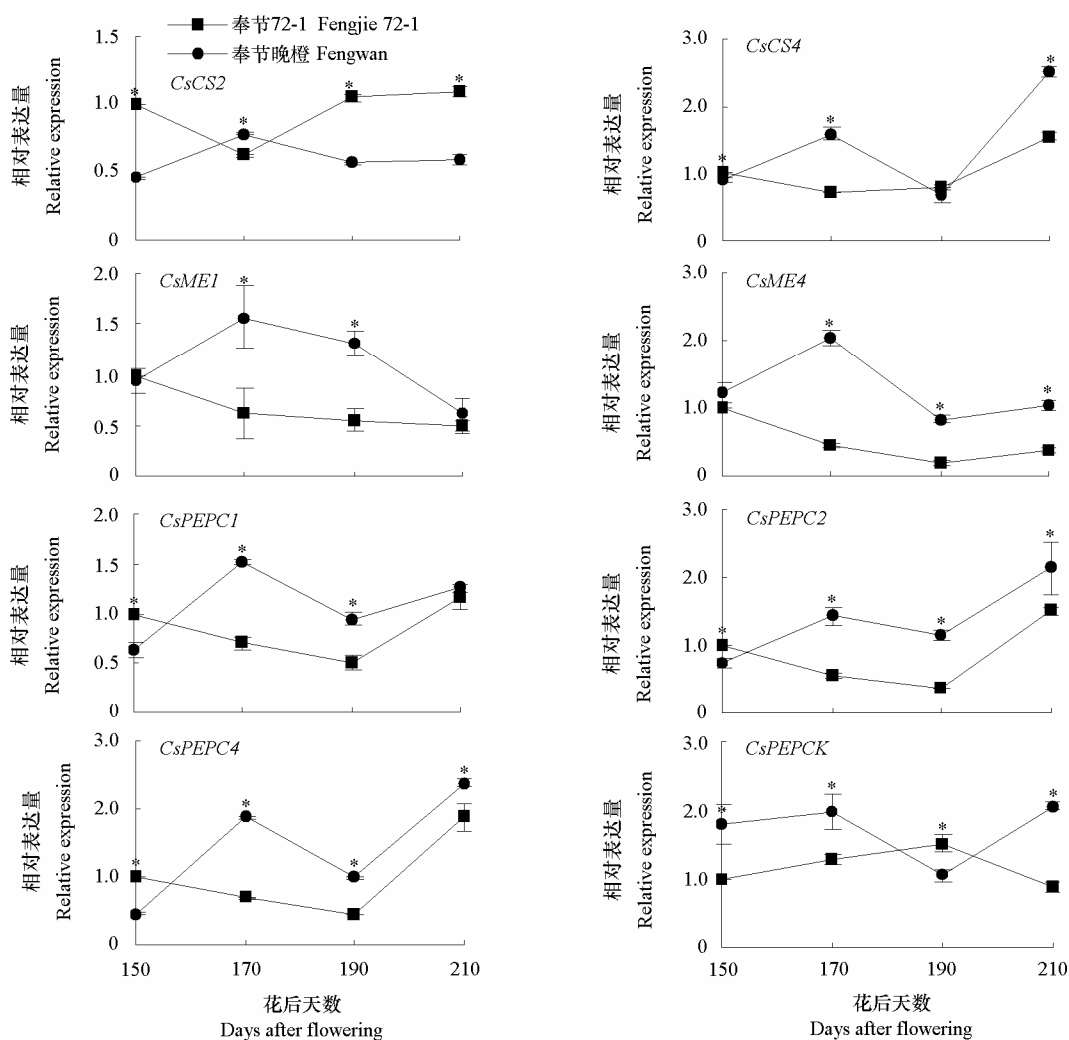


图2 脐橙果实发育过程柠檬酸合成途径关键基因表达分析

Fig. 2 Expression analysis of citric acid biosynthesis genes during orange fruit development

## 2.3 柠檬酸降解相关基因的表达分析

如图 3 所示, 柠檬酸降解相关基因在二者中表达模式差异较大, 其中 *CsACO1*、*CsGAD4*、*CsGS1* 表达较一致, 而 *CsACO2*、*CsACO3*、*CsICDH*、*CsIDH3*、*CsGDH1* 等基因差异很大。顺乌头酸酶

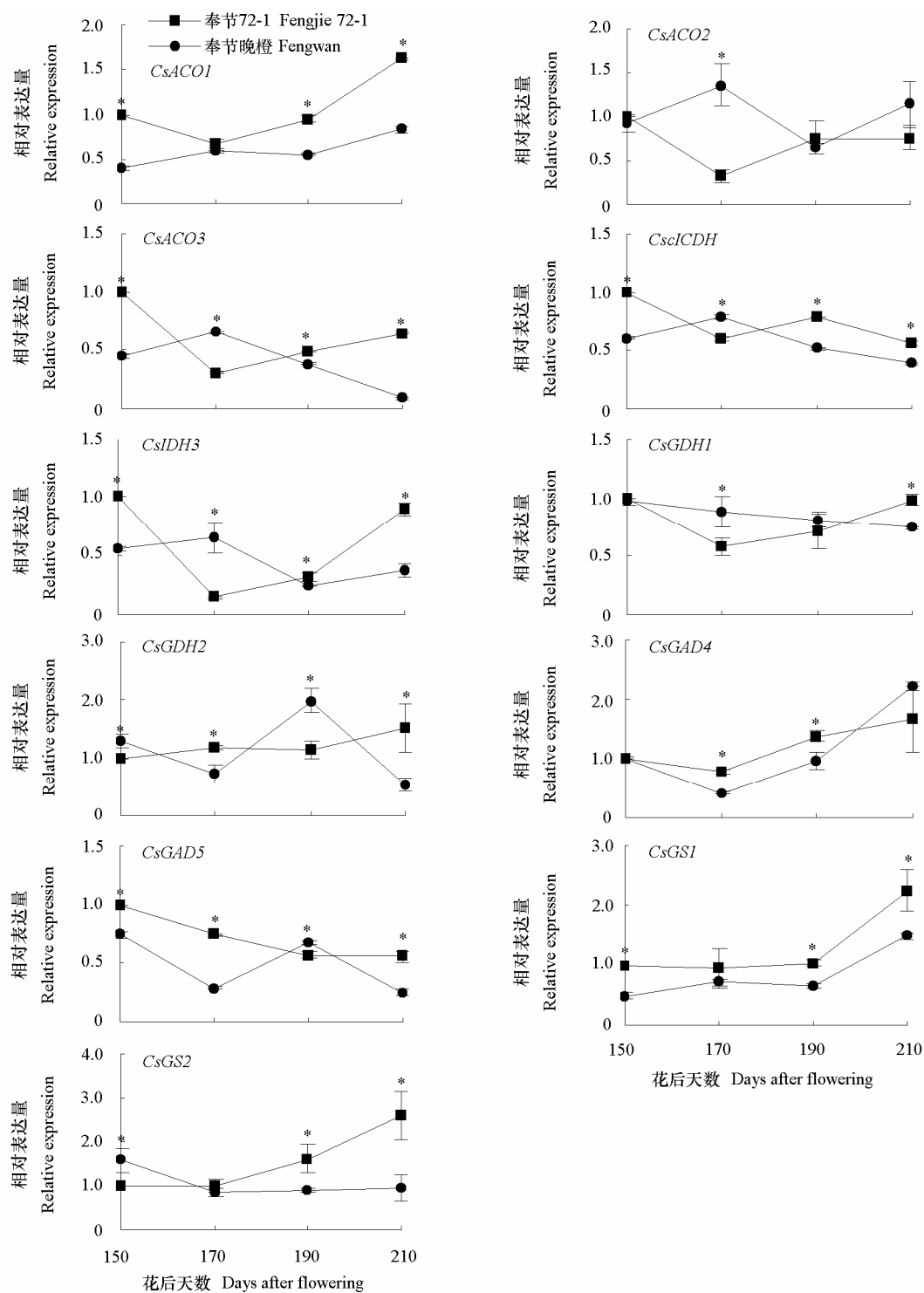


图 3 脐橙果实发育过程柠檬酸降解关键基因表达分析

Fig. 3 Expression analysis of citric acid degradation genes during orange fruit development

(ACO) 催化柠檬酸为异柠檬酸，是柠檬酸降解的第一步。果实发育过程中 3 个 *CsACO* 基因的表达模式各异。*CsACO2* 基因在芽变中仅花后 170 d 表达水平高于‘奉节 72-1’，其余 3 个时期没有显著差异，而 *CsACO1*、*CsACO3* 基因在花后 150、190 及 210 d，‘奉节 72-1’中表达水平均高于芽变。柠檬酸在顺乌头酸酶 (ACO) 作用下降解为异柠檬酸，之后异柠檬酸依次经异柠檬酸脱氢酶 (IDH)、谷氨酸脱氢酶 (GDH) 降解为谷氨酸。

如图 3 所示，花后 170 d，*CsICDH*、*CsIDH3* 两基因在芽变中表达水平高于‘奉节 72-1’，其余 3 个时期表达水平均低于‘奉节 72-1’；而 *CsGDH1*、*CsGDH2* 两基因在二者间表达模式不同。随着果实发育 GABA 途径中 *CsGAD4* 基因在两者间变化趋势一致且表达水平逐渐升高，但是 *CsGAD5* 在两者间差异较大且在‘奉节 72-1’中表达量逐渐下降。另一方面，在 GS 降解途径中，*CsGS1*、*CsGS2* 两基因在‘奉节 72-1’果实发育 4 个时期表达量逐渐升高；在芽变中，*CsGS1* 基因表达水平呈上升趋势，而 *CsGS2* 基因从花后 170 d 开始表达水平趋于稳定。

## 2.4 柠檬酸含量与代谢相关基因的相关性

将柠檬酸含量与代谢相关基因进行相关性分析发现，*CsME1*、*CsME4* 与柠檬酸含量存在较高的正相关性 ( $R = 0.75$ ,  $P = 0.03$ )；( $R = 0.78$ ,  $P = 0.02$ )，而 *CsHXK1*、*CsENO2*、*CsACO1*、*CsGAD4*、*CsGS1* 等基因与柠檬酸含量相关性不显著 (图 4)。

## 3 讨论

柑橘果实柠檬酸代谢是一个错综复杂的过程，其含量的高低是内在遗传特性、外在自然环境和栽培措施共同作用的结果 (陈发兴 等, 2005)。由于‘奉节晚橙’及其野生型‘奉节 72-1’均采自同一果园，排除了环境差异对脐橙果实品质的影响，所以两者的差异源于其内在的遗传特性。

柠檬酸含量是决定柑橘果实成熟的重要指标，‘奉节晚橙’作为‘奉节 72-1’的晚熟芽变表现为成熟的整体延迟，导致其柠檬酸含量下降较晚并且高于‘奉节 72-1’。本研究中发现，花后 150~170 d，*CsCS4*、*CsME1*、*CsME4*、*CsPEPC1* 等基因在‘奉节晚橙’中上调表达，而在‘奉节 72-1’中均下调表达，这与该时期柠檬酸含量的变化趋势一致，说明 *CsCS4*、*CsME1*、*CsME4*、*CsPEPC1* 等是影响柠檬酸合成的关键基因。当果实发育至花后 190~210 d，‘奉节 72-1’及‘奉节晚橙’中柠檬酸合成相关

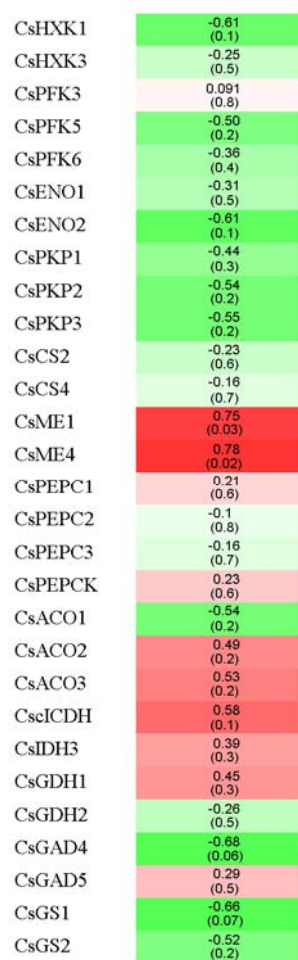


图 4 柠檬酸与相关基因的关联性分析

红色表示正相关，绿色表示负相关，数值分别表示  
相关系数  $R$  和  $P$  值 (括号)。

Fig. 4 Correlation analysis of citric acid and related genes

Red indicate positive correlation, green indicate negative correlation.

The numbers in each cell indicate correlation coefficient

$R$  and  $P$  value, respectively.

基因 *CsME4*、*CsPEPC1*、*CsPEPC2* 上调表达, 但其降解基因 *CsACO1*、*CsGAD4*、*CsGS1* 在该时期表达量升高, 并且明显高于花后 150 ~ 190 d, 导致果实发育后期柠檬酸含量逐渐降低, 揭示了 *CsACO1*、*CsGAD4*、*CsGS1* 在柠檬酸降解过程中发挥重要作用。

陈明 (2013) 比较了普通椪柑及其早熟芽变, 发现柠檬酸含量差异明显, 导致柠檬酸含量的差异与 *CS*、*PEPC* 等合成关键基因无直接关系, 而与降解途径中一系列基因 (*CitAco3*、*CitIDH1*、*CitIDH3*、*CitGAD4*、*CitGAD5*、*CitGS2*) 高丰度表达相关。而本研究中发现 ‘奉节晚橙’ 柠檬酸含量高于 ‘奉节 72-1’ 与 *CsCS4*、*CsME1*、*CsME4*、*CsPEPC1* 等基因高表达及 *CsACO1*、*CsGAD4*、*CsGS1* 降解基因表达水平低相关, 相关性分析进一步说明 *CsME1*、*CsME4* 可能是影响柠檬酸含量差异的关键基因。有研究表明, 柑橘不同品种的柠檬酸含量与 *CS*、*PEPC*、*NAD-IDH*、*ACO* 和 *PEPC/NAP-IDH* 比值相关, 并且其差异可能是上述代谢酶一种或几种综合作用的结果 (罗安才 等, 2003)。与前人研究的差异可能是由于柑橘不同品种所导致的。此外, 本研究中还发现同一家族不同成员的表达存在差异, 说明其具有不同的表达调控模式。

糖酵解与柠檬酸合成存在密切关系。首先, 糖酵解产生的丙酮酸通过氧化脱羧形成的乙酰CoA 是连接三羧酸循环的中心环节 (王金胜, 2003)。其次, *PEPCK*、*PEPC* 通过调节 *PEP* 与 *OAA* 之间的转化、苹果酸合酶 (*ME*) 通过参与苹果酸的合成来共同影响柠檬酸的代谢 (Coursol et al., 2000)。结合本研究, 发现糖酵解途径多数基因在 ‘奉节 72-1’ 中表达量显著高于 ‘奉节晚橙’, 而柠檬酸合成基因 *CsCS4*、*CsME1*、*CsME4*、*CsPEPC1* 等在 ‘奉节 72-1’ 中表达量显著低于 ‘奉节晚橙’。说明糖酵解途径的增强促进了乙酰CoA 的产生, 但是从另一方面却降低了草酰乙酸及苹果酸的含量, 从而使得 ‘奉节 72-1’ 中柠檬酸的合成减少。此外, 研究表明, *PEPCK* 在果实成熟过程中参与糖异生作用, 间接地将苹果酸转化为糖 (Bahrami et al., 2001; Walker et al., 2011)。Sweetman 等 (2009) 同样发现, *PEPCK* 催化 *OAA* 为 *PEP* 在有机酸向糖的转化方面发挥作用, 并且在分流苹果酸进入有机酸代谢也起着非常重要的作用。本试验中 *CsPEPCK* 基因在 ‘奉节晚橙’ 与 ‘奉节 72-1’ 果实发育 4 个时期差异均较显著, 但是其关键作用还需进一步探讨。

分析发现, 花后 190 ~ 210 d, 糖酵解途径关键基因 *CsH XK1*、*CsP FK3*、*CsP FK5* 等均上调表达, 揭示了果实发育后期糖酵解代谢不断增强, 这与 Lin 等 (2015) 的结果一致。而这同时又影响了柠檬酸的合成, 导致果实成熟后期柠檬酸含量不断减少。结合以上分析, 说明糖酵解途径参与果实成熟的多种代谢途径并且与柠檬酸合成相关基因存在复杂的调控机制。

本研究中以特定的柑橘晚熟芽变材料展开, 由于柑橘不同品种及相关基因存在差异, 因此柑橘果实柠檬酸生理代谢及关键基因的作用还需进一步探讨和验证。

## References

- Bahrami A R, Chen Z H, Walker R P, Leegood R C, Gray J E. 2001. Ripening-related occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase in tomato fruit. *Plant Mol Biol*, 47: 499 - 506.
- Bogin E, Wallace A. 1966. CO<sub>2</sub> fixation in preparation from Tunisian Swell Lemon and Eureka Lemon fruits. *Pro Amer Soc Eor Hort Sci*, 88: 298 - 307.
- Cercos M, Soler G, Iglesias D J, Gadea J, Forment J, Talon M. 2006. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant Molecular Biology*, 62: 513 - 527.
- Chen Fa-xing, Liu Xing-hui, Chen Li-song. 2005. Advances in research on organic acid metabolism in fruits. *Journal of Fruit Science*, 22 (5): 526 - 531. (in Chinese)
- 陈发兴, 刘星辉, 陈立松. 2005. 果实有机酸代谢研究进展. *果树学报*, 22 (5): 526 - 531.
- Chen M, Xie X, Lin Q, Chen J, Grierson D, Yin X, Sun C, Chen K. 2013. Differential expression of organic acid degradation-related genes during



- fruit development of Navel oranges (*Citrus sinensis*) in two habitats. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31: 1131 - 1140.
- Chen Ming. 2013. Expression and its regulation of citric acid synthesis and degradation related genes in the fruits of Ponkan and Navel orange [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 陈明. 2013. 椪柑和脐橙果实柠檬酸合成与降解相关基因表达及其调控研究[博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Coursol S, Pierre J N, Vidal J. 2000. Role of the phosphoinositide pathway in the light-dependent C4 phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation cascade in *Digitaria sanguinalis* protoplasts. *Biochemical Society Transactions*, 28: 821 - 823.
- Gong Rong-gao, Lü Xiu-lan, Zhang Guang-lun, Zeng Xiu-li, Luo Nan, Hu Qiang. 2006. Study on the organic acid-metabolizing enzymes in Robertson Navel orange fruit collected from different habitats. *Journal of Fruit Science*, 23 (6): 805 - 808. (in Chinese)
- 龚荣高, 吕秀兰, 张光伦, 曾秀丽, 罗楠, 胡强. 2006. 罗伯逊脐橙在不同生境下果实有机酸代谢相关酶的研究. *果树学报*, 23 (6): 805 - 808.
- Haffner R C, Wallace A. 1959. Dark fixation of CO<sub>2</sub> in homogenates from citrus leaves, fruits, and roots. *Pro Amer Soc Hort Sci*, 74: 348 - 357.
- Lin Q, Wang C, Dong W, Jiang Q, Wang D, Li S, Chen M, Liu C, Sun C, Chen K. 2015. Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. *Gene*, 554: 64 - 74.
- Liu Yong-zhong. 2006. Formation mechanism of a late-ripening bud mutant of Navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 刘永忠. 2006. 脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 晚熟芽变性状形成机理研究[博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Luo An-cai, Yang Xiao-hong, Deng Ying-yi, Li Chun-fan, Xiang Ke-shu, Li Dao-gao. 2003. Organic acid concentrations and the relative enzymatic changes during the development of citrus fruits. *Scientia Agricultura Sinica*, 36 (8): 941 - 944. (in Chinese)
- 罗安才, 杨晓红, 邓英毅, 李纯凡, 向可术, 李道高. 2003. 柑橘果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化. *中国农业科学*, 36 (8): 941 - 944.
- Sadka A, Artzi B, Cohen L, Dahan E, Hasdai D, Tagari E, Erner Y. 2000. Arsenite reduces acid content in *Citrus* fruit, inhibits activity of citrate synthase but induces its gene expression. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125: 288 - 293.
- Schwender J, Ohlrogge J B. 2002. Probing *in vivo* metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *PlantPhysiol*, 130: 347 - 361.
- Sheen J, Zhou L, Jang J C. 1999. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 410 - 418.
- Shimada T, Nakano R, Shulaev V, Sadka A, Blumwald E. 2006. Vacuolar citrate/H<sup>+</sup> symporter of citrus juice cells. *Planta*, 224: 472 - 480.
- Sun X, Zhu A, Liu S, Sheng L, Ma Q, Zhang L, Mohamed E, Nishawy E, Zeng Y, Xu J, Ma Z, Cheng Y, Deng X. 2013. Integration of metabolomics and subcellular organelle expression microarray to increase understanding the organic acid changes in post-harvest citrus fruit. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55: 1038 - 1053.
- Sweetman C, Deluc L Q, Cramer G R, Ford C M, Soole K L. 2009. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*, 70: 1329 - 1344.
- Terol J, Soler G, Talon M, Cercos M. 2010. The aconitate hydratase family from *Citrus*. *Bmc Plant Biology*, 10: 222.
- Walker R P, Battistelli A, Moscatello S, Chen Z H, Lee Good R C, Famiani F. 2011. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cherry (*Prunus avium* L.) fruit during development. *Journal of Experimental Botany*, 62: 5357 - 5365.
- Wang Jin-sheng. 2003. Basic biochemistry. Beijing: China Forestry Publishing House: 211 - 213. (in Chinese)
- 王金胜. 2003. 基础生物化学. 北京: 中国林业出版社: 211 - 213.
- Weber A P. 2004. Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 247 - 253.
- Wu J, Su S, Fu L, Zhang Y, Chai L, Yi H. 2014a. Selection of reliable reference genes for gene expression studies using quantitative real-time PCR in navel orange fruit development and pummelo floral organs. *Scientia Horticulturae*, 176: 180 - 188.
- Wu J, Xu Z, Zhang Y, Chai L, Yi H, Deng X. 2014b. An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1651 - 1671.
- Xiong Jing-jing. 2007. Studies on the metabolism of fruit organic acids in postharvest citrus [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 熊晶晶. 2007. 柑橘果实采后有机酸代谢研究[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.