



易明亮,张王妮,杨莉,等.‘马家柚’果实发育期有机酸含量变化及柠檬酸代谢相关基因的表达分析[J].江西农业大学学报,2022,44(4):841–851.

YI M L,ZHANG W N,YANG L,et al.Analysis of organic acid content and expression of citric acid metabolism related genes during fruit development of ‘Majia’ pomelo[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2022,44(4):841–851.

‘马家柚’果实发育期有机酸含量变化及柠檬酸代谢相关基因的表达分析

易明亮¹,张王妮^{1,2*},杨莉¹,匡柳青¹,刘德春¹,刘勇¹,胡威^{1*}

(1.江西农业大学 农学院/江西省井冈蜜柚繁育与栽培技术工程中心,江西 南昌 330045;2.陕西枫丹百丽生物科技有限公司,陕西 宝鸡 721199)

摘要:【目的】明确江西省地方特色品种‘马家柚’果实发育期有机酸的变化规律及其与柠檬酸相关基因表达量的关系,揭示‘马家柚’果实品质形成的分子机制。【方法】研究以‘马家柚’发育期果实为材料,应用高效液相色谱技术(HPLC)测定花后60~210 d果实中有机酸组分及含量,以及通过荧光定量PCR分析柠檬酸合成、转运和降解相关基因表达量的变化,分析柠檬酸变化规律与相关基因表达量的联系。【结果】‘马家柚’果实发育期有机酸呈先上升后下降的趋势,柠檬酸含量占总有机酸的45.51%~81.47%,且其变化趋势与有机酸变化趋势一致。在整个果实发育期柠檬酸合成基因*CmPEPC1*、*CmPEPC2*、*CmCS1*和*CmCS2*相对表达量变化与柠檬酸含量变化趋势不同;柠檬酸运输相关基因*CmCHX*和*CmVHP2*表达量的变化与柠檬酸积累趋势也不一致,但*CmDIC*基因在果实发育前期的下调表达促进了柠檬酸的快速积累,同时*CmVHA-c4*的表达与柠檬酸积累密切相关;与降解相关的*CmGS2*和*CmACLβ1*基因均在柠檬酸快速增长期时开始下调表达,但在果实成熟期柠檬酸含量下降时表达量变化不大。同时*CmAco3*、*CmGAD5*和*CmGABA-T*均在花后210 d果实成熟期柠檬酸含量下降时表达量达到最高并且显著高于花后195 d。【结论】‘马家柚’果实有机酸在果实膨大期持续上升,而在成熟期后开始下降,并且有机酸的含量及变化趋势均由柠檬酸决定。柠檬酸的积累不受柠檬酸合成相关基因表达的直接影响,而是由柠檬酸转运载体基因以及降解基因的表达决定。在果实发育前中期,柠檬酸的积累主要受*CmDIC*、*CmVHA-c4*、*CmGS2*以及*CmACLβ1*基因的调控,其降解主要通过谷氨酰胺和乙酰辅酶A途径进行,而在果实发育后期柠檬酸的积累在受*CmVHA-c4*基因调控的同时也受*CmAco3*、*CmGAD5*和*CmGABA-T*的调控,其降解主要通过GABA途径进行。

关键词:‘马家柚’;果实发育;柠檬酸;基因表达

中图分类号:S666.2 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2022)04-0841-11

Analysis of Organic Acid Content and Expression of Citric Acid Metabolism Related Genes During Fruit Development of ‘Majia’ Pomelo

YI Mingliang¹,ZHANG Wangni^{1,2*},YANG Li¹,KUANG Liuqing¹,
LIU Dechun¹,LIU Yong¹,HU Wei^{1*}

收稿日期:2021-12-27 修回日期:2022-02-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31860539)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(31860539)

作者简介:易明亮,orcid.org/0000-0003-1958-7983,1962498452@qq.com; *共同第一作者; *通信作者,胡威,助理研究员,博士,主要从事果树发育生理及分子遗传育种研究,orcid.org/0000-0002-1733-5574,wei.hu@jxau.edu.cn。

(1.College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University/Engineering Center of ‘Jinggang’ Honey Pomelo Breeding and Cultivation Technology of Jiangxi Province, Nanchang 330045, China; 2.Shaanxi Fontaine Belle Biological Technology Co.Ltd, Baoji, Shaanxi 721199, China)

Abstract: [Objective] This study aims to determine the variation of organic acid content and its relationship with the expression of citric acid metabolism-related genes in ‘Majia’ pomelo during the fruit development and ripening, thus revealing the molecular mechanism of citrus fruit quality formation. [Method] The content of organic acid in the fruit at 60–210 days post-anthesis (DPA) of ‘Majia’ pomelo was detected with high-performance liquid chromatography (HPLC). The relative expression of genes involved in the citric acid synthesis, transport, and degradation were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). Finally, the correlation between the change of citric acid content and the expression level of metabolism-related genes was analyzed. [Result] The organic acids concentration of ‘Majia’ pomelo fruits increased first and then decreased during the development period. Citric acid content accounted for 45.51%–81.47% of the total organic acids, and its changing trend was consistent with that of organic acids. The change of relative expression of citrate synthesis genes *CmPEPC1*, *CmPEPC2*, *CmCS1*, and *CmCS2* was inconsistent with the change trend of citric acid accumulation. The relative expression of citric acid transport-related genes *CmCHX* and *CmVHP2* had no relationship with citric acid accumulation, but the down-regulated expression of the *CmDIC* gene promoted the rapid accumulation of citric acid in the early stage of fruit development, and the expression of the proton pump gene *CmVHA-c4* was also closely related to citric acid accumulation. Citric acid degradation-related genes *CmGS2* and *CmACLB1* began to be down-regulated during the period of citric acid rapid accumulation, but their expression levels did not change significantly when the citric acid content decreased during the fruit ripening period. Simultaneously, the expression level of *CmAco3*, *CmGAD5*, and *CmGABA-T* genes all reached peak value when the citric acid content decreased on the 210 DPA which is fruit ripening period, were significantly higher than these genes expression on the 195 DPA. [Conclusion] Organic acid concentration of ‘Majia’ pomelo fruit was consistently increased during the fruit swelling period, and then decreased during the ripening period, the content and variation of organic acid were determined by citric acid in fruit. The accumulation of citric acid is not directly determined by citric acid synthesis-related genes but by citric acid transport-related and degradation-related genes. In the early and middle stages of fruit development, the accumulation of citric acid is mainly regulated by *CmDIC*, *CmVHA-c4*, *CmGS2*, and *CmACLB1* genes, and its degradation occurs mainly through the glutamine and acetyl-CoA pathway, while the accumulation of citric acid in the late stage of fruit development is not only regulated by the *CmVHA-c4* gene, but also regulated by *CmAco3*, *CmGAD5*, and *CmGABA-T* genes, and its degradation is mainly through the GABA pathway.

Keywords: ‘Majia’ pomelo; fruit development; citric acid; gene expression

【研究意义】‘马家柚’ [*Citrus maxima* (Burm.) Merr., Rutaceae] 是江西名优柑橘品种, 在上饶市广丰地区广泛种植, 其果肉呈红色、果味清香、风味独特, 享有江西省酸柚类第一名的美誉^[1]。有机酸含量的高低是柚类果实独特品质形成的重要指标之一^[2-3], 对果实口感具有决定性作用。因此研究‘马家柚’果实发育过程中各有机酸含量的变化规律及柠檬酸合成、降解、转运相关基因的表达变化对探究其果实品质形成机制具有重要价值。【前人研究进展】果实中不同的有机酸比例形成其独特的风味品质, 不同柑橘品种的柠檬酸代谢机制也存在差异。高阳等^[4]研究发现‘靖安椪柑’果实有机酸各组分中柠檬酸含量最高, 奎宁酸、酒石酸次之, 而苹果酸最低。柑橘果实发育过程中有机酸变化与柠檬酸代谢密切相关, 柠檬酸的代谢大致分为合成、转运、降解3个环节。在细胞质内, 柠檬酸的合成始于磷酸烯醇式丙酮酸经羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 羧化, 而后经柠檬酸合成酶 (citrate synthase, CS) 的催化合成柠檬酸^[5]。林琼^[6]的研究结果表明 *CitPEPCs* 和 *CitCSs* 基因的上调表达导致了露地栽培的椪柑柠檬酸含量显著

高于温室栽培果实。柠檬酸在线粒体中合成后,转运到植物细胞液泡中储存,在液泡膜上,柠檬酸的转运受到质子泵的调控^[7],其中液泡膜上的质子泵 H^+ -ATP酶(V-ATPase)和 H^+ -焦磷酸化酶(V-PPase)通过水解ATP释放能量并不断的泵入 H^+ 以维持液泡中的酸性环境^[8-9]。Yao等^[10]在苹果上分别鉴定出V-ATPase和V-PPase的编码基因*MdVHPI*和*MdVHA-A*,同时证明这两个基因都与苹果中有机酸的积累有关;Li等^[11]在柑橘中也发现了液泡膜质子泵编码基因*CitVHA-c4*与柑橘果实柠檬酸积累密切相关。另外,CHX(cation/ h^+ exchanger)作为阳离子和氢离子的交换蛋白,可以通过增加液泡膜内的电化学梯度来调控柑橘果实中的柠檬酸积累^[12],同时有研究表明*CitCHX*和二羧酸转运载体基因(dicarboxylate carrier gene,*CitDIC*)参与柑橘类水果中热空气激活的柠檬酸盐的降解^[13]。柠檬酸降解始于从液泡中释放后在细胞质内经顺乌头酸酶(Aconitase, Aco)转化为异柠檬酸,而后经NADP-异柠檬酸脱氢酶(NADP-isocitrate dehydrogenase, NADP-IDH)生成谷氨酸,谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)或谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)作用下经谷氨酰胺或 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)途径进行降解。陈明^[14]的研究结果显示*CitAco3*、*CitGAD4/5*、*CitGS2*的转录丰度在低酸早熟椪柑果实中均显著高于高酸的普通椪柑。曹淑燕等^[15]研究砧木对黄果柑有机酸的影响,表明通过嫁接可显著提高黄果柑NADP-IDH活性,降低果实中有机酸含量。此外,柠檬酸还可能在ATP-柠檬酸裂合酶(ATP citrate lyase, ACL)的作用下,经乙酰辅酶A降解途径生成草酰乙酸和乙酰辅酶A,然后参与类黄酮等次生代谢物合成^[16]。罗丽娟等^[17]研究表明低温处理可显著降低温州蜜柑*ACOs*和*ACLβ1*基因的表达水平,同时提高汁胞中柠檬酸含量。【本研究切入点】目前,‘马家柚’前期研究多集中在气象因子、土壤环境以及栽培管理措施等外在因素对果实品质的影响^[18-20],而关于‘马家柚’果实发育阶段有机酸各组分含量变化规律及其与柠檬酸代谢相关基因表达量变化的内在联系和机制研究鲜有报道。【拟解决的关键问题】为了解‘马家柚’果实发育过程中柠檬酸代谢的分子机制,本研究对‘马家柚’果实发育阶段的有机酸各组分及柠檬酸代谢相关基因的表达进行分析,以期鉴定其柠檬酸代谢的关键基因,为良种‘马家柚’的栽培管理及品质调控提供理论指导依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

‘马家柚’果实于2018年6月开始采自江西省上饶市广丰区芦林镇果园,选定6棵长势相同且树龄在10年以上的成年结果树,2棵为一次生物学重复,在盛花后60(S1),75(S2),90(S3),105(S4),120(S5),135(S6),150(S7),165(S8),180(S9),195(S10),210 d(S11)直至果实成熟,每个时期分别采集6个果实,选取成熟度和大小均一、无病虫害无机械损伤的正常果实,剥取赤道处果肉用液氮速冻,于-80℃低温中保存。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 有机酸的提取与含量测定 果实有机酸的提取参考陈明^[14]的方法,采用高效液相色谱法(HPLC)测定有机酸各组分含量。有机酸测定的色谱条件为:Water C18柱(4.6 mm×250 mm),柱温为25℃,流动相为0.05 mol/L的磷酸氢二氨水溶液(pH=2.7),流速为0.5 mL/min;二极管阵列检测器检测。总有机酸含量是柠檬酸、苹果酸、酒石酸、奎尼酸含量之和。

1.2.2 RNA的提取与逆转录 果肉RNA的提取采用华越洋快速通用植物RNA提取试剂盒,采用琼脂糖凝胶电泳法对提取的RNA进行检测,RNA逆转录采用TaKaRa公司(型号为Cat.#RR047A)反转录试剂盒合成第一链cDNA。

1.2.3 荧光定量 使用Bio-RAD荧光定量PCR仪,日本TaKaRa公司的SYBR Premix EX Taq™荧光定量酶进行q-PCR基因的定量表达分析,其中内参基因(Actin)与柠檬酸相关基因引物设计参考Lin等^[13]、Guo等^[21]的设计(表1),引物序列委托生工生物工程股份有限公司合成,PCR反应体系采用Jiang等^[22]的设计,每个样品设置3个生物学重复,基因相对表达量分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法。

1.3 数据统计与分析

数据统计及整理采用Office365 Excel 2019软件,数据分析利用IBM SPSS软件进行Duncan式方差分析以及LSD检验差异显著性($P<0.05$),最后采用Origin2018软件进行图形制作。

表 1 荧光定量PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences of real-time fluorescence quantitative PCR

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增长度/bp
Gene name	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')	Amplicon size
<i>CmPEPC1</i>	CGTGCTTCTCGTTACTTCCGT	TGGGCCTTGTCATCATGTCC	248
<i>CmPEPC2</i>	GGCATGCAAAACACTGGTTA	CATGTTCATTACGGCTTGGA	130
<i>CmCS1</i>	GGTGCCCCAATATTAACAA	AGAGCTCGGTCCCATATCAA	177
<i>CmCS2</i>	ACTGGTGTATGGATGCGACA	TCTTCGTCTTGTGGCATTTC	105
<i>CmACLα1</i>	GATACTGTTGGAGACTTGGG	GCTCTCTTACGACCATCAGG	143
<i>CmACLβ1</i>	GAGGAGATAACAGAGACAAA	AACAAAGAGCCCATTTCAGAT	251
<i>CmAco3</i>	TGCAGCAATGAGGTACAAGGC	TCACACCCAGAAGCATTGGAC	116
<i>CmNAD-IDH2</i>	CAGCACCTGATATTGCTGGA	CTCTGCAATTGTGCTCAGGA	137
<i>CmNAD-IDH3</i>	AGCAGGAAACGTGGGTAATG	GGCAGCAATAACAGCATCAA	223
<i>CmGS2</i>	TTTGGGATGCTCAGTTGTGA	CTGAATGGCTCCCAAAAATG	100
<i>CmGAD1</i>	CACCAAAAAGAATGAGGAGACC	CCGTACTTGTGACCACTGACAT	153
<i>CmGABA-T</i>	CGCAAAGGCCCTTTCTTCA	ACAGGAAACAGGATGCCCAGA	142
<i>CmCHX1</i>	GTCTCCGTAACAGGCATTGG	ACCACTAAGGGAAGCGTTCA	147
<i>CmDIC</i>	TGACAAAGACTCCAACCGCA	ATCGCGTCGATTACGCTCTT	174
<i>CmVHA-c4</i>	GTACCGGAATTAACCCTAAGGC	CCAGCGGAGAGACCAGCAAG	100
<i>CmVHP2</i>	TGAGCCACAGAATCAGAGAGAGAA	GCACCAACAATCAAACCAATAAAC	196
<i>Actin</i>	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA	TTCCTGTGGACAATGGATGGA	200

2 结果与分析

2.1 ‘马家柚’果实发育过程中有机酸含量的变化

从图 1 可观察到‘马家柚’果实从幼果到成熟过程中的变化,S1~S9 时期(花后 60~180 d)为果实膨大期,果实横纵径及单果质量逐渐变大,之后果实不再膨大进入成熟期,同时 S7~S10 时期果皮由绿转黄的同时果肉也逐渐变红。在发育过程中‘马家柚’果实中柠檬酸含量在膨大期呈上升趋势,在 S1~S5 时期上升较为缓慢,之后在 S6~S9 时期即膨大后期快速上升。成熟初期柠檬酸含量继续上升,至 S10 时期时达到最大值 5.85 mg/g,之后开始显著下降(图 2)。从图 2 中可以看到柠檬酸含量变化趋势与总有机酸基本相同,在果实膨大期不断上升而在果实成熟期后开始下降。从‘马家柚’果实整个发育期来看,柠檬酸的积累可以分为缓慢增长期(S1~S5)、快速增长期(S5~S10)和下降期(S10~S11)。而苹果酸、酒石酸和奎宁酸含量在发育期间变化量不大。‘马家柚’果实中柠檬酸含量始终最高,占总有机酸含量的 45.51%~81.47%,苹果酸含量占总有机酸含量的 3.07%~24.56%,酒石酸含量占总酸含量的 5.65%~27.88%,奎尼酸占总有机酸含量的 5.62%~23.6%,由此表明,‘马家柚’果实发育至成熟期间主要的有机酸是柠檬酸,总有机酸变化趋势主要由柠檬酸含量决定。

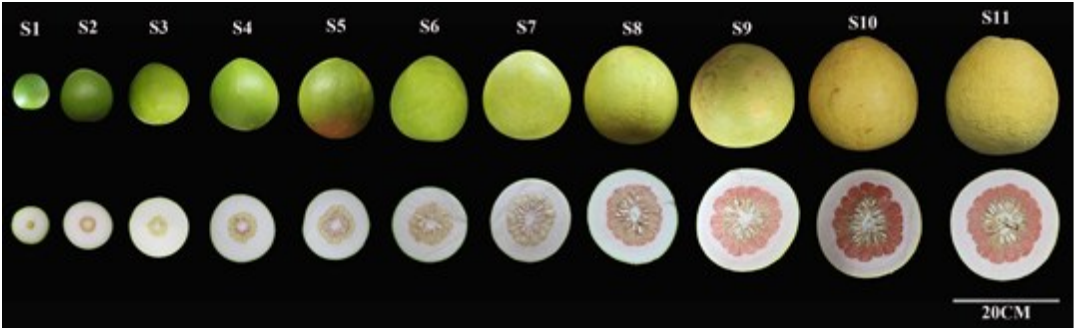


图 1 ‘马家柚’发育过程中果实变化

Fig.1 Fruit and cross section during development of ‘Majia’ pomelo

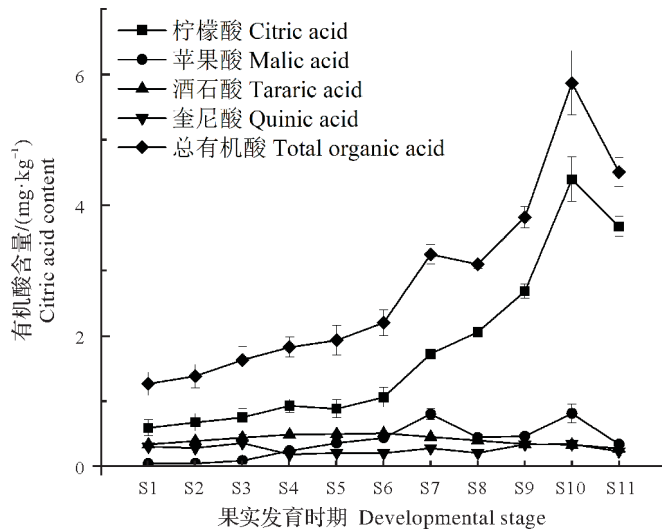
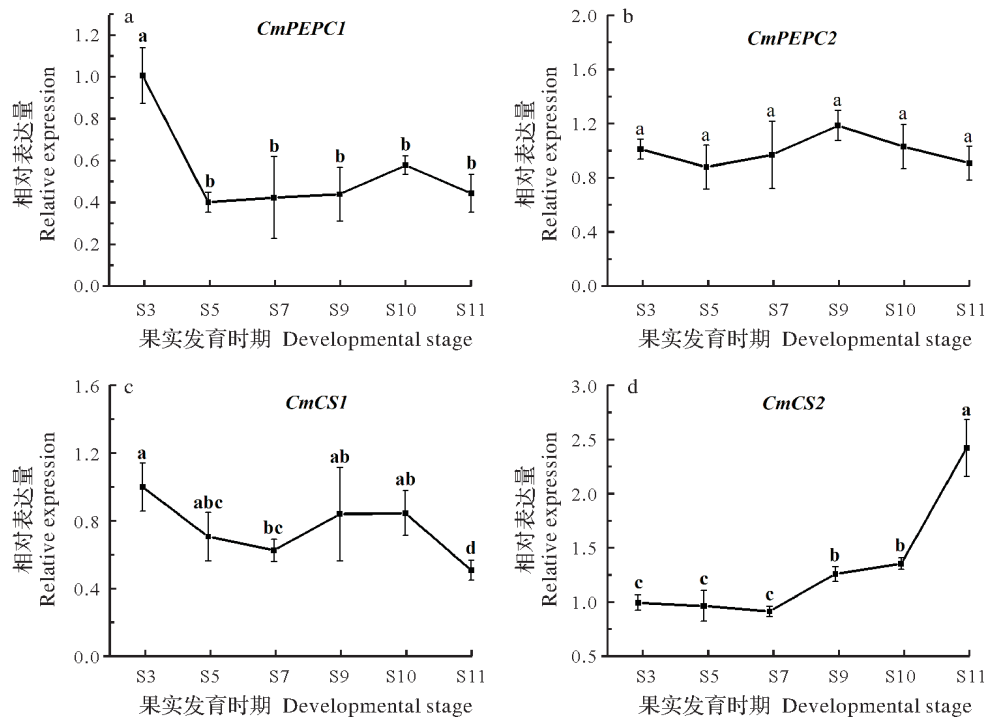


图2 ‘马家柚’果实发育期有机酸含量

Fig.2 Organic acid content of ‘Majia’ pomelo during fruit development

2.2 ‘马家柚’果实发育期柠檬酸合成相关基因的表达

对柠檬酸积累的3个阶段具有代表性的S3、S5、S7、S9、S10、S11时期进行柠檬酸代谢相关基因的表达分析。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和柠檬酸合成酶(CS)参与了柑橘柠檬酸的合成。由图3a可知在‘马家柚’整个果实发育过程中,*CmPEPC1*在S3时期表达量相对较高,在S5~S11时期保持较低水平稳定表达且无显著变化。由图3b可知,*CmPEPC2*基因相对表达量在S3~S11整个时期相对稳定且无明显变化,两个基因的表达趋势与柠檬酸积累趋势并不一致。



不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平的差异显著性。

Different small letters indicate significant differences at the level of $P<0.05$.

图3 ‘马家柚’果实发育期柠檬酸合成相关基因的表达量

Fig.3 Expression of genes related to citric acid synthesis during fruit development of ‘Majia’ pomelo

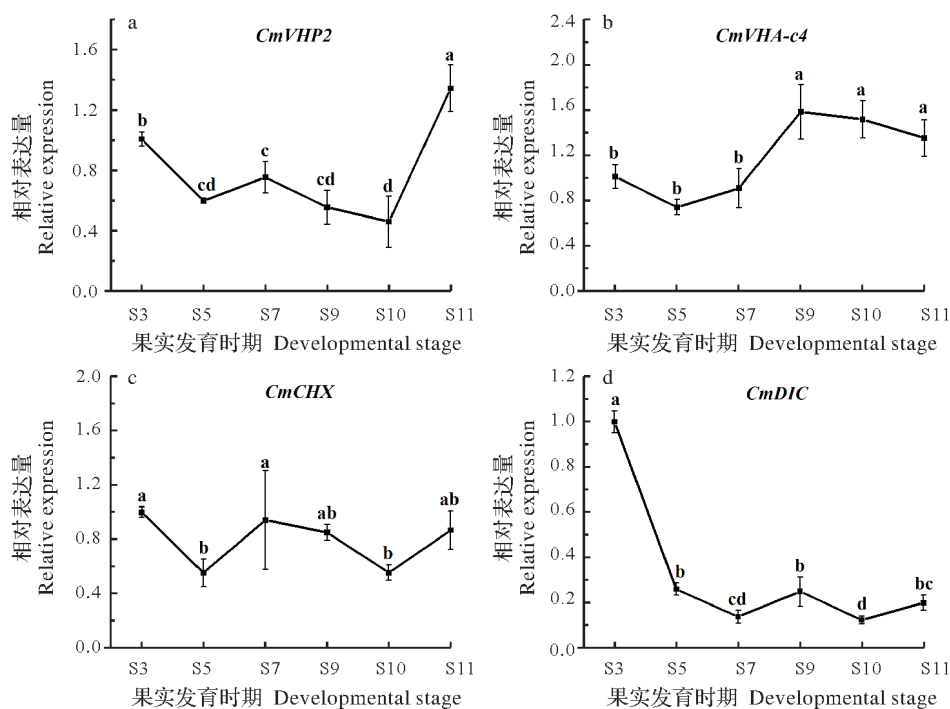
由图3c可知,*CmCS1*基因相对表达量在S3~S7时期持续下降,在S9~S10时期又重新上升,到S11时*CmCS1*基因相对表达量则显著下降至0.51。由图3d可知,*CmCS2*基因的相对表达量在S3~S7期间无明显

显变化,之后一直呈上升趋势,在成熟期S10~S11时期相对表达量急剧上升,达到最高值2.43(图3)。由此表明 *CmCSs* 基因的表达式变化对柠檬酸含量没有影响。

2.3 ‘马家柚’果实发育期柠檬酸转运相关基因表达

质子泵可以为柠檬酸转运到液泡贮藏而提供动力,对果实中有机酸积累具有正向调节作用。质子泵基因 *CmVHP2* 的相对表达量在S3~S10时期整体呈下调表达趋势,在S10时期达到最低相对表达量0.43,S11时期显著上升至最大值1.35,其变化趋势与柠檬酸变化趋势并不一致(图4a)。质子泵基因 *CmVHA-c4* 在果实发育期S5~S9呈上升趋势,在S9时期达到最高值后缓慢下降,S10时期虽有下降但并不显著(图4b),因而其变化趋势与柠檬酸的积累模式类似,可能对柠檬酸的积累起重要作用。

H⁺反向转运蛋白基因 *CmCHX* 相对表达量呈先降低后上升再缓慢降低再上升的波动趋势,与果实柠檬酸含量的变化规律没有联系(图4c)。二羧酸载体基因 *CmDIC* 在S3时期相对表达量最高,至S5时期时显著下降,并维持相对低水平表达,而此时从S5时期开始果实柠檬酸积累刚好进入快速增长期,至S10时期开始后进入下降期,而S11时期 *CmDIC* 基因表达量相对于S10时期显著上调(图4d)。由此表明柠檬酸含量受到 *CmDIC* 基因的负调控,其对‘马家柚’果实柠檬酸积累具有重要作用。



不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平的差异显著性。

Different small letters indicate significant differences at the level of $P < 0.05$.

图4 ‘马家柚’果实发育期有机酸转运相关基因表达

Fig.4 Expression of organic acid transport related genes during fruit development of ‘Majia’ pomelo

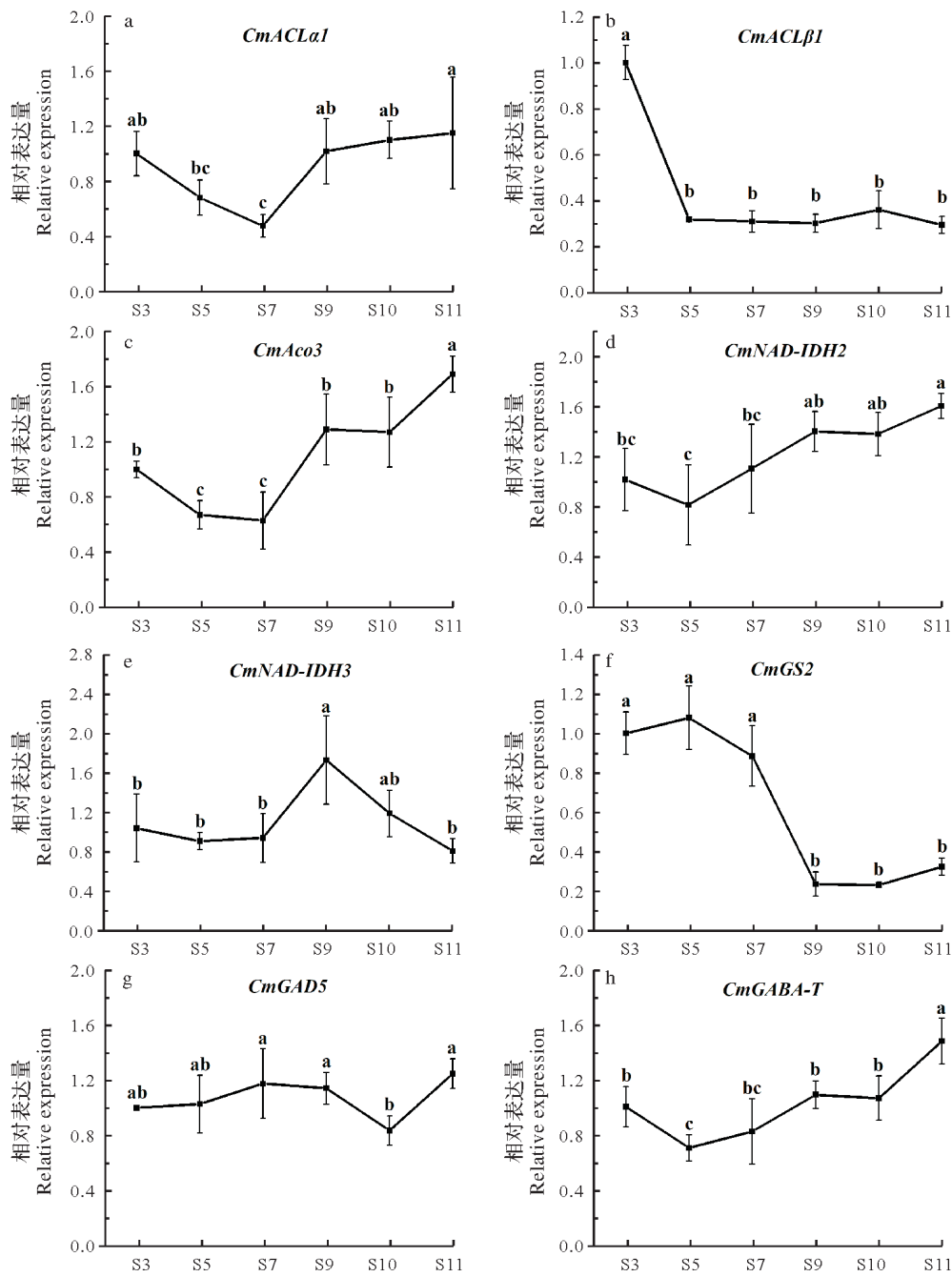
2.4 ‘马家柚’果实发育期柠檬酸降解相关基因表达

在‘马家柚’果实发育阶段 *CmACLα1* 基因的表达是先下降后上升,在S7时期相对表达量最小,在S11时期时达到最大值(图5a)。*CmACLβ1* 基因在S3时期表达较高,随后下降,在果实发育S5~S11时期表达水平较低,且保持相对稳定(图5b),S5时期开始柠檬酸进入快速增长期,因此 *CmACLβ1* 基因可能是马家柚果实膨大期调控柠檬酸积累的重要因素。*CmAco3* 基因表达量在S3~S7时期保持较低水平,之后开始上调表达,至S11时期时表达量显著升高至最高值(图5c),而此时柠檬酸含量下降,因此认为 *CmAco3* 可能是调控果实成熟期降解‘马家柚’柠檬酸的重要基因之一。

从图5f可知谷氨酸合酶基因 *CmGS2* 的表达量在柠檬酸含量较低的S3~S7时期保持较高水平表达,而在柠檬酸含量较高的S9~S11时期维持较低水平表达,因此柠檬酸含量极可能是由 *CmGS2* 基因的表达进行负调节。在果实生长发育过程中, *CmNAD-IDH2* 基因相对表达量在S3~S5时期有下降趋势,之后在柠檬酸上升期却呈上升趋势,并且从S9时期开始其表达量并无显著差异(图5d); *CmNAD-IDH3* 基因的表达在

S3~S7时期相对稳定,在S9时期达到最大值,随后表达量又逐渐下降,其表达量变化对柠檬酸含量没有影响(图5b)。

谷氨酸脱氢酶基因 *CmGAD5* 的相对表达量在 S3~S9 时期无显著变化,在 S10 时表达量最低,随后在 S11 时期达到最大值(图 5g); γ -氨基丁酸转氨酶基因 *CmGABA-T* 的相对表达量在 S3~S10 时期相对稳定,在 S11 时显著上调达峰值(图 5h),因此认为 *CmGAD5* 和 *CmGABA-T* 基因在果实成熟期的显著上调表达也是柠檬酸降解的重要因素。



不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平的差异显著性。

Different small letters indicate significant differences at the level of $P<0.05$.

图5 ‘马家柚’果实发育期有机酸降解相关基因表达

Fig.5 Expression of organic acid degradation-related genes during fruit development of ‘Majia’ pomelo

3 结论与讨论

柑橘果实在发育过程中有机酸逐渐积累,其中柠檬酸为主要有机酸,呈先增加后降低的趋势,而其

他有机酸组分含量因品种不同而存在差异^[23]。研究发现,‘马家柚’果实中有机酸以柠檬酸为主,苹果酸、酒石酸次之,奎尼酸含量最低,柠檬酸的变化趋势为先上升后下降。温州蜜柑、早香柚^[24]以及‘靖安椪柑’^[4]在果实发育期,其有机酸含量均呈先上升后下降趋势,柠檬酸含量均在总有机酸含量中占比最大,温州蜜柑占比56%以上,早香柚占比53%以上,而靖安椪柑更是达到71%以上。

前人对柑橘柠檬酸积累与柠檬酸合成相关基因表达之间的研究很多,大部分研究认为柠檬酸的积累与其合成相关基因无直接联系。如易明亮等^[25]研究表明,温州蜜柑完熟栽培过程中柠檬酸合成相关基因 *CitPEPCs* 和 *CitCSs* 的表达与果实有机酸积累并没有联系。罗安才等^[26]和 Chen 等^[27]研究结果也表明柠檬酸合成相关酶活性以及相关基因的表达量也均与柠檬酸含量无显著相关性。在本研究中 *CmPEPC1*、*CmPEPC2*、*CmCS1* 和 *CmCS2* 基因的相对表达量变化与柠檬酸含量变化规律不一致,他们之间无显著相关性,说明‘马家柚’果实发育过程中柠檬酸的积累并不是由柠檬酸合成基因决定。

柠檬酸合成后需要通过载体运输到液泡中进行保存,其降解同样需要通过载体从液泡中运输至细胞质中进行降解反应。质子泵基因促进柠檬酸运输至液泡贮存,对提高果实柠檬酸含量具有积极作用。Guo 等^[21]的研究表明 V 型质子泵基因 *CsVHA*、*CsVHP* 和 p 型质子泵基因 *CsPH8* 在低柠檬酸突变品种‘红暗柳’橙中的表达水平明显低于‘暗柳’橙;李绍佳^[28]的研究表明 *CitVHA-c4* 基因的表达模式与椪柑果实发育过程中柠檬酸的积累呈正相关关系,同时在烟草叶片中瞬时过表达 *CitVHA-c4* 基因可显著提高叶片中柠檬酸含量。并且在不同柑橘品种中各运输载体基因在柠檬酸积累的过程中发挥的作用不尽相同^[24]。有机酸转运相关基因 *CHX* 和 *DIC* 可将柠檬酸从液泡中运输至细胞质中促进其降解,Lin 等^[13]的研究证实低酸的温州蜜柑中 *CitCHX* 和 *CitDIC* 基因表达水平显著高于高酸品种‘高橙’,同时在烟草叶片中瞬时超表达 *CitCHX* 和 *CitDIC* 基因可显著降低烟草叶片中柠檬酸含量。在‘马家柚’果实发育期 *CmCHX* 和 *CmVHP2* 基因表达量变化与柠檬酸含量变化趋势并不一致;而柠檬酸含量受 *CmDIC* 基因负调控,与此同时 *CmVHA-c4* 基因的表达模式与柠檬酸的变化趋势相近,认为 *CitDIC* 和 *CmVHA-c4* 基因在‘马家柚’果实柠檬酸的积累过程中发挥着重要作用。

柑橘果实发育过程中柠檬酸的积累与柠檬酸降解基因的表达相关,柠檬酸可以通过多个途径进行降解,主要有谷氨酰胺途径、 γ -氨基丁酸(GABA)和乙酰辅酶 A 3 个途径。Terol 等^[29]研究了甜橙、橘、柠檬等多个柑橘种类果实发育过程中柠檬酸的变化规律及 *CcACOs* 基因的表达水平变化,结果表明在除柠檬外的大部分品种中 *CcACOs* 基因的表达能促进果实中柠檬酸的降解。在椪柑叶片及果实中瞬时超表达 *CitAco3* 基因或调控 *CitAco3* 基因的转录因子基因 *CitNAC62* 和 *CitWRKY1* 时均能显著降低其柠檬酸含量^[30],同时 Chen 等^[31]研究发现热处理能促进柑橘果实 *CitAco3* 基因的上调表达导致柠檬酸下降。以上研究均说明 *ACO* 基因在促进柠檬酸降解的途径中发挥着重要作用。另外,有研究报道在脐橙果实生长发育过程中,*CitAco3*-*CitIDH1*-*CitGS2* 的级联反应可能参与了不同环境下柠檬酸的降解,而 *CitGS2* 基因是谷氨酰胺途径中的关键酶基因^[27]。Katz 等^[16]发现果实柠檬酸含量下降过程中 GAD 酶活性持续升高,同时 Lin 等^[32-33]证实在椪柑的果实成熟过程中,以及在低温诱导下柠檬酸的降解主要与 *CitGAD4* 基因的表达密切相关,Sheng 等^[34]的研究表明 HB 柚采后储存过程中 *CitGABA-T* 基因高表达导致了柠檬酸的降解,而 *CitGAD4* 和 *CitGABA-T* 基因均是 GABA 途径上关键的酶基因。在柑橘不同品种果实发育过程对转录本的分析表明乙酰辅酶 A 途径的关键基因 *ACLs* 对果实柠檬酸含量的调控作用根据品种的不同而有所差异,同时仅有 *CitACL β 1* 基因可以受干旱和 ABA 诱导下调表达造成柠檬酸含量的显著上升^[35],在温州蜜柑和纽荷尔脐橙果实中也发现编码 *ACL* 的基因表达升高导致柠檬酸含量的降低,说明 *CitACL* 基因在柠檬酸降解过程中发挥着重要作用^[36]。本研究的结果显示 *CmACL β 1* 基因在‘马家柚’果实发育中后期低水平表达是柠檬酸积累的重要原因;*CmAco3* 基因在柠檬酸下降时显著上调表达,因此认为 *CmAco3* 基因在果实成熟期柠檬酸降解过程中发挥着关键作用。而柠檬酸前期缓慢积累后期大量积累也受降解基因 *CmGS2* 前期的高表达以及后期的低水平表达所控制,说明谷氨酰胺途径是‘马家柚’果实发育前期柠檬酸降解的重要途径之一。*CmGAD5* 和

CmGABA-T 基因的表达量在果实发育前中期表达相对稳定,而在后期显著上调表达,说明 *CmGAD5* 和 *CmGABA-T* 基因是‘马家柚’果实在成熟期柠檬酸降解的关键基因,且在‘马家柚’果实发育后期(果实成熟期)柠檬酸降解主要以 GABA 途径为主;而 *CmACLβ1* 基因可能是马家柚果实膨大期调控柠檬酸积累的重要因素,其下调表达直接导致柠檬酸的快速积累,由此说明乙酰辅酶 A 途径可能是果实发育前期柠檬酸降解的重要途径。因此‘马家柚’果实发育期间柠檬酸降解在不同时间段主要通过不同的代谢途径进行,而不同柑橘品种在果实发育期柠檬酸降解途径是有差异的,如早熟温州蜜柑在果实发育期其柠檬酸降解是通过谷氨酰胺和 GABA 途径进行^[14],普通温州蜜柑在果实发育期柠檬酸降解则主要通过谷氨酰胺途径进行^[6],而‘纽荷尔’脐橙则主要通过 GABA 途径降解柠檬酸, *CsAcos*、*CsIDH1/3* 与 *CsGAD4* 表达水平决定果实柠檬酸含量^[37]。

本研究明确了‘马家柚’果实有机酸在整个发育期的变化规律,其有机酸以柠檬酸为主,柠檬酸积累呈先上升后下降的趋势。在整个果实发育期柠檬酸的积累并不由柠檬酸合成相关基因决定,而是由柠檬酸转运载体基因以及降解基因决定。在果实发育前中期,柠檬酸的积累主要受 *CmDIC*、*CmVHA-c4*、*CmGS2* 和 *CmACLβ1* 基因的调控,其代谢主要是通过谷氨酰胺途径和乙酰辅酶 A 途径进行;而在果实发育后期柠檬酸的积累在受 *CmVHA-c4* 基因调控的同时也受 *CmAco3*、*CmGAD5* 和 *CmGABA-T* 的调控,其降解主要通过 GABA 途径进行;因此本研究丰富了柑橘类果实发育期柠檬酸积累及代谢规律。

致谢:江西省柑橘产业技术体系项目(JXARS-07)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] 张为. 江西国家地理标志保护产品广丰马家柚[J]. 质量探索, 2012, 9(7): 15.
ZHANG W. National geographical indication protection product: Guangfeng ‘Majiayou’ pomelo of Jiangxi province [J]. Quality exploration, 2012, 9(7): 15.
- [2] 张莉, 王瑞庆, 赵刚, 等. 广丰马家柚与平和红柚果实品质比较研究[J]. 中国农学通报, 2021, 37(22): 126-130.
ZHANG L, WANG R Q, ZHAO G, et al. Fruit quality of majia pomelo and pinghe red pomelo: a comparison study [J]. Chinese agricultural science bulletin, 2021, 37(22): 126-130.
- [3] 邓素枫, 廖伟, 龚碧涯, 等. 湖南 30 个柚类品种(资源)果实品质分析与评价[J]. 中国南方果树, 2021, 50(3): 36-41.
DENG S F, LIAO W, GONG B Y, et al. Evaluation of fruit quality of 30 pomelo varieties in Hunan province [J]. South China fruits, 2021, 50(3): 36-41.
- [4] 高阳, 阚超楠, 陈楚英, 等. ‘靖安椪柑’果实发育阶段柠檬酸含量变化及其代谢相关基因的表达分析[J]. 果树学报, 2018, 35(8): 936-46.
GAO Y, KAN C N, CHEN C Y, et al. Changes of citric acid content and the related gene expression at different developmental stages of fruits in ‘Jingan’ ponkan [J]. Journal of fruit science, 2018, 35(8): 936-946.
- [5] SADKA A, DAHAN E, COHEN L, et al. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit [J]. Physiologia plantarum, 2000, 108(3): 255-262.
- [6] 林琼. 柠檬酸代谢及转运相关基因对柑橘果实酸度的调控机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
LIN Q. Regulation of citrus fruit acidity by genes related to citrate metabolism and transportation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [7] RATAJCZAK R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase [J]. Biochimica et biophysica Acta, 2000, 1465(1/2): 17-36.
- [8] MÜLLER M L, IRKENSIESECKER U, RUBINSTEIN B, et al. On the mechanism of hyperacidification in lemon. Comparison of the vacuolar H⁺-ATPase activities of fruits and epicotyls [J]. The journal of biological chemistry, 1996, 271(4): 1916-1924.
- [9] APRILE A, FEDERICI C, CLOSE T J, et al. Expression of the H⁺-ATPase AHA10 proton pump is associated with citric acid accumulation in lemon juice sac cells [J]. Functional & integrative genomics, 2011, 11(4): 515.
- [10] YAO Y X, DONG Q L, YOU C X, et al. Expression analysis and functional characterization of apple *MdVHPI* gene reveals its

- involvement in Na^+ , malate and soluble sugar accumulation[J]. Plant physiology and biochemistry, 2011, 49(10): 1201-1208.
- [11] LI S J, YIN X R, XIE X L, et al. The citrus transcription factor, CitERF13, regulates citric acid accumulation via a protein-protein interaction with the vacuolar proton pump, CitVHA-c4[J]. Scientific report, 2016, 6, 20151.
- [12] FRANÇOISE C, GENEVIÈVE C, LILIAN R, et al. Characterization of AtCHX17, a member of the cation/ H^+ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K^+ homeostasis[J]. The plant journal : for cell and molecular biology, 2004, 39(6): 834-846.
- [13] LIN Q, LI S, DONG W, et al. Involvement of *CitCHX* and *CitDIC* in developmental-related and postharvest-hot-air driven citrate degradation in citrus fruits[J]. PloS one, 2015, 10(3): e0119410.
- [14] 陈明. 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[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- CHEN M. Expression and its regulation of citric acid synthesis and degradation related genes in the fruits of Ponkan and navel orange[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [15] 曹淑燕, 荣毅, 古威杰等. 不同砧木对黄果柑果实有机酸含量和酸代谢相关酶活性及基因表达的影响[J]. 华北农学报, 2016, 31(4): 80-87.
- CAO S Y, RONG Y, GU X J, et al. Effects of different rootstocks on Huangguogan fruit organic acid content, acid metabolism-related enzyme activity and gene expression[J]. Acta agriculturae boreali-Sinica, 2016, 31(4): 80-87.
- [16] KATZ E, FON M, LEE Y J, et al. The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism[J]. Planta, 2007, 226(4): 989-1005.
- [17] 罗丽娟, 郭玲霞, 刘永忠. 温度和pH值对柑橘汁胞柠檬酸含量及相关基因表达的影响[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(1): 18-23.
- LUO L J, GUO L X, LIU Y Z. Effects of temperature and pH on citric acid content and related gene expression in citrus juice sacs[J]. Journal of Huazhong agricultural university, 2020, 39(1): 18-23.
- [18] 谢婧蕻, 杨莉, 旦世浩, 等. 套袋对马家柚果实外观及内在品质的影响[J]. 核农学报, 2021, 35(1): 229-237.
- XIE J H, YANG L, DAN S H, et al. Effect of bagging on fruit appearance and inner quality of majia pomelo[J]. Journal of nuclear agricultural sciences, 2021, 35(1): 229-237.
- [19] 张涓涓, 杨莉, 刘德春, 等. 马家柚果实品质与土壤、叶片、果实矿质养分的相关性分析[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(5): 811-818.
- ZHANG J J, YANG L, LIU D C, et al. Correlation analysis between fruit quality of Majia pomelo and soil nutrients, leaf and fruit mineral nutrients[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2015, 37(5): 811-818.
- [20] 吴方方, 管建丰, 蒋小林, 等. 气象因子对广丰马家柚果实品质的影响[J]. 中国南方果树, 2018, 47(4): 48-50.
- WU F F, GUAN J F, JIANG X L, et al. Effect of meteorological factors on fruit quality of Guangfeng 'Majia' pomelo[J]. South China fruits, 2018, 47(4): 48-50.
- [21] GUO L X, SHI C Y, LIU X, et al. Citrate accumulation-related gene expression and/or enzyme activity analysis combined with metabolomics provide a novel insight for an orange mutant[J]. Scientific reports, 2016, 6(1): 29343.
- [22] JIANG Z Q, HUANG Q, JIA D F, et al. Characterization of organic acid metabolism and expression of related genes during fruit development of *Actinidia eriantha* 'Ganmi 6'[J]. Plants(Basel), 2020, 9(3): 332.
- [23] ALBERTINI M V, CLODIE E, PAILLY O, et al. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, 54(21): 8335-8339.
- [24] 杨欢. 柑橘果实发育过程中柠檬酸积累相关基因表达分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- YANG H. Expression analysis of the citric acid accumulation-related genes during citrus fruit development[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.
- [25] 易明亮, 肖洒, 刘德春, 等. 温州蜜柑完熟栽培期间果实糖酸变化及其相关基因表达分析[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(1): 35-44.
- YI M L, XIAO S, LIU D C, et al. Analysis on changes in sugar and organic acid and related gene expression in fruit of satsuma mandarin during delayed harvest cultivation[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(1): 35-44.
- [26] 罗安才, 杨晓红, 邓英毅, 等. 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[J]. 中国农业科学, 2003,

- 36(8):941-944.
- LUO A C, YANG X H, DENG Y Y, et al. Organic acid concentrations and the relative enzymatic changes during the development of citrus fruits[J]. *Scientia agricultura Sinica*, 2003, 36(8):941-944.
- [27] CHEN M, XIE X, 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.
- [28] 李绍佳. CitERF13 与 CitVHA-c4 协同调控柑橘果实柠檬酸代谢研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- LI S J. research on regulation of the citric acid metabolism in citrus fruit by CitERF13 and CitVHA-c4[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [29] TEROL J, SOLER G, TALON M, et al. The aconitate hydratase family from Citrus[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1):222.
- [30] LI S J, YIN X R, WANG W L, et al. Citrus CitNAC62 cooperates with CitWRKY1 to participate in citric acid degradation via up-regulation of *CitAco3*[J]. *Journal of experimental botany*, 2017, 68(13):3419-3426.
- [31] CHEN M, QIAN J, YIN X R, et al. Effect of hot air treatment on organic acid- and sugar-metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit[J]. *Scientia horticulturae*, 2012, 147:118-125.
- [32] LIN Q, QIAN J, ZHAO C N, et al. Low Temperature induced changes in citrate metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) fruit during maturation[J]. *PLoS one*, 2016, 11(6):e0156703.
- [33] LIN Q, WANG C Y, DONG W C, et al. Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation[J]. *Gene*, 2015, 554(1):64-74.
- [34] SHENG L, SHEN 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.
- [35] HU X M, SHI C Y, LIU X, et al. Genome-wide identification of citrus ATP-citrate lyase genes and their transcript analysis in fruits reveals their possible role in citrate utilization[J]. *Mol genet genomics*, 2015, 290(1):29-38.
- [36] 胡小梅. 柑橘 ATP-柠檬酸裂解酶基因的挖掘与其在柠檬酸代谢中的作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- HU X M. Genome-wide identification of ATP-citrate lyase genes in citrus, and its role in the metabolism of citric acid[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [37] 杨滢滢, 高阳, 向妙莲, 等. ‘纽荷尔’脐橙果实发育过程中几种柠檬酸代谢相关基因的表达特征分析[J]. *果树学报*, 2016, 33(4):400-408.
- YANG Y Y, GAO Y, XIANG M L, et al. Expression profile analysis of several citric acid metabolism related genes in the ‘Newhall’ navel orange during fruit development[J]. *Journal of fruit science*, 2016, 33(4):400-408.