

采后常温贮藏下菠萝罹病果实转录组测序分析

张梦卓, 纳琦婷, 朱长松, 曹 慧, 刘诗颖, 史学群, 孟兰环*

海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228

摘 要: 菠萝在常温贮藏过程中易发生黑心病, 为了探索黑心病的发生机制, 选取菠萝黑心病初期果实的发病部位和健康部位, 每个部位选取 3 个样本分别进行转录组 RNA-Seq 分析, 对差异基因进行 GO、KEGG、各代谢通路基因表达聚类分析和 RT-qPCR 验证, 对比病部 (IB) 和健部 (WT) 的差异基因表达量。通过分析发现, IB vs WT 共有 1037 个差异基因, 其中上调 886 个, 下调 130 个。GO 和 KEGG 分析发现氨基酸生物合成差异基因最显著, 而且差异基因数量占比大; 通过聚类分析和 RT-qPCR 验证, 糖代谢途径发现果实发病后糖酵解、三羧酸循环 (TCA) 和氧化磷酸化过程中相关酶基因表达量显著上调; 植物应对外界环境信号通路发现抗性酶基因表达量显著下调, 致病蛋白基因表达量显著上调, 抗病蛋白基因表达量显著下调; 抗氧化物质通路发现谷胱甘肽合成基因表达量显著下调, 类黄酮生物合成相关基因表达量显著上调, L-抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 基因表达量显著下调, 而 L-抗坏血酸氧化酶 (AOX) 同系物基因表达量显著上调。RNA-Seq 和 RT-qPCR 分析结果表明, 菠萝组织通过显著上调糖代谢关键基因加速果实病部糖代谢、显著上调表达信号传导关键通路 MAPK 途径中的关键基因以及显著下调抗氧化物质等代谢通路变化而导致黑心病的发生。通过这些结果可以丰富菠萝黑心病发生的基因网络, 为后续菠萝黑心病相关基因筛选提供信息参考。

关键词: 常温贮藏; 菠萝; 黑心病; RNA-Seq 分析

中图分类号: S667.9 文献标志码: A

Transcriptome Sequencing Analysis of Diseased Pineapple Fruits Stored at Room Temperature after Harvest

ZHANG Mengzhuo, NA Qiting, ZHU Changsong, CAO Hui, LIU Shiyang, SHI Xuequn, MENG Lanhuan*

School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Pineapple is prone to intern browning during storage at room temperature. Diseased and healthy parts of pineapple at early stage of intern browning were used to explore the mechanism of the disease. Three samples from each part were used for transcriptome RNA-Seq analysis. GO, KEGG, cluster analysis of gene expression in various metabolic pathways, and RT-qPCR validation on differential genes were performed and the differential gene expression levels between the diseased (IB) and healthy (WT) parts were compared. IB vs WT had 1037 differentially expressed genes, of which 886 were up-regulated and 130 were down-regulated. GO and KEGG analysis found that the differentially expressed genes in amino acid biosynthesis were the most significant, and the proportion of differentially expressed genes was large. Cluster analysis and RT-qPCR validation found that the sugar metabolism pathway significantly up-regulated the expression levels of related enzyme genes in glycolysis, tricarboxylic acid cycle (TCA), and oxidative phosphorylation processes after fruit disease onset. The response of plants to external environmental signaling pathways revealed a significant down-regulation of resistance enzyme gene expression, a significant up-regulation of pathogenic protein gene expression, and a significant down-regulation of resistance protein gene expression. The antioxidant pathway revealed significant down-regulation of glutathione synthesis gene expression, significant up-regulation of flavonoid biosynthesis related gene expression, significant down-regulation of L-ascorbate peroxidase (APX) gene expression,

收稿日期 2024-04-11; 修回日期 2024-05-13

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 322QN252)。

作者简介 张梦卓 (1997—), 女, 博士研究生, 研究方向: 采后果蔬贮藏分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 孟兰环 (MENG Lanhuan), E-mail: huanhuanaini1012@126.com。

and significant up-regulation of L-ascorbate oxidase (AOX) homologous gene expression. RNA-Seq and RT-qPCR analysis indicated that pineapple tissue significantly up-regulated key genes in sugar metabolism to accelerate sugar metabolism in fruit disease part, significantly up-regulated key genes in the MAPK signaling pathway, and significantly down-regulated metabolic pathway changes such as antioxidant substances, leading to pineapple intern browning. The results could enrich the gene network of pineapple intern browning and provide a valuable reference for the subsequent gene screening of pineapple intern browning.

Keywords: room temperature storage; pineapple; intern browning; RNA-Seq analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.006

菠萝 (*Ananas comosus* L.), 属凤梨属, 又名凤梨, 仅次于香蕉和芒果的第三大热带水果, 是世界四大名果之一^[1-2]。原产于南美洲巴西、巴拉圭^[3], 现已在热带地区广泛种植。菠萝深受消费者喜爱, 它风味独特, 富含膳食纤维、有机酸、维生素 B₁、维生素 C、类胡萝卜素、钾及多种矿物质等物质^[4], 其中菠萝蛋白酶是一种促消化和抗炎的物质^[5-7]。中国的菠萝产地面积位居世界第 4 位, 产量为世界第 6 位, 虽然我国是菠萝生产和消费大国, 但仍不是菠萝贸易强国^[8-9]。

菠萝黑心病 (black heart), 也称内部褐变病 (internal browning, IB), 是一种生理代谢失调病^[10], 一般从果实外部无法观察, 切开果实才能发现。黑心病初发时, 在果实基部的果心两侧出现水渍状斑点, 之后斑点颜色变暗、范围变大; 发展严重时, 病斑联合一起, 使大部分果肉褐变^[11]。研究发现, 果实内部褐变与酚类物质氧化成醌类、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、膜脂过氧化等有关^[12-13]。目前证明可延缓黑心病的方法包括氯化钙^[14]、热诱导^[15]、水杨酸^[16]、1-甲基丙烯 (1-methylcyclopropene, 1-MCP)^[17-18]和打蜡协同效应^[19]、外源抗坏血酸^[20]等处理, 但仍难以实现广泛应用, 黑心病仍是影响菠萝商品价值和流通性的主要病害。

2015 年福建农林大学首次破译了菠萝基因组^[21], 在菠萝基因组的研究取得了很大的进展, 但目前多是对菠萝幼苗、花进行测序来研究果实生长发育^[22-24], 菠萝果实黑心病相关基因的研究甚少, 仅发现 *AcPPO*^[25]、*AcGA2ox*^[26]、*AcCYSI*^[27]和 *AcPLD2/9*^[28]等可能与黑心病相关, 且其功能也未进行验证。

因此, 我们对常温贮藏 6 d 发病初期果实的病部和健部进行转录组 RNA-Seq 分析, 其主要包括: 首先对测序结果进行总体数据可行性证明; 然后对差异基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 基因功能注释和京都基因与基因组百科全书

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析得到主要的代谢通路; 最后对糖代谢、植物应对外界环境的信号通路和抗氧化物质相关通路进行差异基因聚类分析, 可得到菠萝果实黑心病发生路径。本研究对黑心病如何发生有了更全面的了解, 同时可得到一些相关基因, 为今后通过分子手段控制黑心病发生提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

巴厘菠萝 (*Ananas comosus* cv. Comtede Paris) 于 2021 年 10 月采收于海南省琼海市, 并于 3 h 内送至海南大学食品科学与工程学院采后果蔬保鲜实验室进行贮藏, 挑选果实大小均一, 无病害果实。果实贮藏于 (25±1) °C, 相对湿度 (RH) 为 (85±5)% 环境。贮藏 6 d 后选取初期发病果实, 取其病部和健部 (图 1), 分别取 3 组, 每组 3 个果实, 迅速置于液氮中冻样, 用干冰运输, 送至天津诺禾致源科技有限公司进行有参转录组测序分析。健部 (WT): C₁、C₂、C₃, 病部 (IB): IB₁、IB₂、IB₃。

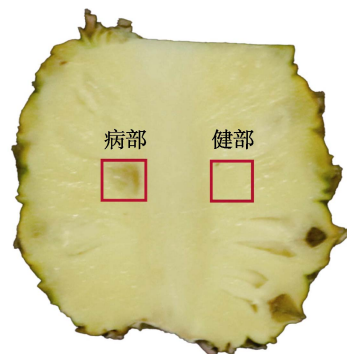


图 1 菠萝果实病部和健部图

Fig. 1 Disease and healthy parts of pineapple fruit

1.2 方法

1.2.1 样品收集和准备 使用 Agilent 2100 bio-analyzer 精确检测 RNA 完整性和总量; 然后构建

文库，后进行质检；质检合格后上机进行 Illumina 测序。

1.2.2 测序数据分析 首先对原始数据中质量较低的 reads 进行过滤，得到高质量的 clean data。然后使用 HISAT2 v2.0.5 构建参考基因组的索引，并使用 HISAT2 v2.0.5 将配对末端 clean reads 与参照基因组比对；采用 StringTie (1.3.3b) 进行新基因预测；对于有生物学重复的样本，使用 DESeq2 (1.20.0) 软件进行差异表达分析。通过 clusterProfiler (3.8.1) 软件进行差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 首先，用天根多糖多酚 RNA 试剂盒提取菠萝果实病部和健部果实 RNA；接着使用天根 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒反转录合成 cDNA；最后利用网站 <https://primer3.ut.ee/> 设计特异性引物(表 1)，然后通过天根 FastReal qPCR PreMix (SYBR Green) 试剂盒进行 PCR 反应，反应程序：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 10 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s，40 个循环；最后 72 ℃ 延伸 10 min。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算^[29]。

1.3 数据处理

采用 Graphpad prism 10.1 软件对数据进行方差分析和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 转录组数据质量评估

对各样本进行转录组数据质量评估发现，WT 和 IB 组间的样本分散，组内 3 个样本聚集，表明样本间生物学重复好(图 2A)；盒型图(图 2B)可直观地看到各样本的基因分布情况，每个样本从下往上可以看出基因分布越来越少。样本间相关性均大于 0.8，组内相关性数值相近，组间相关性数值差值大(图 2C)，表明样本可靠，可用于后续分析。

2.2 差异表达基因数目

差异基因数目分析发现，WT 和 IB 组共有基因为 14 586 个(图 3A)；IB vs WT 的差异表达基因有 1037 个，其中上调基因 886 个，下调基因 130 个，上调基因的数量远大于下调基因(图 3B)。

2.3 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析发现(图 4A)，分子功能(molecular function, MF)显著性富集，其中辅酶结合(coenzyme binding)基因显著上调且差异基因数量最多；生物过程(biological process, BP)显著

表 1 实时荧光定量 PCR 的特异性引物
Tab. 1 Specific primers used for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>β-actin</i>	F: CTGGCCTACGTGGCACTTGACTT R: CACTTCTGGGCAGCGGAACCTTT
109726387	F: TCTAGATGAGAAGCGCCGTT R: ACGTAGAACTTCTGGTGCCA
109726511	F: TGGACAAGTACGAGCTCCTG R: ACGACCTCTTTGAACCGGAT
109707674	F: CTGAGAATGAACAGCTCGCC R: GGTTATTGTGGTGAGCGCAT
109715689	F: CGTGTTACTATGATGGCCC R: CAAACAGGTTCTCGCCGTAG
109715970	F: CGATCTGCAGCTTTTCACGA R: TGCAGAAGAGGCTCCATGAA
109722976	F: AAGTTCATCCAGTACCGCCA R: CTTGGTCTTGTGCGGATCC
109727398	F: CGTAAAGCACTTCTCGGTCG R: CCTCGCACTTGTCATGATG
109709450	F: TCAGCGATGAAGACCGATCA R: GGACGATAAGAGGACGGGAG
109713066	F: GCCAGAACCCAAGCAAAGAA R: CCACCTCCTCATCCGTCAT
109727686	F: CTTGGAAGCCAACATCCTCG R: GCTTCTTGGCCATCCTCATG
109725671	F: GCGAAGTTTGTGTTGGGGAGTT R: CTTGGACAATTTGCCTGGCT
109708431	F: GGGGTGACGGGATTGTTAGA R: CTGCATCAACCTCGACAGTG
109708663	F: AATTTGGAACTTTGCGGCCT R: TTGACCTCGGCACAAAGTTTG
109727824	F: TCGTCGCTGTAGAGATCACC R: TGTATGCCCGCCAGATAGAG
109719227	F: AAGTACAACCTCATCGCCGA R: GTTGTACCCCTTCTGTCTCT
109719166	F: TGGTGATGGTGGATGGAGTC R: CAGCAAGCAGTGTTCCCTTT
109719641	F: CGAGCACTTCTACAGGACA R: TAGAGAGCTGGAAGGGGAGT
109727857	F: GCATCTTCGTCGACACCATC R: CCACCAAACCTCTCACCTTC
109720628	F: CTAATCCTCGGCGTATCAGA R: TCAATCTTCGGGCGTATCAGA
109728610	F: TGTGGGATGCGCTCTACC R: GCCTTTGCCCAACACTG
109709714	F: TCCGCTTCCAGATCCTTCTC R: TCCACCATGTTGTTGCTGTG
109703559	F: TGACATGGCTGAGCAACTTG R: ATAACCGTGGCCTCAGGAAA
109710134	F: CCACATGTTTCGTCGTCAAGG R: TCGTACATACCGTCGAGCTT
109708439	F: CAATCCTGGTTCTGAGGGGT R: CTCTGATCGTTGGCTGCTTC
109716911	F: CCAAGGCTTGTTCAGGATG R: AGACCTCTAGCTCGACATGC
109723651	F: ACTGGGGAGGGAATTGACTG R: TTCGCCTGTCTCTTGGTCAT
109725790	F: TCCTCAGCACACCATCATT R: CTGCCGTCGATCAATCTGTG
109706271	F: AGCTGCGGAATCTCTACAGG R: TCACGGGCTTTGTACACTCT
109710080	F: AGTGTGGGTGGAGTGAGATG R: TACGATGTGCTCCCTTTGT
109720819	F: TCCACTTCTCCGACCTCCTA R: GTAGATGTGGAAGAGCGGGA

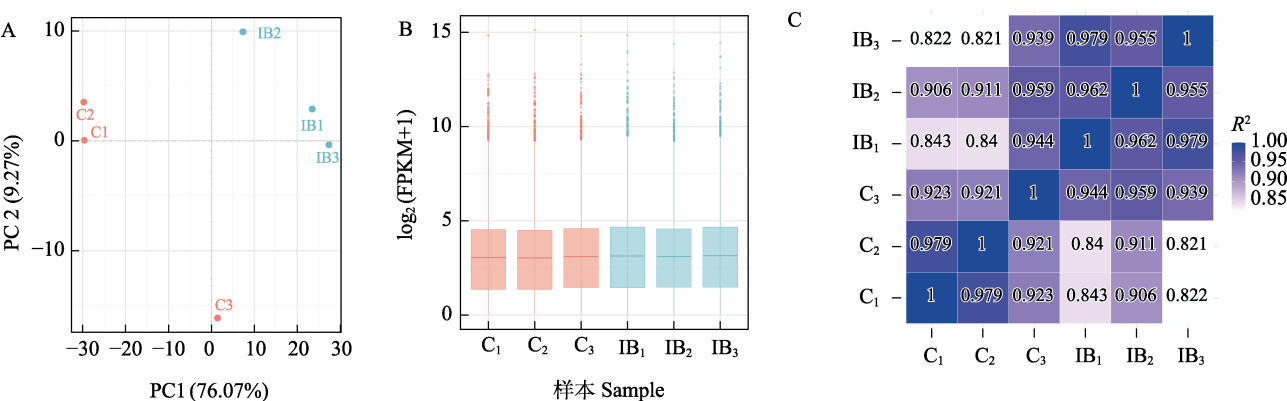


图 2 不同样本间主成分分析 (A)、基因表达分布盒型图 (B) 和 Pearson 相关性图 (C)

Fig. 2 Principal component analysis PCA (A), gene expression distribution box diagram (B) and Pearson correlation diagram (C) among different samples

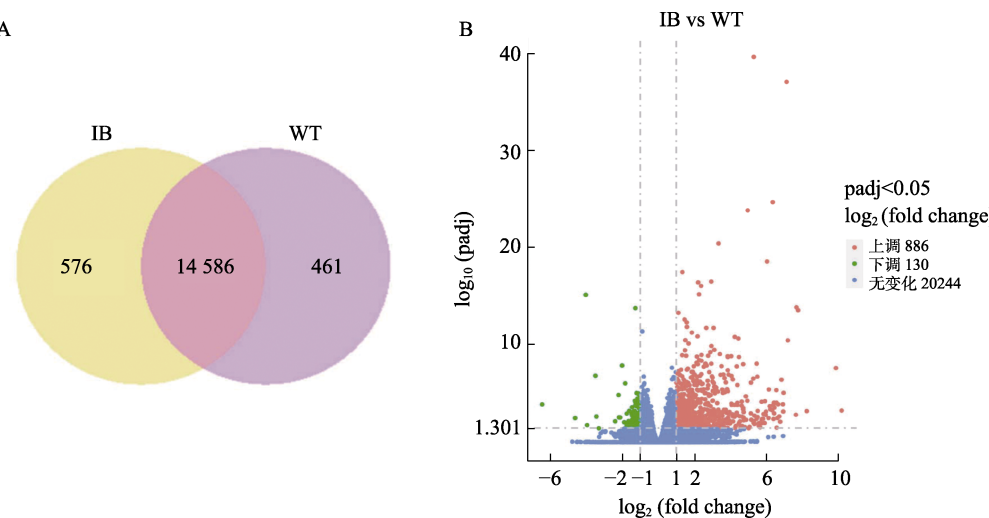


图 3 组间差异表达基因数量韦恩图 (A) 和火山图 (B)

Fig. 3 Number of differentially expressed genes between groups by Wayne diagram (A) and volcano diagram (B)

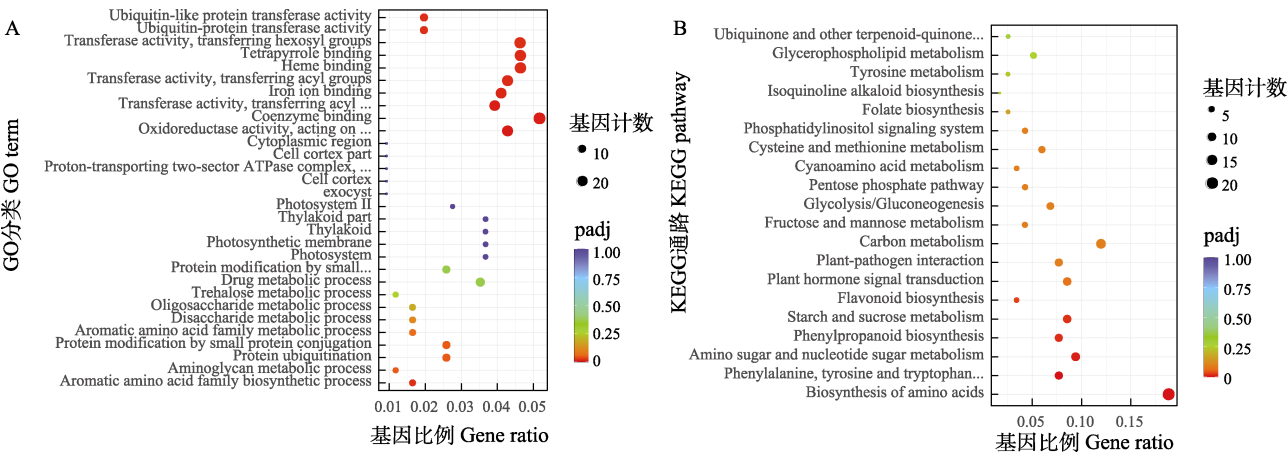


图 4 GO 富集 (A) 和 KEGG 代谢通路 (B)

Fig. 4 Go enrichment (A) and KEGG metabolic pathway (B)

性次之，其中药物代谢过程 (drug metabolism process) 基因显著上调且差异基因数量最多；细胞成分 (cellular components, CC) 无显著性富集。

KEGG 代谢通路中 (图 4B)，氨基酸生物合成 (amino acid biosynthesis) 通路中基因表达差异倍数最高且差异基因数最多 (22 个)，其次为

苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(biosynthesis of phenylalanine, tyrosine and tryptophan) (9 个), 氨基糖和核苷酸糖代谢 (amino sugar and nucleotide sugar metabolism) (11 个), 苯丙烷类生物合成 (phenylpropane biosynthesis) (9 个) 等。

2.4 糖代谢路径分析

菠萝是糖含量丰富的水果之一, 有研究表明果实褐变会加速糖代谢, 糖含量降低^[30-31], 对糖的 3 个生物氧化过程分析发现。首先, 糖酵解中葡萄糖在有氧条件下丙酮酸激酶基因 (109727427、109726650、109726809、109710080、109722348) 表达上调生成烯醇式酮酸, 之后在非酶促反应下生成丙酮酸; 在无氧条件下, 乳酸脱氢酶基因 (109727043) 表达上调生成乳酸, 丙酮酸脱羧酶基因 (109719677) 表达上调生成乙醛, 乙醇脱氢酶基因 (109706271、109720821、109721267) 上调表达生成乙醇 (图 5A)。

然后, 糖酵解生成的丙酮酸可以通过丙酮酸激酶催化生成乙酰 CoA 进入三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) (图 5B), 其关键酶柠檬酸合酶基因 (109710242、109708439、109710921、109724956) 上调表达, 异柠檬酸脱氢酶基因 (109716911、109710820) 上调表达, α -酮戊二酸脱氢酶基因 (109723651、109725790) 上调表达, 表明机体会加速代谢以获取能量。

最后, 在线粒体内膜糖、脂或氨基酸发生氧化磷酸化 (图 5C), 共有 5 个系统。复合体 I 中 NADH-Q 还原酶基因 (109709714、109703559、109709706、109711193、109723703、109716813、109719455、109708116、109703616、109708945、109728114、109727605) 上调表达; 复合体 II 中琥珀酸-Q 还原酶基因 (109710134) 上调表达; 复合体 III 细胞色素还原酶基因 (109726546、109728610、109723560) 上调表达; 复合体 IV 细胞色素氧化酶基因 (109703608、109716203、109722390、109711772、109725159、109725842、109717914) 上调表达; 复合体 V ATP 合酶基因 (109720628、109710804、109722176、109712983、109715104、109710439、109705107、109718567、109712204) 上调表达。

综上, 果实病部糖酵解、TCA 和氧化磷酸化过程相关基因表达上调, 与果实发病呈正相关。

2.5 植物应对外界环境的信号通路

MAPK 主要与植物应对外界环境刺激和植物

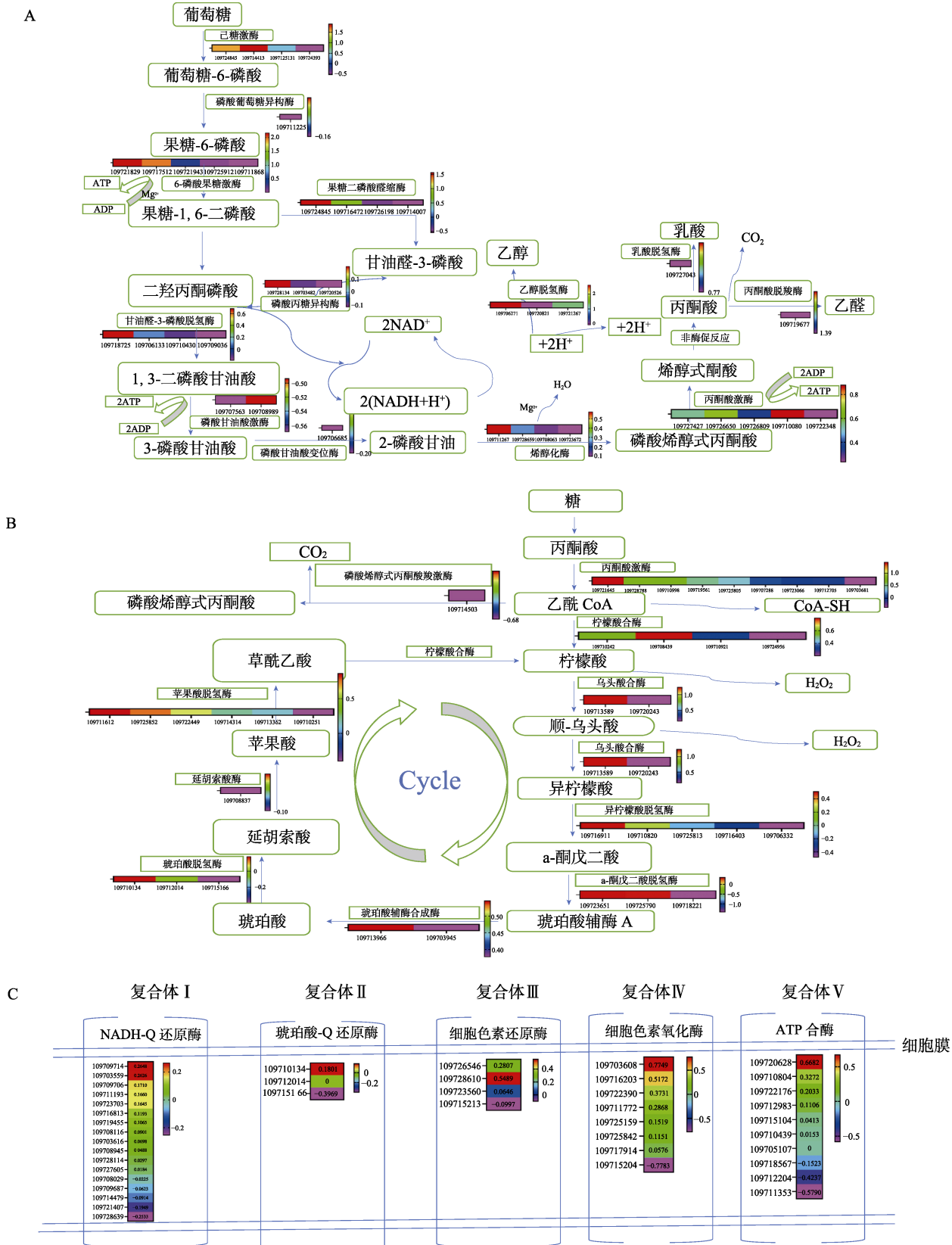
激素有关。几丁质酶可以参与植物发育调控和抗病性, IB vs WT 几丁质酶基因 (109713885) 表达量上升; 蛋白激酶参与调节机体复杂功能, 丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶基因 (109726387、109726511) 显著上调; 过氧化氢酶基因 (catalase, CAT) (109707674) 显著下调表达 (图 6A)。

植物激素主要包括乙烯 (ethylene, EI)、生长素 (auxin, IAA)、赤霉素 (gibberellin, GA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA)。研究已经表明植物激素代谢和相关的信号转导系统可能与褐变有关^[32]。且研究发现脱落酸和赤霉素与植物褐变紊乱过程相关^[33]。类脱落酸受体基因 *PYL5* (109727857) 显著上调, 表明在果实病部感受 ABA 信号增强, 会促进下游基因表达, 开启 ABA 信号通路, 调控植物抗逆性 (图 6B)。

研究发现活性氧 (ROS) 与植物病原相互作用有关^[34], 并且可能与黑心病发生相关。类致病相关蛋白基因 *PRBI-3* (109715689) 显著上调表达, 类抗病蛋白基因 *RPMI* (109715970) 下调表达, 表明果实发病后 ROS 增加, 但呼吸爆发氧会消除 ROS 对细胞产生的毒害作用, 呼吸爆发氧化酶同源蛋白 (A、B、C 和 E) 基因 (109717636、109728108、109722976、109704560) 都上调表达。其次, 当植物细胞受到外界刺激后, 机体会产生热休克蛋白来抵抗压力, 热休克蛋白基因 (109721392、109728698、109727398) 下调表达; WRKY 家族基因和植物抗性有关, 当植物受到外界压力刺激后该家族基因会大量表达, 转录因子 WRKY26 基因 (109709450) 上调表达; 钙是一种细胞膜上的次级调节分子, 类钙调素基因 (109713066、109726233) 也显著上调表达, 表明机体在果实发病后会启动钙离子调节系统 (图 6C)。

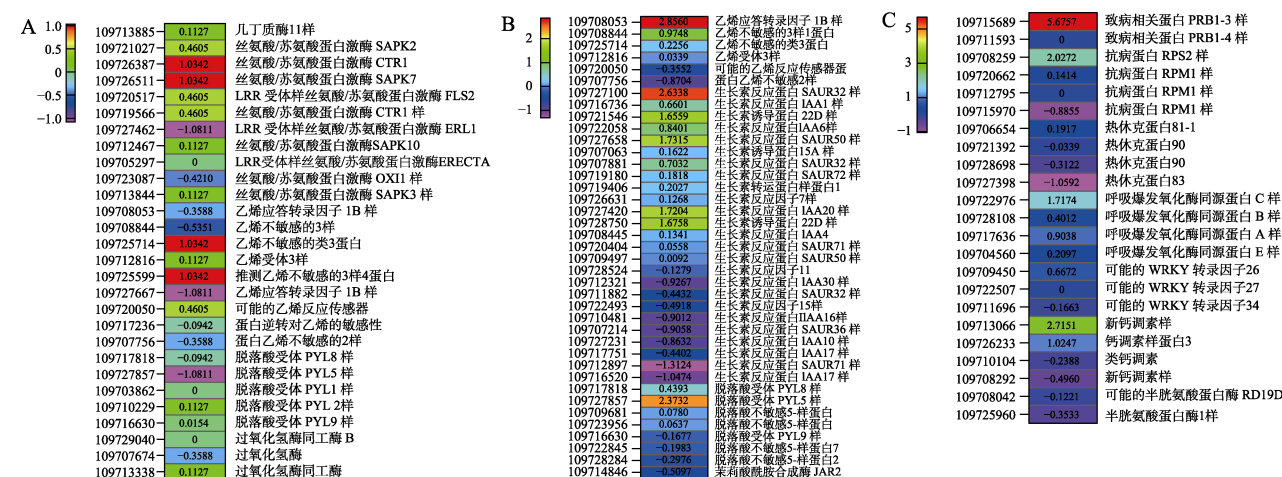
2.6 抗氧化物质相关通路分析

次生代谢苯丙烷生物合成途径是酚类和黄酮类化合物等抗氧化物质合成途径, 可抑制果实褐变。4-香豆酸-CoA 连接酶参与催化类黄酮物质合成, 其相关基因 (109711909、109720819、109711565、109713679、109713578) 上调表达, 可能会加快催化类黄酮物质的合成 (图 7A); 黄酮和异黄酮都是黄酮类化合物, 都属于抗氧化物质。查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是将苯丙烷代谢途径引向黄酮类化合物的合成第一关键酶, 但是 CHS 基因表达下调, 可能影响类黄



A: 糖酵解通路及相关酶的表达; B: 三羧酸循环 (TCA) 代谢通路及相关酶的表达; C: 氧化磷酸化途径及相关酶的表达。
A: The expression of glycolytic pathway and related enzymes; B: The expression of tricarboxylic acid cycle (TCA) metabolic pathway and related enzymes; C: The expression of oxidative phosphorylation pathway and related enzymes.

图 5 糖代谢的生物氧化过程
Fig. 5 Biological oxidation process of glucose metabolism

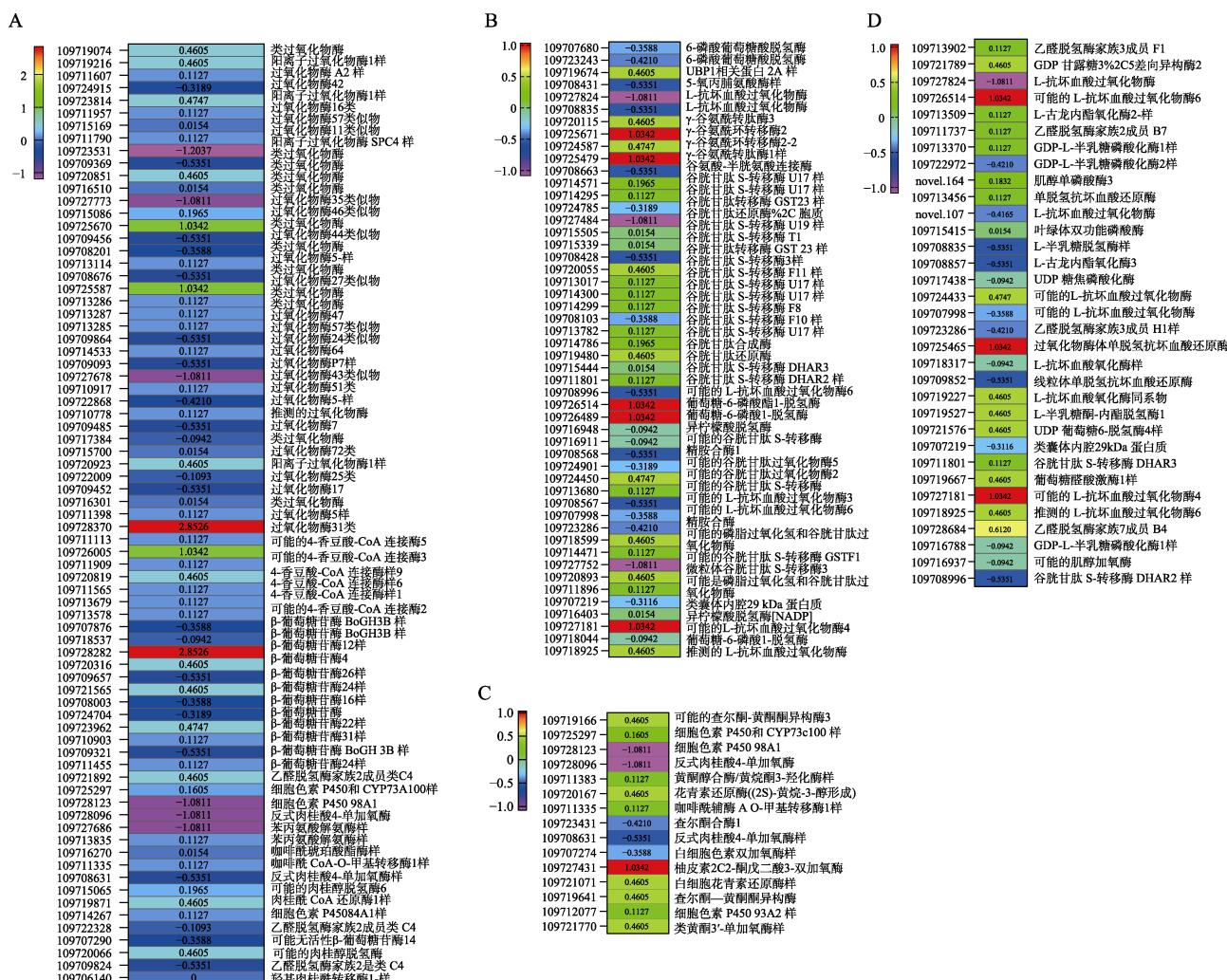


A: 植物 MAPK 信号通路; B: 植物激素信号通路; C: 植物病原相互作用。

A: The MAPK signal pathway of plants; B: The plant hormone signal pathway; C: The interaction of plant pathogens.

图 6 植物应对外界环境的信号通路热图

Fig. 6 Heat map of signal pathway for plants to cope with external environment



A: 苯丙烷生物合成; B: 谷胱甘肽代谢; C: 抗坏血酸和醛酸代谢; D: 类黄酮生物合成。

A: Phenylpropane biosynthesis; B

酮的生物合成。查尔酮异构化酶 (chalcone isomerase, CHI) 是进入异黄酮代谢的关键酶, CHI 基因 (109719166、109719641) 上调表达, 其基因表达量升高 (图 7C)。苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是酚类物质合成的相关酶, PAL 基因 109727686 显著下调表达, 而 109713835 上调表达, 但下调基因 FPKM 值远大于上调基因 (图 7A)。过氧化物酶 (peroxidase, POD) 基因中既有上调基因, 也有下调基因 (图 7A), 研究发现 POD 是一个双向酶, 既可氧化^[35], 又可抗氧化^[36]。

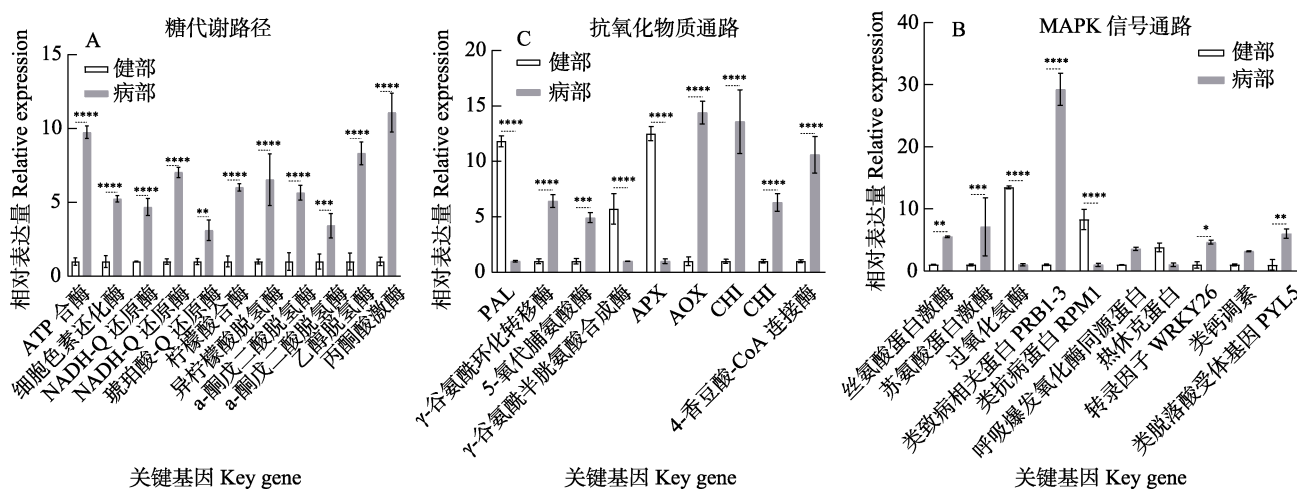
谷胱甘肽是一种还原剂, 参与机体氧化还原反应, 抑制果实褐变。 γ -谷氨酰环化转移酶基因 (109725671、109724587) 上调表达, 而 5-氧代脯氨酸酶基因 (109708431) 下调表达, γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 (109708663) 下调表达 (图 7B), 果实发病后谷胱甘肽合成途径上相关酶基因表达量降低。

抗坏血酸是一种抗氧化物质, 可抑制黑心病的发生。菠萝果实中抗坏血酸含量丰富, 为

47.8 mg/100 g^[30], 对抗坏血酸和醛酸代谢变化分析, 发现 L-抗坏血酸过氧化物酶 (L-ascorbate peroxidase, APX) 基因 (109727824) 显著下调表达, 而且 L-抗坏血酸氧化酶 (L-ascorbate oxidase, AOX) 同系物 (109719227) 显著上调表达 (图 7D), 可能病部果实抗氧化酶能力下降。

2.7 不同通路关键基因表达分析

为了验证转录组数据, 从不同路径中筛选共 30 个关键基因, 通过 RT-qPCR 对果实病部和健部果实的 30 个基因转录水平进行分析。结果表明, 糖代谢路径中 TCA 循环、丙酮酸代谢和氧化磷酸化关键基因在果实病部均显著上调表达 (图 8A), 表明果实发病后机体能量代谢旺盛。MAPK 信号通路中苏氨酸蛋白激酶、致病蛋白脱落酸受体基因在果实病部显著上调表达, 而抗性基因 (如抗病基因和过氧化氢酶) 显著下调表达 (图 8B)。抗氧化通路抗氧化酶 PAL 和 APX 在病部显著下调表达, 氧化酶 AOX 显著上调表达 (图 8C), 表明果实发病后的抗病能力下降。这些结果也与转录组数据一致。



*和**表示差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ***和****表示差异极显著 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$).

* and ** indicate significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$); *** and **** indicate extremely significant difference ($P < 0.001$, $P < 0.0001$).

图 8 不同路径关键基因在果实病部的表达量

Fig. 8 Expression of key genes in different pathways under disease and healthy of fruit

2.8 黑心病路径分析

菠萝果实内部容易发生黑心病, 而且其发生是由多种原因造成的, 通过 RNA-Seq 分析得到黑心病可能与多个代谢通路有关。当早期果实受到外界刺激时, 可诱导呼吸爆发氧化酶和热激蛋白进行抵抗; 发病后果实病部致病相关的蛋白基因显著上调表达, 抗病蛋白基因显著下调表达,

可导致果实内部 ROS 增加, 但 MAPK 途径可以通过调节几丁质酶、蛋白激酶和过氧化氢酶来抑制 ROS 产生; 转录因子 WRKY 可调节细胞膜上的 Ca^{2+} 信号通路; 菠萝果实糖含量高, 发病后糖代谢在有氧和无氧条件下相关基因表达显著升高; 脱落酸受体基因表达显著升高, 促进下游基因表达, 调控果实抗逆性; 抗氧化通路中合成黄

酮相关基因表达下调,但是异黄酮相关基因表达上调;合成谷胱甘肽相关基因下调,抗坏血酸和醛酸代谢通路中生成 APX 的相关基因显著下调表达,而 AOX 的相关基因显著上调表达(图 9)。

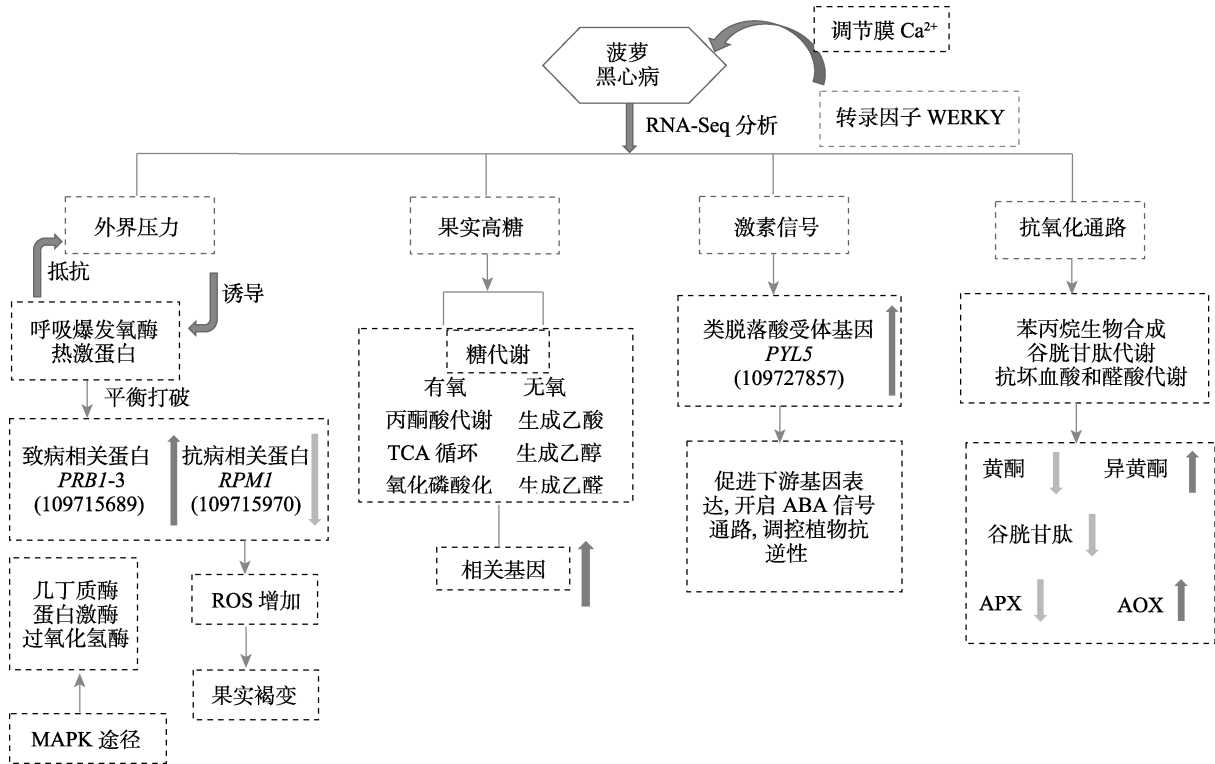


图 9 菠萝黑心病发生路径
Fig. 9 Occurrence path of pineapple intern browning

3 讨论

本研究通过 RNA-Seq 分析菠萝黑心病发病的差异基因,获得参与菠萝黑心病发病基因的基因网络,筛选出菠萝黑心病相关的候选基因,以通过分子生物手段改善菠萝黑心病。

3.1 糖代谢的生物氧化 3 个过程通路

有研究表明,荔枝在成熟过程中会产生大量乙醛和乙酸,加速发酵过程^[37]。通过糖酵解分析可知,糖酵解在无氧条件下生成乙醛和乙酸的酶表达量升高,有氧条件下糖酵解生成的丙酮酸可以进入 TCA 循环,同样 TCA 过程中关键酶基因表达量显著上调,同时果实发病后氧化磷酸化途径中多种酶基因表达量也发生显著上调,说明果实发病后植物细胞代谢加快,需要更多的能量。

3.2 植物应对外界环境的信号通路

MAPK 途径与植物体免疫、应对外界压力和正常的生长发育^[38-40]有关。果实发生黑心病后,抗性酶基因表达量显著下调。类脱落酸受体基因 *PYL5* 表达量显著升高,可能会调控植物抗逆性。

研究发现,机体会在早期大量表达热休克蛋白和呼吸爆发氧化酶来抵抗外界刺激^[41-42],菠萝病部致病蛋白基因显著上调表达。

3.3 抗氧化物质相关通路

果实品质劣变与抗氧化物质含量有关,鲜切茄子褐变会使抗氧化物质 GSH、ASA 含量降低^[43]。果实发病后,抗氧化物质代谢通路谷胱甘肽合成基因表达下调,黄酮生物合成途径基因下调表达,L-抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 基因显著下调表达,但 L-抗坏血酸氧化酶同系物基因显著上调表达,总体来说,果实发病后相关抗氧化物质基因表达量降低,但氧化性物质基因表达量升高,这将会使果实衰老加速,病情恶化。

综上所述,本研究从 RNA-Seq 数据中选择 3 个与菠萝黑心病相关的路径,对其差异进行聚类 and 定量验证分析,发现菠萝果实发病后,病部糖酵解、TCA 和生物氧化过程相关基因表达量显著上调、抗性蛋白基因表达显著下调,致病蛋白基因表达显著上调,抗氧化相关酶基因表达显著下调,氧化酶基因表达显著上调。通过上述分析可

以选择与黑心病相关的候选基因, 以丰富菠萝黑心病的基因网络。

参考文献

- [1] 谷会, 朱世江, 侯晓婉, 贾志伟, 张鲁斌. 氯化钙处理对菠萝采后黑心病及贮藏品质的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 170-176.
GU H, ZHU S J, HOU X W, JIA Z W, ZHANG L B. Effect of calcium chloride treatment on postharvest black heart disease and storage quality of pineapple[J]. Food Science, 2020, 41(9): 170-176. (in Chinese)
- [2] HOSSAIN M A, RAHMAN S. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 672-676.
- [3] 徐迟默, 杨连珍. 菠萝科技研究进展[J]. 热带生物学报, 2007, 13(3): 24-29.
XU C M, YANG L Z. Research progress of pineapple science and technology[J]. Journal of Tropical Biology, 2007, 13(3): 24-29. (in Chinese)
- [4] 张秀梅, 刘忠华, 杜丽清, 窦美安, 谢江辉, 孙光明. 两种菠萝果肉营养成分比较[J]. 食品工业科技, 2010, 31(11): 338-339, 342.
ZHANG X M, LIU Z H, DU L Q, DOU M A, XIE J H, SUN G M. Comparison of nutritional components of two kinds of pineapple flesh[J]. Food Industry Science and Technology, 2010, 31(11): 338-339, 342. (in Chinese)
- [5] HARRACH T, ECKERT K, MAURER H R, MACHLEIDT I, NUCK R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase[J]. Journal of Protein Chemistry, 1998, 14: 351.
- [6] MAURER H R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2001, 58(9): 1234-1245.
- [7] 刘士敬. 菠萝是最好的消炎助手[J]. 家庭科学·新健康, 2010(5): 63.
LIU S J. Pineapple is the best anti-inflammatory assistant[J]. Family Science·New Health, 2010(5): 63. (in Chinese)
- [8] 刘海清. 中国菠萝产业国际竞争力研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
LIU H Q. Research on international competitiveness of Chinese pineapple industry[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016. (in Chinese)
- [9] LI D, JING M, DAI X, CHEN Z, MA C, CHEN J. Current status of pineapple breeding, industrial development, and genetics in China[J]. Euphytica, 2022, 218(6): 1-17.
- [10] SELVARAJAH S, BAUCHOT A D, JOHN P. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene[J]. Postharvest Biology and Technology, 2001, 23(2): 167-170.
- [11] 胡会刚, 孙光明, 董晨, 谷会, 梁菁燕, 谢江辉. 菠萝采后主要病害发生及防治研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, 39(24): 93-96.
HU H G, SUN G M, DONG C, GU H, LIANG J Y, XIE J H. Research progress on occurrence and control of main postharvest diseases of pineapple[J]. Guangdong Agricultural Science, 2012, 39(24): 93-96. (in Chinese)
- [12] SINGH B, SURI K, SHEVKANI K, KAUR A, KAUR A, SINGH N. Enzymatic browning of fruit and vegetables: a review[M]//Kuddus, M. Enzymes in Food Technology. Singapore: Springer, 2018: 63-78.
- [13] ALI S, KHAN A S, MALIK A U. Postharvest L-cysteine application delayed pericarp browning, suppressed lipid peroxidation and maintained antioxidative activities of litchi fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 121: 135-142.
- [14] WÓJCIK P, SKORUPIŃSKA A, FILIPCZAK J. Impacts of preharvest fall sprays of calcium chloride at high rates on quality and 'Conference' pear storability[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 168: 51-57.
- [15] ADIKARAM N. Heat-induced tolerance to internal browning of pineapple (*Ananas comosus* cv. 'Mauritius') under cold storage[J]. Journal of Pomology and Horticultural Science, 2005, 80(4): 503-509.
- [16] SANGPRAYOON P, SUPAPVANICH S, YOURYON P, WONGS-AREE C, BOONYARITTHONGCHAI P. Chilling injury alleviation of Queen pineapple cv. 'Sawi' fruit by acetyl salicylate immersion[J]. Horticulture, Environment and Biotechnology, 2020, 61(1): 83-92.
- [17] 陈鑫瑶, 生吉萍, 胡朋, 王菲, 赵丹莹, 申琳. 外源乙烯和 1-MCP 处理对番茄采后贮藏期抗冷性的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 466-469.
CHEN X Y, SHENG J P, HU P, WANG F, ZHAO D Y, SHEN L. Effect of exogenous ethylene and 1-MCP treatment on cold resistance of tomato during postharvest storage[J]. Food Science, 2008, 29(7): 466-469. (in Chinese)
- [18] YU L, SHAO X, WEI Y, FENG X, WANG H. Sucrose degradation is regulated by 1-methylcyclopropene treatment and is related to chilling tolerance in two peach cultivars[J]. Postharvest Biology and Technology, 2017, 124: 25-34.
- [19] 屈红霞. 低温打蜡对贮藏菠萝黑心病控制的作用[J]. 广西植物, 2000, 20(1): 83-87.
QU H X. Effect of low temperature waxing on the control of pineapple black heart disease during storage[J]. Guihaia, 2000, 20(1): 83-87. (in Chinese)
- [20] 侯晓婉, 鹿志伟, 张鲁斌, 贾志伟, 谷会, 洪克前. 外源抗坏血酸对采后菠萝黑心病发生及抗氧化性能的影响[J]. 果树学报, 2018, 35(9): 1105-1116.
HOU X W, LU Z W, ZHANG L B, JIA Z W, GU H, HONG K Q. Effect of exogenous ascorbic acid on occurrence of

- postharvest pineapple black heart disease and antioxidant performance[J]. *Journal of Fruit Trees*, 2018, 35(9): 1105-1116. (in Chinese)
- [21] 福建农林大学在全世界首次破译菠萝基因组[J]. *福建农业科技*, 2015(12): 44.
Fujian Agriculture and Forestry University has decoded the genome of pineapple for the first time in the world[J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2015(12): 44. (in Chinese)
- [22] SHI Y, ZHANG X, CHANG X, YAN M, ZHAO H, QIN Y, WANG H. Integrated analysis of DNA methylome and transcriptome reveals epigenetic regulation of CAM photosynthesis in pineapple[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 19.
- [23] CHEN C, ZHANG Y, XU Z, LUAN A, HE Y. Transcriptome profiling of the pineapple under low temperature to facilitate its breeding for cold tolerance[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): E0163315.
- [24] WANG L, LI Y, JIN X, LIU L, DAI X, LIU Y. Floral transcriptomes reveal gene networks in pineapple floral growth and fruit development[J]. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 1-15.
- [25] KO L, ECCLESTON K, O'HARE T, WONG L, GILES J, SMITH M. Field evaluation of transgenic pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. 'Smooth Cayenne' for resistance to blackheart under subtropical conditions[J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 159: 103-108.
- [26] ZHANG Q, RAO X, ZHANG L, HE C, YANG F, ZHU S. Mechanism of internal browning of pineapple: the role of gibberellins catabolism gene (*AcGA2ox*) and GAs[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 33344.
- [27] RAIMBAULT A K, ZUILY-FODIL Y, SOLER A, MORA P, CRUZ D C M H. The expression patterns of bromelain and *AcCYSI* correlate with blackheart resistance in pineapple fruits submitted to postharvest chilling stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(16): 1442-1446.
- [28] HONG K, ZHANG L, ZHAN R, HUANG B, SONG K, JIA Z. Identification and characterization of phospholipase D genes putatively involved in internal browning of pineapple during postharvest storage[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 19(8): 913.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] WALI N. Pineapple (*Ananas comosus*) [M]. New York: Academic Press, 2019.
- [31] ZHOU H, ZHANG X, SU M, DU J, LI X, ZHANG M, YE Z. Controlled atmosphere storage alleviates internal browning in flat peach fruit by regulating energy and sugar metabolisms[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 186: 107-120.
- [32] CHEN X, TAN T, XU C, HUANG S, TAN J, ZHANG M, XIE C. Genome-wide transcriptome profiling reveals novel insights into *Luffa cylindrica* browning[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 463(4): 1243-1249.
- [33] PUSITTIGUL I, KONDO S, SIRIPHANICH J. Internal browning of pineapple (*Ananas comosus* L.) fruit and endogenous concentrations of abscisic acid and gibberellins during low temperature storage[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 146: 45-51.
- [34] 李征, 刘登义, 王育鹏, 丁佳红, 王广林. 活性氧在植物—病原物相互作用过程中的作用[J]. *安徽师范大学学报 (自然科学版)*, 2006(1): 70-74.
LI Z, LIU D Y, WANG Y P, DING J H, WANG G L. The role of reactive oxygen species in plant pathogen interactions[J]. *Journal of Anhui Normal University (Natural Science)*, 2006(1): 70-74. (in Chinese)
- [35] POURCEL L, ROUTABOUL J M, CHEYNIER V, LEPINIEC L, DEBEAUJON I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(1): 29-36.
- [36] RAZA S H, ATHAR H R, ASHRAF M, HAMEED A. Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 60(3): 368-376.
- [37] PESIS E, DVIR O, FEYGENBERG O, ARIE R B, ACKERMAN M, LICHTER A. Production of acetaldehyde and ethanol during maturation and modified atmosphere storage of litchi fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 26(2): 157-165.
- [38] SUN T, ZHANG Y. MAP kinase cascades in plant development and immune signaling[J]. *EMBO Reports*, 2022, 23(2): e53817.
- [39] NAKAGAMI H, PITZSCHKE A, HIRT H. Emerging map kinase pathways in plant stress signalling[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(7): 339-346.
- [40] ZHANG S, KLESSIG D F. MAPK cascades in plant defense signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(11): 301-341.
- [41] TIMPERIO A M, EGIDI M G, ZOLLA L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP)[J]. *Journal of Proteomics*, 2008, 71(4): 391-411.
- [42] CAMEJO D, GUZMÁN-CEDENO Á, MORENO A. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 103: 10-23.
- [43] LIU X H, XIAO K, ZHANG A D, ZHU W M, ZHANG H, TAN F, ZHA D S. Metabolomic analysis, combined with enzymatic and transcriptome assays, to reveal the browning resistance mechanism of fresh-cut eggplant[J]. *Foods*, 2022, 11(8): 1174.