

不同贮藏温度下伽师瓜硬度变化的转录组分析

张琴^{1,2}, 唐凤仙^{1,2}, 宋文¹, 周发科¹, 宁明¹, 单春会^{1,2*}

(¹石河子大学食品学院 新疆石河子 832000

²石河子大学 新疆特色果蔬贮藏加工教育部工程研究中心 新疆石河子 832000)

摘要 为从分子水平上研究伽师瓜采后贮藏过程中软化机理,评估不同贮藏条件下果实软化相关基因的表达差异,以采后 0.5,3,21℃贮藏 0,12,24 d 的伽师瓜果实为材料,采用转录组测序技术对伽师瓜果实进行转录组分析,筛选获得 118 个软化相关基因。其中,68 个基因在 3℃和 21℃下表达模式相反,69 个基因在 0.5℃和 21℃下表达模式相反。贮藏 12 d 时,在 21℃-3℃,21℃-0.5℃,3℃-0.5℃组中,差异表达的基因有 10 个;贮藏 24 d 时,在 21℃-3℃,21℃-0.5℃,3℃-0.5℃组中,差异表达的基因有 17 个。筛选到在软化过程中发挥重要调控作用的关键基因,并进行荧光定量验证。结果表明,低温通过调控软化关键基因的表达,延缓采后伽师瓜的软化,研究结果为进一步研究伽师瓜的软化机制以及贮藏保鲜提供理论依据。

关键词 伽师瓜; 软化; 低温贮藏; 转录组学

文章编号 1009-7848(2022)07-0193-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.07.020

伽师瓜属葫芦科 (Cucurbitaceae) 黄瓜属 (*Cucumis* L.),因产地在新疆伽师县而得名,居全疆甜瓜之首,被称为“天下第一瓜”。软化是跃变型果实成熟期间发生的主要变化之一,甜瓜作为一种典型的呼吸跃变型果实,在采后贮藏过程中,易迅速软化,从而增加了对机械损伤和病原菌感染的敏感性,缩短了采后贮藏寿命,造成巨大的经济损失^[1]。开展伽师瓜果实软化过程的研究,对延长其采后寿命和促进甜瓜产业的发展具有重要意义。

果实的软化与细胞壁成分(如果胶物质、半纤维素和纤维素)的分解密切相关^[2-3]。细胞壁的降解过程涉及多种酶,包括果胶酯酶(PE)、多聚半乳糖醛酸酶(PG)、 β -半乳糖苷酶(β -Gal)、 β -葡萄糖苷酶(β -Glu)、内切葡聚糖酶(EGase)、 β -木糖苷酶(β -Xyl)^[4-5]。PE 主要催化高甲基酯化果胶的去酯化反应,使细胞壁易于被 PG 进一步水解^[6];PG 催化聚半乳糖醛酸主链的半乳糖醛酸键的水解^[7],两者协同作用使果实软化。 β -Glu 能够水解结合于碳水化合物或糖苷分子非还原性末端的 β -D-葡萄糖键,基于底物糖苷配基的活性, β -Glu 在植物

中的生理功能包括细胞壁分解代谢^[8]、防御病原体^[9]和木质化^[10]。 β -GAL 可作用于鼠李半乳糖残基,水解 β -1,4-半乳糖键,催化果实软化^[11]。已有报道 PG、PE、EGase、 β -Glu 和 β -Gal 在不同贮藏时期,以不同的方式参与甜瓜果实的软化进程^[12]。在常温贮藏条件下,1-MCP 通过抑制细胞壁酶(PE、PG、EGase 和 β -GAL)活性,来延缓哈密瓜的软化^[1]。

温度控制是维持果实采后品质、延长保存期的有效策略,低温能够降低果实代谢率,同时抑制大量参与果实后熟过程酶的活性及相关基因的表达,从而有效延缓采后果实的软化^[13-14]。研究不同贮藏温度下伽师瓜果实软化相关酶活性变化,以及相关基因的转录表达,对于了解采后贮藏过程中伽师瓜硬度的变化,以及挖掘软化关键基因具有非常重要的意义。

本试验以伽师瓜为研究对象,对不同温度(0.5,3,21℃)贮藏 0,12,24 d 的伽师瓜果实进行转录组分析,旨在研究贮藏温度对采后伽师瓜硬度,特别是相关基因表达的影响,以为伽师瓜的软化调控及贮藏保鲜提供数据支撑。

收稿日期: 2021-07-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560471);新疆生产建设兵团重点领域创新团队建设计划项目(2017CB012)

作者简介: 张琴(1994—),女,博士生

通信作者: 单春会 E-mail: sch_food@shzu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

从新疆石河子 121 团农场采摘成熟度为八成

熟(可溶性固形物含量 12%左右)、大小均匀、无病虫害和机械损伤的伽师瓜。采摘后,将每个哈密瓜置于独立塑料网中,然后放入标准纸箱(50 cm×40 cm×18 cm,每箱 3~4 个),运往石河子大学食品学院,贮藏温度分别为 21,3 °C 和 0.5 °C,相对湿度 85%~95%。

酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,上海优选生物科技有限公司;RNA 试剂盒(Trizol),生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

TA.XT plus 质构仪,英国 Stable Micro Systems 公司;Multifuge X1R 高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;1X71 多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;LightCycler480 II 型荧光定量 PCR 仪,瑞士 Rotkreuz 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品收集 预冷 24 h 后设置为对照组 0 d,对 3 个温度贮藏下的伽师瓜分别于 0,12,24 d 取样,每组取样包含 6 个瓜,设置 3 次重复。取样时,去除 2 mm 果皮,并从表面获取 4~5 g 哈密瓜组织,样品置于液氮速冻并转移至-80 °C 冰箱中保存,备用。

1.3.2 硬度的测定 根据 Ning 等^[9]的方法测定伽师瓜果实硬度。将伽师瓜切成厚度为 1.5 cm 的薄片,利用质构仪在穿刺模式下测定其硬度,每个瓜设置 5 个重复,取平均值。

1.3.3 酶活的测定 果胶酯酶(PE)和 β -葡萄糖苷酶(β -Glu)活力均采用 ELISA 试剂盒进行测定。

1.3.4 转录组测序及数据分析

1.3.4.1 测序 使用 TRIzol RNA 提取试剂盒提取伽师瓜总 RNA,cDNA 文库的构建及转录组测序由深圳华大基因研究院完成。

1.3.4.2 基因表达分析 利用 RSEM^[10]工具进行基因表达定量,表达定量的结果以 FPKM 为单位,具体计算公式如下:

$$FPKM = \frac{10^9 C}{NL} \quad (1)$$

式中, C ——比对到某基因的 fragments 数; N ——比对到参考基因的总 fragments 数; L ——基因编码区的碱基数。

1.3.4.3 差异表达基因的筛选 通过控制错误发现率(FDR)来决定 P -value 的阈值,该基因的表达水平(FPKM 值)用于计算样品之间表达的倍数变化,以 $|\log_2(\text{Ratio})| \geq 1$ 且 $FDR \leq 0.001$ 为标准筛选差异表达基因。

1.3.4.4 实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物序列(表 1),使用 LightCycler480 II 型荧光定量 PCR 仪进行 PCR 检测,反应程序为 95 °C,3 min;反应循环 45 次,循环过程 95 °C,5 s;60 °C,30 s。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达水平。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The sequences of specific primers used for qRT-PCR analysis

基因 ID	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
103483370	GACGGATTCATCGCCAGAGA	CGCAACGGTAGAAGACTGAGA	109
103487960	CATTCTCCTCCTCGCCTTCTG	AATCCTCATAAGCCGCTTCAA	239
103501132	TGTGGAAGTGGATTGGTGAA	AGAAGTGAAGTGGCGATGAAT	137
103502767	TGCTATCTATATGCTTGCTCCTTGT	TCACCTCAATCTTGCTGACTATCT	109
103494366	GCCTTCTGCTCCTCCTCTTC	TCGTTCTGTCTTGTGCCTCTC	152
103492528	TGAACGAGAGCGAGACAGAA	TGGTCATAAGTCACAGAGCCTATT	146

1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2010、Origin 2018、SPSS 17.0 和 TBtools 等软件对试验数据进行统计分析及图像处理。

2 结果与分析

2.1 贮藏温度对伽师瓜果实硬度的影响

由图 1 可以看出,随着贮藏时间的延长,伽师瓜果实的硬度不断降低。0.5 °C 贮藏条件下,伽师瓜硬度下降较为缓慢,且在整个贮藏过程中始终

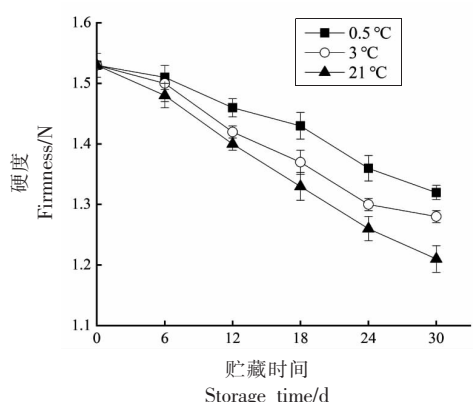
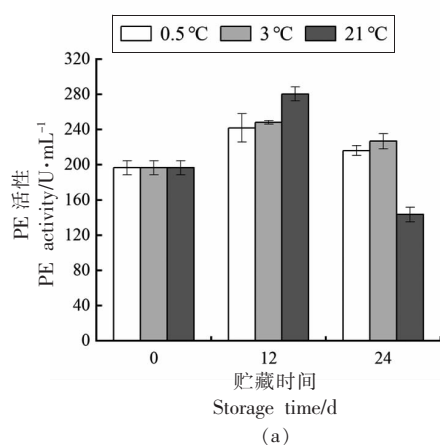


图1 不同贮藏温度对伽师瓜果实在硬度上的影响

Fig.1 Effect of different storage temperatures on the firmness of Jiashi melon

高于3 °C处理组和21 °C处理组。贮藏开始时(0 d),伽师瓜果实在硬度为1.53 N,贮藏结束时(30 d),0.5 °C处理组伽师瓜硬度为1.32 N,相对于贮藏前下降了13.7% ($P < 0.05$);3 °C处理组伽师瓜硬度为1.28 N,相对于贮藏前下降了16.3% ($P < 0.05$);21 °C处理组伽师瓜硬度为1.21 N,相对于

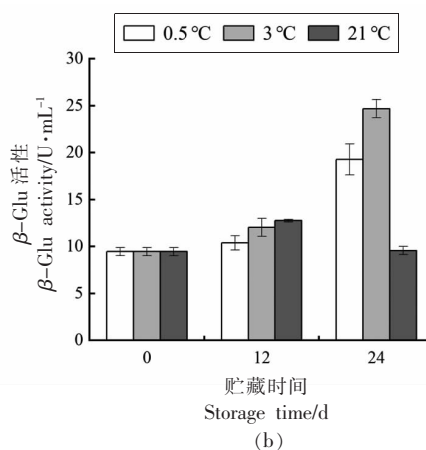


贮藏前下降了20.9% ($P < 0.05$)。由此可知,低温贮藏能够延缓伽师瓜的软化,尤其是0.5 °C贮藏,能够较好的维持伽师瓜的硬度。

2.2 贮藏温度对伽师瓜果实在PE、 β -Glu活性的影响

如图2a所示,伽师瓜果实在贮藏过程中呈先上升后下降的趋势。贮藏12 d时,21 °C处理组的PE活力最高,为280.53 U/mL,3 °C和0.5 °C处理组的PE活力分别为248.29 U/mL和241.84 U/mL。贮藏24 d时,21 °C处理组的PE活力显著低于3 °C和0.5 °C处理组 ($P < 0.05$),同时,0.5 °C处理组的PE活力在12 d和24 d均低于3 °C处理组。

由图2b可知,常温贮藏下伽师瓜果实在 β -Glu活性随着贮藏时间的延长呈先上升后下降的趋势。贮藏12 d时,0.5 °C处理组和3 °C处理组的 β -Glu活力分别为10.37 U/mL和12.04 U/mL,均低于21 °C处理组,低温会抑制伽师瓜果实在 β -Glu活力,这种抑制作用在贮藏后期更为明显。

图2 不同贮藏温度对伽师瓜果实在PE和 β -Glu活性的影响Fig.2 Effect of different storage temperatures on the activity of PE and β -Glu in Jiashi melon

2.3 采后贮藏期间伽师瓜果实在转录组分析

与对照组(0 d)相比,不同贮藏温度和不同贮藏时间下的差异表达基因如图3所示。在3个贮藏温度下,与对照组相比,贮藏24 d时的差异表达基因数目均高于12 d,并且整个贮藏期间下调表达的基因数目均大于上调表达基因数。12 d时,3 °C贮藏条件下的下调表达基因数最多,0.5 °C贮藏条件下的上调表达基因数最多;24 d时,0.5 °C贮藏条件下的下调表达基因数最多,3 °C贮藏条件

下的上调表达基因数最多。结果表明,伽师瓜果实在许多基因的表达水平都受到贮藏条件的影响,并且不同贮藏温度和贮藏时间的影响各不相同。此外,低温动员了更多基因的差异表达,这些基因表达水平的变化,对于调节哈密瓜对冷的应答并保护细胞免受冷害损伤,具有非常重要的作用。

2.4 21 °C下软化相关差异表达基因的筛选与分析

从转录组和KEGG pathway数据库筛选得到33个 β -Glu基因,32个 β -Gal基因,31个PE基

因,9个 *PG* 基因,7个 *EGase* 基因和6个 β -*Xyl* 基因。以上118个基因表达结果显示,与对照组相比,21℃-12d组中筛选出14个显著差异表达基因,21℃-24d组中筛选出42个显著差异表达基因(图4)。进一步分析表明,10个基因在2个时间点均差异表达(表2),包括3个 *EGase* 基因(ID: 103482819;103493091;103499972),2个 β -*Gal* 基

因(103492646;103503132),2个 *PE* 基因(103483370;103483991),1个 β -*Xyl* 基因(103488410),1个 β -*Glu* 基因(103492048)和1个 *PG* 基因(103493318)。这些基因表达水平的变化可能与21℃贮藏条件下伽师瓜硬度的变化特性直接相关。

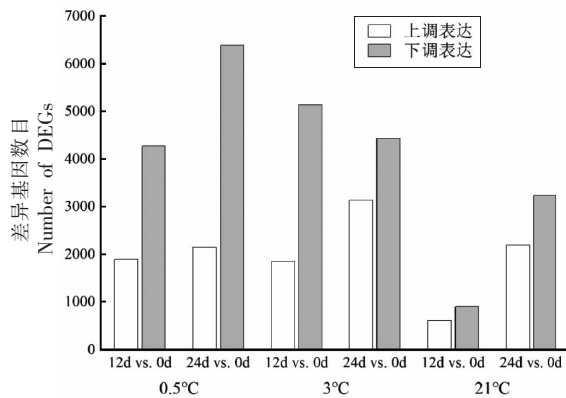


图3 不同贮藏条件下差异表达基因数

Fig.3 Number of DEGs in different storage conditions

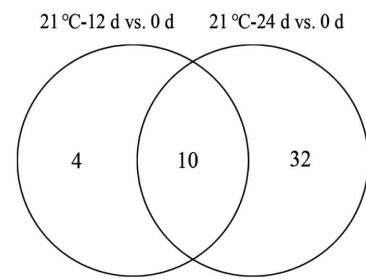


图4 21℃下差异表达基因维恩图
Fig.4 Venn diagram of DEGs at 21℃

表2 21℃贮藏条件下伽师瓜软化相关基因表达情况

Table 2 Expression of softening-related genes in Jiashi melon at 21℃

基因 ID	21℃				KEGG 注释
	log ₂ ratio(样本/0 d)		P 值		
	12 d	24 d	12 d	24 d	
103482819	-1.66	-6.55	1.42×10 ⁻⁶⁶	9.56×10 ⁻⁹⁸	EGase [EC:3.2.1.4]
103483370	3.82	2.68	4.77×10 ⁻⁵²	1.60×10 ⁻¹¹	PE [EC:3.1.1.11]
103483991	-1.81	-1.83	2.10×10 ⁻¹⁹⁰	1.25×10 ⁻⁹²	PE [EC:3.1.1.11]
103488410	-2.11	-2.04	1.06×10 ⁻³⁸	3.64×10 ⁻¹⁸	β -Xyl [EC:3.2.1.37]
103492048	-1.72	-6.91	2.91×10 ⁻¹⁷⁷	2.04×10 ⁻²⁵⁵	β -Glu [EC:3.2.1.21]
103492646	-1.57	-1.65	2.92×10 ⁻¹⁰	9.67×10 ⁻⁶	β -Gal [EC:3.2.1.23]
103493091	-2.57	-2.95	1.58×10 ⁻⁸³	5.83×10 ⁻⁴⁵	EGase [EC:3.2.1.4]
103493318	1.08	-2.53	1.87×10 ⁻³²	6.17×10 ⁻²⁴	PG [EC:3.2.1.15]
103499972	3.65	2.16	4.21×10 ⁻²⁹	8.22×10 ⁻⁵	EGase [EC:3.2.1.4]
103503132	-1.20	-2.92	1.34×10 ⁻⁴	5.79×10 ⁻⁶	β -Gal [EC:3.2.1.23]

2.5 3℃下软化相关基因的表达水平分析

利用 FPKM 法计算基因表达量,以研究温度对采收伽师瓜贮藏期间硬度相关基因表达水平的影响。筛选获得68个软化相关基因在3℃和21℃下表达模式相反(图5),包括18个 *PE* 基因,22个 β -*Glu* 基因,19个 β -*Gal* 基因,4个 *PG* 基因,4

个 β -*Xyl* 基因以及1个 *EGase* 基因。进一步分析表明,与对照组相比,7个 β -*Glu* 基因,6个 β -*Gal* 基因和3个 *PE* 基因在21℃条件下表达水平无变化,然而在3℃下显著下调表达(表3),其中下调倍数最大的是 β -*Glu* 基因 103488476 [\log_2 ratio(12 d/0 d) = -3.37; \log_2 ratio(24 d/0 d) = -3.51]。此

外, β -Gal 基因 (103492389;103492528), β -Glu 基因(103489355;103497095), *PE* 基因(103487960)变化倍数也较大, 这些基因的表达变化可能与 3 °C 贮藏条件下伽师瓜的硬度变化减缓有关。

2.6 0.5 °C 下软化相关基因的表达水平分析

筛选获得 69 个软化相关基因在 0.5 °C 和 21 °C 贮藏条件下表达模式相反(图 6), 其中, 包括 19 个 *PE* 基因, 19 个 β -Glu 基因, 20 个 β -Gal 基因, 4 个 *PG* 基因, 5 个 β -Xyl 基因, 2 个 *EGase* 基因。与对照组相比, 16 个软化相关基因在 21 °C 条件下表

达水平无变化, 然而在 0.5 °C 下显著下调表达(表 4), 包括 7 个 β -Glu 基因, 4 个 *PE* 基因, 4 个 β -Gal 基因和 1 个 *PG* 基因。其中, β -Gal 基因 (103503204) 和 β -Glu 基因 (103494776) 在 12 d 和 24 d 下调倍数均较大, 此外, 12 d 时 β -Glu 基因 (103491100)、*PE* 基因 (107992140), 以及 24 d 时 *PE* 基因 (103499643) β -Glu 基因 (103502767; 103501132; 103489355) 下调倍数也较大。这些基因可能与伽师瓜在 0.5 °C 和 21 °C 贮藏下硬度的变化差异直接相关。

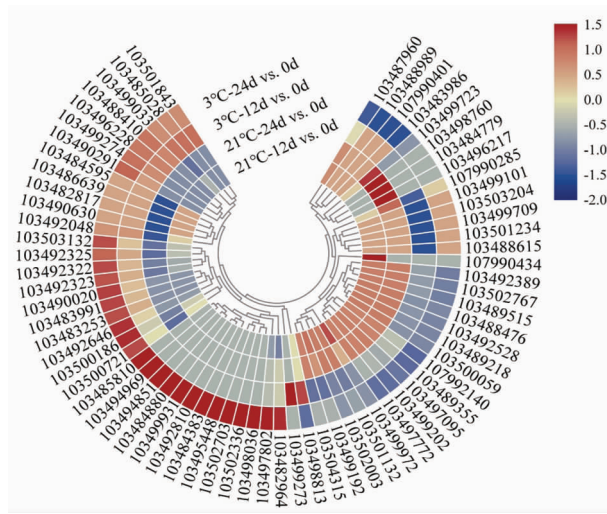


图 5 21 °C 和 3 °C 间表达模式相反的差异表达基因热图分析

Fig.5 Heatmap of DEGs with opposite regulating patterns between 21 °C and 3 °C

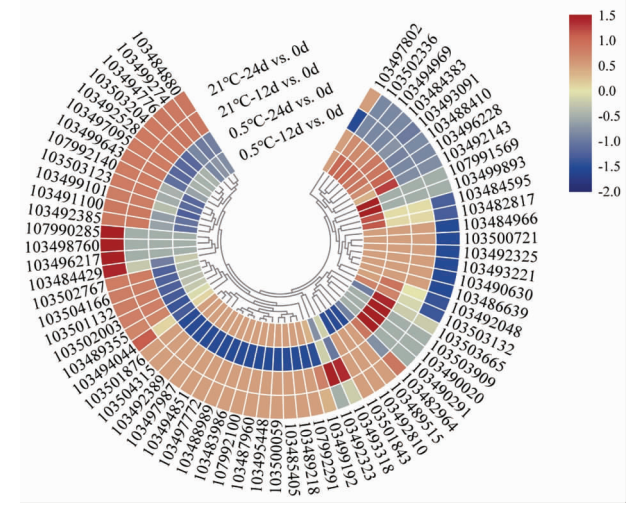


图 6 21 °C 和 0.5 °C 间表达模式相反的差异表达基因热图分析

Fig.6 Heatmap of DEGs with opposite regulating patterns between 21 °C and 0.5 °C

表 3 3 °C 贮藏条件下伽师瓜软化相关基因下调表达情况

Table 3 Down-regulated expression of softening-related genes in Jiashi melon at 3 °C storage

基因 ID	3 °C				KEGG 注释
	log ₂ ratio(样本/0 d)		P 值		
	12 d	24 d	12 d	24 d	
103499202	-1.78	-2.79	1.83×10 ⁻¹⁰⁹	1.80×10 ⁻¹²⁴	PE [EC:3.1.1.11]
103487960	-1.04	-2.88	8.71×10 ⁻¹⁶	1.89×10 ⁻³⁹	PE [EC:3.1.1.11]
107992140	-1.41	-2.56	3.03×10 ⁻¹⁰	7.77×10 ⁻¹⁴	PE [EC:3.1.1.11]
103497772	-1.25	-1.88	9.71×10 ⁻¹⁷⁶	8.68×10 ⁻²¹³	β -Glu [EC:3.2.1.21]
103497095	-2.17	-2.95	1.21×10 ⁻⁸⁵	3.10×10 ⁻⁷⁸	β -Glu [EC:3.2.1.21]
103502767	-1.91	-2.24	7.07×10 ⁻¹⁷	4.58×10 ⁻¹⁴	β -Glu [EC:3.2.1.21]
103501132	-1.68	-1.37	1.72×10 ⁻²²	5.83×10 ⁻¹²	β -Glu [EC:3.2.1.21]
103489218	-2.12	-2.28	7.65×10 ⁻¹⁵	4.75×10 ⁻¹¹	β -Glu [EC:3.2.1.21]
103488476	-3.37	-3.51	1.68×10 ⁻⁹	1.18×10 ⁻⁶	β -Glu [EC:3.2.1.21]
103489355	-1.81	-3.09	6.90×10 ⁻⁹	1.91×10 ⁻¹⁰	β -Glu [EC:3.2.1.21]

(续表 3)

基因 ID	3 °C				KEGG 注释
	log ₂ ratio(样本/0 d)		P 值		
	12 d	24 d	12 d	24 d	
103489515	-1.07	-1.26	4.11×10 ⁻³⁹	1.46×10 ⁻³⁴	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103500059	-1.96	-2.08	2.48×10 ⁻¹²³	4.60×10 ⁻⁸⁹	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103504315	-2.35	-1.58	1.55×10 ⁻¹⁵	9.88×10 ⁻⁷	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103502003	-1.54	-1.40	3.64×10 ⁻²⁰	1.52×10 ⁻¹²	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103492528	-2.38	-2.60	6.23×10 ⁻⁷²	6.93×10 ⁻⁵³	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103492389	-2.54	-3.10	4.05×10 ⁻⁸	1.22×10 ⁻⁶	β-Gal [EC:3.2.1.23]

表 4 0.5 °C 贮藏条件下伽师瓜软化相关基因下调表达情况

Table 4 Down-regulated expression of softening-related genes in Jiashi melon at 0.5 °C storage

基因 ID	0.5 °C				KEGG 注释
	log ₂ ratio(样本/0 d)		P 值		
	12 d	24 d	12 d	24 d	
103499274	-1.31	-1.51	3.00×10 ⁻⁷⁴	3.83×10 ⁻¹¹³	PE [EC:3.1.1.11]
103503123	-1.72	-1.18	1.77×10 ⁻⁹	3.58×10 ⁻⁷	PE [EC:3.1.1.11]
103499643	-2.01	-2.65	2.37×10 ⁻¹¹	6.12×10 ⁻¹⁹	PE [EC:3.1.1.11]
107992140	-2.75	-1.78	2.96×10 ⁻¹⁰	6.53×10 ⁻⁸	PE [EC:3.1.1.11]
103492385	-2.00	-1.51	6.76×10 ⁻²⁵	2.15×10 ⁻²¹	PG [EC:3.2.1.15]
103484880	-1.97	-2.12	1.11×10 ⁻⁶²	1.45×10 ⁻⁸⁵	β-Glu [EC:3.2.1.21]
103504166	-1.62	-2.86	1.78×10 ⁻⁹	6.57×10 ⁻²²	β-Glu [EC:3.2.1.21]
103502767	-2.01	-3.51	8.52×10 ⁻⁸	4.91×10 ⁻¹⁶	β-Glu [EC:3.2.1.21]
103494776	-2.54	-2.52	1.73×10 ⁻⁷¹	2.31×10 ⁻⁸⁹	β-Glu [EC:3.2.1.21]
103491100	-2.64	-2.11	2.11×10 ⁻⁴	1.87×10 ⁻⁴	β-Glu [EC:3.2.1.21]
103501132	-1.51	-2.72	4.54×10 ⁻⁵	1.95×10 ⁻¹¹	β-Glu [EC:3.2.1.21]
103489355	-2.01	-5.30	7.78×10 ⁻⁵	5.77×10 ⁻¹²	β-Glu [EC:3.2.1.21]
103499101	-1.99	-1.11	1.42×10 ⁻¹⁹	3.74×10 ⁻¹¹	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103502003	-1.18	-2.38	1.66×10 ⁻⁸	2.17×10 ⁻²⁴	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103492528	-1.26	-1.92	6.33×10 ⁻¹¹	2.82×10 ⁻²³	β-Gal [EC:3.2.1.23]
103503204	-3.35	-5.13	4.50×10 ⁻²⁴	2.73×10 ⁻⁴⁰	β-Gal [EC:3.2.1.23]

2.7 3 个温度下硬度相关基因的表达水平分析

筛选 21 °C-3 °C, 21 °C-0.5 °C 和 3 °C-0.5 °C 组的差异表达基因来评估贮藏温度对软化相关基因表达水平的影响。由图 7 可知, 贮藏 12 d 时, 在 21 °C-3 °C, 21 °C-0.5 °C 和 3 °C-0.5 °C 组中均差异表达的基因有 10 个, 在 21 °C-3 °C 和 3 °C-0.5 °C 组中均差异表达的基因有 23 个, 在 21 °C-0.5 °C 和 3 °C-0.5 °C 组中均差异表达的基因有 25 个。贮藏 24 d 时, 在 21 °C-3 °C, 21 °C-0.5 °C 和 3 °C-0.5 °C 组中均差异表达的基因有 17 个, 在 21 °C-3 °C 和 3 °C-0.5 °C 组中均差异表达的基因有 33 个, 在

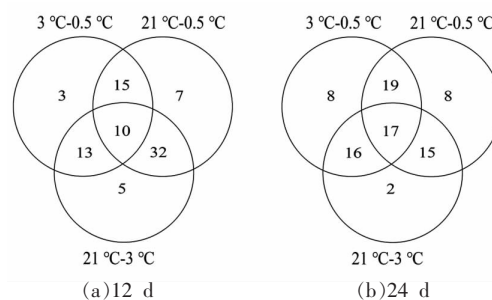


图 7 3 °C-0.5 °C, 21 °C-0.5 °C 和 21 °C-3 °C 组差异表达基因维恩图

Fig.7 Venn diagram of DEGs among the sets of 3 °C-0.5 °C, 21 °C-0.5 °C, and 21 °C-3 °C

21 °C-0.5 °C 和 3 °C-0.5 °C 组中均差异表达的基因有 35 个。这些基因受贮藏温度的影响差异显著,可能与不同温度贮藏下,果实果胶物质的水解程度直接相关,进而影响果实硬度的变化。

对在 3 个对比组中均差异表达的基因分析可知,贮藏 12 d 时,与 21 °C 相比,4 个基因在 3 °C 和 0.5 °C 下调表达,且在 0.5 °C 的下调程度高于 3 °C,包括 2 个 β -Gal 基因 (103494366;103503204),1

个 β -Glu 基因 (103501132) 和 1 个 PE 基因 (103483370)(图 8a)。同样地,贮藏 24 d 时,与 21 °C 相比,4 个基因在 3 °C 和 0.5 °C 下调表达,且在 0.5 °C 的下调程度高于 3 °C,2 个 β -Glu 基因 (103497772;103501132),1 个 β -Gal 基因 (103500059) 和 1 个 PE 基因 (103483986)(图 8b)。

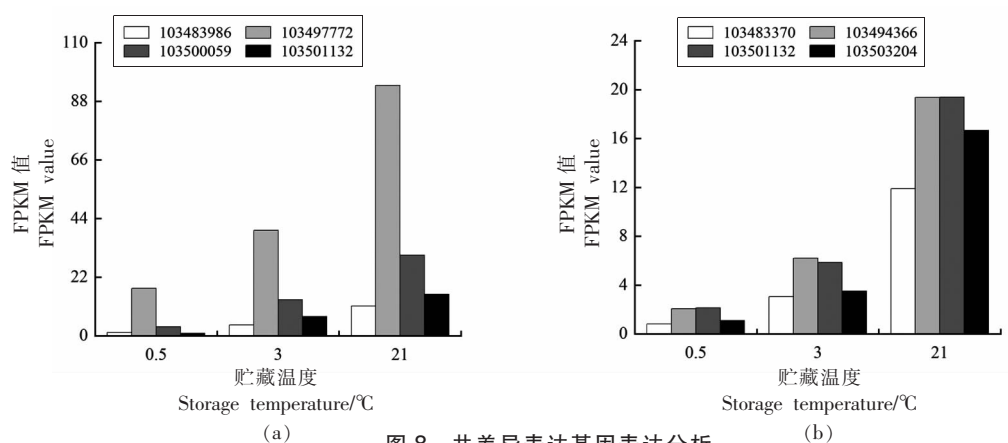


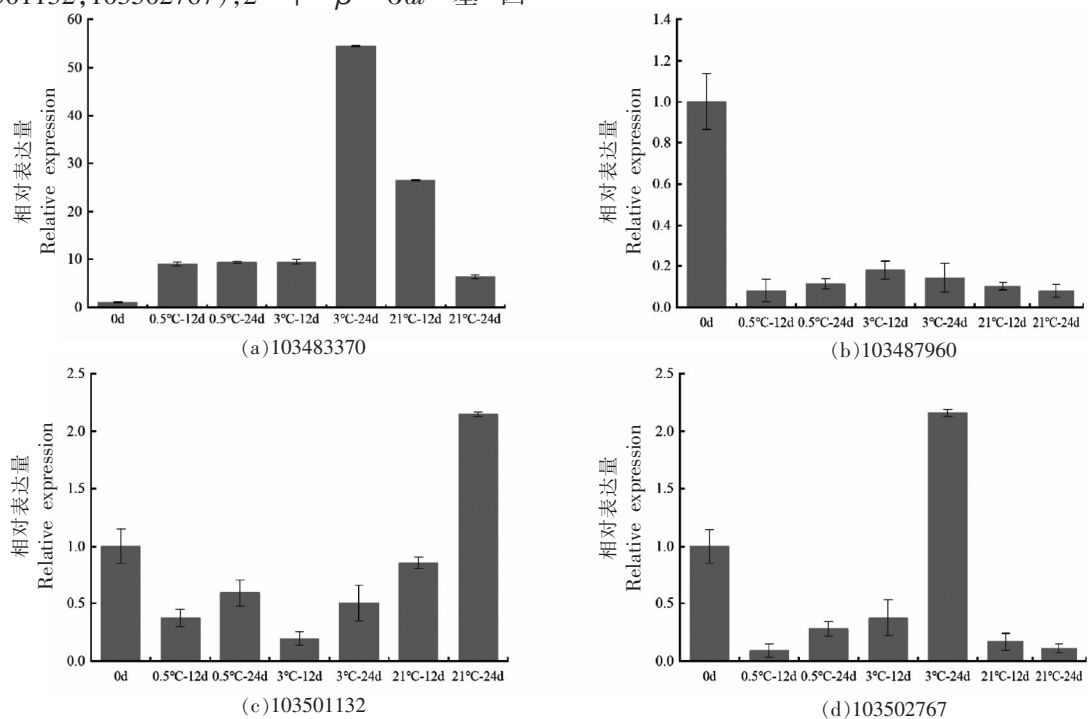
图 8 共差异表达基因表达分析

Fig.8 Expression analysis of common DEGs

2.8 qRT-PCR 验证分析基因表达

为了验证转录组测序结果,选择 6 个软化相关基因进行 qRT-PCR 分析,包括 2 个 PE 基因 (103483370;103487960),2 个 β -Glu 基因 (103501132;103502767),2 个 β -Gal 基因

(103494366;103492528)。结果如图 9 所示,qRT-PCR 验证的基因表达变化趋势与 RNA-Seq 鉴定的基因表达趋势一致,表明转录组测序结果具有较高的可靠性。



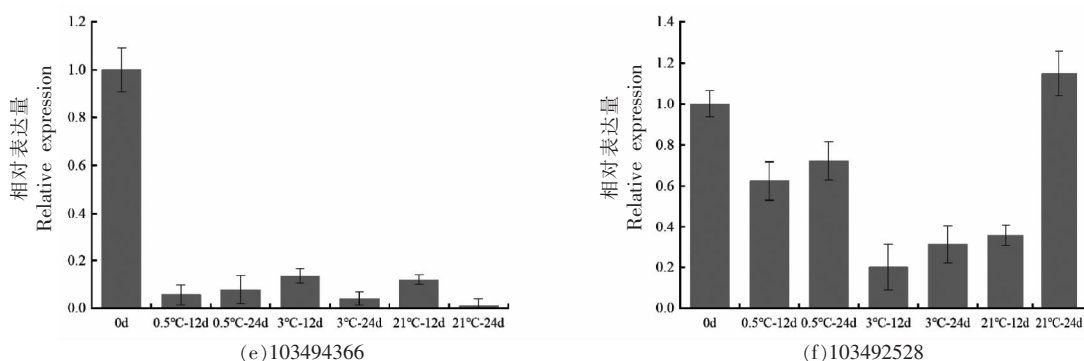


图9 不同贮藏温度对基因表达量的影响

Fig.9 Effect of different storage temperatures on the gene expression

3 讨论

硬度是评价果实品质的重要指标之一,果实软化是硬度降低的外在表现^[17]。哈密瓜是典型的呼吸跃变型果实,在采后常温贮藏条件下易发生软化,严重缩短了其货架期,并限制了贮藏和运输^[1]。对李子的研究发现低温能够在一定程度上抑制各细胞壁酶的活性,从而影响李子的软化^[18],这与本研究结果一致,在贮藏前期(12 d),低温处理组的PE、 β -Glu活性均低于常温处理组,果胶的降解减慢,伽师瓜的硬度降低较缓。后期21℃处理组的PE活力急剧降低,可能与贮藏后期果实的腐烂有关; β -Glu主要参与后期的果实软化。此外,通过采前乙酰水杨酸处理^[19]和采后1-MCP处理^[7,20],均可降低甜瓜果实 β -Glu活性,减缓果实硬度的下降。

通过对不同贮藏温度下哈密瓜软化相关基因表达变化的分析可知,低温主要通过调控 β -Glu基因、 β -Gal基因、PE基因以及PG基因的表达来减缓采后伽师瓜的软化(表3,表4,图8)。在果实软化过程中,PE和PG基因表达量较高,参与细胞壁的修饰从而导致果胶降解和果实软化^[21]。PE基因(107992140)在低温(0.5℃和3℃)下的表达模式与21℃相反,并且与对照组相比,该基因在21℃条件下表达水平无变化,然而在低温下显著下调表达;同样地,PG基因(103492385)在0.5℃下显著下调表达,然而在21℃下表达水平无变化。这些基因的表达差异可能是低温下哈密瓜硬度维持的主要原因。对杏的研究表明 β -Gal基因的表

达峰值时间与最大乙烯产量时间一致,同时1-MCP处理可抑制其表达^[22]。*PpBGAL10*和*PpBGAL16*是影响乙烯依赖型桃果实软化的主要 β -Gal基因,其下调表达时可通过降低PG和PE活性,抑制细胞壁的降解和乙烯的生成,从而延缓桃果实软化^[23]。 β -Glu属于细胞壁多糖水解酶类,能与纤维素酶协调作用,在植物细胞生长发育过程中参与细胞壁结构的松弛或加固^[24]。Ge等^[25]研究表明 β -Glu在延缓枣果实硬度下降中发挥重要作用。 β -Glu基因*DkBG1*的过表达可通过提高脱落酸水平来改变果实成熟度,并通过调节转基因番茄中的可溶性糖水平来影响果实品质。目前,操纵糖苷酶活性和基因转录调控是提高果实品质性状的一种重要策略,在本研究结果中,较多的 β -Gal和 β -Glu基因在不同的贮藏条件下显著差异表达,因此,调节 β -Gal和 β -Glu相关基因的表达可能是减少采后伽师瓜硬度损失的重要方法。

4 结论

运用转录组学技术分别对采后0.5、3℃和21℃贮藏0、12 d和24 d的伽师瓜果实进行转录组分析,筛选得到118个软化相关基因,结果表明贮藏温度显著影响了软化相关基因的表达水平,低温通过抑制细胞壁酶的活性以及调控软化相关基因的表达,来减缓伽师瓜果实的软化进程。另外,挖掘出了部分调控软化的重要基因,为通过基因操作改善伽师瓜贮藏软化提供支撑。

参 考 文 献

- [1] LI X, CAO S, ZHENG Y, et al. 1-MCP suppresses ethylene biosynthesis and delays softening of 'Hami' melon during storage at ambient temperature [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(14): 2684-2688.
- [2] ZHOU R, LI Y, YAN L, et al. Effect of edible coatings on enzymes, cell-membrane integrity, and cell-wall constituents in relation to brittleness and firmness of Huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huanghua) during storage [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(2): 569-575.
- [3] LIN Y, LIN Y, LIN H, et al. Effects of paper containing 1-MCP postharvest treatment on the disassembly of cell wall polysaccharides and softening in Younai plum fruit during storage [J]. *Food Chemistry*, 2018, 264: 1-8.
- [4] ZERPA -CATANHO D, ESQUIVEL P, MORA -NEWCOMER E, et al. Transcription analysis of softening-related genes during postharvest of papaya fruit (*Carica papaya* L. 'Pococí' hybrid) [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 125: 42-51.
- [5] WANG S, ZHOU Q, ZHOU X, et al. Ethylene plays an important role in the softening and sucrose metabolism of blueberries postharvest [J]. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125965.
- [6] CHEN Y, SUN J, LIN H, et al. Paper-based 1-MCP treatment suppresses cell wall metabolism and delays softening of Huanghua pears during storage [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(8): 2547-2552.
- [7] 马文平, 倪志婧, 任贤, 等. 1-MCP对“玉金香”甜瓜采后果实软化的作用机理 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2012, 40(2): 103-108.
MA W P, NI Z J, REN X, et al. Effect of 1-MCP on softening mechanism in "Yujinxiang" melon fruit during storage [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2012, 40(2): 103-108.
- [8] CAIRNS J R K, MAHONG B, BAIYA S, et al. beta-Glucosidases: Multitasking, moonlighting or simply misunderstood? [J]. *Plant Science*, 2015, 241: 246-259.
- [9] SUZUKI H, TAKAHASHI S, WATANABE R, et al. An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings - Purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(40): 30251-30259.
- [10] DHARMAWARDHANA D P, ELLIS B E, CARLSON J E. A beta-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the Ligin precursor coniferin [J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(2): 331-339.
- [11] KHADEMI O, BESADA C, MOSTOFI Y, et al. Changes in pectin methylesterase, polygalacturonase, catalase and peroxidase activities associated with alleviation of chilling injury in persimmon by hot water and 1-MCP treatments [J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 179: 191-197.
- [12] WEI J, QI X, CHENG Y, et al. Difference in activity and gene expression of pectin-degrading enzymes during softening process in two cultivars of Chinese pear fruit [J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 197: 434-440.
- [13] 吴延军, 张继澍, 王春生, 等. 低温对枣果实采后软化衰老的生理效应 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2001(6): 47-49.
WU Y J, ZHANG J S, WANG C S, et al. Effects of post-harvest treatment with low temperature on softening and senescence of the Chinese jujube fruit (*Zizyphus Jujuba* Mill) [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2001(6): 47-49.
- [14] GWANPUA S G, VAN BUGGENHOUT S, VERLINDEN B E, et al. Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples [J]. *Food Chemistry*, 2014, 158: 283-291.
- [15] NING M, TANG F, ZHANG Q, et al. The quality of Gold Queen Hami melons stored under different temperatures [J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 243: 140-147.
- [16] LI B, DEWEY C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323.
- [17] LIN H, ZHAO Y, XI Y. Changes in cell wall components and cell wall-degrading enzyme activities of postharvest longan fruit during aril breakdown

- [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, 33(2): 137–145.
- [18] 梁洁玉, 朱丹实, 赵丽红, 等. 低温贮藏李子细胞壁酶活性变化对果胶降解的影响[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(5): 212–218.
- LIANG J Y, ZHU D S, ZHAO L H, et al. Effect of changes in cell wall enzyme activity on degradation of pectin during low-temperature storage of plum [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(5): 212–218.
- [19] 刘耀娜, 王毅, 毕阳, 等. 采前乙酰水杨酸处理对厚皮甜瓜果实后熟及软化的影响[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(10): 1865–1875.
- LIU Y N, WANG Y, BI Y, et al. Effect of pre-harvest acetylsalicylic acid treatments on ripening and softening of harvested muskmelon fruit[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(10): 1865–1875.
- [20] 朱婉彤, 冯作山, 白羽嘉, 等. 乙烯和 1-MCP 对伯谢克辛甜瓜果实软化及细胞壁降解的影响[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(12): 94–101.
- ZHU W T, FENG Z S, BAI Y J, et al. Effects of ethylene and 1-MCP treatments on softening and cell wall degradation of Bethexin melon fruit [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(12): 94–101.
- [21] SONG L, WANG Z, WANG Z, et al. Screening of cell wall-related genes that are expressed differentially during ripening of pears with different softening characteristics[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 115: 1–8.
- [22] FAN X G, SHU C, ZHAO K, et al. Regulation of apricot ripening and softening process during shelf life by post-storage treatments of exogenous ethylene and 1-methylcyclopropene[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 232: 63–70.
- [23] LIU H, QIAN M, SONG C, et al. Down-regulation of *PpBGAL10* and *PpBGAL16* delays fruit softening in peach by reducing polygalacturonase and pectin methylesterase activity[J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1015.
- [24] TANG Q, LI C, GE Y, et al. Exogenous application of melatonin maintains storage quality of jujubes by enhancing anti-oxidative ability and suppressing the activity of cell wall-degrading enzymes[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2020, 127: 109431.
- [25] GE Y, ZHANG J, LI C, et al. Trisodium phosphate delays softening of jujube fruit by inhibiting cell wall-degrading enzyme activities during ambient storage[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 262: 109059.

Transcriptome Analysis of Firmness Change in Jiashi Melon Fruit at Different Storage Temperatures

Zhang Qin^{1,2}, Tang Fengxian^{1,2}, Song Wen¹, Zhou Fake¹, Ning Ming¹, Shan Chunhui^{1,2*}

¹*Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang*

²*Engineering Research Center of Xinjiang Characteristic Fruit and Vegetable Storage and Processing, Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang*

Abstract The aim of this study was to examine the softening mechanism of Jiashi melon during postharvest storage, and assess differences in the expression of genes involved in fruit softening under different storage conditions. RNA-sequencing was employed to characterize the transcriptomic profiles of Jiashi melon that were stored at 21, 3 °C and 0.5 °C for 0, 12, 24 d. A total of 118 softening-related genes were obtained. Among these genes, 68 genes presented opposite expression pattern between 3 °C and 21 °C, and 69 genes presented opposite expression pattern between 0.5 °C and 21 °C. At a storage time of 12 d, 10 common differentially expressed genes (DEGs) were obtained among 21 °C–3 °C, 21 °C–0.5 °C, and 3 °C–0.5 °C groups. Relatively, at a storage time of 24 d, 17 common DEGs were obtained among 21 °C–3 °C, 21 °C–0.5 °C, and 3 °C–0.5 °C groups. The key genes that played an important regulatory role in the softening process have been screened and verified by qRT-PCR. The results showed that the softening was delayed at low temperatures by regulating the expression of key softening-related genes. The results provide a theoretical basis for further studies on the softening mechanism and preservation of Jiashi melon.

Keywords Jiashi melon; softening; low temperature storage; transcriptomics