

## 基于非靶向代谢组学的柑橘果皮褐斑病发生过程中代谢差异分析

龚意辉<sup>1</sup>, 周桂花<sup>1</sup>, 彭淑君<sup>1</sup>, 吴志蒙<sup>1</sup>, 刘洁<sup>1</sup>, 黄华<sup>2</sup>, 陈致印<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 湖南人文科技学院农业与生物技术学院 湖南娄底 417000

<sup>2</sup> 广东省农业科学院果树研究所/农业农村部亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室  
广东省热带亚热带果树研究重点实验室 广州 510640)

**摘要** 以甜橙果实为试材,利用非靶向代谢组学研究采后柑橘不同褐斑病感染程度果皮中的代谢物差异。通过样本相关性分析、最小二乘判别分析、聚类分析和KEGG富集分析等方法,分析不同褐斑程度果皮中代谢物差异。结果表明:PE包装显著抑制柑橘果实褐斑指数,以无褐斑果皮样品为对照,共筛选出1191个差异离子,在CK-42 d vs CK-0 d样本中,共筛选出107种显著差异代谢物,其中62个为上调,45个为下调,而在PE-42 d vs CK-0 d样本中共筛选出124种显著差异代谢物,其中65个为上调,59个为下调。经KEGG通路分析,代谢物主要分布在10条代谢途径中,代谢物数量富集最多的前3条通路分别是全局和总览图、其它次生代谢产物的生物合成、氨基酸代谢。经HMDB通路分析,代谢差异物主要分布在11条代谢途径中,差异代谢物数量富集最多的前5条通路分别是苯丙烷和聚酮化合物、脂质和类脂质类、有机杂环化合物、有机酸及其衍生物、苯甲酸酯类。研究结果有助于完善柑橘果皮褐斑病形成机制,可为提高柑橘保鲜效果提供参考。

**关键词** 甜橙; 褐斑病; 包装; 非靶向代谢组学; 通路分析

**文章编号** 1009-7848(2022)08-0316-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.08.034

柑橘是我国南方重要的特色水果,也是世界上栽培面积最广的水果之一。柑橘因色泽鲜艳、果汁丰富、营养价值、保健及药用价值高等特点而受到广大消费者的青睐。我国是柑橘的原产地之一,栽培历史悠久,且品种资源丰富。目前柑橘产业是我国农业发展的重要支柱产业之一。

柑橘果实褐斑病(Brownspot)又称干疤病,是柑橘果实低温贮藏中普遍发生的一种生理失调病害,尤其是甜橙类果实褐斑病发病率高达20%~50%,严重时高达90%<sup>[1-2]</sup>。褐斑病的发生严重降低了柑橘果实的外观品质,其病斑部位更容易受到炭疽病、青霉病和绿霉病等病原菌的入侵而导致果肉变质和果实腐烂。果皮褐斑病不仅严重影响果实外观光洁度和果实的风味,而且降低了鲜销果实的出口价格和国际市场竞争力,严重制约了我国柑橘产业的发展。目前柑橘褐斑病的形成机制仍存争议,影响了采后贮藏保鲜过程中褐斑病

控制方法的研发。

在代谢组学研究领域,主要采用靶向(Targeted metabolomics)或非靶向(Untargeted metabolomics)的代谢组学技术来研究生物样品中的代谢物,在水果品质和可靠性评估等多个研究领域中得到广泛的应用<sup>[3-4]</sup>。液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)、气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)、核磁共振技术(NMR)等技术的发展推动了代谢组学的快速发展。这些技术有助于分析生物样本的各种各样的代谢物<sup>[5]</sup>。非靶向的代谢组学技术具有快速、简单、节省时间和成本,适合大样本分析的特点<sup>[6]</sup>。目前,利用代谢组学技术研究采后果实生理病害发生过程中代谢物差异已有较多的报道。Busatto等<sup>[7]</sup>利用靶向代谢组学技术研究苹果虎皮病发生过程中相关代谢化合物,发现苹果酚类物质主要为绿原酸、根皮苷、儿茶素、表儿茶素、黄酮醇化合物,其中总酚在虎皮病较严重的果皮中的含量明显高于果肉。Farneti等<sup>[8]</sup>利用非靶向代谢组学技术发现挥发性化合物6-甲基-5-庚烯-2-酮(6-Methyl-5-hepten-2-one, MHO)与苹果虎皮病的发生有密切的关系。目前,国内外主要从酶促褐变、冷害、膜脂过氧化、气体伤害、乙烯等因素研究柑橘褐斑病的形成机制,而采用非靶向代谢组学

收稿日期: 2021-08-12

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2020JJ5270);湖南省教育厅科学研究重点项目(20A281);湖南省科技创新计划项目(2020RC1014)

作者简介: 龚意辉(1988—),男,博士

通信作者: 陈致印 E-mail: 772612626@qq.com

技术对采后柑橘果皮褐斑病形成过程中差异代谢物的变化规律及代谢途径等的研究鲜见报道。本研究以甜橙果实为研究材料,结合聚乙烯(Polyethylene, PE)包装处理,利用非靶向代谢组学技术研究采后柑橘褐斑病发病过程中的代谢物,以探明相关代谢化合物与褐斑病的相关性,为控制褐斑病的发生提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及处理

以甜橙果实为试验材料,在涟源曲溪柑橘基地采摘果实,挑选果实大小一致、色泽均匀、无病虫害、无机械损失的优质果实。采摘完后立即运到实验室进行试验处理。将挑选好的甜橙果实按 12 个一组装入聚乙烯(PE)保鲜袋中,用橡皮筋绑紧封口后放置于温度为(15±1)℃、相对湿度 85%的恒温箱中贮藏 42 d。同时,以不做任何处理的甜橙果实放置于相同贮藏条件下作为对照组,每个处理均做 3 次生物学重复,每个重复 3 个果实。分别在贮藏 0, 14, 28, 42 d 进行果皮取样,将果皮迅速用液氮充分浸泡,彻底冻结后立即用锡箔纸包装,放入自封袋置于-80℃的超低温冰箱中保存,用于后续质谱数据的采集。

### 1.2 仪器与试剂

Q Exactive™ HF-X 质谱仪、Vanquish UH-PLC 色谱仪,德国 Thermo Fisher 公司;色谱柱 Hypesil Gold column (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)、甲醇、醋酸铵、甲酸等质谱试剂,美国 Thermo Fisher 公司;D3024R 低温离心机,美国 Scilogex 公司;聚乙烯(PE)保鲜袋(规格为 400 mm×400 mm, 双层膜厚度均为 0.05 mm),广州成硕化玻有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 褐斑指数的测定 参照高雪等<sup>[9]</sup>和 Knight 等<sup>[10]</sup>的方法略作修改。褐斑分级标准如下:0 级:果皮完全无褐斑;1 级:0~1/4 面积果皮出现轻微褐斑;2 级:1/4~2/4 面积果皮出现褐斑;3 级:2/4~3/4 面积果皮出现褐斑;4 级:3/4~4/4 面积果皮出现严重褐斑。

褐斑指数=Σ(褐斑级别×该级别果实占总果实的百分比)。

1.3.2 代谢物的提取 参照 Want 等<sup>[11]</sup>的方法并稍作修改。称取 100 mg 经液氮研磨至粉末的甜橙果皮样品,加 500 μL 80%甲醇充分振荡混匀,将各样品在冰浴中放置 5 min,在 4℃、15 000×g 条件下离心 20 min,取上清液加入质谱级 H<sub>2</sub>O 稀释至甲醇体积分数为 53%;在相同条件下再离心 20 min,然后从每个样品中取 550 μL 放入新的样品管中,并记录好样品名称和顺序,最后从每个试验样本中取 30 μL 混匀作为 QC 样本;以 53%甲醇作为空白样本,前处理过程与试验样本相同。将以上各样品保存至样品瓶中,用于后续 LC-MS 分析。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Hypesil Gold column (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm);柱温:40℃;流速:0.2 mL/min;正模式:流动相 A:体积分数 0.1%甲酸,流动相 B:甲醇;负模式:流动相 A:5 mmol/L 醋酸铵、pH 9.0,流动相 B:甲醇;进样量 100 μL;色谱梯度洗脱程序如表 1 所示:

表 1 色谱梯度洗脱程序  
Table 1 The gradient elution program of chromatographic

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	98	2
1.5	98	2
12.0	0	100
14.0	0	100
14.1	98	2
17.0	98	2

1.3.4 代谢物检测 采用高分辨率串联质谱仪对质谱柱洗脱下来的所有代谢物分别进行正、负离子模式检测,其中正离子模式检测范围选择  $m/z$  100~1 500;ESI 源的设置如下:毛细管电压 3.2 kV,气体 I (GS I)和气体 II (GS II)分别设置为 40 PSI 和 10 PSI,离子源温度为 320℃。

1.3.5 代谢物的鉴定 将下机数据(.raw)文件导入 CD 搜库软件(CD3.1, Thermo Fisher)中,根据代谢物保留时间、质荷比等参数进行初步筛选,然后选择保留时间偏差 0.2 min 和质量偏差  $5 \times 10^{-6}$  分别对不同甜橙果皮样品进行峰对齐,以使代谢

物鉴定可信度更高,并对各代谢物的峰面积分别进行相对定量分析,结合目标离子,再次根据碎片离子和分子离子峰对甜橙果皮中各代谢物进行分子式预测并与 mzCloud、mzVault、masslist 数据库进行比较,利用空白样本消除背景离子对试验的影响,并对各代谢物的定量结果进行归一化处理,最终得到甜橙果皮各样品中代谢物的鉴定及定量结果。

**1.3.6 数据分析** 采用 CD3.1 软件处理本研究所获得的质谱数据。采用主成分分析(Principal component analysis, PCA)和聚类分析分别对甜橙果实对照组(CK)和包装组(PE)样品进行差异代谢物分析。通过单因素分析确定的 CK 和 PE 组样本间的差异倍数(Fold change, FC)和  $q$  值来筛选差异代谢物,以  $FC \geq 1.2$  或  $\leq 0.8333$ ,  $q$  值  $< 0.05$  作为筛选差异代谢物的条件。通过 R (v3.3.2)中 pheatmap 程序对柑橘果实褐斑病发生过程中筛选出差异代谢成分进行聚类分析并绘制热图,并分别利用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)和 HMDB 数据库(<https://hmdb.ca/metabolites>)进行代谢物代谢通路注释。

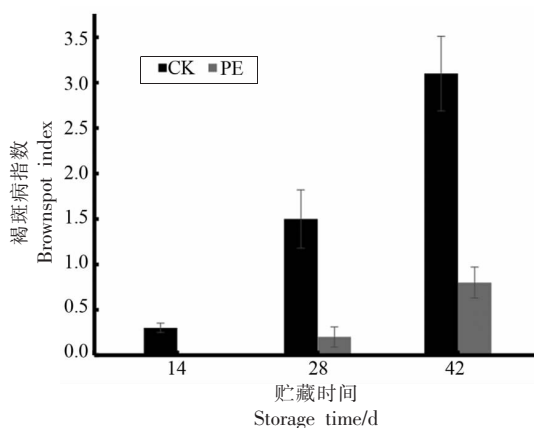
## 2 结果与分析

### 2.1 包装对柑橘褐斑病指数的影响

由图 1 可知,在甜橙果实贮藏期间,果皮褐斑指数随着贮藏时间的延长呈现出逐渐上升的趋势,而 PE 包装处理甜橙果实在贮藏 14 d 时,没有发生褐斑病,说明 PE 包装处理可抑制甜橙果实褐斑病的发生。

### 2.2 代谢物差异筛选结果

基于北京诺禾致源科技股份有限公司自建代谢物数据库及相关质谱数据库,将样本下机质谱文件导入 CD 搜库软件中,对甜橙果皮褐斑病发病过程中的主要代谢物进行定性和定量分析。由表 2 可知,在甜橙果皮中共鉴定出 1 191 种代谢化合物,在 CK-42 d vs CK-0 d 样本中共检测到 107 种显著差异代谢物,其中显著上调和下调的差异代谢物分别为 62 和 45 种,而在 PE-42 d vs CK-0 d 样本中共检测到 124 种显著差异代谢物,其中显著上调和下调的差异代谢物分别为 65 种和 59 种。这些结果说明,处于褐斑病不同程度的



注:0 d 时褐斑病指数为 0。

图 1 PE 包装对褐斑病指数的影响

Fig.1 The effect of PE packaging treatment on brownspot index

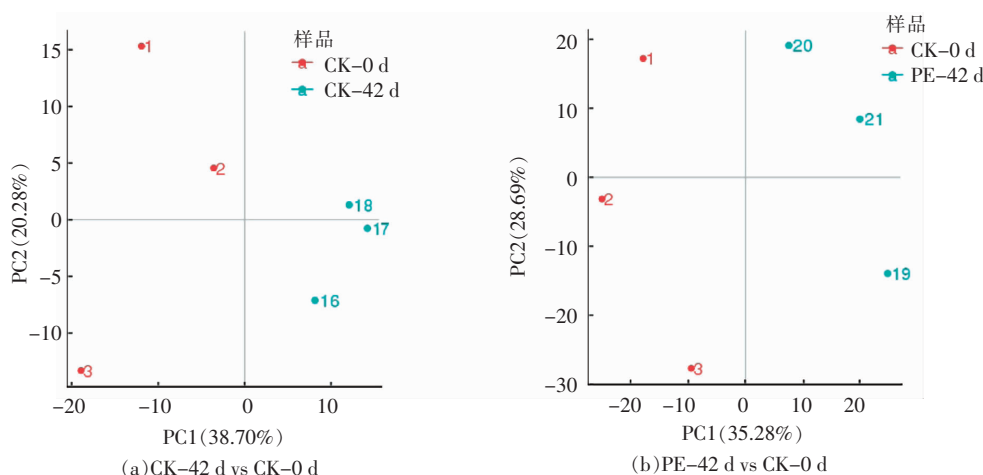
表 2 代谢物差异筛选结果

比对样品	鉴定出的代谢物总数	显著差异代谢物总数	显著上调代谢物总数	显著下调代谢物总数
CK-42 d vs CK-0 d	1 191	107	62	45
PE-42 d vs CK-0 d	1 191	124	65	59
PE-14 d vs CK-14 d	1 191	41	17	24
PE-28 d vs CK-28 d	1 191	50	15	35
PE-42 d vs CK-42 d	1 191	84	21	63

样品中显著上调和下调的代谢物数量存在一定的差异。

### 2.3 PCA 结果

通过对 CK-42 d vs CK-0 d 和 PE-42 d vs CK-0 d 两组样本分别进行主成分分析,判断褐斑病严重(CK-42 d)、褐斑病程度中等(PE-42 d)和无褐斑病(CK-0 d)各组样本之间的分组之间和组内样本之间的变异度大小。PCA 结果分析表明,2 个处理的 3 次重复在得分图中分布较为分散,表明每个处理内差异较大。在 CK-42 d vs CK-0 d 样本中 PC1 和 PC2 的贡献率分别为 38.70%和 20.28%,CK-42 d 和 CK-0 d 两组样本间 PCA 得分差异显著并且相距较远,并位于 95%置信区间内,说明 CK-42 d vs CK-0 d 样本间各代谢物存在较大的差异。在 PE-42 d vs CK-0 d 样本中 PC1 和 PC2 的贡献率分别为 35.28%和 28.69%,PE-42 d vs CK-0 d 样本间 PCA 得分差异显著且置于 95%



注:图中数字分别表示 CK-0 d、CK-42 d、PE-42 d 样品的 3 次生物学重复,下同。

图 2 两组样品的 PCA 结果

Fig.2 PCA results of two groups of samples

置信区间内,说明 PE-42 d vs CK-0 d 样本间各代谢物也存在较大的差异。

### 2.4 PLS-DA 结果

虽然 PCA 分析法能够有效地提取样本主要信息,但是对样本间相关性较小的变量不敏感,然而采用偏最小二乘法判别分析 (Partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 可以使各组样本间的区分最大化,有助于探索差异代谢物。根据 PLS-DA 模型(图 3a)对 1 191 种代谢组数据进行分析,无褐斑病果皮样品(CK-0 d)分布在置信区间的左侧,而褐斑中等程度果皮样品(PE-42 d)分布在置信区间的右侧,CK-0 d 与 PE-42 d 区分效果明显。PC1 的贡献率为 36.81%,PC2 的贡献率为 19.26%, $R^2Y=1$ 、 $Q^2Y=0.65$ (图 3b)。

在置信区间的左侧,褐斑病严重的果皮样品分布在置信区间的右侧,2 个样品的区分效果非常明显。PLS-DA 得到 2 个主成分,PC1 的贡献率为 35.14%、PC2 的贡献率为 23.73%, $R^2Y=1$ 、 $Q^2Y=0.57$ 。无褐斑病果皮样品(CK-0 d)分布在置信区间的左侧,而褐斑中等程度果皮样品(PE-42 d)分布在置信区间的右侧,CK-0 d 与 PE-42 d 区分效果明显。PC1 的贡献率为 36.81%,PC2 的贡献率为 19.26%, $R^2Y=1$ 、 $Q^2Y=0.65$ (图 3b)。

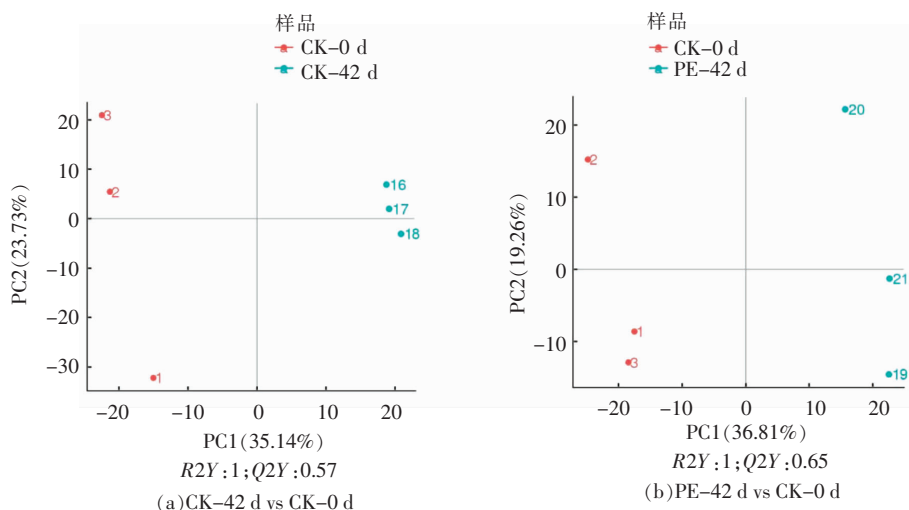


图 3 PLS-DA 得分图

Fig.3 The score chart of PLS-DA

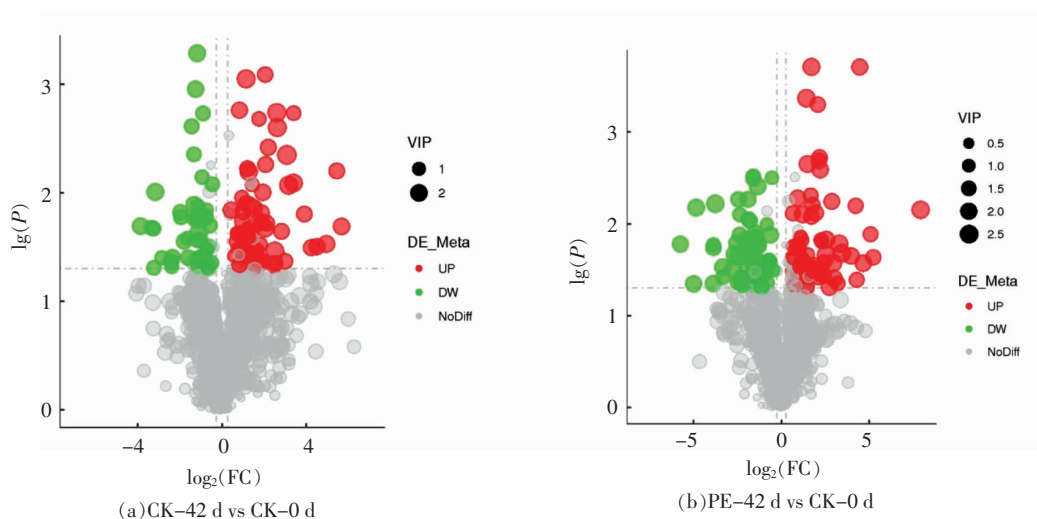
### 2.5 差异代谢物火山图

根据投影重要度 (Variable importance in the

projection, VIP)、FC 和  $P$  值来筛选甜橙果实褐斑病发生过程中的差异代谢物。设定阈值为  $VIP >$

1.0,  $FC > 1.2$  或  $FC < 0.833$  且  $P < 0.05$ 。通过差异倍数分析(FC)和火山图(图4),可直接说明甜橙

果实 CK 和 PE 样本间代谢物的显著性,进而得到差异代谢物。



注:UP表示显著上调的代谢物;DW表示显著下调的代谢物,NoDiff表示没有差异的代谢物。

图4 正离子模式下的组间火山图

Fig.4 Volcano map of two groups of samples in positive ion mode

## 2.6 差异代谢物热图分析

为了方便了解甜橙褐斑病发生过程中代谢物的变化规律,对样本中的显著性差异代谢物进行归一化处理,并制作聚类热图。图5和图6直观、简单地说明了柑橘褐斑病发生过程中代谢物的变

化情况。在CK-42 d vs CK-0 d样本中,在107种具有显著性差异的代谢物中,褐斑严重的果皮样品(CK-42 d)相对无褐斑果皮样品(CK-0 d)有62种代谢物显著上调,即相对含量增加,增加的代谢物占107种差异代谢物的57.94%,45种代

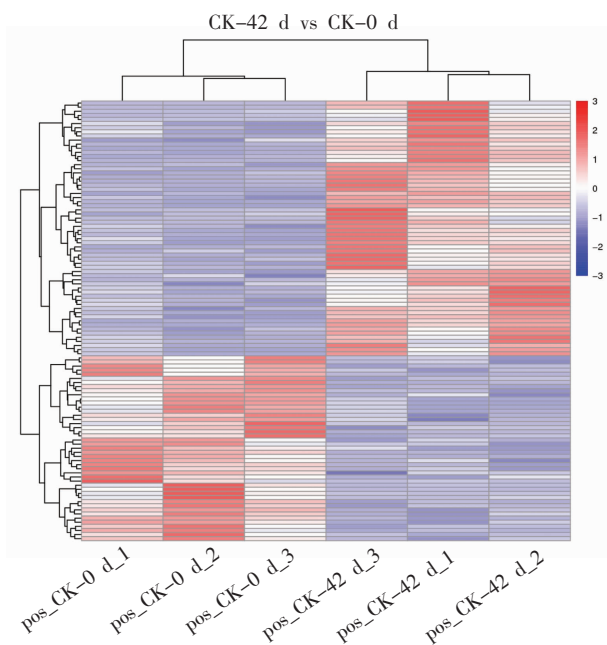


图5 正离子模式代谢物聚类分析

Fig.5 Cluster analysis of metabolites in positive ion mode

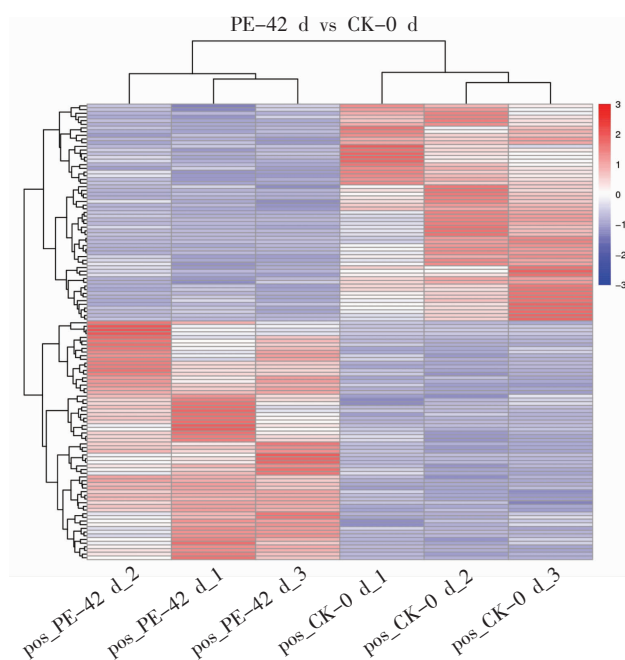


图6 正离子模式代谢物聚类分析

Fig.6 Cluster analysis of metabolites in positive ion mode

物显著下调,包括橘皮素、槲皮素、脱氢二异丁香酚、4-乙基苯酚、糖苷、胍丁胺等代谢物,即相对含量降低,降低的代谢物占 107 种差异代谢物的 42.06%(图 5)。在 PE-42 d vs CK-0 d 样本中,筛选出 124 种显著性差异代谢物中,褐斑程度中等的果皮样品(PE-42 d)相对无褐斑病果皮样品(CK-0 d)有 65 种代谢物显著上调,即相对含量增加,增加的代谢物占 124 种差异代谢物的 52.42%,59 种代谢物显著下调,即相对含量降低,降低的代谢物占 124 种差异代谢物的 47.58%(图 6)。

## 2.7 代谢物通路及分类注释

### 2.7.1 KEGG 通路注释

通过 KEGG Pathway 数据库对甜橙果实褐斑病发生过程中的代谢物进行通路注释分析,结果显示(图 7),甜橙褐斑果皮代谢物主要可分为 3 大类:第 1 类为环境信息加工(Environmental information processing),包括信号转导(Signal transduction)和跨膜运输(Membrane transport)2 个 2 级分类,其中有 3 种代谢物参与信号转导途径,有 10 种代谢物参与跨膜运输途径;第 2 类为遗传信息加工(Genetic information processing),包括翻译(Translation)和折叠、分类及降解(Folding, sorting and degradation)2 个 2 级分类,其中有 7 种代谢物参与翻译途径,有 2 种代谢物参与折叠、分类及降解途径;第 3 类为新陈代谢(Metabolism),包括氨基酸代谢(Amino acid metabolism)、其它次生代谢产物的生物合成(Biosynthesis of other secondary metabolites)、碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism)、脂肪酸代谢(Lipid metabolism)、核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)等 10 个 2 级分类,其中有 12 种代谢物参与核苷酸代谢通路,有 42 种代谢物参与氨基酸代谢通路,有 59 种代谢物参与其它次生代谢产物的生物合成通路,有 13 种代谢物参与碳水化合物代谢通路,有 11 种代谢物参与脂肪酸代谢通路。

### 2.7.2 HMDB 分类注释

通过 Human Metabolome Database 数据库对甜橙褐斑病发生过程中的代谢物进行 HMDB 分类注释结果(图 8)显示,甜橙果实代谢物主要分布在 11 条代谢途径中,代谢物数量富集最多的前 5 条通路分别是①苯丙烷和聚酮

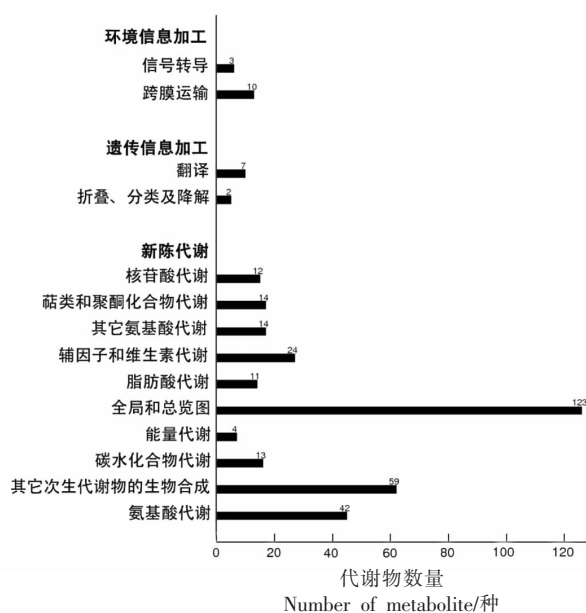


图 7 代谢物 KEGG 富集图

Fig.7 Metabolite KEGG enrichment map

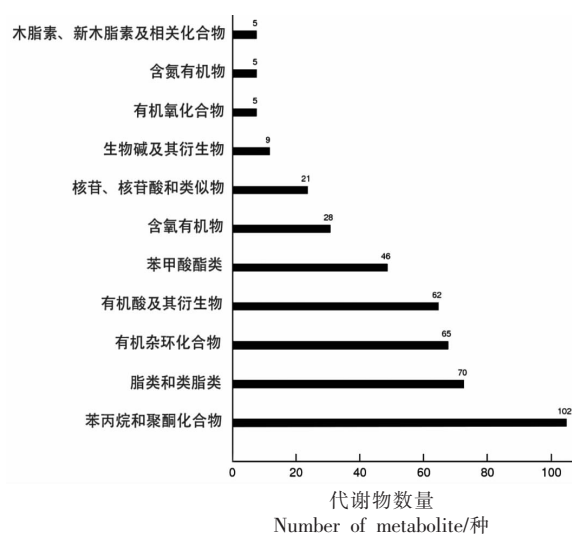


图 8 代谢物的 HMDB 分类注释

Fig.8 Metabolite HMDB enrichment map

化合物通路(Phenylpropanoids and polyketides),主要包括香柠檬素、柠檬酸甘油酯、四环素、表没食子儿茶素、杨梅素、香豆酚、儿茶素等 102 种代谢物;②脂质和类脂质类(Lipids and lipid-like molecules),主要包括香芹酮、焦木酚 E、11-氧代苯二酚、(+)-樟脑、单油精、瓦巴因等 70 种代谢成分;③有机杂环化合物(Organoheterocyclic compounds),主要包括麦芽酚、硫胺素、鸟嘌呤、亚叶酸、间苯三酚、腺嘌呤、DL-色氨酸等 65 种代谢成

分;④有机酸及其衍生物(Organic acids and derivatives),主要包括N8-乙酰亚精胺、N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸、半胱氨酰甘氨酸、脯氨酸、L-谷氨酸、D-丝氨酸、L-组氨酸等62种代谢成分;⑤苯甲酸酯类(Benzenoids),主要包括4-苯基丁酸、4-甲氧基苯甲醛、对乙酰氨基酚、3-甲氧基苯甲醛、丁二酸、3,5-二甲氧基苯甲酸等46种代谢成分。

### 3 讨论

酚类物质是果实中含量比较丰富的次生代谢产物,具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗菌等作用<sup>[12-14]</sup>,对降低人类多种疾病的发生率,抵御紫外线辐射<sup>[15]</sup>等方面具有良好的效果,其中类黄酮和酚酸是柑橘主要的酚类物质。Wang等<sup>[16]</sup>利用HPLC技术鉴定出柑橘果实中5种酚酸物质和9种类黄酮物质。Abad-garcía等<sup>[17]</sup>利用高效液相色谱法(HPLC)共鉴定出柑橘果汁中58种酚类物质。可见,利用HPLC鉴定的代谢物数量有限。随着代谢组学在过去十年中的迅速发展以及质谱仪器研发的进步,使得在生物样品中同时检测数千种代谢化合物成为可能<sup>[18]</sup>。Metlin起源于表征已知代谢物的数据库,目前发展成为用于鉴定已知和未知代谢物和其它化学实体的技术平台,并且可以加快非靶向的代谢物的鉴定流程<sup>[19]</sup>。本研究利用非靶向的代谢组学技术对采后柑橘果实褐斑病发病过程中的代谢物进行了研究,以探索相关代谢化合物与褐斑病的相关性。在甜橙果皮组织中共检测到1191种化合物,大部分代谢化合物不存在显著性差异,只有少数代谢物存在显著性差异,比如在褐斑病严重的果皮样品(CK-42 d)相比无褐斑病果皮样品中(CK-0 d),共检测到107种差异代谢物,其中62种代谢物显著上调,45种代谢物显著下调。Doppler等<sup>[20]</sup>利用LC-MS并结合非靶向的代谢组学技术在植物中鉴定出996种代谢化合物。Vrhovsek等<sup>[21]</sup>利用LC-MS技术在水果中鉴定出113种酚类化合物。可见,非靶向的代谢组学技术具有高效、鉴定化合物种类多、可信度高、适合大样本分析的特点<sup>[6]</sup>。

本研究利用非靶向代谢组学在甜橙果实褐斑病发生过程中发现橘皮素、槲皮素、脱氢二异丁香

酚、4-乙基苯酚、糖苷、胍丁胺等45种代谢物显著下调,表明这些酚类物质可能与果皮褐斑病的发生密切相关。Li等<sup>[22]</sup>研究发现,总酚含量随着柑橘果实褐斑病程度的加深呈现出现下降的趋势,并且与PPO、POD的活性密切相关。柑橘果实在长期低温贮藏中易发生冷害,加剧细胞膜脂质过氧化,大量积累丙二醛产物,打破了细胞区域化分隔系统,造成细胞内酚类物质、PPO、POD等从液泡内溢出与外界发生接触,加快了果皮酶促褐变的进程,使得果皮表现出褐斑病的症状<sup>[23]</sup>。这些研究表明,柑橘果皮褐斑病形成机制是一个复杂的过程,跟酚类物质种类及含量、酶促褐变、冷害等诸多因素有关。

### 4 结论

本研究利用非靶向代谢组学研究甜橙果实褐斑病发生过程中的代谢物差异。结果表明:PE包装显著减少甜橙果实褐斑病发病症状,在样品中共检测到1191种差异离子,在CK-42 d vs CK-0 d样本中,共筛选出107种显著性差异代谢物,其中62个为上调,橘皮素、槲皮素、脱氢二异丁香酚、4-乙基苯酚、糖苷、胍丁胺等45种代谢物显著下调,可能与褐斑病的发生密切相关。经HMDB数据库通路注释,代谢物富集数量最多的前5条通路分别是苯丙烷和聚酮化合物通路、脂质和类脂质分子有机杂环化合物、有机酸及其衍生物、苯甲酸酯类通路。本研究初步探究了柑橘果实褐斑病发生过程中的代谢物,所检测到的代谢物可为柑橘果皮的功能研究及下一步开发利用提供理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] FAN J, YANG Y W, XUE G, et al. Expression of a senescence-associated cysteine protease gene related to peel pitting of navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck)[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2009, 98(3): 281-289.
- [2] PAUL J R C, ZACARÍAS L, ALFÉREZ F. Susceptibility to postharvest peel pitting in Citrus fruits as related to albedo thickness, water loss and phospholipase activity[J]. Postharvest Biology and Tech-

- nology, 2017, 123: 77–82.
- [3] KADDURAH–DAOUK R, KRISHNAN K. Metabolomics: A global biochemical approach to the study of central nervous system diseases [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(1): 173–186.
- [4] WISHART D S. Applications of metabolomics in drug discovery and development [J]. *Drugs in R & D*, 2008, 9(5): 307–322.
- [5] DUNN W B, ELLIS D I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24(4): 285–294.
- [6] FERNIE A R. The future of metabolic phytochemistry: Larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(22/23/24): 2861–2880.
- [7] BUSATTO N, FARNETI B, TADIELLO A, et al. Target metabolite and gene transcription profiling during the development of superficial scald in apple (*Malus x domestica* Borkh) [J]. *Bmc Plant Biology*, 2014, 14(1): 193–193.
- [8] FARNETI B, BUSATTO N, KHOMENKO I, et al. Untargeted metabolomics investigation of volatile compounds involved in the development of apple superficial scald by PTR–ToF–MS [J]. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*, 2015, 11(2): 341–349.
- [9] 高雪, 李正国. 奉节脐橙果皮褐变生理的研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30(8): 280–283.
- GAO X, LI Z G. Physiological study on peel pitting of ‘Fengjie’ navel orange fruits [J]. *Food Science*, 2009, 30(8): 280–283.
- [10] KNIGHT T G, ANDREAS K, MARGARET S. Structural basis of the rind disorder oleocellosis in washington navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. *Annals of Botany*, 2002, 90(6): 765–773.
- [11] WANT E J, MASSON P, MICHPOULOS F, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC–MS [J]. *Nature Protocols*, 2012, 8(1): 17–32.
- [12] GONG Y H, FANG F, ZHANG X, et al. B type and complex A/B type epicatechin trimers isolated from litchi pericarp aqueous extract show high antioxidant and anticancer activity [J]. *International Journal of Molecular Ences*, 2018, 19(1): 301.
- [13] SIR ELKHATIM K A, ELAGIB R A A, HASSAN A B. Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits [J]. *Food Science & Nutrition*, 2018, 6(5): 1214–1219.
- [14] ASSEFA A D, SAINI R K, KEUM Y S. Fatty acids, tocopherols, phenolic and antioxidant properties of six citrus fruit species: A comparative study [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2017, 11(4): 1665–1675.
- [15] BECKMAN C H. Phenolic–storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? [J]. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, 2000, 57(3): 101–110.
- [16] WANG Y C, CHUANG Y C, KU Y H. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1163–1171.
- [17] ABAD –GARCÍA B, GARMÓN –LOBATO S, BERRUETA L A, et al. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high–performance liquid chromatography with photodiode–array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2012, 99(15): 213–224.
- [18] GUIJAS C, MONTENEGRO–BURKE J R, DOMINGO–ALMENARA X, et al. Reply to comment on METLIN: A technology platform for identifying knowns and unknowns [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(5): 3156–3164.
- [19] ZHU Z J, SCHULTZ A W, WANG J, et al. Liquid chromatography quadrupole time–of–flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(3): 451–460.
- [20] DOPPLER M, KLUGER B, BUESCHL C, et al. Stable isotope–assisted evaluation of different extraction solvents for untargeted metabolomics of plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1017.
- [21] VRHOVSEK U, MASUERO D, GASPEROTTI M, et al. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(36): 8831–8840.
- [22] LI Z G, XUE G, JING F, et al. The relationship between activity and gene expression of phenylala-



nine ammonia-lyase and peel pitting in 'Fengjie' navel orange fruits [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(3): 381.

[23] KATINA L. Physiology of chilling-related postharvest rind breakdown of navel oranges[D]. *Boundoora: La Trobe University*, 2007.

### Differential Analysis of the Metabolites on Citrus Pericarp Brownspot Based on Untargeted Metabolomics

Gong Yihui<sup>1</sup>, Zhou Guihua<sup>1</sup>, Peng Shujun<sup>1</sup>, Wu Zhimeng<sup>1</sup>, Liu Jie<sup>1</sup>, Huang Hua<sup>2</sup>, Chen Zhiyin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>*School of Agriculture and Biotechnology, Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, Hunan*

<sup>2</sup>*Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Guangzhou 510640*)

**Abstract** In this study, untargeted metabolomics method was used to detect and analysis the differences of metabolites during the development of brownspot at storage stage. Sweet orange fruit were used as experimental materials, and their metabolic compounds were detected and analyzed by sample repetitive correlation analysis, cluster analysis, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and KEGG pathway based on the high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) instrument platform. The results showed that brownspot was significantly inhibited by PE packaging treatment. A total of 1 191 metabolites were identified in citrus fruit. In the CK-42 d vs CK-0 d samples, a total of 107 significantly different metabolites were detected, which 62 metabolic compounds were significantly up-regulated and 45 metabolic compounds were significantly down-regulated. While in the PE-42 d vs CK-0 d sample, a total of 124 significantly different metabolites were identified. Among them, 65 compounds were significantly up-regulated and 59 compounds were significantly down-regulated. The different metabolic compounds mainly distributed in 10 KEGG metabolic pathways, the first top 3 pathways are global and overview maps, amino acid metabolism and biosynthesis of other secondary metabolites. While the different metabolic compounds mainly distributed in 11 HMDB metabolic pathways, the first top 5 pathways are phenylpropanoids and polyketides, lipids and lipid-like molecules, organoheterocyclic compounds, organic acids and derivatives and benzenoids biosynthesis. These results are helpful to improve the formation mechanism of peel pitting, and can provide a reference for improving the preservation effect of citrus fruit.

**Keywords** sweet orange; brownspot; packaging; untargeted metabolomics; pathway analysis