

不同溶质型桃果实采后贮藏过程中线粒体内 COX 活性及其基因的表达

阚娟, 万冰, 张庆庆, 刘俊, 金昌海

(扬州大学食品科学与工程, 江苏扬州 225127)

摘要:以软溶质型桃‘雨花三号’(*Prunus persica* (L.) Batsch, cv. Yuhua3)和硬溶质型桃‘加纳岩’(*Prunus persica* (L.) Batsch, cv. Jianayan)果实为试材,研究不同溶质型桃果实采后贮藏过程中呼吸速率、乙烯释放量、细胞色素氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)活性以及线粒体编码的COX 3种亚基(COX I、COX II、COX III)基因表达量的变化。结果表明:‘雨花三号’桃果实贮藏过程中,硬度不断下降,且在贮藏后期伴随着呼吸高峰和乙烯释放高峰的出现;而‘加纳岩’在贮藏过程中,硬度下降较缓慢,乙烯释放量较少,呼吸速率较平稳。两种溶质型桃果实贮藏前期,COX活性不断增加,但到贮藏后期,COX活性下降。‘雨花三号’桃果实中COX活性三种亚基基因的表达量显著低于‘加纳岩’。COX主要作用于桃果实贮藏前期,为果实后熟提供足够能量,贮藏后期表达量降低,活性受影响,机体代谢失衡,线粒体编码的COX与桃果实采后衰老之间存在一定的内在联系。

关键词:桃;线粒体;呼吸速率;细胞色素氧化酶

文章编号:1673-9078(2015)12-69-74

DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.011

Activity of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase and Gene Expression in Peach Cultivars with Different Flesh Types during Postharvest Storage

KAN Juan, WAN Bin, ZHANG Qing-qing, LIU Jun, JIN Chang-hai

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: Soft flesh peach ‘Yuhuasanhao’ (*Prunus persica*) and stony hard peach ‘Jianayan’ (*Prunus persica*) were used as test materials, and the changes in the ethylene production, respiration rate, activity of cytochrome c oxidase (COX), and the gene expression of three mitochondrial DNA encoded subunits of COX (COX I, COX II, and COX III) in peach fruit with different flesh types during postharvest storage were studied. The results showed that during postharvest storage, the firmness of ‘Yuhuasanhao’ peach fruit decreased continuously, and the ethylene production and respiration rate peaked during the late storage period. The firmness of ‘Jianayan’ peach fruit decreased slowly, with low ethylene production and a stable respiration rate. For both the peach cultivars with different flesh types, the activities of COX increased continuously at the early stage and decreased at the later stage of storage. The activity of COX and the relative expressions of the three mitochondrial DNA encoded subunits of COX were lower in ‘Yuhuasanhao’ than those in ‘Jianayan’. COX played an important role in the early storage period, providing enough energy for postharvest ripening of the peach fruits. At the later stage of the storage period, the expression of the COX genes declined, COX activity was decreased, and there was an imbalance in cellular metabolism. These results suggest the existence of certain intrinsic relationships between COX and peach fruit softening and senescence during the postharvest period.

Key words: peach; mitochondria; respiration rate; cytochrome c oxidase

果实的后熟衰老与其呼吸代谢关系密切,而线粒体是果实进行呼吸作用的细胞器,因此线粒体代谢活性与果实的成熟软化有着必然的联系。植物细胞中活
收稿日期:2015-04-06

基金项目:国家自然科学基金项目(31101586);江苏省科技计划项目资助(BC2013401);江苏省自然科学基金项目(BK2010310)

作者简介:阚娟(1980-),女,博士,副教授,研究方向为农产品贮藏与加工
通讯作者:金昌海(1963-),男,博士,教授,研究方向为农产品贮藏与加工

性氧产生主要来源于线粒体、叶绿体和过氧化物体等,其中线粒体是产生活性氧的主要部位^[1]。Lieberman^[2]首先提出了活性氧参与乙烯的形成后,很多研究者相继对此进行了大量的研究。在对绿豆黄化幼苗研究中发现外源乙烯能显著提高活性氧产生速率,同时使得线粒体呼吸高峰提前出现,从侧面表明乙烯对线粒体呼吸的促进作用可能是通过提高线粒体活性氧的产生速率实现的^[3]。

一系列实验表明,细胞衰老时线粒体功能发生退

行性改变, 线粒体功能的正常有赖于其结构的稳定^[4-5]。细胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase, COX) 是线粒体呼吸链末端氧化反应过程中的关键酶, 在线粒体呼吸链电子传递中发挥着极其重要的作用, COX 的损伤又可直接影响线粒体的功能, 导致 ATP 合成减少, 膜电位丧失, 促使线粒体呼吸链产生大量的 ROS, 活化凋亡信号通路, 细胞出现死亡^[6]。COX 是由细胞核 DNA 和线粒体 DNA 分别编码的亚基共同组成, 其中线粒体 DNA 编码的 3 个亚基 *COX I*、*COX II* 及 *COX III*, 共同构成了 COX 的核心结构^[7], 影响着 COX 的活性, 而 COX 活性直接影响到线粒体功能状态^[8,9]。

Qin 等研究通过对蛋白质组学、蛋白免疫杂交以及其他生理生化分析, 证明了线粒体蛋白氧化损伤与果实成熟衰老的关系^[10], 前期研究中发现, 在桃果实成熟前期, COX 基因表达量较高, COX 活性相对较高, 到了桃果实成熟后期, COX 表达量降低。但 COX 与桃果实采后贮藏过程中后熟衰老的关系尚不清楚, 仍需要进一步研究。

本研究以‘雨花三号’和‘加纳岩’两种溶质型桃为研究材料, 桃果实无论是软溶质型还是硬溶质型在其成熟过程中都会产生乙烯。软溶质型桃的特点是成熟过程中乙烯大量释放, 果肉软化迅速, 而硬溶质型桃的软化过程会受到更多的限制, 成熟过程中乙烯释放一直很少, 软化过程缓慢, 果肉坚硬, 直到后期在溶解的时候, 果肉软化并伴随乙烯释放增加。通过研究不同溶质型桃果实采后贮藏过程中呼吸速率、乙烯释放、COX 活性和基因表达的变化, 探讨 COX 在桃果实采后贮藏过程中的活性状态, 通过对线粒体编码的 COX 三种亚基基因表达量的分析, 从分子水平探讨 COX 在不同溶质型桃果实采后后熟衰老过程中的作用, 探讨线粒体中关键酶 COX 与桃果实后熟衰老之间的关系, 为从线粒体角度研究果实后熟衰老提供一定的实验依据, 进一步从分子水平完善桃果实成熟软化机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

本试验选取‘雨花三号’和‘加纳岩’适熟期一部分材料 (各 200 个左右), 以 7~8 个为单位, 装在聚乙烯薄膜塑料袋中, 20℃ (95% 以上的相对湿度) 贮藏。贮藏 0、2、4、6、8、10 d, 分别取 5~6 个鲜果测定硬度和呼吸速率后取果肉部分切成小块, 用液氮处理后装在聚乙烯薄膜塑料袋中, 并保存在-75℃超低温冰箱中用于分析实验。

1.2 试验方法

1.2.1 果实硬度的测定

采用 GY-1 型果实硬度计测定 (调头直径 3.5 mm), 单位以 N 计算。每个果实胴部不同部位对称均匀选取六个点, 每次测量 6 个果实, 均匀取平均值。

1.2.2 呼吸速率的测定

采用静置法。

1.2.3 乙烯释放量的测定

气相色谱条件为: FID 检测器, SPB-1 毛细管柱 (0.25 mm×30 m)。采用岛津 GC-14B 气相色谱仪, 载气 N₂, 柱温 40℃, 检测器温度 120℃, 试验重复三次。

1.2.4 线粒体的提取

参照 Bonner^[11]和 Liang 等^[12]方法。

1.2.5 COX 活性的测定

取提取的线粒体制备液, COX 活性的测定参照 Errede 等^[13]的方法。

1.2.6 桃果实总 RNA 提取

参照 Meisel 等^[14]方法提取。

1.2.7 *COX I*、*COX II*、*COX III* 基因的 RT-PCR 和荧光定量 PCR (real-time PCR)

根据 NCBI 上 *COX I*、*II*、*III* 基因序列信息 (GenBank 登录号分别为 M16884.1, Z11980.1, X15131.1), 用 Primer premier 5.0 软件设计引物, RT-PCR 特异性引物 *COX I* (5'-ATTGGTCTGTTCCGATTC-3') 和 (5'-CCGCTACCCACTTCTACT-3'), *COX II* (5'-AAGACGCAGCAACACCTA-3') 和 (5'-CTAACCACCTCAACTCCC-3'), *COX III* (5'-TTCCTTTAGCCTTTCGTG-3') 和 (5'-CCTCAATCCACTGTTTCG-3'), 用于扩增目的基因。*Actin* (5'-GATTCTGGTGATGGTGTGAGTCA-3') 和 (5'-GAGAGATGGCTGGAAGAGGACTT-3') 用于内参基因。荧光定量 PCR 引物 *COX I* (5'-GACACCCGAGCCTACTTTAC-3') 和 (5'-GCTATGATGGCGAATACTGC-3'), *COX II* (5'-GCTTACAAGACGCCACATCACC-3') 和 (5'-CGTAGGGAGGGAAGGGCAAT-3'), *COX III* (5'-CAGCCTAGTTCCTACCCACGAC-3') 和 (5'-CCCGTTGCTATGAAGAATGTTG-3') 用于扩增目的基因。*Actin* (5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3') 和 (5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3') 用于内参基因。

1.2.8 数据分析

数据分析采用 SPSS 软件, 分析不同溶质型桃果实各指标间的差异及不同指标间的相关性。

2 结果与讨论

2.1 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中果实硬度的变化

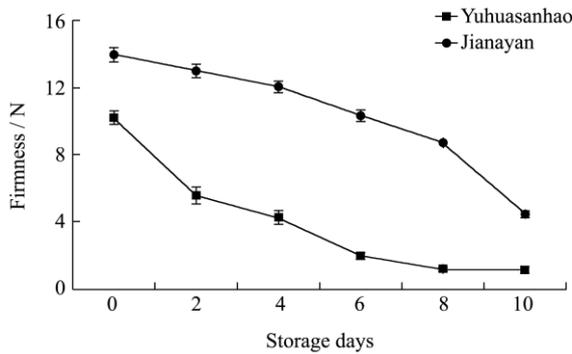


图1 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中硬度的变化

Fig.1 Changes in the firmness during the postharvest storage period of two peach cultivars

由图 1 可知, 采后贮藏过程中, ‘雨花三号’ 桃果实在 20 °C 条件下贮藏初期(2 d 内), 其硬度急剧下降, 在其贮藏后的第 6 d 硬度已下降至小于 2N, 至 10 d 时果实硬度已降至 1.1N。与 ‘雨花三号’ 桃果实相比, ‘加纳岩’ 桃果实贮藏过程中果实硬度下降的速度和幅度比较缓慢, 在整个贮藏周期内始终保持较高的硬度, 只在贮藏第 8 d 后, 其硬度才开始显著下降, 但其硬度也明显高于 ‘雨花三号’。

2.2 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中呼吸速率的变化

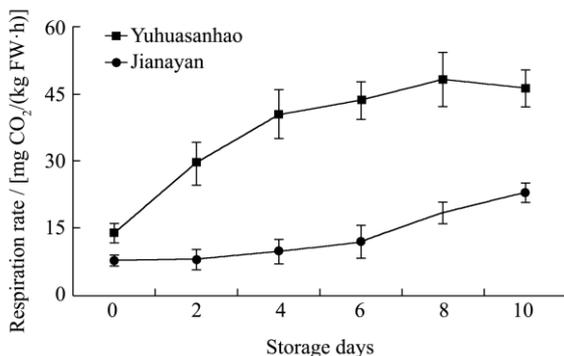


图2 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中呼吸速率的变化

Fig.2 Changes in the respiration rates during the postharvest storage period of two peach cultivars

呼吸速率是表示组织新陈代谢的一个重要指标, 是预测产品贮藏潜力的指标之一。如图 2 所示, ‘雨花三号’ 桃果实贮藏的前 8 d 呼吸速率迅速上升, 之

后保持较高呼吸速率, 贮藏的末期呼吸速率下降。而 ‘加纳岩’ 桃果实贮藏前 4 d 呼吸速率变化不明显, 贮藏至 8 d 后呼吸速率增加, 在贮藏末期呼吸速率保持恒定。20 °C 贮藏条件下, ‘雨花三号’ 桃果实呼吸速率的增加集中在贮藏前期, 而 ‘加纳岩’ 桃果实在贮藏中后期具有较高呼吸速率, 但 ‘雨花三号’ 在整个贮藏期的呼吸速率均显著高于 ‘加纳岩’ ($p < 0.05$)。

2.3 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中乙烯释放量的变化

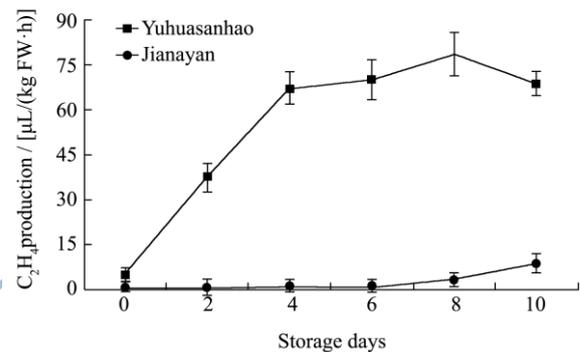


图3 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中乙烯释放量的变化

Fig.3 Changes in the ethylene production during the postharvest storage period of two peach cultivars

‘雨花三号’ 桃果实在 20 °C 贮藏 2 d 后乙烯释放即开始启动并迅速增加, 乙烯释放量至第 8 天达到最大值 78.91 µL/(kg FW h), 而后又有所下降; ‘加纳岩’ 桃果实在贮藏过程中乙烯释放量总体均处在很低的水平上, 只在贮藏末期有微弱上升趋势, 与 ‘雨花三号’ 桃果实有明显差异。

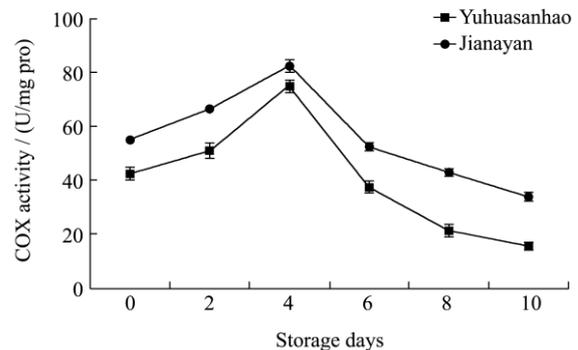


图4 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中细胞色素氧化酶活性的变化

Fig.4 Changes in the COX activity during the postharvest storage period of two peach cultivars

2.4 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中 COX

活性的变化

COX 是存在于线粒体内膜上重要的酶类，它能直接参与生物的有氧呼吸反应，从图 4 可知，两种溶质型桃果实在贮藏前期 COX 活性不断增加，在采后贮藏第 4 d 时 COX 活性达到峰值，随后 COX 活性不断下降，且不同溶质型桃果实在采后贮藏过程中 COX 活性存在显著差异 ($p < 0.05$)。

2.5 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中 COX

I、COX II、COX III 基因表达水平的比较

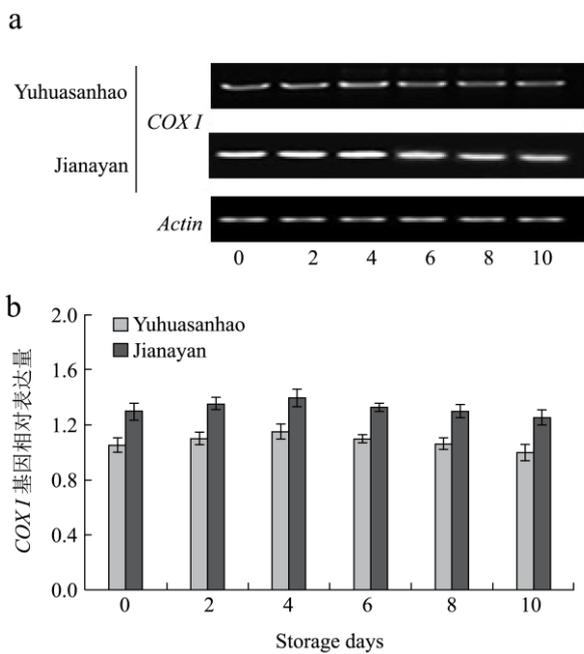


图 5 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中 COX I 基因表达的影响

Fig.5 Changes in the gene expression of COX I during the postharvest storage period of two peach cultivars

注: A.RT-PCR 分析 COX I 基因的表达; B.实时荧光定量 PCR 分析 COX I 基因的表达。以 Actin 作内参。

COX I 在两种不同溶质型桃果实贮藏过程中均有表达，但整个贮藏期其变化相对较平缓。两种溶质型桃果实在采后贮藏过程中 COX I 表达趋势相近，但硬溶质型“加纳岩”桃果实中 COX I 基因相对表达量显著高于软溶质型“雨花三号” ($p < 0.05$)。

由图 6 和图 7 可以看出，两种溶质型桃果实采后贮藏过程中 COX II 和 COX III 基因表达量均表现先增加后降低的趋势，但硬溶质型桃果实“加纳岩”COX II 和 COX III 基因的表达量在贮藏过程中均高于“雨花三号”。COX II 和 COX III 基因在贮藏过程中基因表达的变化趋势与 COX 的活性变化呈现一定正相关性 ($r = 0.873$)。

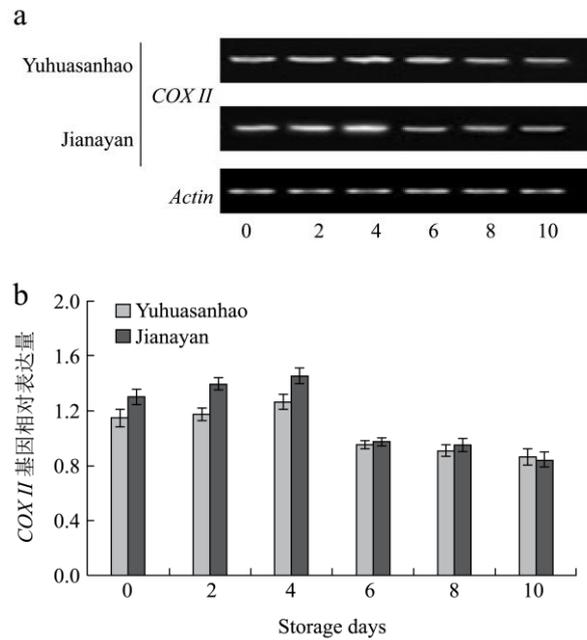


图 6 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中 COX II 基因表达的影响

Fig.6 Changes in the gene expression of COX II during the postharvest storage period of two peach cultivars

注: a. RT-PCR 分析 COX II 基因的表达; b. 实时荧光定量 PCR 分析 COX II 基因的表达。以 Actin 作内参。

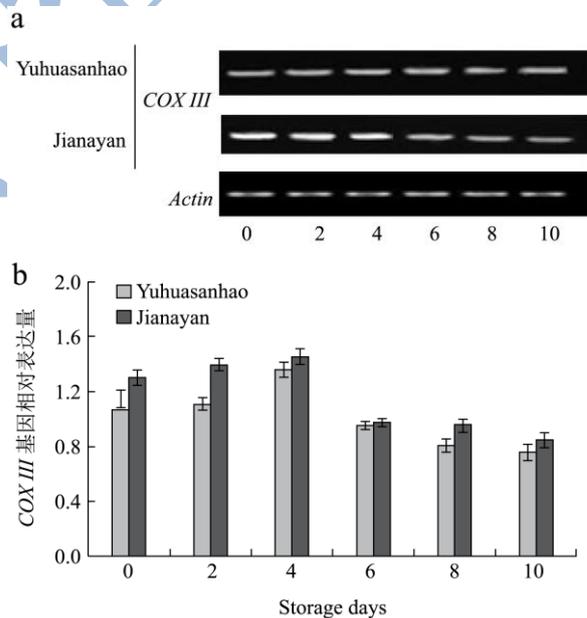


图 7 不同溶质型桃果实采后贮藏过程中 COX III 基因表达的影响

Fig.7 Changes in the gene expression of COX III during the postharvest storage period of two peach cultivars

注: A.RT-PCR 分析 COX III 基因的表达; B.实时荧光定量 PCR 分析 COX III 基因的表达。以 Actin 作内参。

3 讨论

3.1 果实硬度是果实后熟衰老的重要指标。呼吸跃变型果实成熟时最显著的变化特征就是果肉硬度的变

化,而桃果实为典型的呼吸跃变型果实,采后果实迅速软化是最显著的变化特征,且果实的硬度与果实的贮藏时间有着非常密切的关系。本研究中的两个桃果实品种,‘加纳岩’桃果实采后 20 °C 贮藏过程中,贮藏后期即 10 d 时硬度降至 4.2N (图 1),与此不同的是‘雨花三号’桃果实 20 °C 贮藏的前期就已迅速软化,采后贮藏的前 2 d 是硬度发生显著下降的时期(图 1),‘加纳岩’桃果实硬度保持期更长,有利于采后贮藏。

3.2 呼吸作用与果实品质的变化、贮藏寿命、贮藏中生理病变及果实贮藏保鲜技术的开发密切相关,是果蔬采收后生命活动的中心。本研究中软溶质型桃果实‘雨花三号’贮藏过程中在前期呼吸速率就已迅速升高并保持较高水平,而硬溶质型桃果实在贮藏后期具较高呼吸速率(图 2),与两类型桃果实的硬度下降呈现一定的相关性 ($r=-0.732$ 和 $r=-0.623$)。

3.3 乙烯对桃果实采后贮藏过程的调节是通过乙烯生成量的增加和组织对乙烯敏感性的改变而实现的,乙烯产生速率在不同种类和不同成熟期的植物组织中有所不同,在呼吸跃变型果实中乙烯在不同时期的产生速率不同。本研究中‘加纳岩’桃果实采后贮藏过程中乙烯释放水平较低(图 3),与呼吸速率的变化无明显相关性;而‘雨花三号’桃果实采后贮藏过程中乙烯释放量迅速上升期与果实硬度迅速下降期及呼吸速率的变化均有一定相关性。软溶质型桃果实的乙烯释放量与果实的软化具有很大的相关性,这一现象在硬溶质型桃果实中不明显。‘雨花三号’桃果实乙烯释放高峰,呼吸作用与果实后熟软化衰老关系密切。‘雨花三号’桃果实与‘加纳岩’桃果实采后贮藏过程中,在果实硬度、呼吸速率、乙烯释放量等生理变化上存在明显差异,‘加纳岩’属于硬溶质型桃果实,与‘雨花三号’桃果实(软溶质型)相比,具有较高的果实硬度,呼吸速率增加延迟,具有较低的乙烯释放量。细胞膜破坏和细胞膨压的降低是果实细胞结构破坏果肉发生软化的反映,淀粉作为细胞的内容物,对细胞起支撑作用,水解后转化成可溶性糖,不仅与果实的风味变化有关,而且导致膨压下降、果实软化,这也与果实质地相关。这些质地影响因素的最终作用反应在果实硬度上的不同。材料不同,品种不同,以上变化对硬度的影响也各不相同,最终导致了它们质地的差异。

3.4 细胞色素氧化酶作为线粒体呼吸链氧化磷酸化过程中的关键酶^[15],从细胞色素 C 接收电子传给最终受体 O_2 ,催化 O_2 还原为 H_2O ,并与质子泵功能相耦联,其活性大小可直接影响线粒体功能。在不同生物

中,甚至在同一生物种类、同一器官的不同部位,COX 表达皆存在着一定的差异^[16]。在本研究中,桃果实在采后贮藏前期(0~4 d),COX 活性逐渐增大,到贮藏第 4 d 时达到最大值(图 3)。,COX 活性增加,维持线粒体功能稳定,平衡细胞能量代谢,为桃果实贮藏时后熟提供充足的代谢能量。果实贮藏中后期,COX 活性开始下降,导致线粒体呼吸链中细胞色素氧化酶途径受阻,诱导了抗氰呼吸作用的加强,导致细胞内能量合成变少,膜电位遭到破坏,呼吸链末端电子流被阻断,直接影响了线粒体功能,机体进入衰老状态^[17]。很多果实在成熟过程中出现的呼吸跃变是与果实内源乙烯产生同步的,抗氰呼吸电子传递是乙烯促进呼吸的必要条件。乙烯的产生与抗氰呼吸上升有平行的关系,乙烯刺激抗氰呼吸,从而诱发呼吸跃变的产生,这与‘雨花三号’桃果实在贮藏期 8 天时出现呼吸高峰相一致(图 2)。呼吸高峰的出现标志着果实进入衰老状态,说明 COX 活性与桃果实贮藏过程中衰老存在一定关系。

3.5 COX 蛋白表达受核基因和线粒体基因的共同影响,COX 最大的三个亚基(COX I、COX II 及 COX III)是酶活性不可缺少的部分^[18],因此研究 COX 基因表达能从分子水平上探明 COX 对桃果实采后贮藏过程中衰老机制提供理论依据。本研究中,在桃果实采后贮藏过程中,COX I 基因表达量变化相对平缓,硬溶质型桃果实‘加纳岩’ COX I 在贮藏过程中的表达趋势与‘雨花三号’类似(图 4),但软溶质型‘雨花三号’中 COX I 基因表达量高于硬溶质型‘加纳岩’,结合两种溶质型桃果实贮藏过程中 COX 活性先增加后降低的变化趋势,COX I 亚基可能不是导致 COX 活性变化的关键因素。COX II 和 COX III 基因表达量均在贮藏前期(0~4 d)表达量逐渐升高,之后缓慢下降,COX II 和 COX III 基因表达量变化与 COX 活性变化呈现明显相关性 ($r=0.821$ 和 $r=0.816$),表明 COX 活性可能受到 COX II 和 COX III 基因的影响较大,COX 蛋白可能更多的会受到 COX II 和 COX III 基因的调控。同时,硬溶质型桃果实‘加纳岩’在采后贮藏过程中呼吸速率远低于软溶质型桃果实,且果实硬度相对于‘雨花三号’变化稍缓慢。初步表明,COX 与桃果实采后软化衰老之间具有一定的相关性,COX 在桃果实的采后衰老中起到了一定的作用。

3.6 本研究中,COX 活性及线粒体 DNA 编码的 COX 三种亚基主要作用于桃果实贮藏前期,为果实采后后熟提供所需能量,到了贮藏后期基因表达量降低,活性受影响,机体代谢失衡,呼吸速率和乙烯释放量增加,果实硬度下降,发生软化衰老。COX 与桃果实采

后贮藏过程中呼吸代谢及后熟衰老之间存在一定的内在联系。

参考文献

- [1] Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, et al. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria [J]. *Physiol. Plant*, 2007, 129(1): 185-195
- [2] Liberman M. Biosynthesis and action of ethylene [J]. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1979, 30(6): 533-591
- [3] 柯德森,王爱国,罗广华. 乙烯促进线粒体呼吸过程中活性氧的作用[J]. *热带亚热带植物学报*, 1999, 7(2): 140-145
- [4] Kataoka M, Fukura Y, Shinohara Y, et al. Analysis of mitochondrial membrane potential in the cells by microchip flow cytometry [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(15): 3025-3031
- [5] Collman JP, Dey A, Decreau RA, et al. Interaction of nitric oxide with a functional model of cytochrome c oxidase [J]. *PNAS*, 2008, 105(29): 9892-9896
- [6] Kadenbach B, Ramzan R, Vogt S. Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2009, 15 (4): 139-148
- [7] Francisca D. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802: 100-110
- [8] Vygodina TV, Zakirzianova W, Konstantinov AA. Inhibition of membrane-bound cytochrome c oxidase by zinc ions: High-affinity Zn²⁺-binding site at the P-side of the membrane [J]. *Febs Letters*, 2008, 582 (30): 4158-4162
- [9] Pecina P, Houstkova H, Hansikova H. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly [J]. *Physiological Research*, 2004, 53 (1): 213-223
- [10] Qin GZ, Meng XH, Wang Q, et al. Oxidative Damage of Mitochondrial Proteins Contributes to Fruit Senescence: A Redox Proteomics Analysis [J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8 (5): 2449-2462
- [11] Bonner W D. A general method for the preparation of plant mitochondria [J]. New York: Academic Press, 1967, 10: 126-133
- [12] Liang WS, Pan J, Liang HG. Activation of cyanideresistant respiration by pyruvate in mitochondria of aged potato tuber slices [J]. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2003, 29: 317-321
- [13] Errede B, Kamen MD, Hatefi Y. Preparation and properties of complex IV (ferrocytochrome c: oxygen oxidoreductase EC 1.9.3.1) [J]. *Methods in Enzymology*, 1978, 53: 40-47
- [14] Meisel L, Fonseca B, González S, et al. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for Functional genomics analyses [J]. *Biological Research*, 2005, 38, 83-88
- [15] Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, et al. An anthocyanin-rich strawberry extract protects against oxidative stress damage and improves mitochondrial functionality in human dermal fibroblasts exposed to an oxidizing agent [J]. *Food and Function*, 2014, 5(8): 1939-1948
- [16] Francisca D. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802: 100-110
- [17] Perez-Lopez A, Chavez-Franco SH, Villasenor-Perea CA, Espinosa-Solares T, Hernández-Gómez LH, Lobato-Calleros C. Respiration rate and mechanical properties of peach fruit during storage at three maturity stages [J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 142: 111-117
- [18] Francisca D. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802: 100-110