

1-甲基环丙烯和自发气调包装处理诱导鸭梨冷害过程中果肉褐变及水孔蛋白基因表达的变化

何近刚^{1,2}, 冯云霄^{1,2}, 程玉豆^{1,2}, 王坤¹, 付亚雄¹, 关军锋^{1,2}

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北石家庄 050051) (2. 河北省植物转基因中心, 河北石家庄 050051)

摘要: 本文分析鸭梨贮藏过程中果实品质以及果肉水孔蛋白基因表达量的变化。鸭梨果实经 1.0 $\mu\text{L/L}$ 1-甲基环丙烯 (1-MCP) 处理及自发气调包装 (MAP) 后入 0 $^{\circ}\text{C}$ 库冷藏 180 d, 之后常温货架贮藏 7 d。测定果实品质, MAP 包装内气体 (O_2 、 CO_2 、乙烯) 含量; 分析果肉褐变发生率以及果肉绿原酸含量、过氧化物酶 (POD) 和多酚氧化酶 (PPO) 活性; 通过荧光定量 PCR 分析 5 个质膜水孔蛋白基因 (*PbPIP*s)、2 个液泡膜水孔蛋白基因 (*PbTIP*s) 表达量的变化。结果表明: 1-MCP 显著抑制乙烯的生成, 1-MCP 与 MAP 复合处理 (1-MCP+MAP) 果实乙烯高峰含量为 17.30 $\mu\text{L/L}$, 果实硬度维持较好, 但果肉褐变率达 25.78%, 并且绿原酸含量、POD 和 PPO 酶活性都较对照显著升高。冷藏期间, *PbPIP1;1* 和 *PbTIP2;1* 表达量下调, *PbPIP1;4*、*PbPIP2;1*、*PbPIP2;2*、*PbPIP2;5* 和 *PbTIP1;1* 表达量上调, 这些基因的表达在不同程度上受 1-MCP 以及 1-MCP+MAP 处理的调控。总之, 1-MCP 与 MAP 处理都较好地维持长期贮藏鸭梨的硬度和 SSC, 但易导致果肉褐变的发生, 其原因可能是高浓度 CO_2 和冷害协同作用的结果。*PbPIP2;1*、*PbPIP2;5* 参与了鸭梨果实贮藏过程中冷害发生, 其表达受低温和乙烯的调控。

关键词: 鸭梨; 1-甲基环丙烯; 自发气调包装; 水孔蛋白基因; 果肉褐变

文章编号: 1673-9078(2021)07-128-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.1066

Analysis of Flesh Browning, Expression Characteristics of Aquaporin

Genes in 'Yali' Pear during Chilling Injury Induced by 1-MCP and MAP

HE Jin-gang^{1,2}, FENG Yun-xiao^{1,2}, CHENG Yu-dou^{1,2}, WANG Shen¹, FU Ya-xiong¹, GUAN Jun-feng^{1,2}

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

(2. Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Fruit quality, flesh browning, expression characteristics of aquaporin genes in 'Yali' pear were analyzed during long-term cold storage. The 'Yali' fruit was treated with 1.0 $\mu\text{L/L}$ of 1-methylcyclopropene (1-MCP), packaged with polyethylene film as modified atmosphere packaging (MAP), then was stored at 0 $^{\circ}\text{C}$ for 180 d and 20 $^{\circ}\text{C}$ for 7 d. During storage, fruit firmness, soluble solid contents (SSC) was analyzed, and gas (O_2 , CO_2 , ethylene) contents were measured; flesh browning rates, chlorogenic acid contents, polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) activities in the flesh were measured. Expression characteristics of *PbPIP*s and *PbTIP*s were analyzed by Real-time PCR. The results showed that fruit firmness reduced and SSC increased during cold storage. The ethylene production in MAP was effectively restrained by 1-MCP treatment, and the peak ethylene content of 1-MCP+MAP-treated fruit was 17.30 $\mu\text{L/L}$. Fruit firmness was maintained by 1-MCP treatment and MAP respectively, whereas flesh browning was more serious. During long-term cold storage, the flesh browning rates and chlorogenic acid contents were higher in 1-MCP and MAP fruits, especially in 1-MCP+MAP treated fruit, the flesh browning rate was 25.78%.

引文格式:

何近刚,冯云霄,程玉豆,等.1-甲基环丙烯和自发气调包装处理诱导鸭梨冷害过程中果肉褐变及水孔蛋白基因表达的变化[J].现代食品科技,2021,37(7):128-136

HE Jin-gang, FENG Yun-xiao, CHENG Yu-dou, et al. Analysis of flesh browning, expression characteristics of aquaporin genes in 'Yali' pear during chilling injury induced by 1-MCP and MAP [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 128-136

收稿日期: 2020-11-19

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (G2020301054); 河北省农林科学院科学技术研究与发展计划项目 (2018110301); 河北省拔尖人才支持资金

作者简介: 何近刚 (1982-), 女, 副研究员, 研究方向: 果实采后生理与分子生物学

通讯作者: 关军锋 (1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 果实贮藏与加工

In addition, PPO and POD activities were high as well. During cold storage, the expression levels of *PbPIP1;1* and *PbTIP2;1* were down-regulated, while the expression levels of *PbPIP1;4*, *PbPIP2;1*, *PbPIP2;2*, *PbPIP2;5* and *PbTIP1;1* were up-regulated. The expressions of *PbPIPs* and *PbTIPs* tested were regulated by 1-MCP and 1-MCP+MAP. In conclusion, 1-MCP and MAP treatment could maintain fruit firmness and SSC in 'Yali' pear during long term storage, but caused serious flesh browning, which might be a consequence of high concentration CO₂ and chilling injury. *PbPIP2;1* and *PbPIP2;5* participated the process of chilling injury, and could be regulated by low temperature and ethylene.

Key words: 'Yali' pear; 1-methylcyclopropene; modified atmosphere packaging; aquaporin genes; flesh browning

鸭梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) 是我国主栽梨品种之一, 果型美观、味甜多汁, 深受广大消费者的喜爱。为了延长鸭梨贮藏期常进行冷藏, 但长期冷藏后, 易发生黑皮、果肉褐变现象^[1,2], 导致果实商品价值明显下降, 经济效益损失严重。

1-甲基环丙烯 (1-methylcyclopropene, 1-MCP) 作为一种新型乙烯受体抑制剂, 可显著延缓跃变型果实成熟, 延长货架期^[3], 在生产上具有广阔的应用前景。薄膜形成的自发气调包装 (Modified atmosphere packaging, MAP) 可调节果实微环境气体条件, 实现微气调, 延缓果实衰老, 以达到保鲜效果^[4,5]。1-MCP 与 MAP 联合使用 (1-MCP+MAP), 具有协同效应, 可以实现较好的保鲜效果。在梨果实上, 1-MCP+MCP 处理可延缓果实硬度的下降, 降低呼吸速率和乙烯释放速率, 减少黑皮发生^[6]。但我们在研究中发现, 1-MCP+MAP 处理有时会导致果肉褐变, 果肉呈水渍状, 可能属于冷害现象, 但其原因尚不清楚。

植物冷害产生的原因之一是在低温下发生了水分吸收运输和散失的不平衡^[7]。水孔蛋白 (Aquaporins, AQP) 在植物水分吸收、根部营养物质摄入、组织扩张、蒸腾作用、光合作用以及逆境胁迫等方面都发挥着重要的作用^[8-10], 并且还参与果实发育。如西洋梨 'La France' 幼果发育时, 细胞膨大期液泡膜水孔蛋白基因 (*TIP*) 表达量特别高, 可能为细胞膨大时的液泡水通道^[11]; 富士苹果中 *MdPIP1;3* 的两个表达高峰与果实发育中两个细胞膨大期一致^[12]; 沙梨果实发育过程中, *PpPIP1* 表达量受乙烯上调^[13]。已有研究证明, 当番茄乙烯合成增加并且跃变期提前时, 果实加速失水, 同时 *SlPIP12Q*、*SlPIPQ*、*SlPIP21Q* 和 *SlPIP22* 表达量上调^[14]。但目前关于水孔蛋白在低温和乙烯调控下参与梨果实采后品质变化的研究较少。

本研究主要探讨 1-MCP 及 MAP 处理下, 分析鸭梨长期贮藏过程中果实品质及果肉褐变发生, 以及果实水孔蛋白基因的表达情况, 进而深入解析 1-MCP 及 MAP 对鸭梨贮藏效果的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 材料与处理

鸭梨于 2017 年 9 月 16 日采自河北省赵县管理良好的果园。采后当天运回实验室, 解去果实纸袋, 过夜, 散去田间热。次日, 挑选大小均匀 (单果重 286.76±34.41 g)、成熟度一致的无病虫害的果实为材料, 进行处理。果实在塑料帐篷内密封, 使用 1.0 μL/L 1-MCP (美国陶氏公司生产) 熏蒸 18 h, 之后一部分果实进行自发气调包装 (1-MCP+MAP), 一部分果实直接装入纸箱 (1-MCP); 对照果实直接于帐篷内密封 18 h, 同样一部分果实进行自发气调包装 (MAP), 一部分果实直接装入纸箱 (CK)。自发气调包装保鲜膜 (厚度 15 μm) 为微孔 PE 膜, 由国家农产品保鲜工程技术研究中心 (天津) 提供。处理完毕后, 果实装入纸箱。每箱 30 个果实, 进入冷库贮藏 (温度为 0±0.5 °C, 相对湿度 85%~95%)。自冷藏 60 d 时, 每隔 30 d 随机选取 15 个果实, 取样测定各项指标, 5 个果实 1 组, 每个处理测定 3 个重复。冷藏 180 d 时将果实取出冷库, 测定其在 20 °C 下货架 7 d 各项指标。

1.2 方法

1.2.1 品质指标

果实硬度: 使用 GY-4 型果实硬度计 (浙江托普公司) 测定, 单位为 kg/cm²; 可溶性固形物含量 (SSC) 使用 PAL-1 型手持数字糖度计 (日本爱拓公司) 测定。

1.2.2 果实包装内气体成分含量测定

包装及纸箱内 O₂ 和 CO₂ 含量使用 99790 II 型便携式气体分析仪 (德国 Witt 公司) 测定, 乙烯含量采用 GC-9790 II 型气相色谱仪测定 (浙江福立公司)。乙烯测定的条件为, 柱箱温度: 80 °C; 汽化室温度为: 140 °C; FID (氢火焰离子检测器) 的温度为: 200 °C。N₂ 为载气, H₂ 为燃气, 助燃空气为合成空气。N₂ 的流量为: 40 mL/min (0.04 MPa), H₂ 流量为: 40 mL/min, 空气流量为: 30 mL/min (0.03 MPa)。每个处理固定 3 箱进行气体测定, 每箱重复 3 次取样。

1.2.3 果肉褐变率测定

果肉褐变率: 纵切果实后, 计果肉褐变果实数,

计算褐变果实数占总果实数量的百分比。

1.2.4 果肉绿原酸含量测定

绿原酸含量采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定^[15]。取果皮 1 cm 深果肉冻样, 进行绿原酸提取和测定。HPLC 色谱条件: 日立 HITACHI L-2000 高效液相色谱仪自带的反相 Lachrom C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 洗脱程序为 A 相 5% 冰醋酸水溶液、B 相为水、C 相为乙腈 (0 min, A:B:C=19:76:5; 7 min, A:B:C=95:0:5; 20 min, A:B:C=85:0:15; 25 min, A:B:C=55:0:45; 26 min, A:B:C=15:0:85; 31 min, A:B:C=15:0:85; 32 min, A:B:C=19:76:5), 流速为 1.0 mL/min, 进样体积为 10 μL。

1.2.5 POD 和 PPO 活性测定

POD 活性测定: 采用愈创木酚法^[16]。取果肉冻样 1 g, 加入 3 mL 0.1 mol/L 乙酸钠提取缓冲液 (1 mmol/L

PEG、4% PVPP 和 1% Triton X-100), 4 °C 下 12000 r/min 离心 30 min, 取上清液用于测定 POD 活性。将 200 μL 酶提取液加入到反应液中 (含 25 mmol/L 愈创木酚), 使终体积为 4 mL。在 470 nm 波长下测定 OD 变化值, 以每分钟吸光度变化值增加 0.01 时为 1 个 POD 活性单位 (U), 单位为 U/g FW。

PPO 活性测定^[17]: 称取果肉冻样 1 g, 加入 3 mL 的 0.1 mol/L (pH=7.0) 磷酸缓冲液 (含 6% PVP), 4 °C 下 12000 r/min 离心 15 min, 取上清液用于测定 PPO 活性。将 200 μL 酶提取液加入到 25 °C 预热反应液中 (含 25 mmol/L 邻苯二酚的磷酸盐缓冲液, pH 6.0), 使终体积为 4 mL。在 420 nm 波长下测定 OD 变化值, 以每分钟吸光度变化值增加 0.01 时为 1 个 PPO 活性单位 (U), 单位为 U/g FW。

1.2.6 RNA 提取和定量 PCR (RT-PCR) 分析

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	基因序列号	引物序列
<i>PbPIP1;1</i>	XM_009369549.2	5'-CCCTGACCAGATCCGTGTTTC-3' 5'-TCACCACATTAGCTCCACCG-3'
<i>PbPIP1;4</i>	XM_009346277.2	5'-GTCATCAGTCACCGGGAGC-3' 5'-GTTTCGCTCCCAGCCTAACAT-3'
<i>PbPIP2;1</i>	XM_009347483.2	5'-CCTGCAGTCACATTGGGCTA-3' 5'-ACCACATATGGCTCCCAACG-3'
<i>PbPIP2;2</i>	XM_009368799.2	5'-TGACAATTGCAGGAGGACAC-3' 5'-GCTTTCACCAACCCAACACC-3'
<i>PbPIP2;5</i>	XM_009347488.2	5'-ACAAGCACAAACAACCTGGCTC-3' 5'-TCCTGGTAGTCCTGGCTGA-3'
<i>PbTIP1;1</i>	XM_009351469.2	5'-CCTGAGGAAACGTACCACCC-3' 5'-GAGTATTTGCGGCGTCATCG-3'
<i>PbTIP2;1</i>	XM_009379603.2	5'-CCAGCTTGGAACCTCCATTTTC-3' 5'-TGCATTGTTGAAATCACCG-3'
<i>PbActin2</i>	GU830959	5'-GGACATTCAACCCCTCGTCT-3' 5'-ATCCTTCTGACCCATACCAACC-3'

采用 Gasic 等改良 CTAB 法^[18]提取果肉的总 RNA。总 RNA 经 DNase 清除 DNA 后, 用 Primescript TM RT reagent Kit (宝生物工程 (大连) 有限公司) 进行反转录。

定量 PCR 仪为 ABI 7500 型 (Applied Biosystems™, 美国), 反应试剂为 TB Green™ Premix Ex Taq II 定量 PCR 试剂盒 (宝生物工程 (大连) 有限公司)。以 *PbActin2* 为内参基因^[19], 其余基因参照 Genbank 上登记序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计基因引物, 所有引物委托上海生物工程有限公司合成 (表 1)。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算出待测基因相对表达量。

1.3 数据处理

数据采用 Excel 2007 和 SPSS (18.0) 数据处理软件进行统计分析, 方差分析采用 LSD 法, 结果用 3 次重复的平均值表示。

2 结果与讨论

2.1 1-MCP 及 MAP 对鸭梨冷藏期包装内气体含量的影响

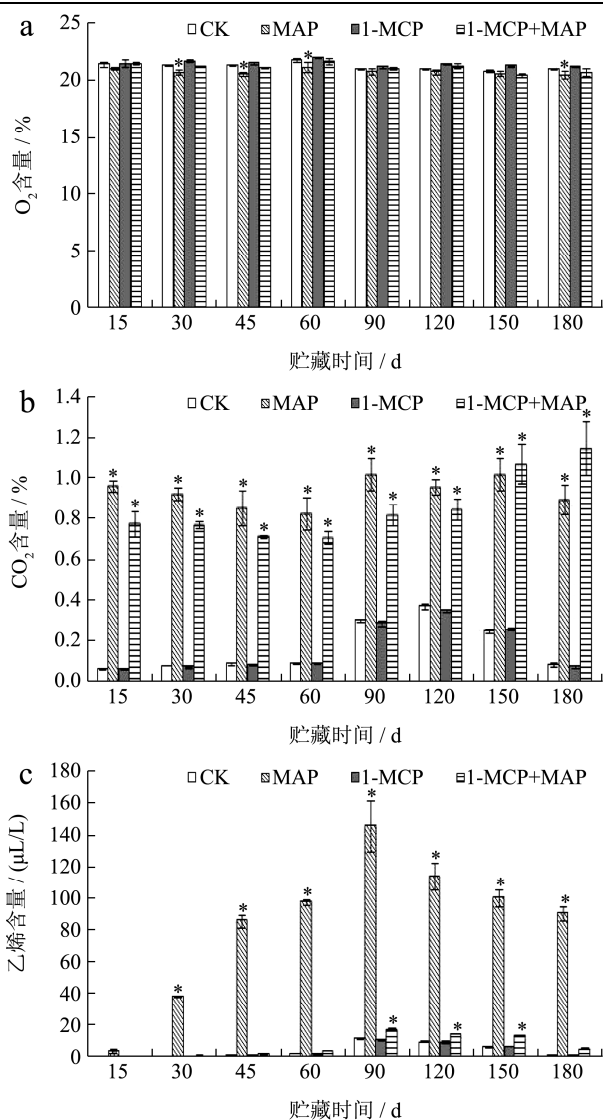


图1 1-MCP及MAP处理后冷藏鸭梨包装箱/膜内O₂ (a)、CO₂ (b)以及乙烯含量 (c)变化

Fig.1 Changes of O₂ (a), CO₂ (b) and ethylene contents in package box and film (c) of 'Yali' pear treated by 1-MCP and MAP during cold storage

注: 与CK比较, *表示差异显著 (p < 0.05), 下同。

经测定, 不同处理及包装内 O₂ 含量在 20.43%~21.78%之间, 贮藏 30 d、45 d、60 d 以及 180 d 时 MAP 处理内 O₂ 含量显著低于 CK, 其余处理与 CK 之间无明显差别 (图 1a); 包装内 CO₂ 含量在 0.71%~1.15% 之间, 显著高于 CK 以及 1-MCP 处理箱内含量 (图 1b)。包装内乙烯含量在 90 d 时达到高峰 (图 1c), MAP 处理内乙烯含量为 146.38 μL/L, 而 1-MCP 可有效抑制 MAP 包装内乙烯含量的升高, 1-MCP+MAP 处理内乙烯含量仅为 17.30 μL/L。

1-MCP 可通过强烈结合乙烯受体, 因而有效地阻碍了乙烯与其受体的正常结合, 致使乙烯作用信号的传导和表达受阻^[3,20]。本研究中 1-MCP 处理显著抑制

了冷藏期间鸭梨果实乙烯的生成 (图 1c), 这是其延缓果实衰老的基础。1-MCP 与 MAP 联合使用 (1-MCP+MAP) 对自发气调包装内 O₂ 的影响不显著, 但在冷藏 120 d 之前降低袋内 CO₂ 含量, 之后略有升高, 尤其是冷藏 180 d 时 CO₂ 升高显著; 但从乙烯含量来看, 1-MCP+MAP 复合处理显著降低袋内乙烯含量 (图 1b、c)。

2.2 1-MCP 及 MAP 对鸭梨冷藏期及货架期品质的影响

质的影响

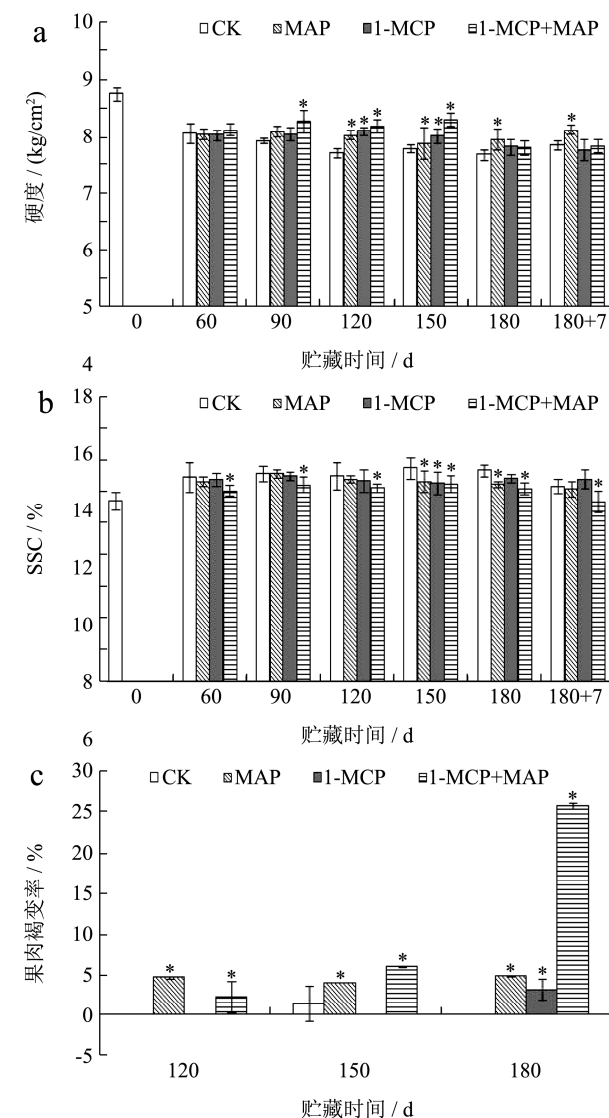


图2 1-MCP及MAP处理后冷藏和货架期鸭梨硬度 (a)、SSC (b)和果肉褐变率 (c)的变化

Fig.2 Changes of fruit firmness (a), SSC (b) and flesh browning rate (c) of 'Yali' pear treated by 1-MCP and MAP during cold and shelf-life storage

硬度在贮藏期间呈下降趋势, 1-MCP 与 MAP 处理可较好地维持硬度 (图 2a); 随着贮藏时间的延长,

SSC 升高, 且 CK 与 1-MCP 处理的果实 SSC 显著升高(图 2b)。采收时果实硬度和 SSC 分别为 7.51 kg/cm² 和 11.46%, 贮藏 180+7 d 时 MAP 包装处理果实硬度 (6.25 kg/cm²) 最高, CK、1-MCP 以及 1-MCP+MAP 处理的果实硬度分别为 5.72 kg/cm²、5.53 kg/cm² 和 5.68 kg/cm², 三者之间无明显差别; 贮藏 180+7 d 时, 1-MCP+MAP 果实 SSC (11.43%) 最低, CK、MAP 和 1-MCP 处理果实 SSC 分别为 12.40%、12.24%和 12.86%, 三者之间无明显差别。冷藏 120 d 时果实胴部果肉开始发生褐变, 并且呈水渍状, 属于典型的冷害症状。贮藏 180 d 时 1-MCP+MAP 处理果实果肉褐变情况最为严重, 果肉褐变率达 25.78% (图 2c)。

乙烯受体抑制剂 1-MCP 具有明显的延缓果实衰老的作用^[20], 在梨贮藏保鲜应用中已经取得长足的进展。MAP 包装通过调节果实微环境, 从而达到保鲜的效果^[5,21]。本研究中 MAP 和 1-MCP 处理均可有效维持冷藏期鸭梨果实硬度、SSC (图 2a、b), 但二者联合使用 (1-MCP+MAP) 加重了果肉组织褐变 (图 2c)。

梨果在贮藏过程中产生的组织褐变, 有时被认为与贮藏环境中高浓度的 CO₂ 有关。当包装内 CO₂ 浓度大于 1% 时, 黄金梨果肉组织易发生褐变^[21]。冷藏期间包装内 CO₂ 浓度为 1.3%~3.2% 时, 鸭梨果肉发生褐变; 而微孔膜包装内 CO₂ 浓度将至 0.6% 以下时, 果肉褐变指数显著降低^[22]。本研究中 MAP 处理袋内 CO₂ 浓度在冷藏期间一直保持在 0.71% 以上 (图 1b), 推测在一定程度上的 CO₂ 积累也是导致 MAP 处理鸭梨果肉褐变发生的原因之一。

2.3 1-MCP 及 MAP 对鸭梨冷藏期及货架期果肉绿原酸含量、POD 及 PPO 活性的影响

绿原酸含量随着贮藏时间的延长而增加, 尤其在褐变较为严重的 1-MCP+MAP 处理果实中 (180+7 d) 含量达最高值 (201.75 μg/g FW) (图 3a)。在贮藏期间 POD 活性先升高后下降, 1-MCP 以及 1-MCP+MAP 处理果实 POD 活性在整个贮藏期间显著高于 CK 及 MAP 果实, 其中 1-MCP+MAP 处理果实 POD 活性在贮藏 150 d 时达最高值 37.37 U/g FW (图 3b)。与 POD 不同, PPO 活性随着贮藏时间延长而升高, 其中 1-MCP 和 1-MCP+MAP 处理果实在贮藏后期 (180 d 和 180+7 d) 其活性显著高于 CK 和 MAP 果实 (图 3c), 180+7 d 时 1-MCP+MAP 处理果实 PPO 活性最高, 达 157.00 U/g FW, 而此时 CK 以及 MAP 果实中 PPO 活性仅为 89.00 U/g FW 和 84.00 U/g FW。

绿原酸是鸭梨果肉中含量较高的酚类物质^[23]。本

研究发现绿原酸含量随着果肉褐变加重而升高, 并且在褐变最为严重的 1-MCP+MAP 处理中最高 (图 3a)。POD 通过催化酚类物质与 H₂O₂ 反应生成醌类来清除果实内的 H₂O₂^[24], PPO 可催化醌和单宁的合成, 是引起酶促褐变的主要酶类^[25]。在本研究中, POD 活性在冷藏早期呈上升趋势, 并于 150 d 时达到最高值, 随后活性下降, 1-MCP 处理果实 POD 活性下降不明显, 而 1-MCP+MAP 处理果实 POD 活性在 180+7 d 时升高 (图 3b)。果肉内 PPO 活性随着贮藏时间的延长而升高, 并且在 180+7 d 时达到最高值, 1-MCP 以及 1-MCP+MAP 处理果实中 PPO 活性较高 (图 3c)。因此, POD 和 PPO 活性的显著升高是导致果肉组织褐变的生化基础。

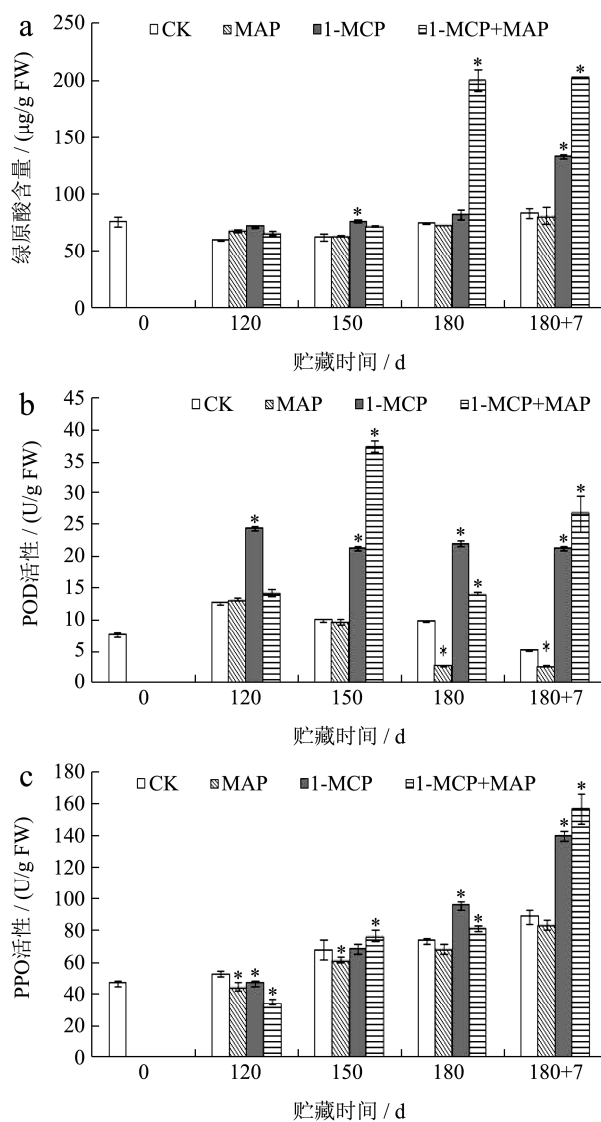


图 3 1-MCP 及 MAP 处理后冷藏和货架期鸭梨果肉绿原酸含量 (a)、POD 活性 (b) 以及 PPO 活性 (c) 的变化

Fig.3 Changes of flesh chlorogenic acid content (a), POD (b) and PPO activity (c) of 'Yali' pear treated by 1-MCP and MAP during cold and shelf-life storage

2.4 1-MCP 及 MAP 对鸭梨冷藏及货架期及货架期果肉 *PbPIP*s 和 *PbTIP*s 表达量的影响

在鸭梨贮藏过程中, CK 果实和 MAP 包装果实质膜水孔蛋白基因 *PbPIP1;1* 表达量在冷藏过程中呈下降趋势, 在货架期略有升高, 而 1-MCP 处理可延缓该基因的下降, 整个贮藏期间 1-MCP 以及 1-MCP+MAP 处理果实 *PbPIP1;1* 表达量显著高于 CK 果实(图 4a); 180 d 时 CK 和 MAP 果实中 *PbPIP1;1* 表达量分别为 0.07 和 1.11, 1-MCP 和 1-MCP+MAP 处理果实中该基因表达量为 0.52 和 0.16。*PbPIP1;4* 在贮藏过程中表达量先升高后下降, 入库 60 d 时 CK 果实中该基因即达到表达高峰 4.02, 而处理果实中 *PbPIP1;4* 表达量相对较低(图 4b)。

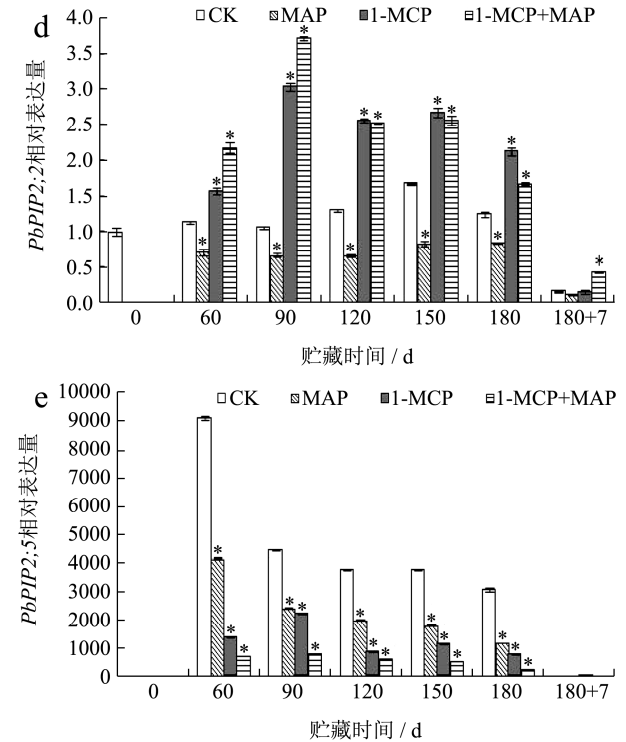
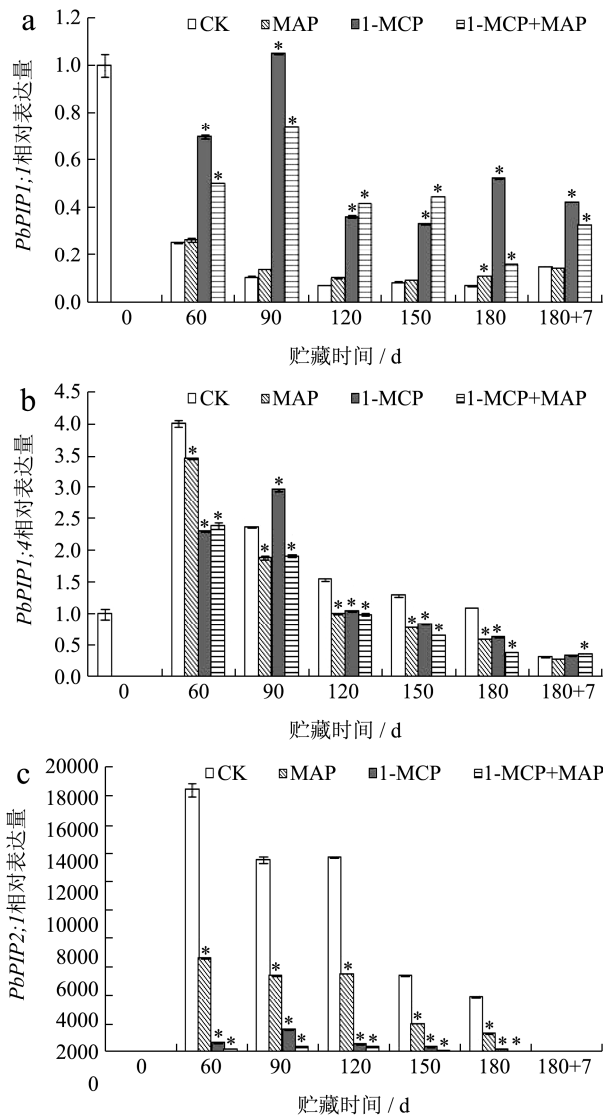


图 4 1-MCP 及 MAP 处理后冷藏鸭梨果肉 *PbPIP1;1*(a)、*PbPIP1;4* (b)、*PbPIP2;1* (c)、*PbPIP2;2* (d) 以及 *PbPIP2;5* (e) 相对表达量的变化

Fig.4 Relative expression level of *PbPIP1;1* (a), *PbPIP1;4* (b), *PbPIP2;1* (c), *PbPIP2;2* (d) and *PbPIP2;5* (e) in the flesh of 'Yali' pear treated by 1-MCP and MAP during cold and shelf-life storage

CK 果实的 *PbPIP2;1* 在冷藏 60 d 时表达量激增, 其表达量可达初始值的 18000 倍左右, 随后表达量下降, MAP 和 1-MCP 处理均可抑制该基因表达量的升高, 而 1-MCP+MAP 对该基因的抑制效果最为明显(图 4c), 该处理 *PbPIP2;1* 表达高峰仅为 406.08; *PbPIP2;5* 的表达趋势在 CK 果实中与 *PbPIP2;1* 相似, 表达量在贮藏初期(60 d)达高峰(9128.53), 之后表达量下调, MAP 以及 1-MCP 抑制该基因的表达, 而 1-MCP+MAP 联合处理的抑制作用更为明显, 并且可以推迟表达高峰(90 d, 768.75)(图 4e)。在冷藏初期 CK 果实、1-MCP 以及 1-MCP+MAP 处理果实中 *PbPIP2;2* 基因表达量都呈升高趋势, 贮藏 90 d 时表达量达到最高值, 随后下降; 与另外两个 *PIP2* 基因不同的是, 1-MCP 处理果实中 *PbPIP2;2* 表达量均高于 CK 果实(图 4d)。

本研究分析了两个梨 *TIP* 基因, 结果发现(图 5), *PbTIP1;1* 基因的表达量在冷藏 60 d 时达到表达高峰, 随之逐渐下降, 而 1-MCP 以及 1-MCP+MAP 处理果

实中该基因表达量显著高于 CK 果实和 MAP 处理果实, 180+7 d 时该基因在 1-MCP+MAP 处理果实中相对表达量为 7.67, 为 CK 和 MAP 处理果实中的十余倍; *PbTIP2;1* 基因在冷藏后表达量明显下降, 1-MCP 在一定程度上可抑制该基因的下调。而 1-MCP+MAP 联合处理果实中, *PbTIP1;1* 和 *PbTIP2;1* 表达量在贮藏后期高于其余处理果实。

一般认为, 1-MCP 能有效延长梨果实的贮藏时间, 抑制果肉褐变^[26]。但本研究发现 1-MCP 对鸭梨冷藏期间果肉褐变并未有显著效果, 反而 1-MCP+MAP 处理可加重长期冷藏鸭梨 (180 d) 果肉褐变的发生 (图 3a)。这种情况可能与 MAP 处理的前提下, 1-MCP 加重果实发生冷害有一定关系。已有文献报道 1-MCP 处理可加剧桃^[27]、香蕉^[28]、番茄^[29]和猕猴桃^[30]等果实在冷藏期间冷害的发生。

低温下水分吸收、运输和散失的不平衡是植物冷害发生的原因之一^[7]。研究发现, 低温导致植物水孔蛋白活性及其基因表达、细胞免疫定位发生变化^[31]。已有研究表明, 香蕉中 *MaPIP1;1*、*MaPIP1;2*、*MaPIP2;4* 和 *MaPIP2;6* 参与早期冷响应^[32]。橡树质膜水孔蛋白基因 *HbPIP1;1* 启动子包含乙烯响应元件和多种干旱响应元件^[33]。在拟南芥中对乙烯调控水孔蛋白通道活性的机制研究发现, 乙烯可促进 *AtPIP2;1* 的磷酸化, 进而增强水通道活性^[34]。本研究发现 *PbPIP*s 和 *PbTIP*s 在低温下表达量均有不同程度变化, 其中 CK 果实中 *PbPIP2;1*、*PbPIP2;5* 在鸭梨冷藏后表达量显著升高, 推测其表达受低温的诱导。同时, 这两个基因表达量的升高受 MAP 以及 1-MCP 的抑制, 尤其 1-MCP 的抑制作用更为明显; 而 1-MCP+MAP 联合处理对 *PbPIP2;1* 和 *PbPIP2;5* 表达的抑制作用强于单独处理, 进一步推测它们的表达同时受乙烯的调控。

鸭梨在长期低温贮藏下仍产生大量乙烯, 而 1-MCP 处理抑制了乙烯的生成 (图 2c), 抑制了水孔蛋白基因 *PbPIP2;1*、*PbPIP2;5* 在整个贮藏期的表达 (图 4c、e), 促进了 *PbTIP1;1* 在贮藏早期表达量的升高, 延缓了在贮藏后期冷害发生时 *PbTIP1;1* 和 *PbTIP2;1* 表达量的下降 (图 5), 导致细胞水分状况改变, 进而引起果实冷害, 发生果肉褐变。总之, 1-MCP+MAP 联合处理除了维持自发气调包装内较大的湿度外, 使袋内 CO₂ 浓度较高, 而乙烯含量较低, 使果实微环境变得更为复杂。因此, 与前人研究结果相比^[21,22], 本研究认为鸭梨长期冷藏过程中果肉褐变发生不仅仅是高浓度 CO₂ 伤害的结果, 很有可能是高湿度、高浓度 CO₂ 和冷害共同作用的结果, 其具体机理还需进一步的研究。

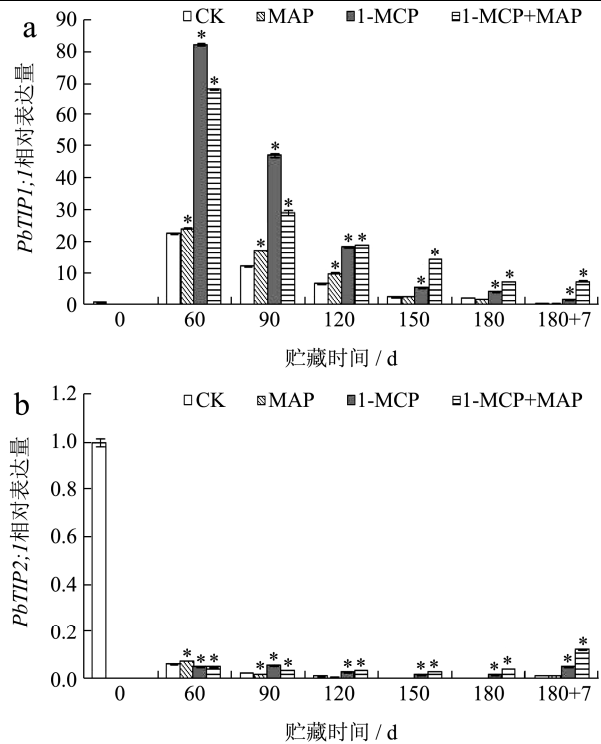


图 5 1-MCP 及 MAP 处理后冷藏和货架期鸭梨果肉 *PbTIP1;1*(a)、*PbTIP2;1* (b) 相对表达量的变化

Fig.5 Changes in the relative expression level of *PbTIP1;1* (a) and *PbTIP2;1* (b) in the flesh of 'Yali' pear treated by 1-MCP and MAP during cold and shelf-life storage

3 结论

1-MCP 与 MAP 处理都可以较好地维持鸭梨长期贮藏期间硬度、SSC, 但易导致果肉褐变发生, 此时, 果肉中绿原酸含量升高, POD、PPO 活性增加; 同时, 果肉褐变的发生可能是高浓度 CO₂ 和冷害协同作用的结果。*PbPIP2;1*、*PbPIP2;5* 可能参与了鸭梨果实贮藏过程中冷害发生, 其表达受低温和乙烯的调控。

参考文献

[1] 何近刚,冯云霄,程玉豆,等.套袋对鸭梨采后生理及贮藏品质的影响[J].保鲜与加工,2017,17(2):25-30
HE Jin-gang, FENG Yun-xiao, CHENG Yu-dou, et al. Effects of fruit bagging on physiology characteristics and quality of 'Yali' pear during storage [J]. Storage and Process, 2017, 17(2): 25-30

[2] 梁丽雅,胡小松,何爱红,等.降温方法对不同成熟度鸭梨果肉脂氧合酶活性和膜脂脂肪酸的影响[J].食品科技,2012, 37(4):35- 39
LIANG Li-ya, HU Xiao-song, HE Ai-hong, et al. Effect of different cooling methods on LOX activity and membrane fatty acid of different maturity 'Yali' pear after harvest [J].

- Food Science and Technology, 2012, 37(4): 35-39
- [3] Blankenship S M, Dole J M. 1-Methylcyclopropene: a review [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 28: 1-25
- [4] Smith S, Geeson J, Stow J. Production of modified atmosphere in deciduous fruits by the use of films and coatings [J]. Hort Science, 1987, 22(5): 772-776
- [5] 贾晓辉,王文辉,佟伟,等.自发气调包装对库尔勒香梨采后生理及贮藏品质的影响[J].中国农业科学,2016,49(24): 4785-4796
- JIA Xiao-hui, WANG Wen-hui, TONG Wei, et al. Effect of modified atmosphere packaging on postharvest physiology and quality of 'Korla Xiangli' pears during storage [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(24): 4785-4796
- [6] Feng Y X, Cheng Y D, He J G, et al. Effects of 1-methylcyclopropene and modified atmosphere packaging on fruit quality and superficial scald in 'Yali' pears during storage [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(7): 1667-1675
- [7] Bloom A J, Zwieniecki M A, Passioura J B, et al. Water relations under root chilling in a sensitive and tolerant tomato species [J]. Plant Cell and Environment, 2004, 27(8): 971-979
- [8] Ayadi M, Cavez D, Miled N, et al. Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) and their role in abiotic stress tolerance [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(9): 1029-1039
- [9] Schymanski S, Or D, Zwieniecki M. Leaf thermal and hydraulic capacitances-structural safeguards for rapid ambient fluctuations [J]. Plos One, 2013, 8(1): e54231
- [10] Singh R K, Deshmukh R, Muthamilarasan M, et al. Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 149: 178-189
- [11] Shiratake K, Kanayama Y, Maeshima M, et al. Changes in H⁽⁺⁾-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit [J]. Plant and Cell Physiology, 1997, 38(9): 1039-1045
- [12] Wang L, Li Q T, Lei Q, et al. Ectopically expressing *MdPIP1;3*, an aquaporin gene, increased fruit size and enhanced drought tolerance of transgenic tomatoes [J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 246
- [13] Shi H, Wang Y, Zhang D, et al. Pear PIP1 gene is regulated during fruit development and is involved in response to salicylic acid and ethylene [J]. Revue Canadienne De Phytotechnie, 2015, 95(1): 77-85
- [14] Sun Q Q, Zhang N, Wang J F, et al. Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 3: 657-668
- [15] He J G, Cheng Y D, Guan J F, et al. Changes of chlorogenic acid content and its synthesis-associated genes expression in 'Xuehua' pear fruit during development [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(2): 471-477
- [16] Jiang A L, Tian S P, Xu Y. Effect of controlled atmospheres with high O₂ or high CO₂ concentrations on postharvest physiology and storability of 'Napoleon' sweet cherry [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2002, 44(8): 925-930
- [17] 程玉豆,关军锋.'鸭梨'果心多酚氧化酶提取方法的优化[J].植物生理学报,2012,48(10):1021-1025
- CHENG Yu-dou, GUAN Jun-feng. Optimization of polyphenol oxidase extraction in the core of 'Yali' pear [J]. Plant Physiology Communications, 2012, 48(10): 1021-1025
- [18] Gasic K, Hernandez A, Korban S S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22(4): 437-438
- [19] Cheng Y D, Liu L Q, Zhao G Q, et al. The effects of modified atmosphere packaging on core browning and the expression patterns of *PPO* and *PAL* genes in 'Yali' pears during cold storage [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1243-1248
- [20] Watkins C B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(4): 389-409
- [21] 王志华,丁丹丹,王文辉,等.黄金梨气调贮藏中 CO₂ 对果实组织褐变及品质的影响[J].农业机械学报,2010,41(7):114-118
- WANG Zhi-hua, DING Dan-dan, WANG Wen-hui, et al. Effects of different CO₂ volume fraction on fruit browning and quality of 'Whangkeumbae' during controlled atmosphere storage [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(7): 114-118
- [22] 李家政,毕大鹏.微孔膜包装对鸭梨贮藏品质的影响[J].果树学报,2010,1:57-62
- LI Jia-zheng, BI Da-peng. Effects of micro-perforated film packaging on the quality of Yali pear fruit (*Pyrus bretschneideri* cv. Yali) during storage [J]. Journal of Fruit Science, 2010, 1: 57-62
- [23] 李丽梅,赵哲,何近刚,等.不同品种梨果实酚类物质和抗氧

- 化性能分析[J].食品科学,2014,35(17):83-88
- LI Li-mei, ZHAO Zhe, HE Jin-gang, et al. Analysis of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits from different pear cultivars [J]. Food Science, 2014, 35(17): 83-88
- [24] Hossain M A, Bhattacharjee S, Armin S M, et al. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6(420): 1-19
- [25] Franck C, Lammertyn J, Ho Q T, et al. Browning disorders in pear fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 43(1): 1-13
- [26] Cheng S, Wei B, Zhou Q, et al. 1-methylcyclopropene alleviates chilling injury by regulating energy metabolism and fatty acid content in 'Nanguo' pears [J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 109: 130-136
- [27] Fan X, Argenta L, Mattheis J. Interactive effects of 1-MCP and temperature on 'Elberta' peach quality [J]. Hort Science, 2002, 37(1): 134-138
- [28] Jiang Y, Joyce D C, Jiang W, et al. Effects of chilling temperatures on ethylene binding by banana fruit [J]. Plant Growth Regulation, 2004, 43: 109-115
- [29] 解静,罗自生.1-甲基环丙烯对番茄冷害的影响[J].园艺学报,2011,38(2):281-287
- XIE Jing, LUO Zi-sheng. Effect of 1-methylcyclopropene on chilling injury of tomato fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(2): 281-287
- [30] 王玉萍,段琪,饶景萍,等.1-MCP 对不同品种猕猴桃果实冷害的调控作用[J].西北农业学报,2013,22(3):110-114
- WANG Yu-ping, DUAN Qi, RAO Jing-ping, et al. Regulating action of 1-methylcyclopropene on chilling injury of different kiwi fruits [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2013, 22(3): 110-114
- [31] Miki Y, Takahashi D, Kawamura Y, et al. Temporal proteomics of *Arabidopsis* plasma membrane during cold- and de-acclimation [J]. Journal of Proteomics, 2019, 197: 71-81
- [32] He W D, Gao J, Dou T X, et al. Early cold induced peroxidases and aquaporins are associated with high cold tolerance in dajiao (*Musa* spp. 'dajiao') [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 282
- [33] Tungngoen K, Viboonjun U, Kongsawadworakul P, et al. Hormonal treatment of the bark of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) increases latex yield through latex dilution in relation with the differential expression of two aquaporin genes [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(3): 253-262
- [34] Qing D, Yang Z, Li M, et al. Quantitative and functional phosphoproteomic analysis reveals that ethylene-regulates water transport via the C-terminal phosphorylation of aquaporin PIP2;1 in *Arabidopsis* [J]. Molecular Plant, 2016, 9(1): 158-174

(上接第 127 页)

- [24] Kanwal Rehman, Kamran Haider, Komal Jabeen, et al. Current perspectives of oleic acid: regulation of molecular pathways in mitochondrial and endothelial functioning against insulin resistance and diabetes [J]. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2020, 21(publish): 631-643
- [25] Sarker Umakanta, Oba Shinya. Polyphenol and flavonoid profiles and radical scavenging activity in leafy vegetable *Amaranthus gangeticus* [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 101-110
- [26] Choi Yu Mi, Yoon Hyemyeong, Lee Sukyeung, et al. Isoflavones, anthocyanins, phenolic content, and antioxidant activities of black soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) as affected by seed weight [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 2111-2119
- [27] Lin Simon X, Curtis Maurice A, Sperry Jonathan. Pyridine alkaloids with activity in the central nervous system [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2020, 28(24): 201-210
- [28] Sardarodiyani Maryam, Arianfar Akram, Mohamadi Sani Ali, et al. Physicochemical properties and surface activity characterization of water-soluble polysaccharide isolated from Balangu seed (*Lallemantia royleana*) gum [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(6): 3625-3632