

李思彤, 李真琴, 林婉彤, 等. 波罗蜜柠檬酸合酶基因 (*AheCS*) 的表达及其与柠檬酸积累的相关性分析 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (2): 154–164.

LI S T, LI Z Q, LIN W T, et al. Expression and Function of Citrate Synthase Gene in Jackfruit [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (2): 154–164.

波罗蜜柠檬酸合酶基因 (*AheCS*) 的表达及其与柠檬酸积累的相关性分析

李思彤, 李真琴, 林婉彤, 王俊宁*

(广东海洋大学滨海农业学院, 广东 湛江 524088)

摘要:【目的】分析波罗蜜柠檬酸合酶基因 (*Artocarpus heterophyllus* citrate synthase, *AheCS*) 的生物学功能, 研究柠檬酸含量与 *AheCS* 基因相对表达量的相关性, 为探究 *AheCS* 基因在波罗蜜 (*Artocarpus heterophyllus* Lam., *Ahe*) 果实有机酸代谢中的可能作用提供参考。【方法】以海大 2 号波罗蜜果实为材料, 采用 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-甲基环丙烯 (1-Methylcyclopropene, 1-MCP) 和 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源乙烯利 (ethrel, ETH) (40%) 处理, 研究室温 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 90% 条件下波罗蜜果实成熟过程中柠檬酸的动态变化, 克隆获得 3 个波罗蜜的 *CS* 基因 (*AheCS1*、*AheCS2* 和 *AheCS3*), 对其进行生物信息学分析, 同时分析 3 个 *AheCS* 基因在不同采后处理下 (自然成熟、外源乙烯利催熟和 1-MCP 延缓成熟) 的相对表达情况及其与柠檬酸含量的相关性。【结果】随着波罗蜜果实的自然成熟, 果实中柠檬酸含量呈先上升后下降的变化趋势; 外源 ETH 处理加速了柠檬酸的合成速率, 提前了峰值出现的时间; 1-MCP 处理抑制了贮藏前期柠檬酸含量下降速率, 推迟了高峰出现时间。生物信息学分析发现, *AheCS1/2/3* 基因的开放阅读框 (ORF) 长 1422~1827 bp, 编码蛋白都含有柠檬酸合酶保守结构域 WPNVDAHS, 属于柠檬酸合酶家族成员。*AheCS1/2/3* 蛋白氨基酸序列分别与柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco.) *CsCS* (MH_048698.1)、川桑 (*Morus notabilis* C. K. Schneid.) *MnCs* (XP010087965.1)、红掌 (*Anthurium andraeanum* Linden.) *AaCS* (JAT55223.1) 亲缘关系最近, 相似性分别达到 86.49%、97.00%、86.00%。qRT-PCR 结果显示: *AheCS1/2/3* 基因在果实自然成熟 (CK) 前期表达量低, 而后期表达量高; 外源 ETH 处理提前了 *AheCS1* 的表达峰值时间, 整体提高了 *AheCS2/3* 的表达量; 而 1-MCP 处理推迟了 *AheCS1/2/3* 表达峰值出现时间, 增加了 *AheCS1/2/3* 成熟后期的表达量。相关性分析发现, 波罗蜜果实成熟过程中柠檬酸含量与 *AheCS1/2/3* 基因表达呈一定相关性, 其中与 *AheCS2* 相关性显著。【结论】*AheCS2* 是参与调控波罗蜜成熟过程中柠檬酸积累的潜在基因, 可作为进一步研究波罗蜜 *AheCS* 基因的功能及遗传改良的候选基因。

关键词: 波罗蜜; 柠檬酸; *AheCS* 基因; 克隆; 基因表达

中图分类号: S667.8

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 02-0154-11

Expression and Function of Citrate Synthase Gene in Jackfruit

LI Sitong, LI Zhenqin, LIN Wantong, WANG Junning*

(Coastal Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract:【Objective】The biological function of *AheCS* gene and the correlation between citric acid content and relative expression of *AheCS* gene were analyzed, and the possible role of *AheCS* gene in the metabolism of organic acids in jackfruit was discussed.【Method】*AheCS1*, *AheCS2*, and *AheCS3* from fruits of *A. heterophyllus* Haida 2 were cloned for a bioinformatic analysis. At room temperature (22 ± 1 $^{\circ}\text{C}$) and 90% RH, changes on the gene expression and citric acid content in the fruits under natural ripening process or exposed to either $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 1-MCP or $1,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 40% ethylene (ETH) were determined.【Result】The citric acid content in a naturally ripening jackfruit gradually rose and declined subsequently. It increased at an accelerated rate when exposed to ETH, but the rate was slowed down by the 1-MCP treatment. The ORFs of

收稿日期: 2023-10-11 修回日期: 2023-12-23

作者简介: 李思彤 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事采后生理与分子生物学研究, E-mail: lisitong0228@163.com

* 通信作者: 王俊宁 (1978—), 女, 博士, 教授, 主要从事果蔬采后生理与分子生物学研究, E-mail: wangjunningb@126.com

基金项目: 农科教合作人才培养基地项目 (GDOU2013040301); 教育部卓越农林人才培养计划项目 (GDOU2014041204); 广东省园艺和园林专业实践技能型农林人才培养模式改革试点项目 (GDOU2014041208)

the three genes ranged from 1 422 bp to 1 827 bp containing conserved WPNVDAHS domain and belonging to the CS family. The amino acid sequences were phylogenetically closely related to those of *CsCS* (MH_048698.1) in citrus with a similarity of 86.49%, *MnCS* (XP010087965.1) in mulberry with a similarity of 97%, and *AaCS* (JAT55223.1) in anthurium with a similarity of 86%. The expressions of these genes were low in the early stage and raised subsequently during natural ripening (CK). However, the exogenous ETH hastened the increasing rate of *AheCS1* expression and elevated the levels of *AheCS2* and *AheCS3* expressions, while 1-MCP delayed the rise but heightened the expression levels of the three genes at the stage near fruit maturity. The citric acid content of the ripening fruits generally positively correlated with the gene expressions. The correlation with *AheCS2* reached a statistically significant level. 【Conclusion】 *AheCS2* is a potential gene involved in the regulation of citric acid accumulation during the ripening process of jackfruit, and it can be a candidate gene for further study of the function and genetic improvement of the *AheCS* gene in jackfruit.

Key words: Jackfruit; citrate acid; *AheCS*; cloning; gene expression

0 引言

【研究意义】有机酸是果实内在品质的重要组成部分,直接影响果实口感^[1]。在果实采后贮藏的过程中,有机酸作为基础代谢底物,会随着呼吸和能量代谢转化逐渐减少,而导致果实加速衰老,果实品质降低,甚至失去食用价值^[2]。柠檬酸是果实中主要的有机酸之一,它的合成起源于线粒体的三羧酸循环,磷酸烯醇式丙酮酸经羧化酶催化生成草酰乙酸,进入柠檬酸循环,草酰乙酸和乙酰辅酶A缩合生成柠檬酸,形成柠檬酸合成途径^[3]。参与此过程的酶有异柠檬酸脱氢酶、乌头酸酶、磷酸烯醇丙酮酸和柠檬酸合酶(Citrate synthase, CS)等。在不同种类的果实中,这些酶的作用也不尽相同,其中柠檬酸合酶和磷酸烯醇式丙酮酸是促进柠檬酸合成的关键酶,而乌头酸酶和异柠檬酸脱氢酶则负责促进柠檬酸的分解^[4]。柠檬酸合酶是三羧酸循环中柠檬酸合成的关键限速酶之一,其作用是将乙酰辅酶A和草酰乙酸催化缩合生成柠檬酸,因此柠檬酸合酶的活性对整个代谢途径的速度具有重要影响^[5]。CS具有多种同工酶,参与线粒体能量代谢、抗逆等多种生理过程^[6,7]。柠檬酸合酶根据在真核细胞中的位置,可分为线粒体CS(mtCS)、乙醛酸循环体CS(gCS)和过氧化物酶体CS(pCS)^[8],它们几乎存在于所有的生物体中,其中控制柠檬酸合成的主要酶是线粒体柠檬酸合酶(mtCS)^[9]。波罗蜜(*Artocarpus heterophyllus* Lam.),又名木菠萝、树菠萝,是一种有名的热带水果,果实风味极佳。波罗蜜柠檬酸合酶基因(*AheCS*)研究,特别是果实后熟过程中柠檬酸的变化及其相关基因表达变化,对了解波罗蜜果实风味品质的形成机理具有重要意义。【前人研究进展】研究表明,CS基因是一个多家族成员基因,最早从蓖麻(*Ricinus communis* L.)^[10]中分离得到,目前已从柑橘^[11]、柚子[*Citrus maxima* (Burm) Merr.]^[12]、草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)^[13]、油茶(*Camellia oleifera* Abel.)^[14]和甜橙[*Citrus sinensis* (L.)

Osbeck]^[15]、酸橙(*Citrus × aurantium* Engl.)^[16]、油菜(*Brassica napus* L.)^[17]等多种植物中克隆到CS基因,证明CS基因广泛存在于植物体内,并且发现它们在柠檬酸代谢中扮演着重要角色。波罗蜜属于淀粉转化型果实,在果实后熟过程中淀粉快速降解,葡萄糖、果糖和蔗糖含量快速增加,果实风味变甜,可滴定酸含量也呈现先升后降的变化趋势^[18]。分析不同株系波罗蜜果肉中有机酸发现,波罗蜜果肉中的有机酸包括草酸、酒石酸、维生素C、柠檬酸和苹果酸,其中柠檬酸是主要的有机酸之一^[19]。波罗蜜属于呼吸跃变型果实,其成熟过程与乙烯代谢紧密相关。在波罗蜜果实成熟过程中,内源乙烯不断释放,并出现明显的乙烯高峰和呼吸跃变^[20]。外源乙烯利可促进波罗蜜果实的成熟衰老^[21],而乙烯作用抑制剂1-甲基环丙烯(1-Methylcyclopropene, 1-MCP)则抑制了波罗蜜成熟相关的变化,并且有效延缓了波罗蜜衰老,保持波罗蜜品质^[22]。【本研究切入点】目前关于波罗蜜果实采后CS基因的表达还有待深入研究。【拟解决的关键问题】以海大2号波罗蜜果实为材料,对其*AheCS1/2/3*基因进行扩增和生物信息学分析,同时对不同处理下果实柠檬酸含量和CS基因的相对表达情况进行分析,阐述波罗蜜果实柠檬酸的变化与CS基因表达量的相关性,为有机酸积累机理的研究和波罗蜜的采后保鲜提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其处理

于广东海洋大学种质资源圃(110°19'7.21"E, 21°09'18.47"N)采集供试材料海大2号干苞型波罗蜜品种果实。在果实八分成熟时采收。果实采后立即运回实验室,选择成熟度和大小一致、无病虫害的果实,以1000 mg·L⁻¹ ETH(40%)溶液浸泡和0.5 mg·L⁻¹ 1-MCP熏蒸处理,密封熏蒸17 h处理,具体操作参照王俊宁等^[18]的方法,以未经处理的果作为对照(CK)。处理后将3组材料均放在(22±1)℃、

90% 的相对湿度条件下贮藏, 在相同间隔时间的取样: CK 在贮藏后 0、2、4、6、8、10、12 d 取样, 外源 ETH 处理在贮藏后 0、2、4、6、8 d 取样, 1-MCP 处理在贮藏后 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 d 取样。每次取 3~5 个果, 取出果肉并切成小块, 混匀后用液氮速冻, 存放在-80 ℃ 超低温冰箱中备用。

1.2 柠檬酸测定及基因表达分析

1.2.1 柠檬酸的测定

参照夏春华等^[19]的方法。称取上述果肉 1.0 g 于研钵中, 2 mL 偏磷酸(叶源生物, 中国上海)研磨匀浆, 转入 10 mL 离心管, 用超纯水清洗研钵并定容至 10 mL, 室温 12000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取 1 mL 上清液于 0.22 μm 滤膜过滤后上机分析。采用安捷伦 1260 Infinity II 超高效液相色谱仪, 色谱柱为 C₁₈, 流动相为 0.2% 偏磷酸, 柱流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为 35 ℃, 进样量 10 μL, 每个指标重复 3 次。标样为柠檬酸(TMstandard, 美国)。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

使用华越洋 Plant RNA Kit 超快型植物 RNA 提取试剂盒(华越洋, 中国北京)。从波罗蜜果实中成功提取总 RNA。这些总 RNA 随后被用作模板, 通过使用 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix 试剂盒(TaKaRa, 中国大连)进行反转录, 合成第一链 cDNA。

1.2.3 PCR 引物设计及合成

波罗蜜全基因组数据库中找到 3 个全长的 CS 基因(NCBI 登录号: PRJNA788174), 命名为 *AheCS1*、*AheCS2* 和 *AheCS3*。使用 Primer Premier 5.0 软件, 针对全长引物和 qRT-PCR 引物进行设计, 并委托上海生工生物工程有限公司进行合成(表 1)。

表 1 <i>AheCS1</i> 、 <i>AheCS2</i> 和 <i>AheCS3</i> 基因全长引物序列	
Table 1 Sequences of <i>AheCS1</i> , <i>AheCS2</i> , and <i>AheCS3</i> primers	
引物名称 Primer names	引物序列 (5'-3') Primer sequences
<i>AheCS1</i> -F	5'-ATGGCCACCGGACAGCTATTCTCGCG-3'
<i>AheCS1</i> -R	5'-TCACTTGGTGTAAGAAGACGTCCTCCCATG-3'
<i>AheCS2</i> -F	5'-ATGGTGTTCTTCAGGGCGGTGTCTGTGC-3'
<i>AheCS2</i> -R	5'-TCAAGACGAAGCCGCTTTCTGCAGTAA-3'
<i>AheCS3</i> -F	5'-ATGGAATTGCCAGTCACGGCACGAGC-3'
<i>AheCS3</i> -R	5'-TTAAATGCCAGAACCGCCAGCCGG-3'

1.2.4 目的基因克隆与表达分析

以海大 2 号波罗蜜果实 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增技术, 成功获得目的片段。对目的片段经回收、连接转化后, 阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司进行检测测序, 得到目的基因的全长序

表 2 基因荧光定量引物序列	
Table 2 Sequences of quantitative qRT-PCR primers	
引物名称 Primer names	引物序列 (5'-3') Primer sequences
<i>AheCS1</i> -F	5'-AGAATCAAGCACTAAGGGACG-3'
<i>AheCS1</i> -R	5'-TTCAGGAATTTGTGGAGGC-3'
<i>AheCS2</i> -F	5'-GCCTCCCATCCTAACAGAAA-3'
<i>AheCS2</i> -R	5'-CGCTCGGTCCCATACTA-3'
<i>AheCS3</i> -F	5'-CCAACCGAGTTCTTCCCTG-3'
<i>AheCS3</i> -R	5'-GATAATGCCGCAACCAAAC-3'
<i>GAPDH</i> -F	5'-TTGAAGGGTGGNGCNAARAARG-3'
<i>GAPDH</i> -R	5'-ATAACCCCAYTCTTTRCTCTAC-3'

列。选择 *GAPDH* 为内参基因, 并基于 *AheCS1*/2/3 基因的全长设计荧光定量引物(表 2)。qPCR 扩增程序如下: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 35 个循环; 然后 72 ℃ 延伸 10 min, 16 ℃ 保存。基因相对表达量采用 2^{-ΔΔCT} 的方法进行计算。

1.2.5 基因生物学功能分析

利用 DNAMAN 软件进行碱基序列分析, 翻译成氨基酸序列。利用 EXPASY (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行氨基酸序列分析。采用 ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *AheCS1*/2/3 编码蛋白的基本理化性质; 利用在线工具 DictyOGlyc 1.1 Server 和 NetPhos 3.1 Server 对 *AheCS1*/2/3 编码蛋白糖基化和磷酸化位点预测; 利用 Plant-mPLocserver-SJTU (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 对 *AheCS1*/2/3 蛋白质进行亚细胞定位预测。利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 网站的进行蛋白疏水性分析分析。用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测 *AheCS1*/2/3 编码蛋白的二级结构; 使用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page>) 构建其 *AheCS1*/2/3 蛋白的三级结构模型; 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 基因编码的氨基酸的结构域进行分析; 将 *AheCS1*/2/3 蛋白提交到 Pfam 34.0 (<http://pfam.xfam.org/>) 和 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 数据库对其保守结构区域进行验证。在 NCBI-Blast 与 *AheCS1*/2/3 氨基酸序列相似的物种序列及在拟南芥数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 CS 蛋白全长序列; 使用 Phytozome 13 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) 下载其他物种的 CS 蛋白序列; 用软件 Clustalx 和 GENEDOC 进行不同物种 CS 氨基酸多重匹配分析; 在软件 MEGA11.0 上使用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树; 使用 iTOL (<https://itol.embl.de/upload.cgi>) 对进化树

进行美化；将 AheCS1/2/3 蛋白质提交到 MEME (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>) 网站对保守基序进行分析，保存 xml 文件并使用 Tbtools 软件对结果进行可视化分析。

1.3 数据统计

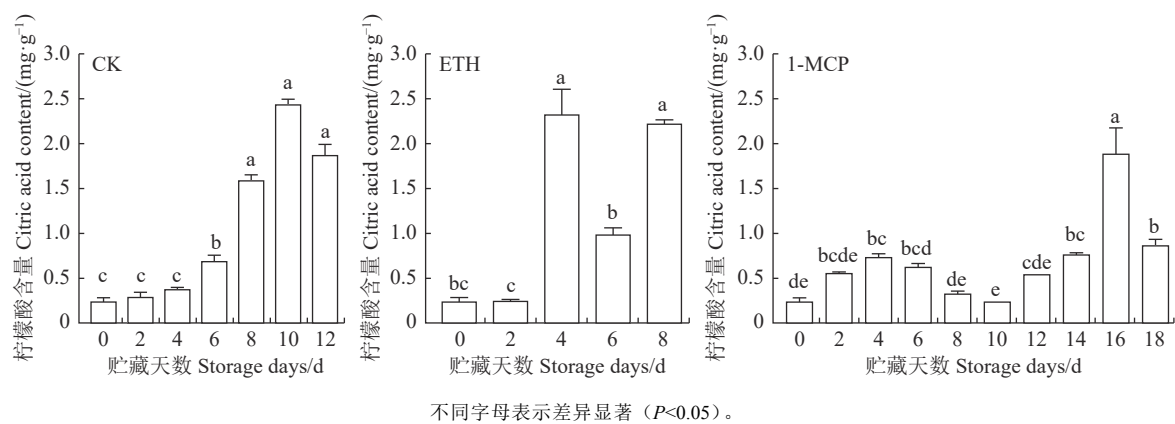
采用 Excel 2007、SPSS25.0 软件进行 Duncan's 方差分析以及 Pearson 相关性分析。图表制作软件为 Origin Lab Origin 2021。

2 结果与分析

2.1 不同处理波罗蜜果实柠檬酸含量的变化

对处理和未处理果实的采样分析表明，未处理

波罗蜜果实（CK）成熟过程中柠檬酸含量呈先上升后下降的变化趋势，于第 10 天出现峰值，为（2.43±0.06）mg·g⁻¹，且在 8~12 d 极显著高于 0~6 d 的含量。ETH 处理加速了柠檬酸的合成，于第 4 天出现峰值（2.32±0.28）mg·g⁻¹后下降，在第 8 天又有所上升，在第 4 天其含量显著高于对照（CK）（*P*<0.05）。1-MCP 处理的柠檬酸含量变化均呈“一小一大”双峰变化趋势，分别于第 4 天和第 16 天出现一小峰和一大峰，峰值分别为（0.73±0.04）mg·g⁻¹和（1.88±0.29）mg·g⁻¹，且第 16 天与第 0 天相比含量显著提高了 8.17%（图 1）。

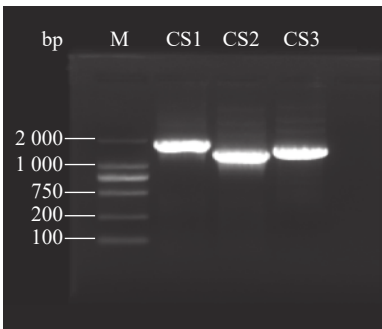


不同字母表示差异显著（*P*<0.05）。
Data with different letters indicate significant difference at (*P*<0.05).

图 1 不同处理对柠檬酸含量的影响
Fig. 1 Effect of various treatments on citric acid in jackfruit

2.2 波罗蜜 AheCS1、AheCS2 和 AheCS3 基因克隆

以反转录的 cDNA 作为模板，PCR 扩增后，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测（图 2），AheCS1 基因长度在 2000 bp 左右，AheCS2 和 AheCS3 基因的长度在 1500 bp 左右，经过回收、连接、转化和测序检测。最终获得它们的全长 cDNA 序列，长度分别为 1827、1422、1539 bp，与数据库中预测的长度相符。



M: DL2 000 DNA Marker; CS1/2/3: 波罗蜜目的基因。
M: DL2 000 DNA marker; CS1/2/3: jackfruit genes.
图 2 AheCS1、AheCS2、AheCS3 基因的克隆
Fig. 2 Cloning of AheCS1, AheCS2, and AheCS3

2.3 波罗蜜 AheCS 基因的生物信息学分析

使用 ProtParam tool 在线预测软件对 AheCS1/2/3 蛋白理化性质分析发现，结果显示分别编码 608、473 和 513 个氨基酸，分子量为 151.18、52.89、56.42 kDa；在 AheCS1/2/3 蛋白的氨基酸组成中，酪氨酸（Try）含量最高，其次是甘氨酸（Glu），丝氨酸（Ser）含量最低；AheCS1/2/3 编码蛋白属于不稳定性的碱性蛋白，同时也是亲水性蛋白（表 3）。

利用 SoftBerry ProtComp 9.0 软件对波罗蜜 AheCS1/2/3 蛋白进行亚细胞定位预测发现，AheCS1 定位在细胞质的分数为 8.81；而 AheCS2 不仅在线粒体中定位得分高达 6.94，且在过氧化物酶体上有较高得分，分数为 5.91；AheCS3 蛋白在过氧化物酶体上有较高得分 9.41（共 10 分）。说明 AheCS1 蛋白可能定位于细胞质上，AheCS2 蛋白可能定位于线粒体、过氧化物酶体上；而 AheCS3 蛋白定位在过氧化物酶体（9.41）、细胞质内层（0.33）、高尔基体（0.14）、叶绿体（0.12）等部位，但分值差异较大，证明它可能在上述等部位均有分布（表 4）。

表 3 AheCS1/2/3 蛋白的理化性质
Table 3 Physiochemical properties of AheCS1, AheCS2, and AheCS3 proteins

基因名称 Gene name	氨基酸数 Number of amino acids	分子质量 Molecular weight/kD	等电点 pI	脂肪系数 Aliphatic index	不稳定系数 Instability index	亲水性 Grand average of hydropathicity	含量最多的 3 种氨基酸 Top 3 amino acids/%
AheCS1	608	151.18	4.96	25.29	45.73	0.698	Ala 25.3 Gly25.7 Thr27.5
AheCS2	473	52.89	7.20	26.37	40.34	0.652	Gly24.6 Ala26.4 Thr29.7
AheCS3	513	56.42	8.15	25.02	47.61	0.748	Ala25.0 Gly25.4 Thr26.3

表 4 AheCS1/2/3 蛋白的亚细胞定位预测
Table 4 Predicted subcellular localization of AheCS1, AheCS2, and AheCS3 proteins

定位 Location	AheCS1	AheCS2	AheCS3
细胞核 Nuclear	0.04	0.03	0.00
质膜 Plasma membrane	0.02	0.12	0.00
胞外 Extra-cellular	0.00	0.00	0.00
细胞质 Cytoplasmic	8.81	0.00	0.00
线粒体 Mitochondria	0.07	6.94	0.00
细胞质内层 Endoplasm retic	0.08	0.00	0.33
过氧化物酶体 Peroxisomal	0.00	5.91	9.41
高尔基体 Golgi	0.00	0.01	0.14
叶绿体 Chloroplast	0.66	0.00	0.12
液泡 Vacuolar	0.31	0.00	0.00

利用 DictyOGlyc 1.1 Server 对波罗蜜 AheCS1/2/3 蛋白进行糖基化位点预测发现, AheCS1 蛋白有 1 个丝氨酸 (Ser) 的糖基化位点, 而 AheCS1/2/3 蛋白无糖基化位点。磷酸化位点预测显示: 其中 AheCS1 包括 59 个丝氨酸 (Ser)、55 个苏氨酸 (Thr) 和 24 个酪氨酸 (Tyr) 3 种磷酸化位点; 而 AheCS2 蛋白磷酸化位点仅有 36 个; AheCS3 蛋白含有 48 个磷酸化位点 (表 5), 其中, 被磷酸化丝氨酸的位点数目在

AheCS1/2/3 中均为最多, 而酪氨酸被磷酸化的位点均最少。

使用 PHD 在线软件对 AheCS 1/2/3 蛋白进行预测发现, 发现该蛋白均由 α -螺旋、延长线和 β -转角、无规则卷曲结构组成, 其中 AheCS 1/2/3 的主要组分均为 α -螺旋, 占比分别为 40.95%、53.70%、47.85% (表 5)。同时无规则卷曲和延长线结构也占比较大, 这一点在其三维结构上得到了印证 (图 3)。

将 AheCS1/2/3 基因氨基酸序列在 NCBI 中进行序列比对, 发现 AheCS1 氨基酸序列与柑橘 (MH_048698.1)、甘草 (EF_571302.1) 相似性较高, 分别为 86.49%、85.95%。AheCS2 与川桑 (XP010087965.1) 相似度最高, 为 97.00%; 与麻风树 (XP012092602.1) 相似度为 91.00%。AheCS3 氨基酸序列与红掌 (JAT55223.1)、梅 (NP001313434.1) 相似度最高, 均为 86.00%; 与葫芦 (D38132.1) 的氨基酸序列相似性度为 84.19%。

通过使用 NCBI 保守结构域数据库进行分析, 发现 AheCS1/2/3 所编码的蛋白“CS__ACL-C__CCL superfamily”是柠檬酸合酶超家族。对 AheCS1/2/3 蛋白进行多重序列比对 (图 4) 发现共同存在 PWPN-box, 且含有一个柠檬酸合酶结构域 WPNVDAHS, 该结构域是所有柠檬酸合酶都有的一段保守序列; 以及

表 5 AheCS1/2/3 蛋白磷酸化和糖基化位点及二级结构组分
Table 5 Phosphorylation and glycosylation sites and secondary structure components of AheCS1, AheCS2, and AheCS3 proteins

基因名称 Gene name	糖基化位点数 Number of glycosy/个	磷酸化位点数 number of phosphorylation sites/个			二级结构组分 secondary structure component/%			
		丝氨酸 Ser	苏氨酸 Thr	酪氨酸 Tyr	α -螺旋 α -helix	延长链 Extend chain	β -转角 β -turn	无规则卷曲 Random coil
AheCS1	1	59	55	24	40.95	16.78	9.54	32.73
AheCS2	0	17	10	9	53.70	8.88	7.82	29.60
AheCS3	0	28	9	11	47.85	9.96	5.08	37.11

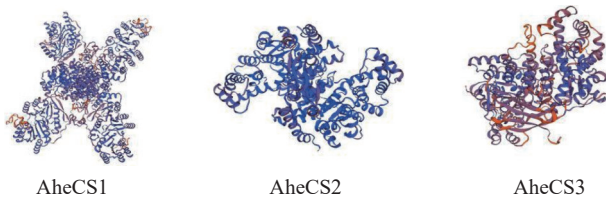


图3 AheCS1/2/3 编码蛋白的三级结构预测

Fig.3 Predicted tertiary structure of protein encoded by AheCS1, AheCS2, and AheCS3

一个柠檬酸合酶家族的标签基序“GFGHGVLRNTDP”，但 AheCS1/2/3 蛋白保守基序中存在个别氨基酸发生了变异，如在基序 GFGHGVLRNTDP 中 AheCS1 的‘F、V、L’变成‘I、I、Y’，AheCS2 中‘L、N’变成‘K、K’，AheCS3 中的‘L’变成‘Y’。

使用 MEME 在线软件对 AheCS1/2/3 蛋白的保守基序进行预测（图5）。发现不同物种 CS 基因 motif 数量和分布有一定差异，每个基因均含有 3~10 个 motif。AheCS1/2/3 蛋白 N 端高度保守，所有 CS 蛋白 N 端都含有 motif 13，C 端则保守性较差，不同亚族蛋白含有不同数量、不同类型的 motif，但同时存在 motif 1。图5可知，AheCS1、AheCS2、AheCS3 保守基序类别相似，进一步说明系统进化分析具有准确性，但是 3 个基因分别与其他物种的保守基序高度相似，证明不同的 3 个基因可能不同的亚族行使不同的功能。

为了解波罗蜜 CS 基因的进化关系，将 3 个波罗蜜 CS 蛋白与其他物种 CS 蛋白在 MEGA11.0 上使用 Neighbor-Joining 进行构建系统发育树，在进化关系图（图6）中可以发现，根据亲缘关系可将这些 CS 蛋白分为 6 个亚族。其中，AheCS1 与柑橘、甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）、拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]、马铃薯（*Solanum tuberosum* L.）聚为一簇；AheCS2 与柑橘、泡核桃（*Juglans sigillata* Dode.）、桃（*Prunus persica*.）、山杏 [*Armeniaca sibirica* (L.) Lam.]、沙梨 [*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai.]、山荆子 [*Malus baccata* (L.) Borkh.]、豆梨（*Pyrus calleryana* Decne.）、马铃薯、甜椒（*Capsicum frutescens* L.）、中粒咖啡（*Coffea canephora* Pierre ex Froehn.）及牡丹（*Paeonia × suffruticosa* Andr.）聚为一簇；AheCS3 与拟南芥 4 个基因、马铃薯、番茄（*Solanum lycopersicum* L.）聚为第一簇。基因在同一簇内，物种之间的差异性较小；随着分支不断扩大，各物种间的亲缘关系值逐渐减小，推测这些基因在发育过程中可能丢失了部分结构，表明波罗蜜 CS 基因在进化过程中可能遵循不同的进化方式。

2.4 AheCS1、AheCS2 和 AheCS3 的表达分析

如图7所示，波罗蜜果实后熟过程（CK）中，AheCS1 的表达量在采后前 2 d 略有上升后开始下降，但在第 8 天突然上升达到最大，显著高于外源

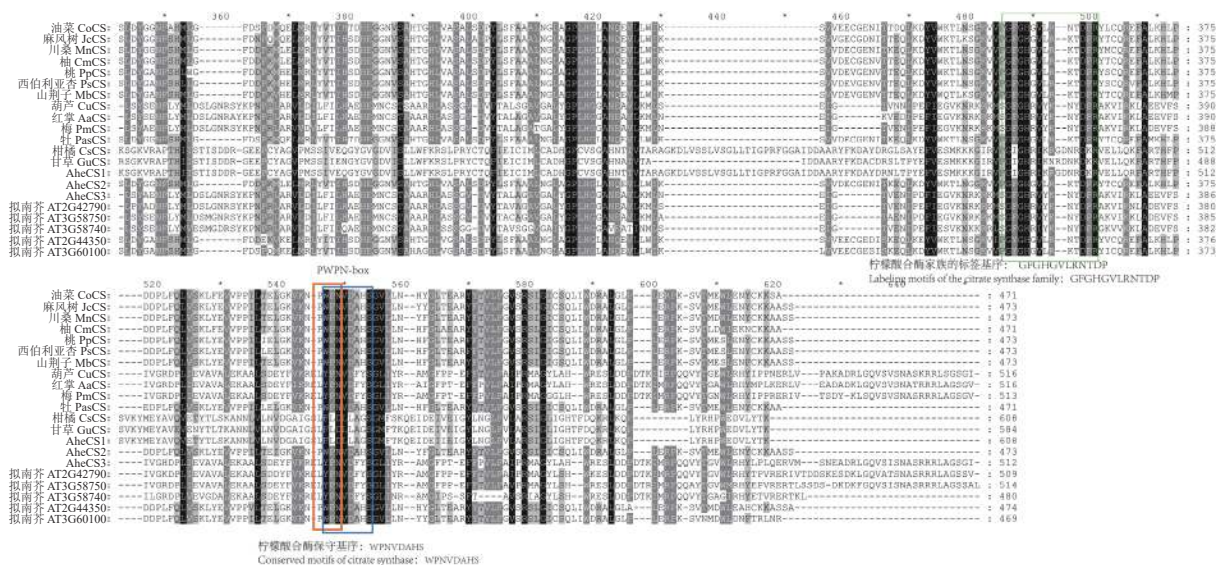


图4 AheCS1/2/3 蛋白的多重序列比对

Fig.4 Alignment of amino acid sequences of AheCS1, AheCS2, and AheCS3 proteins

Co: 油菜; Jc: 麻风树; Mn: 川桑; Cm: 柚; Pp: 桃; Ps: 西伯利亚杏; Mb: 山荆子; Cu: 葫芦; Aa: 红掌; Pm: 梅; Pas: 牡丹; Ahe: 波罗蜜; Cs: 柑橘; Gu: 甘草; AT: 拟南芥。

Co: *Camellia oleifera* Abel.; Jc: *Jatropha curcas* L.; Mn: *Morus notabilis* C. K. Schneid.; Cm: *Citrus maxima* (Burm) Merr.; Pp: *Prunus persica*; Ps: *Prunus sibirica* L.; Mb: *Malus baccata* (L.) Borkh.; Cu: *Cucurbita* cv.; Aa: *Anthurium andraeanum*; Pm: *Armeniaca mume* Sieb.; Pas: *Paeonia × suffruticosa* Andr.; Ahe: *Artocarpus heterophyllus* Lam.; Cs: *Citrus reticulata* Blanco.; Gu: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; AT: *Arabidopsis thaliana*.

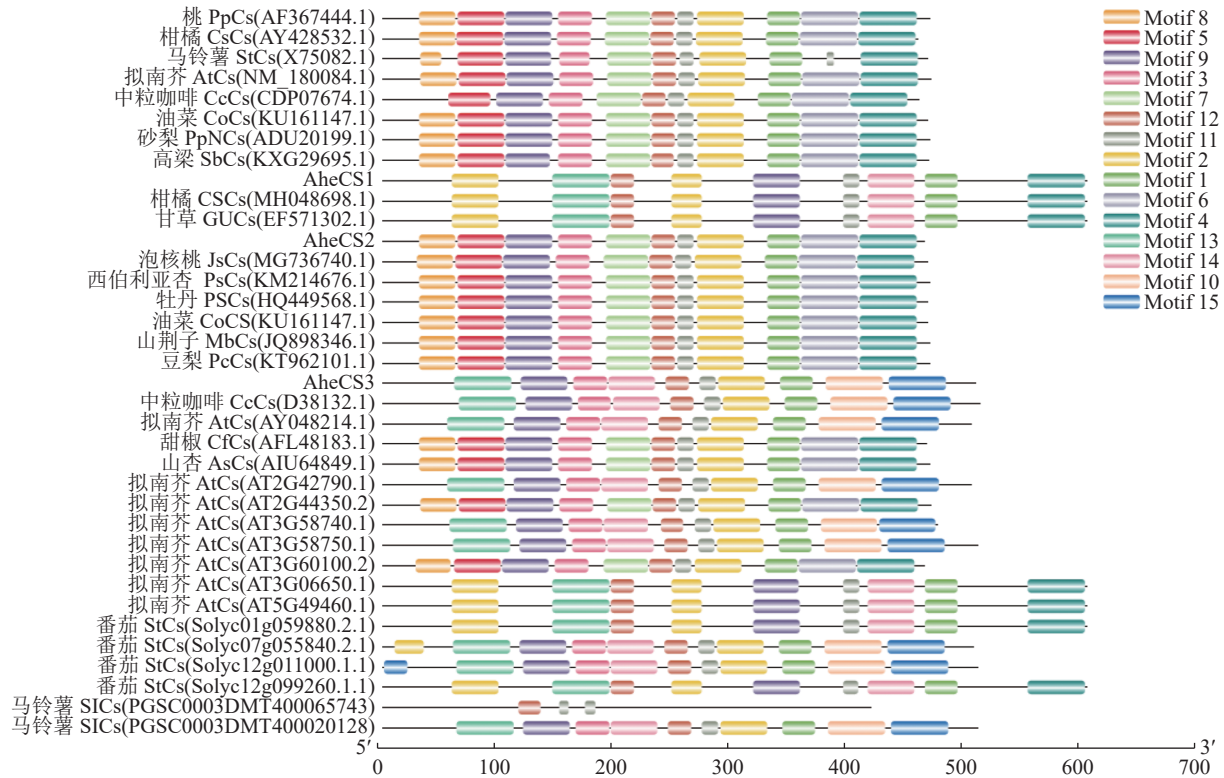
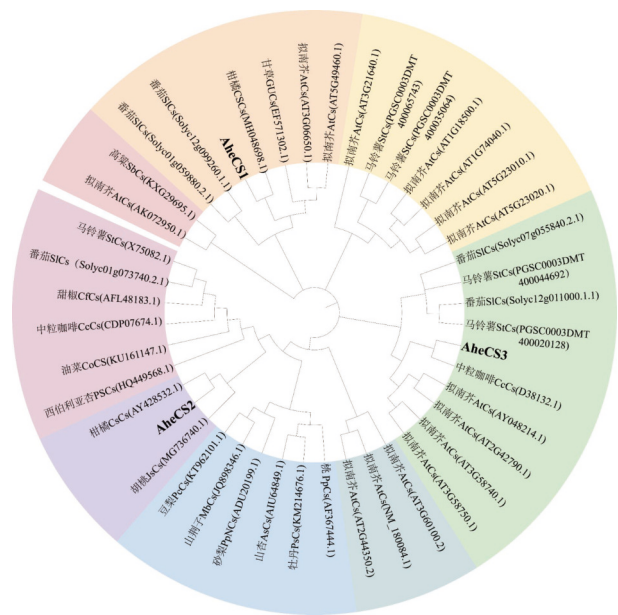


图 5 AheCS1/2/3 蛋白保守基序分析

Fig. 5 Conserved motifs of AheCS1, AheCS2, and AheCS3 proteins



St: 马铃薯; Cf: 甜椒; Cc: 中粒咖啡; Co: 油菜; As: 山杏; Ps: 牡丹; Js: 泡核桃; Pp: 桃; PpN: 砂梨; Mb: 山荆子; Pc: 豆梨; AT: 拟南芥; Os: 水稻; Sb: 高粱; Ahe: 波罗蜜; SL: 番茄。

St: *Solanum tuberosum* L.; Cf: *Capsicum frutescens* L.; Cc: *Coffea canephora* Pierre ex Froehn.; Co: *Camellia oleifera*; As: *Armeniaca sibirica* (L.) Lam.; Ps: *Paeonia × suffruticosa* Andr.; Js: *Juglans sigillata* Dode.; Pp: *Prunus persica*; PpN: *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai.; Mb: *Malus baccata* (L.) Borkh.; Pc: *Pyrus calleryana* Decne.; AT: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; Os: *Oryza sativa* L.; Sb: *Sorghum 'Bicolor'* (L.) Moench.; Ahe: *Artocarpus heterophyllus* Lam. SL: *Solanum lycopersicum* L.

图 6 不同物种 CS 基因的系统发育树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of CSs in various species

ETH 和 1-MCP 处理 ($P < 0.05$), 其相对表达量分别提高了 15.39% 和 7.01%, 随后开始下降, 表明果实成熟诱导了 *AheCS1* 基因的表达。外源 ETH 处理后 *AheCS1* 基因的相对表达量开始增加, 于第 4 天达到峰值, 显著高于 CK ($P < 0.05$), 随后开始下降, 说明外源 ETH 处理诱导了 *AheCS1* 基因的表达。1-MCP 处理在贮藏前 8 d 抑制了 *AheCS1* 基因的相对表达, 随后 *AheCS1* 基因的表达开始上升, 于第 16 天达到最大峰值后迅速下降。

对照 (CK) 果中的 *AheCS2* 基因的相对表达量在贮藏前 8 d 变化不显著, 在第 10 天骤然上升, 达到最大。外源 ETH 处理后提高了 *AheCS2* 基因的表达, 并于第 6 天达到峰值, 显著高于对照和 1-MCP 处理 ($P < 0.05$), 随后开始下降。1-MCP 处理在贮藏前 8 天, *AheCS2* 基因的表达变化不大, 之后开始上升, 于第 16 天达到最大后开始下降。可见, 外源 ETH 处理提前了 *AheCS2* 基因的表达高峰, 而 1-MCP 处理推迟了 *AheCS2* 基因的表达高峰。

对照处理中 *AheCS3* 基因的表达在波罗蜜果实采后前 4 d 变化不显著, 第 6 天迅速增加达到最大, 随后缓慢下降。外源 ETH 处理提高了采后前 4 d 的 *AheCS3* 基因的表达量, 也于第 6 天达到最大后开始下降, 基因的表达量较对照提高 1.45%, 较 1-MCP 提高了 4.45%。1-MCP 处理抑制了贮藏前 4 d *AheCS3*

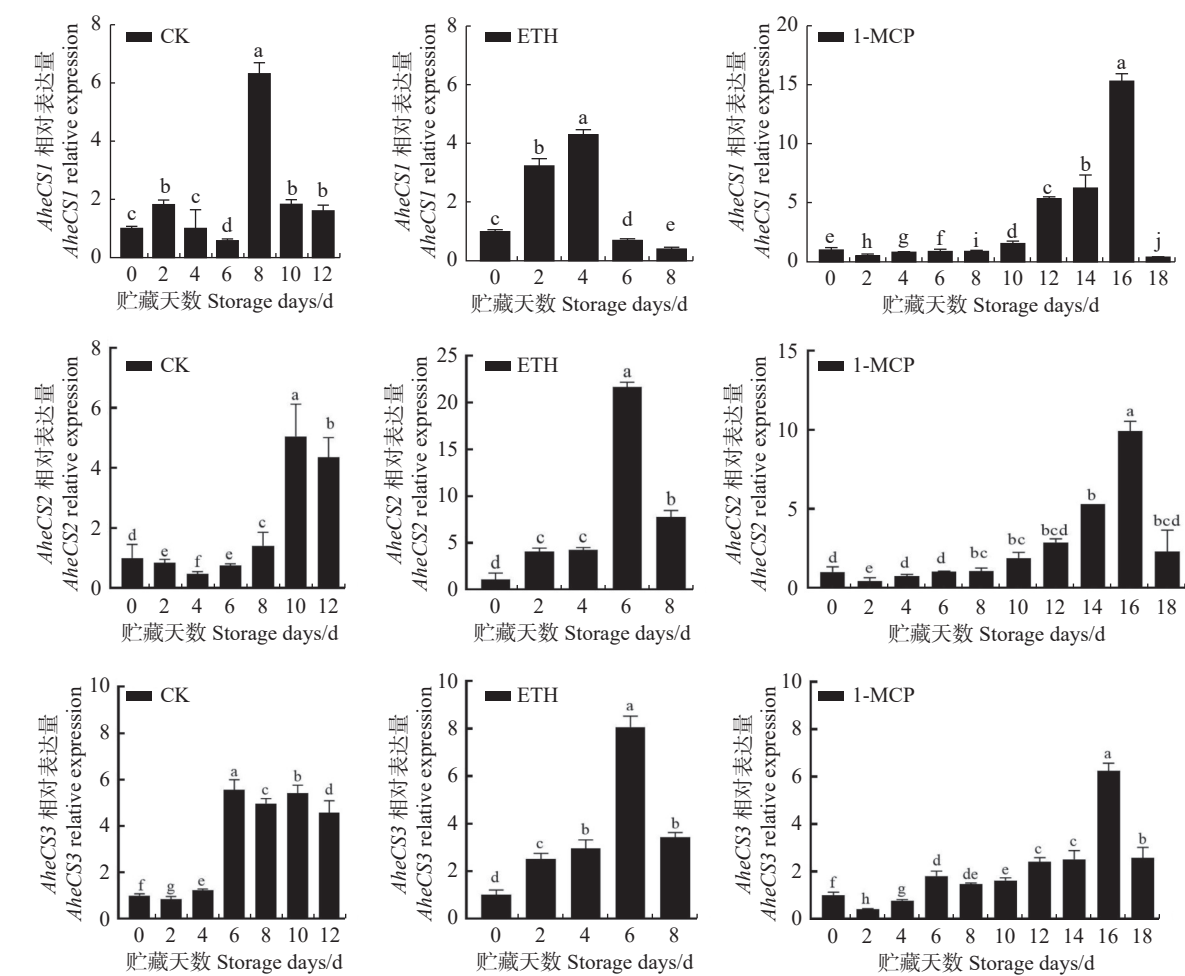


图7 成熟过程中 *AheCS1*、*AheCS2* 和 *AheCS3* 基因的表达分析

Fig. 7 Relative expressions of *AheCS1*, *AheCS2*, and *AheCS3*

基因的表达，随后其表达量开始上升，于第16天达到最大后开始下降。

2.5 柠檬酸与 *AheCS1/2/3* 基因表达的相关性分析

对自然成熟过程（CK）中波罗蜜果实中的柠檬酸含量与 *AheCS1/2/3* 基因的相对表达水平进行相关性分析发现，柠檬酸含量与 *AheCS1/2/3* 基因的相对表达量均呈正相关，其中与 *AheCS2* 基因的相关性达到显著水平，相关系数为 0.887（表6）。

表6 柠檬酸含量与 *AheCS1/2/3* 基因表达的相关性分析
Table 6 Correlation between organic acids and *AheCS1*, *AheCS2*, and *AheCS3*

指标 Index	柠檬酸 Citrate acid	<i>AheCS1</i>	<i>AheCS2</i>	<i>AheCS3</i>
柠檬酸	1			
<i>AheCS1</i>	0.450	1		
<i>AheCS2</i>	0.887*	0.088	1	
<i>AheCS3</i>	0.766	0.339	0.521	1

* 在 0.05 级别（双尾），相关性显著。
* indicates significant correlation at 0.05 level (two-tailed).

3 讨论与结论

柠檬酸是有机酸的重要组成部分，在果实品质形成上具有重要意义^[23]。一般有机酸在果实成熟过程中进行合成，同时在此过程中作为呼吸基质被消耗^[24]。不同品种沙梨的柠檬酸含量在成熟过程中均呈现出先上升后下降的趋势，但上升下降的速率不同，品种间差异较大^[25]。在葡萄（*Vitis vinifera* L.）的生长发育和脐橙（*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tanaka）的成熟过程中，柠檬酸含量均呈现下降趋势^[26,27]。柠檬酸是巴厘和卡因菠萝 [*Ananas comosus* (L.) Merr.] 果实的主要有机酸，在果实发育初期其含量迅速增加，到青熟期含量达到最高，进入完全成熟期柠檬酸开始降解，其含量急剧下降^[28]。在脐橙果实成熟过程中，柠檬酸合酶与有机酸含量均呈现前期升高后期降低的变化趋势^[29]。外源 ETH 和 1-MCP 是果实采后常用的催熟剂和保鲜剂，可以很好地促进或延缓果实成熟，调剂果实上市时间。在柠檬 [*Citrus × limon* (Linnaeus) Osbeck] 和猕猴桃（*Actinidia chinensis* Planch.）^[31] 果实上，柠檬酸含量

呈现先升后降的变化趋势,外源 ETH 处理并未加速柠檬酸合成速率。郭香凤等^[32]发现 1-MCP 处理对凯特杏 (*Prunus armeniaca* L.) 贮藏后期的柠檬酸含量的下降有显著抑制作用,并延缓了柠檬酸含量高峰的出现。在樱桃番茄 (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* A.Gray)^[33]果实中,1-MCP 处理延缓了后期柠檬酸含量的下降。本研究发现,在波罗蜜果实成熟过程中,柠檬酸含量呈先升后降的变化趋势,这与菠萝^[28]和脐橙^[29]上的研究一致。ETH 处理加速了波罗蜜柠檬酸的合成速率,提前了峰值出现时间,这与柠檬^[30]和猕猴桃^[31]上的研究结果不同。1-MCP 处理在贮藏前期出现柠檬酸含量小峰,但整体延缓了柠檬酸的变化趋势,这与樱桃番茄^[33]上的研究结果类似。

CS 基因是有机酸代谢的关键基因之一。CS 蛋白一般都含有一个典型的保守结构域‘WPNVDAHS’和一个柠檬酸合酶家族的标签基序‘GHGVLR’^[34],但在不同物种上,有些物种只含 CS 蛋白的保守结构域,存在缺失标签基序的现象^[14-16,34]。如在油茶上只含有‘GHGVLR’结构域,但在小金海棠 (*Malus xiaojinensis* M. H. Cheng & N. G. Jiang) 上同时存在结构域和标签基序^[34]。本研究获得的 AheCS1/2/3 蛋白具有 CS 基因家族的保守结构域和标签基序,且与柑橘、川桑 (*Morus notabilis* Schneid.)、柚子等上的 CS 基因编码的蛋白序列的相似性极高^[14-16,34]。亚细胞定位预测发现,它们所表达的蛋白定位在细胞质、线粒体、过氧化物酶上,说明克隆得到的 AheCS1/2/3 基因是波罗蜜 CS 家族的成员。波罗蜜的 3 个 AheCS 蛋白分别和不同物种存在相同的保守基序,但是它们彼此之间相同的保守基序很少,这暗示它们可能行使不同的功能。

在果实成熟期间,柠檬酸合酶的表达与有机酸的积累密切相关^[29]。馆溪蜜柚 [*Citrus grandis* (L.) osbeck. cv. guanxi Miyou] 果实贮藏过程中,可滴定酸含量下降与柠檬酸合成减少与柠檬酸合酶活性下降有关^[35]。在酸枣 [*Ziziphus jujuba* var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F.Chow.]^[36]和椪柑 (*Citrus reticulata* ‘Ponkan’)^[37]中,ZjCS3 和 CitCS 的高表达促进了果实柠檬酸的积累。在脐橙^[38,29]、甜橙^[15]、菠萝^[28]、中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus* Lindl.)^[39]和梅 (*Prunus mume* Siebold & Zucc.)^[40]上的研究发现,柠檬酸含量与 CS 基因的表达量均具有显著的正相关。上述研究表明,CS 基因是调控柠檬酸含量的关键基因。本研究也得到类似的结果,即随着波罗蜜果实的成熟,CS 基因的相对表达量在呈先上升后下

降的趋势,这与蜀脆枣 (*Ziziphus jujuba* cv. ‘Shucuihao’)^[41]的研究结果类似;此外还发现,柠檬酸的含量与 AheCS1/2/3 基因的相对表达水平呈正相关,其中与 AheCS2 的相关性达到显著水平,这与甜橙^[15]、菠萝^[28]、中国樱桃^[39]等研究结果一致,说明 AheCS1/2/3 参与波罗蜜成熟过程中柠檬酸的合成,其中 AheCS2 可能是波罗蜜果实柠檬酸循环途径上的关键基因。

Liu^[42]等发现,在香蕉 (*Musa nana* Lour.) 上, MaGCS 的表达可能与乙烯代谢密切相关,可由乙烯诱导,并被 1-MCP 抑制。本研究发现,外源 ETH 诱导 AheCS1 提前表达;改变 AheCS2 基因的表达模式,极显著增加 AheCS2 基因的表达量;也增加 AheCS3 的表达量。1-MCP 处理延缓 AheCS1/2/3 基因的表达,但提高波罗蜜果实贮藏后期的基因表达。可见,外源 ETH 处理诱导并增加波罗蜜果实中 AheCS2/3 基因的表达;而 1-MCP 处理则延缓它们的表达,起抑制作用。

本试验研究了波罗蜜果实中有机酸积累过程的特点,从波罗蜜果实中分离到 3 个 CS 基因,发现波罗蜜 AheCS1/2/3 基因各个成员间在不同处理下的表达量差异较大,而且对柠檬酸积累响应程度不同但都受到乙烯的调控。在 3 个基因中, AheCS2 的表达量与果实柠檬酸积累的相关性较强。但是 AheCS1/2/3 基因参与调控波罗蜜酸积累过程的机制尚不清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] LI J X, ZHANG C L, LIU H, et al. Profiles of sugar and organic acid of fruit juices: A comparative study and implication for authentication [J]. *Journal of Food Quality*, 2020, 2020: 7236534.
- [2] 马晓倩. 柠檬酸含量对冰糖橙果实贮藏性能的影响及其代谢相关基因分析 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
MA X Q. Effect of citric acid content on storage performance of ‘Bingtang’ Sweet Orange and expression analysis of genes in citrate metabolism [D]. ChangSha: Hunan Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [3] SADKA A, DAHAN E, COHEN L, et al. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit [J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 108(3): 255–262.
- [4] BLANKE M M, LENZ F. Fruit photosynthesis[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1989, 12(1): 31–46.
- [5] KOYAMA H, TAKITA E, KAWAMURA A, et al. Over expression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1999, 40(5): 482–488.
- [6] PRACHAROENWATTANA I, CORNAH J E, SMITH S M. *Arabidopsis* peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid

- respiration and seed germination [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(7): 2037–2048.
- [7] OHLROGGE J, POLLARD M, BAO X, et al. Fatty acid synthesis: From CO₂ to functional genomics [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28(6): 567–573.
- [8] SCHNARRENBURGER C, MARTIN W. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(3): 868–883.
- [9] ZHAO H N, CHEN G J, SANG L N, et al. Mitochondrial citrate synthase plays important roles in anthocyanin synthesis in petunia [J]. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 2021, 305: 110835.
- [10] TOVAR-MÉNDEZ A, MIERNYK J A, RANDALL D D. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(6): 1043–1049.
- [11] SADKA A, DAHAN E, OR E, et al. Comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure, transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing *Citrus* varieties [J]. *Functional Plant Biology*, 2001, 28(5): 383.
- [12] CANEL C, BAILEY-SERRES J N, ROOSE M L. Molecular characterization of the mitochondrial citrate synthase gene of an acidless pummelo (*Citrus maxima*) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 31(1): 143–147.
- [13] IANNETTA P P M, ESCOBAR N M, ROSS H A, et al. Identification, cloning and expression analysis of strawberry (*Fragaria × ananassa*) mitochondrial citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase [J]. *Physiologia Plantarum*, 2004, 121(1): 15–26.
- [14] 叶思诚, 姚小华, 王开良, 等. 油茶柠檬酸合成酶 (CS) 基因的克隆和表达分析 [J]. *植物研究*, 2016, 36 (4): 556–564.
- YE S C, YAO X H, WANG K L, et al. Cloning and expression analysis of citrate synthase(CS)gene in *Camellia oleifera* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2016, 36(4): 556–564. (in Chinese)
- [15] 王滕旭, 李正国, 杨迎伍, 等. 甜橙柠檬酸合酶基因的克隆及其表达分析 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26 (10): 65–69.
- WANG T X, LI Z G, YANG Y W, et al. Cloning and expression analysis of citrate synthase gene in orange [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(10): 65–69. (in Chinese)
- [16] 赵宝庆, 任伟超, 王震, 等. 酸橙柠檬酸合酶基因电子克隆和生物信息学分析 [J]. *东北林业大学学报*, 2019, 47 (12): 79–83.
- ZHAO B Q, REN W C, WANG Z, et al. In silico cloning and bioinformatics analysis of citrate synthase gene from *Citrus aurantium* [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2019, 47(12): 79–83. (in Chinese)
- [17] 童晋, 詹高森, 王新发, 等. 油菜柠檬酸合酶基因的克隆及在逆境下的表达 [J]. *作物学报*, 2009, 35 (1): 33–40.
- TONG J, ZHAN G M, WANG X F, et al. Cloning of citrate synthase gene in rapeseed (*Brassica napus* L.) and its expression under stresses [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(1): 33–40. (in Chinese)
- [18] 王俊宁, 刘建文, 李凤娣, 等. 菠萝蜜果实采后糖、酸、蛋白质和 V_C 含量的变化 [J]. *西南师范大学学报 (自然科学版)*, 2015, 40 (3): 80–85.
- WANG J N, LIU J W, LI F D, et al. On changes in starch, sugar, acids, VC and proteins contents of jackfruit during ripening process [J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 40(3): 80–85. (in Chinese)
- [19] 夏春华, 杨转英, 叶春海, 等. 不同株系菠萝蜜果肉中可溶性糖和有机酸的分析 [J]. *果树学报*, 2014, 31 (4): 648–652.
- XIA C H, YANG Z Y, YE C H, et al. Analysis of contents and compositions of soluble sugars and organic acids in different jackfruit(*Artocarpus heterophyllus*) lines [J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(4): 648–652. (in Chinese)
- [20] 王俊宁, 吕庆芳, 丰锋, 等. 湿包类型菠萝蜜采后呼吸跃变和主要成分的变化 [J]. *园艺学报*, 2014, 41 (2): 329–334.
- WANG J N, LYU Q F, FENG F, et al. Changes in respiration, ethylene and biochemical values of soft jackfruits during the ripening period [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(2): 329–334. (in Chinese)
- [21] 王俊宁, 陈文耀, 丰锋, 等. 乙烯利处理对菠萝蜜果实催熟的影响 [J]. *广东农业科学*, 2014, 41 (3): 94–98.
- WANG J N, CHEN W Y, FENG F, et al. Effect of ethephon treatment on physiological index of jackfruit after harvest [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(3): 94–98. (in Chinese)
- [22] 王俊宁, 陈俊鹏, 弓德强, 等. 1-MCP 处理对菠萝蜜采后生理效应的影响 [J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36 (1): 56–61, 96.
- WANG J N, CHEN J P, GONG D Q, et al. Effects of 1-MCP treatment on post-harvest physiology of jackfruit(*Artocarpus heterophyllus* lam.) [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(1): 56–61, 96. (in Chinese)
- [23] GAO Y Y, YAO Y L, CHEN X, et al. Metabolomic and transcriptomic analyses reveal the mechanism of sweet-acidic taste formation during pineapple fruit development [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 971506.
- [24] ZHANG X X, WEI X X, ALI M M, et al. Changes in the content of organic acids and expression analysis of citric acid accumulation-related genes during fruit development of yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and purple (*Passiflora edulis* f. *edulis*) passion fruits [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5765.
- [25] 李雪梅. 砂梨果实有机酸含量及代谢相关酶活性动态变化研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- LI X M. Studies on dynamic changes of organic acid contents and metabolizing enzyme activities in sand pear fruit [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [26] 朱磊, 陈芸华, 胡禧熙, 等. 葡萄有机酸的研究进展 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2022, (6): 88–95.
- ZHU L, CHEN Y H, HU X X, et al. Research progress of organic acids in grape [J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 2022(6): 88–95. (in Chinese)
- [27] 杨滢滢. ‘纽荷尔’脐橙果实柠檬酸合成与降解机理的研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2017.
- YANG Y Y. Research on synthesis and degradation of citric acid in ‘Newhall’ navel orange fruit [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural

- University, 2017. (in Chinese)
- [28] 张秀梅, 杜丽清, 孙光明, 等. 菠萝果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化 [J]. *果树学报*, 2007, 24 (3): 381–384.
- ZHANG X M, DU L Q, SUN G M, et al. Changes in organic acid concentrations and the relative enzyme activities during the development of Cayenne pineapple fruit [J]. *Journal of Fruit Science*, 2007, 24(3): 381–384. (in Chinese)
- [29] 文涛, 熊庆娥, 曾伟光, 等. 脐橙果实发育中有有机酸合成代谢酶活性变化的研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2001, 19 (1): 27–30.
- WEN T, XIONG Q E, ZENG W G, et al. Study on the change of organic acid synthetase activity during fruit development of navel orange (*Citrus sinensis* osbeck) [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2001, 19(1): 27–30. (in Chinese)
- [30] 张沛宇. 采后乙烯利脱绿对柠檬果实色泽、风味及抗氧化能力的影响研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- ZHANG P Y. Effects of postharvest ethephon degreening on the color, flavor quality and antioxidant capacity of lemon (*Citrus limon* (L.) burm. f.) fruit [D]. Chongqing: Southwest University, 2019. (in Chinese)
- [31] LIM S, LEE J G, LEE E J. Comparison of fruit quality and GC-MS-based metabolite profiling of kiwifruit 'Jecy green': Natural and exogenous ethylene-induced ripening [J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 81–92.
- [32] 郭香凤, 向进乐, 史国安, 等. 1-MCP 对凯特杏果实采后糖酸组分与含量的影响 [J]. *保鲜与加工*, 2008, 8 (5): 30–33.
- GUO X F, XIANG J Y, SHI G A, et al. Effects of 1-methylcyclopropene on sugar and organic acid constituents in kate apricot [J]. *Storage and Process*, 2008, 8(5): 30–33. (in Chinese)
- [33] 弓德强, 李敏, 高兆银, 等. 1-甲基环丙烯处理对樱桃番茄果实低温贮藏品质的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48 (4): 116–122, 129.
- GONG D Q, LI M, GAO Z Y, et al. Effect of 1-methylcyclopropene treatment on quality of cherry tomatoes stored at low temperature [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(4): 116–122, 129. (in Chinese)
- [34] 石岩. 小金海棠柠檬酸合成酶基因 MxCS₂ 的克隆与功能分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- SHI Y. Cloning and functional analysis of *Malus xiaojinensis* citrate synthase gene MxCS₂ [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [35] 张小红. 琯溪蜜柚 (*Citrus grandis*(L.) osbeck. cv. guanxi Miyou) 果实采后酸代谢研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- ZHANG X H. Studies on the metabolism of organic acids in *Citrus guanxi-miyou* (*Citrus grandis* (L.) osbeck. cv. guanxi Miyou) fruit after harvest [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2005. (in Chinese)
- [36] 张春梅. 枣糖酸代谢及其驯化的分子机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- ZHANG C M. Molecular mechanism related to the metabolism of sugar, acid and domestication for *Ziziphus jujuba* mill [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016. (in Chinese)
- [37] ZHANG G F, XIE S X. Influence of water stress on the citric acid metabolism related gene expression in the ponkan fruits [J]. *Agricultural Sciences*, 2014, 5(14): 1513–1521.
- [38] 文涛, 熊庆娥, 曾伟光, 等. 脐橙果实发育过程中有机酸合成代谢酶活性的变化 [J]. *园艺学报*, 2001, 28 (2): 161–163.
- WEN T, XIONG Q E, ZENG W G, et al. Changes of organic acid synthetase activity during fruit development of navel orange (*Citrus sinensis* osbeck) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(2): 161–163. (in Chinese)
- [39] 李航. 两种中国樱桃果实糖酸积累和代谢相关酶及其基因表达的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- LI H. Study on sugar and acid accumulation, metabolism enzymes activities and gene expression of two Chinese cherry fruits [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [40] 翁金洋. 梅和杏果实糖酸变化规律及有机酸代谢差异研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- WENG J Y. Studies on the change regulation of sugar and acid and the metabolism of organic acids in *Prunus mume* and apricot fruits [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [41] 王羊, 邓倩, 邓群仙, 等. “蜀脆枣”果实发育过程中糖酸代谢相关基因表达分析 [J]. *西北农业学报*, 2022, 31 (7): 876–885.
- WANG Y, DENG Q, DENG Q X, et al. Analysis of sugar and organic acid metabolism-related genes expression during development of *Ziziphus jujuba* cv. “Shucuizao” fruits [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2022, 31(7): 876–885. (in Chinese)
- [42] LIU J H, CHI G H, JIA C H, et al. Function of a citrate synthase gene (MaGCS) during postharvest banana fruit ripening [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 84: 43–50.

(责任编辑: 黄爱萍)