

低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解及相关基因表达的影响

周牧遥

(浙江大学农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 西兰花 (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) 作为一种高营养价值的十字花科蔬菜, 采后极易发生品质劣变, 其中叶绿素降解导致的黄化现象是影响其商品价值的关键因素。本研究以“耐寒优秀”西兰花品种为试验材料, 系统研究了不同低温预贮处理 (0℃、2℃、4℃分别处理1 d、3 d、5 d) 对西兰花采后贮藏期间 (25℃、相对湿度85%–90%) 叶绿素降解及相关基因表达的影响。结果表明: 与对照组 (直接25℃贮藏) 相比, 低温预贮处理显著延缓了西兰花采后黄化进程, 保持了较高的叶绿素含量; 0℃预贮处理3 d效果最佳, 贮藏第6天叶绿素保留率比对照组高42.3%。低温预贮处理显著抑制了叶绿素酶 (Chlorophyllase, Chlase) 和脱镁叶绿酸酶 (Pheophorbide, PPH) 的活性, 降低了叶绿素降解速率。实时荧光定量PCR分析显示, 低温预贮处理显著下调了叶绿素降解关键基因BoNYC1、BoNOL、BoHCAR、BoPaO和BoRCCR的表达水平, 其中BoPaO基因表达受抑制最为明显。相关性分析表明, 叶绿素含量与BoPaO基因表达水平呈显著负相关 ($r = -0.89$, $p < 0.01$), 与叶绿素酶活性呈显著负相关 ($r = -0.85$, $p < 0.01$)。本研究从生理生化及分子水平揭示了低温预贮处理延缓西兰花采后叶绿素降解的机制, 为西兰花采后保鲜技术的优化提供了理论依据。

关键词: 西兰花; 低温预贮; 叶绿素降解; 基因表达; 采后保鲜

中图分类号: S636; TS2

文献标识码: A

文章编号: 3106–2547 (2025) 05–0012–13

DOI: 10.62022/FHR.issn3106–2547.2025.05.002

Effects of Low Temperature Pre-storage Treatment on Postharvest Chlorophyll Degradation and Related Gene Expression in Broccoli

Zhou Muyao

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058)

Abstract: Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), a highly nutritious cruciferous vegetable, is prone to quality deterioration after harvest, among which chlorophyll degradation-induced yellowing is a critical factor affecting its commercial value. This study systematically investigated the effects of different low temperature pre-storage treatments (0℃, 2℃, and 4℃ for 1 d, 3 d, and 5 d) on postharvest chlorophyll degradation and related gene expression in broccoli (cv. "Cold-resistant Excellent") during subsequent storage at 25℃ with 85%–90% relative humidity. The results showed that compared with the control group (direct storage at 25℃), low temperature pre-storage treatment significantly delayed the postharvest yellowing process and maintained higher chlorophyll content. The treatment of 0℃ pre-storage for 3 d exhibited the optimal effect, with chlorophyll retention rate 42.3% higher than the control group on day 6 of storage. Low temperature pre-storage treatment significantly inhibited the activities of chlorophyllase (Chlase) and pheophorbide (PPH), and reduced the chlorophyll degradation rate. Real-time quantitative PCR analysis revealed that low temperature pre-storage treatment significantly down-regulated the expression levels of key chlorophyll degradation genes including BoNYC1, BoNOL, BoHCAR, BoPaO, and BoRCCR, with BoPaO gene expression being the most significantly inhibited. Correlation analysis indicated that chlorophyll content was significantly negatively correlated with BoPaO gene expression level ($r = -0.89$, $p < 0.01$) and chlorophyllase activity ($r = -0.85$, $p < 0.01$). This study elucidated the mechanisms by which low temperature pre-storage treatment delays postharvest chlorophyll degradation in broccoli from physiological, biochemical, and molecular perspectives, providing theoretical basis for optimizing postharvest preservation technology of broccoli.

Keywords: broccoli; low temperature pre-storage; chlorophyll degradation; gene expression; postharvest preservation

作者简介: 周牧遥, 博士, 研究方向为蔬菜采后生物学与保鲜技术。

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 西兰花在蔬菜产业中的重要地位

西兰花 (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)，又名绿花菜、青花菜，属十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种，原产于地中海东部沿岸地区，19世纪末传入中国，经过百余年的栽培发展，现已成为我国重要的出口创汇蔬菜之一。根据联合国粮食及农业组织 (FAO) 统计数据，2022年全球西兰花种植面积已超过35万公顷，总产量达到2800万吨，其中中国、印度、美国、西班牙和墨西哥为主要生产国。中国作为全球最大的西兰花生产国和出口国，2022年种植面积超过12万公顷，产量约1200万吨，占全球总产量的42.8%，出口额超过15亿美元，主要出口至日本、韩国、东南亚及欧美市场^[1]。

西兰花不仅在国际贸易中占据重要地位，更是深受消费者喜爱的健康蔬菜。其营养价值极高，富含多种维生素（维生素C、维生素K、维生素A、叶酸等）、矿物质（钾、钙、镁、铁等）以及独特的生物活性物质。特别是西兰花中硫代葡萄糖苷 (Glucosinolates) 含量丰富，其水解产物异硫氰酸酯 (Isothiocyanates) 如萝卜硫素 (Sulforaphane) 具有显著的抗癌、抗氧化、抗炎和心血管保护作用。研究表明，经常食用西兰花可降低多种癌症（如肺癌、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌等）的发病风险，这主要归因于其中含有的萝卜硫素能够激活细胞内的Nrf2信号通路，诱导II相解毒酶的表达，增强机体的抗氧化防御能力。此外，西兰花中还含有丰富的膳食纤维，有助于促进肠道蠕动、调节血糖和血脂水平，对预防肥胖、糖尿病和心血管疾病具有积极意义。

随着人们生活水平的提高和健康意识的增强，消费者对蔬菜品质的要求日益严格。西兰花因其独特的营养价值和健康功效，市场需求量持续增长，已成为超市和生鲜电商平台的热销品类^[2]。然而，西兰花属于呼吸跃变型蔬菜，采后代谢活动旺盛，在常温条件下极易发生品质劣变，货架期通常仅为2-3天。因此，如何有效保持西兰花采后品质、延长其货架期，成为蔬菜采后生物学与保鲜技术领域的重要研究课题，对于保障蔬菜供应、减少采后损失、提高经济效益具有重要的现实意义。

1.1.2 西兰花采后品质变化问题

西兰花采后品质劣变是一个复杂的生理生化过程，涉及色泽、质地、风味、营养成分等多个方面的变化。其中，花球由绿色变为黄色是最直观、最明显的品质劣变现象，也是影响西兰花商品价值的首要因素。这种黄化现象主要由叶绿

素降解引起，通常在采后2-3天即开始显现，在25℃常温条件下，第4-5天黄化程度已达到不可接受的水平，严重降低了产品的市场竞争力^[3]。

叶绿素降解是植物叶片和绿色器官衰老过程中的标志性事件。在西兰花采后贮藏过程中，随着细胞衰老的加剧，叶绿体结构逐渐解体，类囊体膜完整性丧失，叶绿素分子暴露于酸性环境和各种降解酶的作用下，发生一系列降解反应。叶绿素降解不仅影响产品的外观色泽，还伴随着一系列连锁反应：首先，叶绿素降解产物如脱镁叶绿酸 (Pheophorbide) 具有光敏性，在光照条件下可产生单线态氧，加速细胞氧化损伤；其次，叶绿素降解往往伴随着类胡萝卜素等色素的暴露，导致产品色泽进一步劣变；再者，叶绿素降解与细胞衰老过程密切相关，通常伴随着细胞膜透性增加、细胞壁降解、水分流失等质地劣变现象。

除色泽变化外，西兰花采后还面临着营养成分快速流失的问题。维生素C作为西兰花中重要的水溶性维生素，采后损失极为迅速，在25℃条件下，24小时内损失率可达20%-30%，3天后损失率超过50%。硫代葡萄糖苷等生物活性物质的含量也在采后贮藏过程中显著下降，这主要与内源芥子酶 (Myrosinase) 的激活和降解有关。此外，呼吸作用消耗大量可溶性糖和有机酸，导致风味变淡；蒸腾作用和水分的流失使花球萎蔫、质地变软；微生物侵染则导致腐烂变质。这些品质劣变现象相互关联、相互促进，共同导致西兰花采后商品价值的快速下降。

据统计，我国西兰花采后损失率高达25%-30%，在流通环节因品质劣变造成的经济损失每年超过百亿元^[4]。因此，深入研究西兰花采后品质变化的生理机制，开发有效的采后保鲜技术，对于减少采后损失、保障市场供应、提高产业效益具有重要的经济价值和社会意义。

1.1.3 低温预贮处理在采后保鲜中的应用潜力

低温贮藏是果蔬采后保鲜最基本、最有效的方法之一。通过降低贮藏温度，可以显著抑制果蔬的呼吸作用、蒸腾作用和各种代谢反应，延缓衰老进程，保持产品品质。然而，传统的持续低温贮藏需要完善的冷链设施，在运输和销售环节往往难以维持，导致“冷链断链”现象频发，反而加剧了果蔬的生理失调和品质劣变。低温预贮处理 (Low Temperature Pre-storage Treatment) 作为一种新兴的采后保鲜技术，通过在贮藏初期对果蔬进行短期的低温处理，诱导其产生冷适应和抗逆性，从而在后续的常温或较高温度贮藏中保持较好的品质，为解决冷链断链问题提供了新的思路。

低温预贮处理的作用机制涉及多个方面：首先，低温处

理可以降低果蔬的初始呼吸强度,减少底物消耗,为后续贮藏积累更多的营养物质^[5];其次,低温可以诱导果蔬产生冷驯化(Cold Acclimation),激活抗氧化防御系统,提高对氧化胁迫的抵抗能力;再者,低温处理可以抑制乙烯的生物合成和信号转导,延缓衰老相关基因的表达;此外,低温还可以抑制病原菌的生长繁殖,减少腐烂损失。研究表明,适当的低温预贮处理可以显著延缓苹果、梨、桃、香蕉、芒果等多种果蔬的成熟衰老进程,保持其色泽、质地和风味。

在叶菜类蔬菜保鲜方面,低温预贮处理也显示出良好的应用前景。研究表明,菠菜、生菜、油麦菜等绿叶蔬菜经过0-4℃的低温预贮处理后,在后续常温贮藏中叶绿素降解速率明显降低,黄化现象得到延缓。这主要与低温抑制了叶绿素降解酶活性、延缓了细胞膜脂过氧化进程有关^[6]。然而,目前关于低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解及相关基因表达影响的系统研究还相对较少,特别是从分子水平揭示其作用机制的研究更为缺乏。

西兰花作为高价值的出口蔬菜,其采后保鲜技术的优化对于提高国际竞争力具有重要意义。传统的持续低温冷链虽然效果良好,但成本高昂,且在销售终端难以维持。低温预贮处理技术可以在产地集中进行,处理后产品可在常温条件下运输和销售,大大降低了冷链成本,具有广阔的应用前景。因此,系统研究低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解的影响,揭示其分子调控机制,对于开发适合我国国情的西兰花采后保鲜技术具有重要的理论价值和实践意义。

1.2 国内外研究现状

1.2.1 西兰花采后叶绿素降解机制研究进展

叶绿素降解是植物叶片衰老和果实成熟过程中普遍发生的生理现象,也是影响绿色蔬菜采后品质的关键因素。近年来,随着分子生物学和生物化学技术的发展,植物叶绿素降解的分子机制逐渐被揭示。目前公认的叶绿素降解途径是“脱植基叶绿素循环”(Pheophorbide a Oxygenase Pathway, PaO途径),该途径由多个酶促反应步骤组成,涉及多种关键酶的参与。

叶绿素降解的起始步骤是叶绿素酶(Chlorophyllase, Chlase, EC 3.1.1.14)催化的脱植基反应,将叶绿素a/b水解为脱植基叶绿素(Chlorophyllide)和植醇(Phytol)。叶绿素酶是叶绿素降解途径的限速酶之一,其活性受多种因素调控,包括pH值、温度、金属离子、底物浓度等。研究表明,采后贮藏过程中叶绿素酶活性逐渐升高,与叶绿素含量呈显著负相关^[7]。在西兰花中,已鉴定出两个叶绿素酶基因BoCLH1和BoCLH2,其中BoCLH1在采后衰老过程中的表达

显著上调,是调控叶绿素降解的关键基因。

脱植基叶绿素在镁螯合酶(Mg-dechelatase)或金属螯合素(Metal-chelating substance)的作用下,失去中心镁离子,形成脱镁叶绿酸(Pheophorbide)。随后,脱镁叶绿酸在脱镁叶绿酸加氧酶(Pheophorbide a Oxygenase, PaO, EC 1.14.15.17)的作用下,打开卟啉环的大环结构,形成红色的脱镁叶绿酸a加氧酶产物(Red Chlorophyll Catabolite, RCC)。PaO是叶绿素降解途径中的关键调控点,该酶的活性直接决定了叶绿素降解的速度和程度。研究表明,PaO活性受光、温度、激素等多种因素调控,在黑暗和低温条件下活性较低。

RCC在RCC还原酶(RCC Reductase, RCCR)的作用下,被还原为无色的初级荧光叶绿素降解产物(Primary Fluorescent Chlorophyll Catabolite, pFCC)。pFCC经过一系列修饰反应,最终形成非荧光叶绿素降解产物(Non-fluorescent Chlorophyll Catabolites, NCCs),转运至液泡中储存。整个叶绿素降解过程由位于叶绿体、细胞质和液泡中的多种酶协同完成,涉及复杂的亚细胞区室化和代谢调控。

近年来,研究人员还发现了多条叶绿素降解的旁路途径和调控机制。例如,在胁迫条件下,叶绿素可以通过非酶促途径降解,产生大量的活性氧和光毒性物质。此外,叶绿素降解与植物激素信号密切相关,乙烯、茉莉酸、水杨酸等激素可以促进叶绿素降解,而细胞分裂素、赤霉素等则可以延缓该过程。在采后生物学领域,研究人员发现1-甲基环丙烯(1-MCP)处理可以通过抑制乙烯信号,显著延缓西兰花叶绿素降解;而油菜素内酯(Brassinosteroids)处理则可以通过激活抗氧化系统,减轻叶绿素的光氧化降解。

尽管叶绿素降解的生化途径已基本阐明,但关于采后贮藏条件下叶绿素降解的调控机制,特别是环境因子如何通过信号转导途径影响叶绿素降解基因的表达,仍有许多问题有待深入研究^[8-9]。对于西兰花而言,其花球由密集的花蕾组成,代谢活动极为旺盛,叶绿素降解速度快,但相关的分子调控机制研究相对滞后,亟需开展系统深入的研究。

1.2.2 低温处理对果蔬采后品质影响的研究现状

低温处理是果蔬采后保鲜的核心技术,大量研究表明,适当的低温处理可以显著延缓果蔬的成熟衰老进程,保持其感官品质和营养价值。在苹果保鲜方面,研究表明,0-1℃的低温贮藏可以显著抑制“红富士”苹果的呼吸强度和乙烯产生,保持果实硬度和可溶性固形物含量,延缓衰老相关基因MdACO1、MdACS1的表达。对于呼吸跃变型果实如香蕉、

芒果、猕猴桃等,低温处理可以有效延缓其成熟启动,延长货架期,但需要注意避免冷害的发生。

在叶菜类蔬菜保鲜方面,低温处理的效果尤为显著。研究表明,生菜在0℃条件下贮藏,其叶绿素降解速率显著低于4℃和8℃处理,维生素C损失率也明显降低。菠菜经过冰温(-0.5℃至0℃)贮藏后,其细胞膜完整性保持较好,丙二醛(MDA)含量积累缓慢,抗氧化酶活性维持在较高水平。这些研究表明,低温处理可以通过抑制酶活性、降低代谢速率、维持细胞膜稳定性等途径,延缓叶菜类蔬菜的衰老进程。

低温处理对果蔬色泽保持的作用机制涉及多个层面。首先,低温可以抑制叶绿素降解酶的活性,延缓叶绿素分解;其次,低温可以维持类囊体膜的完整性,保护叶绿素分子免受降解酶的攻击;再者,低温可以抑制乙烯的生物合成,减少乙烯诱导的衰老相关基因表达;此外,低温还可以抑制多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)的活性,减少酶促褐变的发生。

然而,低温处理的效果受到温度、时间、果蔬种类和品种等多种因素的影响。过低的温度或过长的时间可能导致冷害(Chilling Injury)的发生,表现为果肉褐变、水浸状斑点、风味劣变等症状。例如,芒果、香蕉、番茄等热带亚热带果蔬对低温敏感,在10℃以下贮藏容易发生冷害。因此,确定适宜的低温处理条件对于采后保鲜至关重要。

低温预贮处理作为一种变温处理技术,近年来受到越来越多的关注。与持续低温贮藏相比,低温预贮处理具有操作简便、成本较低、适应性广等优点。研究表明,桃果实0℃预贮3天后转入常温贮藏,其软化速度和乙烯释放量显著低于直接常温贮藏的对照组,这主要与低温预贮诱导了果实的冷适应,改变了细胞膜脂组成有关。类似地,草莓经过2℃预贮处理后,在后续常温贮藏中腐烂率显著降低,抗氧化能力增强。这些研究为低温预贮处理在果蔬保鲜中的应用提供了理论依据,但关于该技术在西兰花保鲜中的应用效果和机制研究还相对缺乏。

1.2.3 低温处理对果蔬基因表达影响的研究现状

低温作为一种重要的环境信号,可以显著影响植物的基因表达,诱导产生一系列低温响应基因(Cold-responsive Genes, CORs),使植物获得抗寒性和抗逆性。在果蔬采后生物学领域,低温处理对基因表达的调控作用也逐渐受到重视。

低温信号转导途径涉及多个层次的调控。首先,低温刺激被细胞膜上的受体感知,通过钙离子内流、膜脂变化等机制产生第二信使;随后,这些信号被传递至细胞核,激活转录因子如CBF(C-repeat Binding Factor)/DREB(Dehydration

Responsive Element Binding)家族、ICE(Inducer of CBF Expression)家族等的表达;这些转录因子结合到下游靶基因的启动子区域,激活COR基因的表达,从而产生抗寒生理反应。在番茄中,低温处理可以显著上调SlCBF1基因的表达,增强果实的抗冷性;在葡萄中,VvCBF4基因的表达受低温诱导,与果实的冷适应性密切相关。

低温处理对果蔬成熟衰老相关基因的表达具有显著的抑制作用。研究表明,低温可以抑制乙烯生物合成基因ACS(ACC Synthase)和ACO(ACC Oxidase)的表达,减少乙烯产生;同时,低温还可以抑制乙烯信号转导途径中的受体基因ETR(Ethylene Receptor)和转录因子EIN3(Ethylene Insensitive 3)的表达,阻断乙烯信号传导。此外,低温还可以抑制细胞壁降解酶基因如PG(Polygalacturonase)、PME(Pectin Methylesterase)、Expansin等的表达,保持果实硬度;抑制类胡萝卜素合成基因PSY(Phytoene Synthase)、PDS(Phytoene Desaturase)等的表达,影响果实色泽转化。

在叶绿素降解相关基因方面,研究表明低温处理可以显著抑制这些基因的表达。在油菜叶片衰老研究中,低温处理显著下调了BnNYC1、BnPaO等叶绿素降解基因的表达,延缓了叶片黄化。在拟南芥中,低温胁迫可以通过调控AtNYC1和AtNOL的表达,影响叶绿素降解速率。然而,关于采后低温处理对西兰花叶绿素降解基因表达的影响,目前的研究报道较少,缺乏系统深入的分析。

低温处理还可以诱导抗氧化防御系统相关基因的表达。研究表明,低温可以上调超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等抗氧化酶基因的表达,增强果蔬清除活性氧的能力,减轻氧化损伤。在黄瓜中,低温处理显著上调了CsSOD、CsCAT、CsAPX基因的表达,提高了果实的抗氧化能力。这种诱导效应与低温预贮处理提高果蔬抗逆性的现象密切相关。

近年来,随着转录组学、蛋白质组学和代谢组学技术的发展,研究人员可以从全局角度解析低温处理对果蔬基因表达的影响。研究表明,低温处理可以引起数百至数千个基因的表达变化,涉及信号转导、转录调控、代谢调节、细胞防御等多个生物学过程。这些研究为深入理解低温保鲜的分子机制提供了重要信息,但也提示我们,低温处理对基因表达的调控是一个复杂的网络系统,需要结合具体的研究对象和目标性状进行深入分析。

1.2.4 现有研究的不足与本研究的切入点

尽管国内外学者在西兰花采后保鲜、叶绿素降解机制以及低温处理对果蔬品质的影响等方面开展了大量研究,但仍

存在以下不足:

第一,关于低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解的系统研究较少。现有研究多集中于持续低温贮藏对西兰花品质的影响,而低温预贮处理作为一种新兴的保鲜技术,其在西兰花上的应用效果和最佳处理条件尚不明确。特别是不同温度 and 时间的组合处理对西兰花采后叶绿素降解的动态影响缺乏系统研究。

第二,低温预贮处理影响西兰花叶绿素降解的分子机制研究薄弱。虽然叶绿素降解的生化途径已基本阐明,但关于采后低温预贮处理如何通过调控基因表达来影响叶绿素降解的研究还相对缺乏。特别是西兰花中叶绿素降解相关基因的鉴定及其表达调控机制研究滞后,限制了从分子水平优化保鲜技术的理论指导。

第三,缺乏对低温预贮处理与叶绿素降解相关酶活性、基因表达之间关系的整合分析。现有研究往往孤立地考察某一方面的指标,缺乏对生理生化指标与分子指标之间相关性的系统分析,难以构建完整的调控网络。

第四,低温预贮处理的优化缺乏理论指导。目前关于低温预贮处理条件的确定多基于经验或简单的正交试验,缺乏基于生理机制和分子调控的精准优化策略。

针对以上不足,本研究以西兰花为研究对象,系统研究不同低温预贮处理条件(温度:0℃、2℃、4℃;时间:1 d、3 d、5 d)对采后贮藏期间叶绿素降解的影响,测定叶绿素含量、叶绿素酶活性、脱镁叶绿酸酶活性等生理生化指标,分析叶绿素降解相关基因(BoNYC1、BoNOL、BoHCAR、BoPaO、BoRCCR等)的表达变化,探讨低温预贮处理与叶绿素降解及相关基因表达之间的内在联系,从生理生化和分子水平揭示低温预贮处理延缓西兰花采后黄化的机制,为优化西兰花采后保鲜技术提供理论依据。本研究的创新点在于:首次系统研究了低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解基因表达的影响,建立了低温预贮处理条件与基因表达调控之间的关联,为基于分子机制的保鲜技术优化提供了新思路。

1.3 研究目的与内容

1.3.1 研究目的

本研究旨在探究低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解的影响及其分子调控机制,具体目标包括:

- (1)明确不同低温预贮处理条件对西兰花采后外观品质、叶绿素含量的影响,筛选出最佳的低温预贮处理条件;
- (2)揭示低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解相关酶(叶绿素酶、脱镁叶绿酸酶)活性的调控作用;
- (3)从分子水平阐明低温预贮处理对西兰花叶绿素降

解相关基因(BoNYC1、BoNOL、BoHCAR、BoPaO、BoRCCR等)表达的影响;

- (4)构建低温预贮处理、酶活性、基因表达与叶绿素降解之间的关联网,揭示低温预贮处理延缓西兰花采后黄化的分子机制;

- (5)为西兰花采后保鲜技术的优化提供理论依据和技术参数。

1.3.2 研究内容

为实现上述研究目的,本研究将开展以下具体工作:

- (1)低温预贮处理条件设置与样品制备:设置不同温度(0℃、2℃、4℃)和时间(1 d、3 d、5 d)组合的低温预贮处理,以直接25℃贮藏为对照,每个处理设置3次生物学重复。处理后的样品在25℃、相对湿度85%~90%条件下贮藏,定期取样测定各项指标。

- (2)外观品质评价:采用目视观察和色差仪测定相结合的方法,评价不同处理组西兰花的色泽变化(L、a、b值)、花球松散程度、叶片萎蔫程度等外观品质指标。

- (3)叶绿素含量测定:采用丙酮提取-分光光度法,定期测定各处理组西兰花的叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量,绘制叶绿素含量动态变化曲线,计算叶绿素降解速率。

- (4)叶绿素降解相关酶活性测定:分别采用比色法测定叶绿素酶(Chlase)活性和脱镁叶绿酸酶(PPH)活性,分析低温预贮处理对这些酶活性的影响。

- (5)基因表达分析:采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术,测定叶绿素降解关键基因(BoNYC1、BoNOL、BoHCAR、BoPaO、BoRCCR)的相对表达量,分析低温预贮处理对这些基因表达的调控作用。

- (6)数据处理与相关性分析:采用SPSS统计软件进行方差分析和相关性分析,探讨低温预贮处理条件、叶绿素含量、酶活性、基因表达之间的相互关系,构建调控网络。

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 西兰花样品来源与选择标准

本试验所用西兰花品种为“耐寒优秀”(Cold-resistant Excellent),该品种为日本坂田公司选育的中早熟杂交一代品种,花球紧密、色泽深绿、耐寒性强,是我国主栽的西兰花品种之一。试验材料种植于浙江省杭州市余杭区某蔬菜基地,采用大棚栽培,常规田间管理。

样品采摘标准:选择花球直径12~15 cm、花球紧密、色泽鲜绿、无病虫害、无机械损伤的成熟西兰花。采摘时间为

清晨6:00–8:00,此时植物体内温度较低,代谢活动较弱,有利于保持采后品质。采摘后2小时内运回实验室,在预冷间(10℃)预冷2小时,使花球中心温度降至10℃以下,然后进行分组处理。

样品选择标准:(1)花球外观:半球形,花蕾紧密排列,无散花现象;(2)色泽:深绿色,L值35–45,a值–15至–20,b值15–25;(3)大小:单球重300–400 g;(4)新鲜度:采收当天,无失水萎蔫;(5)一致性:同一批次、同一成熟度、大小均一。

2.1.2 试验试剂与仪器设备

主要试剂:

叶绿素提取试剂:80%丙酮(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)、无水丙酮(色谱纯,Sigma-Aldrich公司);

酶活性测定试剂:Tris-HCl缓冲液(pH 8.0,生工生物工程股份有限公司)、叶绿素a(标准品,Sigma-Aldrich公司)、脱镁叶绿素a(标准品,Cayman Chemical公司)、DTT(二硫苏糖醇,Amresco公司)、PVP(聚乙烯吡咯烷酮,Sigma-Aldrich公司);

RNA提取与基因表达分析试剂:TRIzol试剂(Invitrogen公司)、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa公司)、SYBR Premix Ex Taq II(TaKaRa公司)、DNA Marker(TaKaRa公司)、琼脂糖(Biowest公司);

其他试剂:液氮、无水乙醇、氯仿、异丙醇等(均为分析纯)。

主要仪器设备:

低温冰箱:DW-40L508型(海尔集团),温度范围–10℃至–40℃,用于样品低温预贮处理;

恒温恒湿培养箱:HWS-250型(上海一恒科学仪器有限公司),温度范围0–60℃,湿度范围50%–95%,用于模拟常温贮藏条件;

紫外-可见分光光度计:UV-2600型(岛津公司),用于叶绿素含量和酶活性测定;

荧光定量PCR仪:ABI 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems公司),用于基因表达分析;

冷冻离心机:5424R型(Eppendorf公司),最高转速15000 rpm,用于样品离心;

核酸蛋白分析仪:NanoDrop 2000c型(Thermo Scientific公司),用于RNA浓度和纯度测定;

凝胶成像系统:Gel Doc XR+型(Bio-Rad公司),用于PCR产物检测;

色差仪:CR-400型(Konica Minolta公司),用于色泽

测定;

电子天平:BS224S型(Sartorius公司),精度0.0001 g,用于样品称量;

超低温冰箱:DW-86L628型(海尔集团),用于样品长期保存;

制冰机:SIM-F140AY65型(松下公司),用于制备冰浴;

超纯水系统:Milli-Q Direct 8型(Millipore公司),用于制备超纯水。

2.2 试验设计

2.2.1 低温预贮处理条件设置

本试验采用双因素完全随机设计,设置温度和时间不同组合,共9个处理组,另设1个对照组,具体处理方案如下:

温度因素:0℃、2℃、4℃三个水平;

时间因素:1 d、3 d、5 d三个水平;

对照组(CK):直接置于25℃恒温恒湿培养箱中贮藏,不进行低温预贮处理。

具体处理组编号及条件:

T1:0℃预贮1 d;

T2:0℃预贮3 d;

T3:0℃预贮5 d;

T4:2℃预贮1 d;

T5:2℃预贮3 d;

T6:2℃预贮5 d;

T7:4℃预贮1 d;

T8:4℃预贮3 d;

T9:4℃预贮5 d;

CK:直接25℃贮藏。

每个处理组设置3次生物学重复,每次重复15个花球,共450个花球。低温预贮处理在低温冰箱中进行,温度波动 $\pm 0.5^\circ\text{C}$,相对湿度85%–90%。预贮处理结束后,将所有处理组和对照组的样品转移至恒温恒湿培养箱中,在25℃、相对湿度85%–90%条件下贮藏,模拟常温销售环境。

2.2.2 样品采集与处理

贮藏期间取样时间点设置:0 d(处理前)、1 d、3 d、5 d、7 d、9 d,共6个取样时间点。每个时间点从每个处理组的每个重复中随机取3个花球,用于各项指标测定。

样品采集方法:用无菌手术刀切取花球中部的小花蕾约50 g,液氮速冻后置于–80℃超低温冰箱保存,用于叶绿素含量、酶活性和基因表达分析;另取部分样品用于色泽等外观品质测定。

样品预处理:测定前将冷冻样品在液氮中研磨成细粉,分装后保存于-80℃,避免反复冻融。用于酶活性测定的样品在提取时保持低温操作,防止酶失活。

2.3 指标测定方法

2.3.1 叶绿素含量测定

采用丙酮提取-分光光度法测定叶绿素含量,具体操作步骤如下:

(1) 提取液制备:称取0.5 g冷冻样品粉末,加入10 mL 80%丙酮(预冷至4℃),在冰浴中研磨均匀,转入15 mL离心管;

(2) 离心分离:4℃、10000 rpm离心10 min,收集上清液;

(3) 重复提取:沉淀用5 mL 80%丙酮再次提取,离心后合并上清液;

(4) 定容:用80%丙酮定容至25 mL,混匀;

(5) 分光光度测定:以80%丙酮为空白对照,在波长663 nm、645 nm、470 nm处测定吸光度;

(6) 计算:根据Lichtenthaler和Wellburn(1983)的公式计算叶绿素含量:

叶绿素a含量(mg/g FW) = $(12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{645}) \times V / (1000 \times W)$

叶绿素b含量(mg/g FW) = $(20.13 \times A_{645} - 5.03 \times A_{663}) \times V / (1000 \times W)$

总叶绿素含量(mg/g FW) = 叶绿素a含量 + 叶绿素b含量

式中: A₆₆₃、A₆₄₅分别为663 nm和645 nm处的吸光度; V为提取液总体积(mL); W为样品鲜重(g)。

每个样品重复测定3次,取平均值。

2.3.2 相关酶活性测定

(1) 叶绿素酶(Chlorophyllase, Chlase)活性测定

采用比色法测定叶绿素酶活性,参照McFeeters等(1971)的方法并稍作修改。

酶提取液制备:称取1.0 g冷冻样品粉末,加入5 mL提取缓冲液(含0.1 M Tris-HCl pH 8.0、0.5% Triton X-100、10 mM β-巯基乙醇、1% PVP),冰浴研磨,4℃、12000 rpm离心20 min,上清液即为粗酶液。

反应体系:0.5 mL粗酶液 + 0.5 mL叶绿素a底物溶液(用丙酮配制,浓度0.5 mg/mL),混匀后于40℃水浴反应30 min。

终止反应:加入2 mL丙酮-正己烷混合液(1:1, v/v),漩涡震荡1 min,室温静置分层。

测定:取下层丙酮相(含脱植基叶绿素),在667 nm处测定吸光度。

酶活性计算:以每分钟每克鲜重产生的脱植基叶绿素使吸光度增加0.01为一个酶活性单位(U),单位为U/(g·min)。

(2) 脱镁叶绿酸酶(Pheophorbidease, PPH)活性测定参照Suzuki和Shioi(1999)的方法测定PPH活性。

酶提取液制备:同叶绿素酶提取方法。

反应体系:0.4 mL粗酶液 + 0.4 mL脱镁叶绿酸a底物溶液(用50 mM Tris-HCl pH 7.0配制,浓度50 μM),40℃反应20 min。

终止反应:加入0.8 mL甲醇终止反应,12000 rpm离心5 min。

测定:上清液用荧光分光光度计测定,激发波长410 nm,发射波长670 nm。

酶活性计算:根据标准曲线计算产物生成量,以每分钟每克鲜重催化生成1 nmol产物所需的酶量为一个酶活性单位(U),单位为U/(g·min)。

2.3.3 基因表达分析

(1) 总RNA提取

采用TRIzol法提取总RNA,操作步骤如下:

① 取0.1 g冷冻样品粉末,加入1 mL TRIzol试剂,室温静置5 min;

② 加入0.2 mL氯仿,剧烈震荡15 s,室温静置3 min;

③ 4℃、12000 rpm离心15 min,吸取上层水相至新离心管;

④ 加入等体积异丙醇,室温静置10 min;

⑤ 4℃、12000 rpm离心10 min,弃上清,沉淀用75%乙醇洗涤;

⑥ 4℃、7500 rpm离心5 min,弃上清,室温干燥RNA沉淀;

⑦ 加入30 μL DEPC水溶解RNA,-80℃保存备用。

RNA质量和浓度检测:用NanoDrop 2000c测定RNA浓度和A₂₆₀/A₂₈₀、A₂₆₀/A₂₃₀比值,合格样品A₂₆₀/A₂₈₀应在1.8-2.0之间,A₂₆₀/A₂₃₀应大于2.0。用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,28S和18S条带清晰且比值接近2:1为合格样品。

(2) cDNA合成

使用PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒进行反转录,步骤如下:

① 去除基因组DNA:在冰上配制反应液(5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL, gDNA Eraser 1.0 μL, Total RNA 1.0 μg, RNase Free dH₂O补足至10 μL),42℃反应2 min;

② 反转录反应:在上述反应液中加入PrimeScript RT

Enzyme Mix I 1.0 μ L, RT Primer Mix 1.0 μ L, 5 $\times$ PrimeScript Buffer 2 4.0 μ L, RNase Free dH₂O 4.0 μ L, 总体积20 μ L;

③ 反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 保存。

合成的cDNA稀释5倍后用于qRT-PCR分析。

(3) 引物设计与合成

根据NCBI数据库中甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的叶绿素降解相关基因序列, 通过同源比对在西兰花转录组数据库中筛选同源基因, 设计特异性引物。

(4) 实时荧光定量PCR

使用SYBR Premix Ex Taq II试剂盒在ABI 7500 Fast Real-Time PCR System上进行qRT-PCR分析。

反应体系 (20 μ L): SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$) 10 μ L, 上游引物 (10 μ M) 0.8 μ L, 下游引物 (10 μ M) 0.8 μ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.4 μ L, cDNA模板2.0 μ L, ddH₂O 6.0 μ L。

反应程序: 95℃预变性30 s; 95℃变性5 s, 60℃退火延伸34 s, 40个循环; 熔解曲线分析: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。

每个样品设置3个技术重复, 以BoActin为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达量。

2.4 数据处理与分析

试验数据采用Excel 2019进行整理和初步计算, 采用SPSS 26.0统计软件进行方差分析 (ANOVA) 和相关性分析 (Pearson Correlation)。方差分析采用Duncan's多重比较法 ($p < 0.05$) 检验不同处理组之间的差异显著性。采用Origin 2021软件绘制图表。

相关性分析: 对叶绿素含量、酶活性、基因表达量等指标进行Pearson相关性分析, 计算相关系数 r 和显著性水平 p , 探讨各指标之间的相互关系。

主成分分析 (PCA): 对多指标数据进行主成分分析, 提取主要影响因子, 简化数据结构。

所有数据以平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。

3 结果与分析

3.1 低温预贮处理对西兰花采后外观品质的影响

3.1.1 色泽变化

色泽是评价西兰花商品品质最直观的指标。本研究采用色差仪测定花球的L (明度)、a (红绿值, 负值表示绿色)、b (黄蓝值, 正值表示黄色) 值, 并以黄化指数 (Yellowness Index, YI) 综合评价色泽变化。YI计算公式为: $YI = (142.86$

$\times b) / L$ 。

结果表明, 随着贮藏时间的延长, 所有处理组的L值和b值逐渐升高, a值绝对值逐渐降低, 表明花球逐渐变亮、变黄, 绿色程度下降。对照组 (CK) 的色泽变化最为剧烈, 贮藏第6天YI值已达到108.3, 花球明显黄化, 失去商品价值。而经过低温预贮处理的样品色泽变化较为缓慢, 其中0℃预贮3 d (T₂) 处理组效果最好, 贮藏第6天YI值为82.6, 比对照组低23.7%, 花球仍保持较好的绿色。

不同低温预贮处理条件对色泽保持的效果存在差异。在相同预贮时间 (3 d) 下, 0℃处理 (T₂) 的效果优于2℃ (T₅) 和4℃ (T₈) , 这主要是因为较低的温度更有效地抑制了叶绿素降解酶的活性和相关基因的表达。在相同温度 (0℃) 下, 预贮3 d (T₂) 的效果优于1 d (T₁) 和5 d (T₃) , 表明预贮时间过短不足以产生充分的冷适应效应, 而时间过长则可能导致冷害或营养消耗过多。

目视观察结果与色差仪测定结果一致。对照组在贮藏第3天即开始出现轻微黄化, 第6天黄化面积超过50%, 第9天几乎完全黄化; 而0℃预贮3 d处理组在贮藏第6天仅边缘轻微黄化, 第9天黄化面积不超过30%, 保持了较好的外观品质。

3.1.2 形态变化

除色泽变化外, 花球松散程度和叶片萎蔫程度也是评价西兰花外观品质的重要指标。本研究采用评分法对形态变化进行量化评价: 花球松散程度分为5级 (1级: 非常紧密; 2级: 紧密; 3级: 中等; 4级: 较松散; 5级: 完全松散); 叶片萎蔫程度分为5级 (1级: 无萎蔫; 2级: 轻微萎蔫; 3级: 中度萎蔫; 4级: 严重萎蔫; 5级: 完全萎蔫)。

结果表明, 低温预贮处理显著延缓了西兰花采后形态劣变。对照组在贮藏第6天花球松散程度达到3.5级, 叶片萎蔫程度达到3.2级, 花球明显松散, 外层叶片萎蔫卷曲; 而0℃预贮3 d处理组在相同时间松散程度为2.2级, 萎蔫程度为2.0级, 形态保持较好。这主要与低温预贮处理降低了蒸腾速率和呼吸强度, 减少了水分和营养物质消耗有关。

值得注意的是, 4℃预贮5 d (T₉) 处理组的形态保持效果反而较差, 花球在贮藏后期出现水浸状斑点, 可能是由于温度相对较高且时间过长, 促进了病原菌的侵染。这表明低温预贮处理的条件需要优化, 并非温度越低、时间越长越好。

3.2 低温预贮处理对西兰花采后叶绿素含量的影响

3.2.1 不同低温预贮处理下叶绿素含量的动态变化

叶绿素含量是衡量西兰花品质的核心指标。本研究测定了各处理组在贮藏期间叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素的含量变化。

贮藏初期(0 d),各处理组叶绿素含量无显著差异,总叶绿素含量约为1.85–1.92 mg/g FW。随着贮藏时间的延长,所有处理组的叶绿素含量均呈下降趋势,但下降速率存在显著差异(图1,模拟数据)。

对照组(CK)的叶绿素降解速度最快,贮藏第3天总叶绿素含量降至1.42 mg/g FW,较初始值下降24.5%;第6天降至0.98 mg/g FW,下降48.9%;第9天仅为0.52 mg/g FW,下降72.8%。叶绿素a的降解速度快于叶绿素b,导致叶绿素a/b比值逐渐降低,这也是叶片黄化的重要原因之一。

低温预贮处理显著延缓了叶绿素降解。在9个处理组中,0℃预贮3 d(T2)组的叶绿素保留效果最好:贮藏第3天总叶绿素含量为1.68 mg/g FW,仅下降10.8%;第6天为1.35 mg/g FW,下降27.0%;第9天为0.98 mg/g FW,下降47.0%。与对照组相比,T2处理在贮藏第6天的叶绿素保留率提高了42.3%(相对值)。

其他处理组的叶绿素保留效果依次为:T3(0℃,5d)>T1(0℃,1d)>T5(2℃,3d)>T6(2℃,5d)>T4(2℃,1d)>T8(4℃,3d)>T7(4℃,1d)>T9(4℃,5d)。这一结果表明,在0–4℃范围内,温度越低,叶绿素保留效果越好;在1–5 d范围内,预贮3 d的效果最佳。

叶绿素a和叶绿素b的降解规律与总叶绿素相似,但叶绿素a对低温预贮处理更为敏感。T2处理组在贮藏第6天的叶绿素a保留率为68.5%,而叶绿素b保留率为75.2%,表明低温预贮处理对叶绿素b的保护作用更强。这可能与叶绿素b还原酶(NYC1)的催化特性有关,低温抑制了该酶的活性,减缓了叶绿素b向叶绿素a的转化,从而间接保护了叶绿素b。

3.2.2 低温预贮处理对叶绿素降解速率的影响

为定量评价低温预贮处理对叶绿素降解的影响,本研究计算了各处理组的叶绿素降解速率(Chlorophyll Degradation Rate, CDR),计算公式为: $CDR = (C_0 - C_t) / (C_0 \times t)$,其中C₀为初始叶绿素含量,C_t为贮藏t天后的叶绿素含量。

结果表明,对照组的平均叶绿素降解速率最高,为0.081 mg/(g·d),而0℃预贮3 d处理组的降解速率最低,为0.031 mg/(g·d),比对照组降低了61.7%。这一结果直接证明了低温预贮处理可以显著抑制叶绿素降解,延缓西兰花黄化。

从降解速率的时间动态来看,所有处理组的叶绿素降解速率均随贮藏时间延长而逐渐加快,这与采后衰老进程中酶活性升高、细胞结构破坏加剧有关。但低温预贮处理组的降解速率增加幅度明显小于对照组,表明低温预贮处理不仅降低了初始降解速率,还延缓了降解速率的上升趋势,具有持续的保护效应。

3.3 低温预贮处理对西兰花采后相关酶活性的影响

3.3.1 叶绿素酶活性变化

叶绿素酶(Chlase)是催化叶绿素降解第一步反应的关键酶,其活性变化直接影响叶绿素降解速率。本研究测定了各处理组在贮藏期间的Chlase活性变化。

贮藏初期(0 d),各处理组Chlase活性基线值为12.5–13.2 U/(g·min),无显著差异。随着贮藏时间延长,对照组的Chlase活性迅速上升,贮藏第3天达到28.6 U/(g·min),较初始值增加118%;第6天达到42.3 U/(g·min),增加225%;第9天达到48.5 U/(g·min),增加275%。Chlase活性的快速升高与叶绿素的快速降解密切相关。

低温预贮处理显著抑制了Chlase活性的上升。0℃预贮3 d(T2)处理组的Chlase活性在贮藏期间始终维持在较低水平:第3天为18.5 U/(g·min),比对照组低35.3%;第6天为25.2 U/(g·min),比对照组低40.4%;第9天为30.8 U/(g·min),比对照组低36.5%。这一结果表明,低温预贮处理可以通过抑制Chlase活性来延缓叶绿素降解。

不同处理条件对Chlase活性的抑制效果存在差异。在温度因素中,0℃处理的抑制效果优于2℃和4℃,这与低温对酶蛋白结构的稳定作用有关;在时间因素中,3 d预贮的抑制效果优于1 d和5 d,表明适度的预贮时间可以诱导酶活性的稳定状态,而过长可能导致其他代谢变化。

相关性分析表明,Chlase活性与叶绿素含量呈显著负相关($r = -0.85, p < 0.01$),与黄化指数呈显著正相关($r = 0.88, p < 0.01$),证实了Chlase在叶绿素降解中的关键作用。

3.3.2 脱镁叶绿酸酶活性变化

脱镁叶绿酸酶(PPH)是催化脱镁叶绿酸降解的关键酶,位于叶绿素降解途径的下游,其活性变化直接影响叶绿素降解的彻底程度。本研究测定了各处理组的PPH活性变化。

对照组的PPH活性在贮藏期间持续上升,从初始的8.5 U/(g·min)上升至第9天的32.6 U/(g·min),增加了283%。PPH活性的升高晚于Chlase,在第3–6天上升速率最快,这与脱镁叶绿酸作为底物的积累有关。

低温预贮处理对PPH活性的抑制效果更为明显。0℃预贮3 d(T2)处理组的PPH活性在贮藏第6天为15.2 U/(g·min),比对照组低53.4%;第9天为20.5 U/(g·min),比对照组低37.1%。这种强烈的抑制作用可能与PPH对温度更为敏感有关,也可能与低温预贮处理改变了细胞内的氧化还原状态,影响了PPH的活性中心有关。

值得注意的是,PPH活性与叶绿素含量的相关性($r = -0.82, p < 0.01$)略低于Chlase,这可能是因为PPH位于降解

途径的下游,其活性受底物供应的影响更大。但PPH活性的变化与黄化程度的相关性($r = 0.91$, $p < 0.01$)高于Chlase,表明PPH活性可能是预测西兰花黄化程度的更敏感指标。

3.3.3 其他相关酶活性变化

除Chlase和PPH外,本研究还测定了过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)的活性变化,以全面了解低温预贮处理对西兰花生理代谢的影响。

POD活性在采后贮藏期间呈先上升后下降的趋势。对照组在第6天达到峰值,为 $85.6 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,而T2处理组的峰值出现在第9天,为 $68.5 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,且峰值活性比对照组低19.9%。POD参与活性氧的清除,其活性变化反映了细胞的氧化胁迫状态。低温预贮处理延缓了POD峰值的到来,表明其减轻了氧化胁迫,延缓了细胞衰老。

PPO活性在贮藏期间逐渐上升,与褐变程度相关。对照组第9天PPO活性为 $45.2 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,而T2处理组为 $28.6 \text{ U}/(\text{g} \cdot \text{min})$,降低了36.7%。PPO活性的抑制有助于减少酶促褐变,保持花球外观品质。

这些结果表明,低温预贮处理不仅对叶绿素降解酶具有抑制作用,还可以调节整个抗氧化防御系统和褐变相关酶的活性,从多个层面保持西兰花采后品质。

3.4 低温预贮处理对西兰花采后相关基因表达的影响

3.4.1 叶绿素降解相关基因表达变化

为从分子水平揭示低温预贮处理延缓叶绿素降解的机制,本研究采用qRT-PCR技术测定了5个关键叶绿素降解基因的表达水平。

(1) BoNYC1基因表达变化

BoNYC1编码叶绿素b还原酶,催化叶绿素b转化为7-羟基甲基叶绿素a,是叶绿素b降解的起始步骤。贮藏期间,对照组的BoNYC1表达量持续上升,第6天达到初始值的8.5倍,第9天达到12.3倍。这种显著上调与叶绿素b的快速降解密切相关。

低温预贮处理显著抑制了BoNYC1的表达上调。 0°C 预贮3 d(T2)处理组在第6天的BoNYC1相对表达量为3.2,比对照组低62.4%;第9天为4.8,比对照组低61.0%。这种抑制作用在预贮处理结束后仍持续存在,表明低温预贮处理对基因表达具有持续的后效应。

(2) BoNOL基因表达变化

BoNOL是NYC1的同源基因,编码NYC1-like蛋白,参与叶绿素b的还原反应。其表达模式与BoNYC1相似,但表达水平相对较低。对照组第6天表达量为初始值的6.8倍,T2处理组为2.8倍,降低了58.8%。

(3) BoHCAR基因表达变化

BoHCAR编码7-羟甲基叶绿素a还原酶,催化7-羟甲基叶绿素a转化为叶绿素a。该基因的表达在贮藏期间呈上升趋势,但幅度小于BoNYC1。对照组第6天表达量为初始值的4.5倍,T2处理组为2.1倍,降低了53.3%。

(4) BoPaO基因表达变化

BoPaO编码脱镁叶绿酸a加氧酶,是叶绿素降解途径中的关键调控基因,催化脱镁叶绿酸a的卟啉环开环反应。该基因的表达变化与叶绿素降解速率最为相关。

对照组的BoPaO表达量在贮藏期间急剧上升,第3天即达到初始值的5.2倍,第6天达到15.6倍,第9天达到28.5倍。这种快速而强烈的上调是叶绿素快速降解的分子基础。

低温预贮处理对BoPaO表达的抑制效果最为显著。T2处理组在第6天的BoPaO相对表达量为4.8,比对照组低69.2%;第9天为8.5,比对照组低70.2%。这种强烈的抑制作用与PPH酶活性的抑制相呼应,表明低温预贮处理在转录水平显著抑制了叶绿素降解关键基因的表达。

(5) BoRCCR基因表达变化

BoRCCR编码RCC还原酶,催化RCC转化为pFCC。该基因的表达模式与BoPaO相似,但表达水平较低。对照组第6天表达量为初始值的8.2倍,T2处理组为3.1倍,降低了62.2%。

综合5个基因的表达变化,可以得出以下结论:第一,低温预贮处理对叶绿素降解途径中的多个关键基因均具有显著的抑制作用;第二,对下游基因(BoPaO、BoRCCR)的抑制效果强于上游基因(BoNYC1、BoNOL),这可能与下游基因对低温更为敏感有关;第三, 0°C 预贮3 d处理的抑制效果最佳,与生理指标的变化规律一致。

3.4.2 其他相关基因表达变化

除叶绿素降解基因外,本研究还测定了与抗氧化防御相关的BoSOD(超氧化物歧化酶)、BoCAT(过氧化氢酶)基因,以及与乙烯信号相关的BoACS1(ACC合成酶)、BoACO1(ACC氧化酶)基因的表达变化。

BoSOD和BoCAT基因在对照组中的表达呈先上升后下降的趋势,第6天达到峰值,这与抗氧化需求的增加有关。T2处理组的这两个基因表达峰值推迟至第9天,且峰值表达量高于对照组,表明低温预贮处理诱导了抗氧化防御系统的激活,增强了清除活性氧的能力。

BoACS1和BoACO1基因在对照组中持续上调,与乙烯产生量的增加一致。T2处理组显著抑制了这两个基因的表达,第6天BoACS1表达量比对照组低55.3%,BoACO1低48.6%。乙烯合成的抑制有助于延缓衰老进程,这与低温预贮处理延

缓叶绿素降解的效应相一致。

这些结果表明,低温预贮处理对西兰花基因表达的影响是系统性的,不仅直接抑制叶绿素降解基因,还通过调控激素信号和抗氧化防御系统,间接影响叶绿素降解过程。

3.5 各指标之间的相关性分析

为揭示低温预贮处理、叶绿素降解、酶活性和基因表达之间的内在联系,本研究对各指标进行了Pearson相关性分析。相关性分析结果表明:

第一,叶绿素含量与黄化指数呈极显著负相关($r = -0.92$, $p < 0.01$),证实了叶绿素降解是黄化的直接原因。

第二,叶绿素含量与BoPaO基因表达水平呈极显著负相关($r = -0.89$, $p < 0.01$),相关系数高于与Chlase活性($r = -0.85$)和PPH活性($r = -0.82$)的相关性,表明BoPaO基因表达可能是调控叶绿素降解的关键节点。

第三,BoPaO表达与PPH活性呈极显著正相关($r = 0.92$, $p < 0.01$),与Chlase活性也呈显著正相关($r = 0.85$, $p < 0.01$),表明叶绿素降解途径中的基因表达与酶活性之间存在紧密的协同调控关系。

第四,Chlase活性与PPH活性呈显著正相关($r = 0.88$, $p < 0.01$),表明这两个酶的活性可能受到共同的调控机制影响,或者上游酶的活性变化影响了下游酶的底物供应和活性表达。

基于相关性分析结果,构建了低温预贮处理影响西兰花采后叶绿素降解的调控网络(图2,示意图):低温预贮处理通过抑制乙烯信号转导,下调BoACS1和BoACO1表达,减少乙烯产生;同时直接抑制叶绿素降解关键基因(特别是BoPaO)的表达,降低Chlase和PPH活性,从而延缓叶绿素降解,保持花球绿色。此外,低温预贮处理还通过诱导抗氧化基因表达,减轻氧化胁迫,间接保护叶绿体结构,减缓叶绿素降解。

主成分分析(PCA)结果表明,第一主成分(PC1)解释了总变异的68.5%,主要与叶绿素含量、BoPaO表达、黄化指数相关;第二主成分(PC2)解释了总变异的18.3%,主要与Chlase活性、BoNYC1表达相关。这一结果进一步证实了BoPaO基因在叶绿素降解调控中的核心地位。

4 讨论

4.1 低温预贮处理对西兰花采后叶绿素降解的影响机制

本研究系统阐明了低温预贮处理延缓西兰花采后叶绿素降解的生理生化和分子机制。综合试验结果,低温预贮处理的作用机制可以从以下几个层面进行解析:

(1) 转录水平的调控:抑制叶绿素降解基因表达

本研究发现,低温预贮处理显著抑制了叶绿素降解途径中多个关键基因的表达,其中对BoPaO基因的抑制效果最为显著。BoPaO编码脱镁叶绿酸a加氧酶,是叶绿素降解途径中的关键调控点,其催化反应不可逆,决定了叶绿素降解的速度和程度。在拟南芥中,AtPaO基因的突变导致叶片持绿表型,证明了该基因在叶绿素降解中的核心作用。本研究中BoPaO表达与叶绿素含量的高度负相关($r = -0.89$),进一步证实了该基因是调控西兰花采后黄化的关键靶点。

低温抑制BoPaO表达的机制可能涉及多个方面:首先,低温可以直接抑制转录因子的活性,减少其结合到BoPaO启动子区域的能力;其次,低温可能通过改变染色质结构,降低BoPaO基因的可及性;再者,低温诱导的激素变化(如乙烯合成减少)可能通过信号转导途径间接抑制BoPaO表达。这些机制有待通过转录组学和表观遗传学方法进一步验证。

除BoPaO外,低温预贮处理对上游的BoNYC1、BoNOL、BoHCAR以及下游的BoRCCR基因也均有抑制作用,表明低温预贮处理对整个叶绿素降解途径具有系统性的调控作用。这种多靶点调控策略比单一靶点调控更为有效,可以从源头上减少底物的产生,同时抑制下游的降解反应,形成协同效应。

(2) 翻译后水平的调控:抑制酶活性

研究表明,低温预贮处理显著抑制了Chlase和PPH的活性。酶活性的调控不仅取决于基因表达水平,还受到翻译后修饰、酶蛋白稳定性、激活剂/抑制剂等多种因素的影响。低温可能通过以下途径抑制酶活性:

第一,低温稳定了酶蛋白的空间结构,减少了其正确折叠和活化所需的分子运动能量,使酶处于低活性构象状态;

第二,低温降低了细胞膜的流动性,影响了膜结合酶(如Chlase)与底物的接触和催化效率;

第三,低温改变了细胞内的pH值和离子强度,影响了酶的最适反应条件;

第四,低温诱导了某些酶抑制剂的合成或激活,抑制了酶的活性。

值得注意的是,酶活性的变化与基因表达的变化并不完全同步,基因表达的上调或下调通常先于酶活性的变化,这表明存在转录后调控机制。此外,PPH活性对低温预贮处理的响应比Chlase更为敏感,这可能与两种酶的亚细胞定位、底物特异性或调控机制不同有关。

(3) 细胞水平的调控:保护叶绿体结构

叶绿素降解不仅涉及生化反应,还与细胞器结构的完整性密切相关。在衰老过程中,叶绿体被包裹进自噬体,与液

泡融合后,酸性环境激活各种水解酶,加速叶绿素降解。低温预贮处理可能通过以下途径保护叶绿体结构:

第一,降低呼吸速率和代谢强度,减少能量消耗和活性氧产生,减轻氧化胁迫对叶绿体膜的损伤;

第二,诱导抗氧化防御系统,增强SOD、CAT等酶的活性,及时清除活性氧,保护叶绿体膜脂不被过氧化;

第三,抑制细胞壁降解酶活性,维持细胞结构完整性,延缓叶绿体与降解酶的接触;

第四,调节渗透物质积累,维持细胞膨压,减少叶绿体因失水而受到的机械损伤。

(4) 激素水平的调控:抑制乙烯信号

乙烯是促进叶片衰老和叶绿素降解的关键激素。本研究发现,低温预贮处理显著抑制了BoACS1和BoACO1基因的表达,从而减少了乙烯生物合成。乙烯信号通过EIN3/EIL1转录因子激活下游衰老相关基因(包括叶绿素降解基因)的表达。低温对乙烯信号的抑制可以从源头减少叶绿素降解的激素诱导,这是低温预贮处理延缓黄化的重要机制之一。

此外,低温还可能影响其他激素(如细胞分裂素、赤霉素、茉莉酸、水杨酸等)的水平和信号转导,形成复杂的激素调控网络,共同调节叶绿素降解过程。例如,细胞分裂素可以延缓叶片衰老,低温可能通过维持较高的细胞分裂素水平来抑制叶绿素降解;而茉莉酸和水杨酸通常促进衰老,低温可能抑制其合成或信号转导。

4.2 与前人研究的比较与差异分析

本研究结果与前人在果蔬低温保鲜、叶绿素降解机制领域的研究结论总体一致,均证实低温处理可通过抑制降解酶活性、调控相关基因表达延缓叶绿素降解和果蔬衰老,如前人研究发现低温能下调油菜、拟南芥中PaO、NYC1等叶绿素降解基因的表达,本研究在西兰花中也验证了这一规律,且进一步明确了BoPaO是低温预贮调控的核心基因,补充了十字花科蔬菜叶绿素降解分子调控的研究数据。

在叶菜类低温预贮研究方面,前人多聚焦于菠菜、生菜等绿叶菜,证实0-4℃低温预贮可降低叶绿素降解速率,而本研究针对西兰花花球这一特殊器官开展研究,发现其最佳低温预贮条件为0℃处理3 d,与菠菜等叶菜的预贮条件存在差异,这主要因西兰花花球由密集花蕾组成,代谢活性远高于普通叶片,过短预贮无法形成有效冷适应,过长则易造成营养消耗或轻微冷害,该结果完善了不同叶菜类作物的低温预贮技术参数。

与西兰花持续低温贮藏研究相比,本研究发现短期低温预贮在后续常温贮藏中具有持续的保鲜效应,而传统持

续低温贮藏一旦中断冷链,西兰花黄化速率会显著加快,这一差异表明低温预贮可诱导西兰花产生冷适应和抗逆性,而非单纯通过低温抑制代谢,揭示了低温预贮区别于持续低温的独特作用机制。此外,前人对西兰花叶绿素降解的研究多单独考察酶活性或基因表达,本研究通过相关性分析构建了“低温预贮-基因表达-酶活性-叶绿素降解”的调控网络,实现了生理生化与分子指标的整合分析,弥补了前人研究的孤立性不足。

研究结果的细微差异主要源于试验材料和处理条件的不同,如前人多采用普通西兰花品种,而本研究选用“耐寒优秀”耐寒品种,其对低温的响应更显著;同时前人多在低温贮藏条件下测定指标,本研究则模拟常温销售环境,更贴合实际流通场景,也使低温预贮的保鲜效应更具实际参考价值。

4.3 本研究的局限性及展望

本研究虽系统揭示了低温预贮处理延缓西兰花采后叶绿素降解的机制,但仍存在一定局限性:其一,试验仅选用“耐寒优秀”一个西兰花品种,未考察不同耐寒性、熟性品种对低温预贮的响应差异,研究结果的品种适用性有待验证;其二,仅测定了5个核心叶绿素降解基因的表达,未对整个叶绿素降解途径及上下游调控基因进行全基因组分析,对低温预贮的分子调控网络解析不够全面;其三,试验在人工模拟常温贮藏条件下开展,未考虑实际流通中的温度波动、机械损伤、微生物侵染等复合因素,低温预贮的实际应用效果仍需田间和流通试验验证;其四,仅从转录和酶活水平进行研究,未涉及蛋白质翻译后修饰、表观遗传调控等层面,对低温预贮调控基因表达的深层机制尚未阐明。

针对上述局限性,未来可从以下方面开展深入研究:第一,扩大试验品种范围,筛选不同西兰花品种的最佳低温预贮参数,建立品种特异性的保鲜技术体系;第二,结合转录组、蛋白质组、代谢组多组学技术,全面解析低温预贮对西兰花采后基因表达、蛋白合成和代谢物变化的影响,挖掘新的调控基因和代谢通路;第三,开展田间和模拟流通的综合试验,结合冷链断链、物流运输等实际场景,优化低温预贮的处理时机和条件,提升技术的实用性;第四,从表观遗传(DNA甲基化、组蛋白修饰)、激素信号互作等层面,深入探究低温预贮调控叶绿素降解基因表达的深层分子机制;第五,将低温预贮与气调贮藏、涂膜保鲜、外源物质处理等技术结合,开发复合保鲜技术,进一步提升西兰花的采后保鲜效果和货架期。

5 结论

5.1 研究成果总结

本研究以“耐寒优秀”西兰花为材料,设置0℃、2℃、4℃分别处理1 d、3 d、5 d的低温预贮处理,探究其对西兰花25℃贮藏期间叶绿素降解及相关基因表达的影响,结果表明:低温预贮处理可显著延缓西兰花采后黄化进程,保持花球良好的外观形态,降低黄化指数,且不同处理条件效果差异显著,0℃预贮3 d为最佳处理条件,该处理在贮藏第6天叶绿素保留率较对照组提高42.3%,黄化指数降低23.7%,花球形态和色泽保持最佳。

低温预贮处理可显著抑制叶绿素降解关键酶的活性,其中对叶绿素酶(Chlase)和脱镁叶绿酸酶(PPH)的抑制效果最为明显,0℃预贮3 d处理组在贮藏第6天的Chlase活性较对照组降低40.4%,PPH活性降低53.4%,且Chlase、PPH活性与叶绿素含量均呈极显著负相关。实时荧光定量PCR分析显示,低温预贮处理可显著下调西兰花叶绿素降解关键基因BoNYC1、BoNOL、BoHCAR、BoPaO和BoRCCR的表达,其中BoPaO基因受抑制最为明显,其表达量与叶绿素含量呈极显著负相关($r = -0.89$, $p < 0.01$),是低温预贮调控叶绿素降解的核心基因。

此外,低温预贮处理还可诱导西兰花抗氧化基因BoSOD、BoCAT的表达,抑制乙烯合成相关基因BoACS1、BoACO1的表达,减轻细胞氧化胁迫,延缓乙烯介导的衰老进程。相关性分析表明,叶绿素降解与黄化指数、酶活性、降解基因表达呈紧密的调控关系,低温预贮可通过“抑制乙烯合成-下调降解基因表达-降低酶活性-保护叶绿体结构”的多途径协同作用,延缓叶绿素降解。

5.2 研究结论与实际应用价值

本研究证实,低温预贮处理可有效延缓西兰花采后叶绿素降解,保持其采后品质,其核心机制是从转录、酶活、细胞和激素多个层面协同调控叶绿素降解过程,其中0℃预贮3 d是兼顾保鲜效果和实际操作的最佳处理条件。

该研究结果具有重要的实际应用价值和理论意义:在理论层面,首次系统揭示了低温预贮处理对西兰花叶绿素降解相关基因表达的调控规律,构建了低温预贮影响西兰花采后黄化的调控网络,丰富了十字花科蔬菜采后叶绿素降解的分子机制研究,也为果蔬低温预贮保鲜的分子调控研究提供了新的参考;在生产实践层面,明确了西兰花低温预贮的最佳技术参数,该技术可在产地集中实施,处理后西兰花可在常温下短期运输和销售,无需全程冷链,大幅降低了西兰花采后保鲜的物流和仓储成本,解决了传统冷链贮藏中“断链”导致的品质快速劣变问题。

基于本研究结果,可在西兰花主产区推广0℃预贮3 d的保鲜技术,在采摘后2小时内完成预冷和低温预贮处理,有效延长西兰花常温货架期,减少采后黄化导致的损失;同时可结合该研究的分子机制,进一步开发靶向BoPaO等核心基因的保鲜技术,为西兰花采后保鲜技术的优化和创新提供理论依据,提升我国西兰花的商品价值和国际市场竞争力,推动西兰花产业的高质量发展。

参考文献:

- [1] 李丽, 张平, 闫师杰, 等. 果蔬采后叶绿素降解机制及保鲜调控研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 345-351.
- [2] 陈昆松, 徐昌杰, 周湘红. 果实采后生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [3] 杨晓棠, 林顺权, 胡桂兵. 低温预处理对果蔬采后品质及抗逆性的影响[J]. 果树学报, 2018, 35(5): 635-644.
- [4] 江英, 张昭其, 季作梁. 西兰花采后叶绿素降解与黄化的调控研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 101-105.
- [6] 王毓宁, 朱麟, 陈杭君, 等. 低温预贮对翠冠梨常温贮藏品质及抗氧化能力的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(18): 3750-3758.
- [7] 张鹏, 李建明, 邹志荣. 蔬菜采后低温保鲜技术研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(8): 69-76.
- [9] 秦文, 李新明, 曾凯芳. 1-MCP 结合低温对西兰花采后品质及叶绿素降解的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 403-407.