

孙海燕,田 芸,郝丹青,等. 不同处理方式对鲜切天麻贮藏软化相关酶表达的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(17):198–205.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2022.17.032

# 不同处理方式对鲜切天麻贮藏软化相关酶表达的影响

孙海燕<sup>1,2,3</sup>, 田 芸<sup>1</sup>, 郝丹青<sup>1</sup>, 王 瑞<sup>4</sup>, 裴金金<sup>1</sup>, 陈 琛<sup>1</sup>, 李新生<sup>1,2</sup>

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; 2. 陕西理工大学/陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723000;  
3. 国家农产品保鲜工程技术研究中心秦巴地区保鲜工作站, 陕西汉中 723000; 4. 贵阳学院食品与制药工程学院, 贵州贵阳 550000)

**摘要:**研究不同处理方式对鲜切天麻贮藏过程中软化的影响,为天麻保鲜贮藏提供新的检测指标。通过茶多酚涂膜、超高压、茶多酚涂膜+超高压3种方法处理新鲜天麻样品,通过表型观察、筛选与天麻软化相关的酶,设计其引物。提取天麻总RNA后,经反转录、实时荧光定量PCR(qPCR)等方法检测软化相关酶的表达水平,进一步分析不同包装方式对天麻软化的影响机制。结果显示,通过筛选获得5种天麻软化相关酶,经茶多酚涂膜处理的天麻样品中果胶裂解酶(PL)的表达量显著降低;果胶甲酯酶(PME)在贮藏35 d时的基因表达水平变化除超高压处理组外,其他2组均显著高于空白组;过氧化物酶(POD)在超高压处理后表达水平的变化趋势与空白组相反;木瓜蛋白酶(Papain)在超高压处理后显著高于空白组;组织蛋白酶(Cathepsin)在茶多酚涂膜后表达量低于空白组,但在贮藏35 d时,经过茶多酚涂膜+超高压处理的样品中表达量却显著高于空白组。由结果可以看出,茶多酚涂膜处理可以抑制PL的表达,保鲜效果较好;3种处理方式均可以抑制POD的表达,在一定程度上减缓了天麻的氧化,具有较好的保鲜效果;而超高压处理反而促进了Papain的表达,加速了天麻的软化;PME的表达水平变化不明显,对天麻软化的影响较小。

**关键词:**鲜切天麻;处理方式;软化酶;分子基因;表达量

**中图分类号:** TS205      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002–1302(2022)17–0198–07

天麻(*Gastrodia elata* Bl.) 又称赤箭、离母、神草等,属于兰科植物,广泛分布于秦巴山区,是一种传统的名贵中药材<sup>[1]</sup>。天麻的主要有效成分是天麻素及其苷元、天麻多糖,对头痛失眠等症状有较好的治疗作用。目前,天麻主要作为药材使用,在市面上以干品居多,新鲜样品较少,这是因为天麻的采收时间较短,新鲜天麻容易溃烂,不易保鲜,一般仅可自然放置5~7 d。传统的天麻贮藏大多采用保鲜剂、真空包装、低温冷藏等方法,在一定程度上可以延长天麻的保鲜时间。目前,国内外对天麻保鲜的研究较少,国内已有的报道主要集中于鲜食天麻贮藏工艺及鲜食天麻与传统干制天麻贮藏方法的比较<sup>[1]</sup>,也有一些报道是关于天麻失质量率、可食率、口感、硬度、色度等进行的研究<sup>[2–3]</sup>。至今,天麻软化相关酶是否会影响其后续保鲜效果尚仍不清

楚。天麻在采收后仍具有活性,在其贮藏期间会逐渐软化,活性物质会被降解,不利于保鲜;天麻软化是一个非常复杂的发育调控过程,包含一些生理生化反应,包括细胞壁的降解、内含物的变化、呼吸速率的变化等,可能有多种软化相关酶参与调控。果胶裂解酶(PL)是一种通过降解果胶使果实软化的酶<sup>[4–5]</sup>,可以随机裂解高等植物的中胶层和初生细胞壁,主要功能是在果实成熟过程中参与果胶结构的裂解以达到软化果实的目的<sup>[6–8]</sup>;果胶甲酯酶(PME)能够催化细胞壁中多聚半乳糖醛酸的脱甲酯化<sup>[9]</sup>,可以使植物细胞壁中的果胶多糖降解<sup>[10]</sup>;过氧化物酶(POD)隶属于氧化还原酶类,广泛分布于大自然中,是造成植物木质化的关键酶之一<sup>[11–12]</sup>;木瓜蛋白酶主要存在于番木瓜中,是一种催化活性很强的蛋白水解酶<sup>[13–14]</sup>;组织蛋白酶是蛋白酶类的一种,其主要功能是降解蛋白质。

本研究所用天麻取自陕西省汉中市南郑县青树镇,采收当天运回实验室,筛选无损伤且大小均一的天麻。成熟天麻为黄褐色块茎,取新鲜天麻,清洗干净后切成块状,采用茶多酚涂膜、超高压处理、茶多酚涂膜+超高压处理3种方式处理,用聚乙烯保鲜袋保存于4℃冰箱中,以备后续试验使用。

收稿日期:2021–09–01

基金项目:国家自然科学基金(编号:3180101528);陕西省2011协同中心项目(编号:QBXT–18–5);陕西省资源生物重点实验室后补助项目(编号:2018SZS–27–04);陕西理工大学人才启动项目(编号:SLGRCQD2029);陕西省教育厅项目(编号:20JS027)。

作者简介:孙海燕(1979—),女,河北廊坊人,博士,副教授,主要从事食品保鲜及功能化学研究。E-mail:diyson2008@163.com。

本试验以 3 种不同处理方式处理的天麻样品为材料,首先进行表型分析,然后提取样品 RNA,进行反转录后用 qPCR 检测天麻软化调控相关酶的表达规律,为进一步从分子水平揭示天麻软化机制和保鲜效应奠定研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

2019 年 3 月于陕西省汉中市略阳县采挖新鲜天麻,当天运回实验室后,用清水清洗、晾干、去皮后切成 1 cm 厚的片状,用 3 种不同方式处理(茶多酚涂膜、超高压、茶多酚涂膜 + 超高压)后,各个处理均称取  $(250 \pm 2)$  g 装入聚乙烯塑料袋中,封口后存放于 4 ℃ 冰箱中。

### 1.2 主要试剂及仪器

总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒(TaKaRa)、qPCR 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq[宝生物工程(大连)有限公司,TaKaRa];三氯甲烷、异丙醇、75% 冷乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)水[上海科拉曼试剂有限公司];TRIzol(西安热默尔生物科技有限公司)。PCR 扩增仪(美国伯乐公司)、恒温水浴锅(上海精密仪器仪表有限公司)、离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、电子分析天平(奥豪斯公司)、蛋白核酸分析仪(美国 Thermo 公司)、电泳仪(北京君意东方电泳设备公司)、凝胶成像(英国 Syngene 公司)等。

### 1.3 试验方法

1.3.1 样品处理 选取新鲜天麻,分别用 3 种方式(茶多酚涂膜、超高压、茶多酚涂膜 + 超高压)进行处理。(1)茶多酚涂膜。在新鲜天麻表面均匀喷涂 1.5% 茶多酚保鲜液,阴凉避光处晾干后,装入聚乙烯袋中保存。(2)超高压处理。将新鲜天麻装入聚乙烯袋中,封口后在 20 ℃、300 MPa 条件下超高压处理 10 min。(3)茶多酚涂膜 + 超高压处理。在新鲜天麻表面均匀喷涂 1.5% 茶多酚保鲜液后,于阴凉避光处晾干,再将其装入聚乙烯袋内,封口后在 20 ℃、300 MPa 条件下超高压处理 10 min。

1.3.2 取样及表型观察 每 7 d 取样 1 次,每次取出 2 片鲜切天麻,观察样品表型差异并拍照记录。再将样品切成小块,用液氮速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱中。

1.3.3 RNA 的提取 提取用不同方式处理的天麻样品 RNA 的具体步骤如下:(1)取 2 mL 离心管,加入 1 mL TRIzol,将试验样品和研钵(160 ℃ 灭菌)从

-80 ℃ 冰箱中取出,先向研钵中加入液氮预冷,再将样品放入研钵中研磨,边研磨边补充液氮,研磨至粉末状,用药匙将粉末加入离心管中,做好标记;(2)室温静置 10 min 使粉末充分裂解,于 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,去除组织碎片,小心吸取上清(红色)至新的 2 mL 离心管中;(3)向离心管中加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷(TRIzol 体积的 1/5),盖紧离心管盖,剧烈振荡 15 s,待液体充分乳化后,冰上静置 5 min,于 12 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min;(4)从离心机中取出离心管,此时匀浆分为 3 层,上层为无色水相上清(RNA 所在层),中间层为白色蛋白层,下层为有机层,小心吸取上清液转移至新的离心管中并做好标记,勿吸取白色中间层;(5)向上清液中加入与上清液等体积的异丙醇,上下轻柔颠倒,于室温静置 10 min;(6)于 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min;(7)轻轻倒掉上清液,沿离心管壁缓慢加入 1 mL 75% 预冷乙醇(提取 RNA 专用),轻轻上下颠倒洗涤沉淀,于 12 000 r/min、4 ℃ 离心 5 min,小心倒掉 75% 乙醇;(8)室温下干燥沉淀 2 ~ 5 min,待乙醇完全挥发后,加入 60  $\mu$ L DEPC 水溶解沉淀;(9)用核酸定量仪测定 RNA 浓度,于 -80 ℃ 保存备用。

1.3.4 RNA 反转录为 cDNA 参照 PrimeScript(TaKaRa)反转录试剂盒说明书进行反转录反应,合成相应的 cDNA。1  $\mu$ L gDNA Eraser,2  $\mu$ L 5  $\times$  gDNA Eraser Buffer,1  $\mu$ L 样品 RNA,补加 Rnase Free dH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L,于 42 ℃ 水浴 2 min,即可得到消除基因组的 DNA 体系。在上述体系中,加入 Reaction solution from Step 1 10  $\mu$ L,5  $\times$  Primerscript Buffer 2 4  $\mu$ L,Primerscript Mix 1  $\mu$ L,RT Primer Mix 1  $\mu$ L,Rnase Free ddH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L,涡旋混匀,置于 PCR 仪中进行反转录,反应程序:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃ 保存。

1.3.5 引物的设计 为了筛选天麻中的软化酶,本研究在美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中查阅相关文献,以了解软化相关酶的种类,由于天麻软化相关酶基因在 NCBI 数据库上未见公布,因此选取与其同科植物的相关基因序列,用 BLAST 进行比对,选取高度保守的序列,结合引物设计的原则,用 Primer 5.0 软件<sup>[15]</sup>,每个基因设计 2 ~ 3 对引物,共设计 22 对引物。

1.3.6 通过普通 PCR 法筛选引物 以 cDNA 为模板,按照 PCR 反应体系将所需试剂依次加入 PCR 管中,具体反应体系为 0.6  $\mu$ L 模板 DNA,7.5  $\mu$ L Mix,0.7  $\mu$ L 上游引物,0.7  $\mu$ L 下游引物,5.5  $\mu$ L 灭

菌水,总体积 15  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,循环 34 次;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min,12  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.3.7 Real-time qPCR 检测软化相关酶编码基因的 mRNA 表达水平 Real-time qPCR 的具体操作参照 TaKaRa 的说明书,每个基因做 3 个重复,20  $\mu\text{L}$  反应体系:10  $\mu\text{L}$  SYBR,1.6  $\mu\text{L}$  上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ),1.6  $\mu\text{L}$  下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ),2  $\mu\text{L}$  cDNA 模板,4.8  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。采用两步法 PCR 反应程序,具体反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,循环 50 次;95  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min,12  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.4 数据统计

用 Excel 97-2003 进行数据整理并分析结果。



图1 不同包装方式天麻的表型特征

2.2 RNA 质量的检测

为了检测 RNA 的质量,随机选取部分 RNA 样品,并用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。从图 2 可以看出,所有样品总 RNA 的 28S、18S RNA 主峰单一、清晰无降解,说明提取的 RNA 质量较好,可用于后续研究。

2.3 引物的筛选

由于在 NCBI 等数据库中未检索到天麻软化相关酶的编码基因序列,因此本试验选取多个与天麻同科或同种植物软化相关酶的编码基因序列,经

2 结果与分析

2.1 天麻保鲜过程中的表型分析

本试验每隔 7 d 取样 1 次,同时拍照记录样品的表型。经统计发现,天麻在保鲜过程中的表型变化具有以下特征:(1)天麻在自然条件下(空白对照组)逐渐变软,颜色由白色变成淡黄色;(2)经茶多酚涂膜的天麻颜色与空白组相比差异不显著,用刀不易切开;(3)经过超高压处理的天麻整体变脆,很容易用小刀切成块状,且有汁液流出;(4)用茶多酚涂膜并进行超高压处理的天麻水分较多,取样后袋中有较多汁状液体残余,相较于其他 3 种处理方式样品的颜色更深(图 1)。

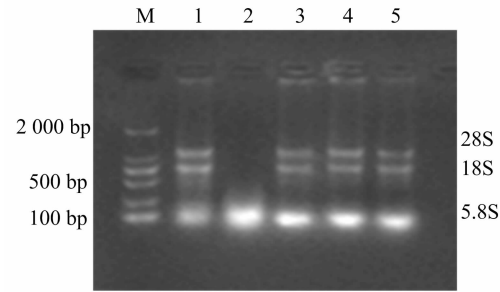


图2 不同处理天麻样品的 RNA 质量检测结果

BLAST 软件比对,选取高度保守序列,结合引物设计原则,用 Primer 5.0 工具,每个基因设计 2~3 对引物,共设计 22 对引物,其中 *Actin* 为内参基因引物,引物序列见表 1。

表 1 天麻软化表达酶相关基因引物

基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)
内参基因	Actin - F	GCAGCATGAAGATCAAGGTGG	111
	Actin - R	GCCTTAGAAATCCACATCTGTTG	
纤维素酶编码基因	CX - 1F	CGGATCACCAGATGCTGGG	155
	CX - 1R	GTAGGAACTGTCCGAGTCACCAAAT	
	CX - 2F	CTCATCTCACTCGCAAAGAAACAG	161
	CX - 2R	TTGCAGGGTATGGAATTAGGGT	
	CX - 3F	GAACCTCATCTCACTCGCAAAG	195
	CX - 3R	GGGCTAGAATACAGGTACTGAAATCC	
多聚半乳糖醛酸酶编码基因	PG - 1F	GTCCCAAAGAGTTCAAGCCACAC	150
	PG - 1R	ATCCGGAGTCCATTGGAGGTTT	
	PG - 2F	AGTGCAACCAACATTGTTTCCAG	165
	PG - 2R	AGCACTCGTTCCTCTTATGTTTTGG	
果胶裂解酶编码基因	PL - 1F	TTGGTTGATGCGATTTATGGG	126
	PL - 1R	GGTGATTTGCATGTCTTGTCTCTTG	
	PL - 2F	TGGTCCAAAGAAATGCCAAGATGTAG	125
	PL - 2R	TCTGTTCCCTTGGCTATTGATTGTA	
果胶甲酯酶编码基因	PME - 1F	CATCATCGGATACCAAGACACATTT	116
	PME - 1R	TTTGGAACACTACAGCCGCATTG	
	PME - 2F	GAACACGGGCATTTCTATCCAT	184
	PME - 2R	GAAATFCCCATTCCACTCAAGC	
甘露聚糖内切 1,4-β-甘露糖苷酶编码基因	1,4-β-1F	AGGGCTTGGATTTTGTTGTTTC	97
	1,4-β-1R	TGTGGTCTGCCTCCATAGTCCTT	
	1,4-β-2F	CAGTAAACGGTTGGGTTCAAGAGAT	110
	1,4-β-2R	CTTTTCCGGCATTTGTGTCGC	
木瓜蛋白酶编码基因	Papain - 1F	ATTGGAGAAAGAATGGAGCCG	110
	Papain - 1R	ATTGGAGAAAGAATGGAGCCG	
	Papain - 2F	TCTAATGGACCTTGCTTTTGAGTTC	119
	Papain - 2R	CTACCGGAGCATTTTCTTTGTTTGT	
	Papain - 3F	CAAACAAAGAAAATGCTCCGGTAGT	133
	Papain - 3R	AAGTCTGAGCCTCCAGCATCAATAG	
葡聚糖水二激酶编码基因	GWD - 1F	GCCGCATCTTTATCGGTGTTACTT	203
	GWD - 1R	GGAATTTCTCTTCTCCCTTGAC	
	GWD - 2F	TTGCTCTACCATTTGGAGTTTTTG	131
	GWD - 2R	TCTGCGTATTTACCAAGGGC	
组织蛋白酶编码基因	Cathepsin - F	CTTTTACTGTCTACGAGGATTTTGC	126
	Cathepsin - R	AGTCCTCTCCTTGCTCACTAGTTCC	
过氧化物酶编码基因	POD - F	AGTGCTTGTCAGGAGTTGA	134
	POD - R	GAGAGATGGCTGGAATAG	
超氧化物歧化酶编码基因	SOD - F	ATGAAAACATACAAAAAAGG	138
	SOD - R	ATGGACTCCCAGAGAAAAATC	
抗坏血酸过氧化物酶编码基因	APX - F	ATGGGAAAGTGCTACCTGT	128
	APX - R	ACAATGTCCTGGTCCGAAAG	
过氧化氢酶编码基因	CAT - F	TGGACTCTGGTGATGGTGTTA	142
	CAT - R	CAATGAGGGATGGCTGGA	

用 PCR 扩增后,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,由图 3、图 4 可以看出,只有组织蛋白酶 (Cathepsin) 和过氧化物酶 (POD) 扩增出相应条带,其他引物均未检测到条带。

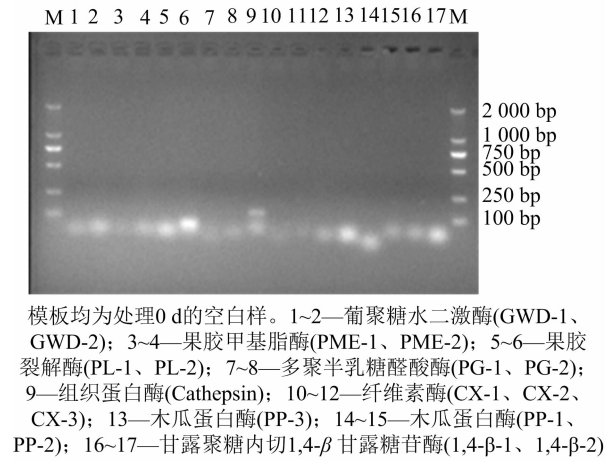


图3 9 种天麻软化酶 RNA 引物检测结果

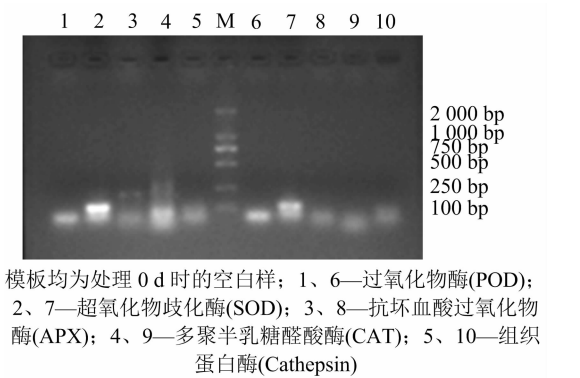


图4 5 种天麻软化酶 RNA 引物检测结果

2.4 天麻软化相关酶的表达趋势

以空白样 (处理 0 d) 为对照进行数据处理,并绘制成折线图。由图 5 可以看出,28 d 前,PL、Cathepsin 这 2 种酶的编码基因的 mRNA 水平变化趋势一致,都是先升后降;PME 则前期出现一个快速下降的趋势;Papain 的表达水平为先升高再降低;POD 相对表达量在处理 28 d 前与 Papain 相对表达

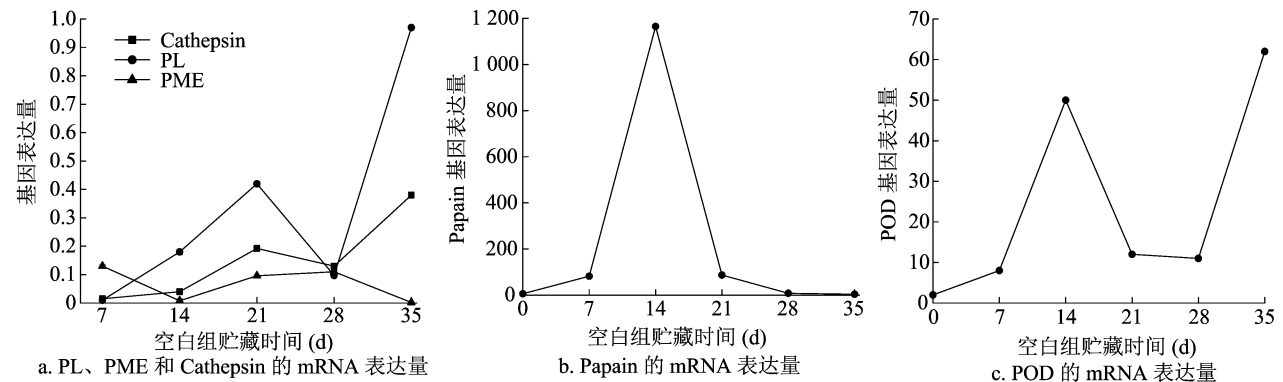


图5 空白组天麻软化酶的 mRNA 基因表达量

量变化趋势相似,但在处理 28 d 后则迅速升高。

2.5 PL 编码基因的相对表达量

本试验通过 qPCR 检测 PL 基因的 mRNA 相对表达量<sup>[16]</sup>,结果发现,PL 在所有天麻样品中都有表达,经过茶多酚涂膜的样品,其 PL 的相对表达量明显低于空白组;用超高压处理的天麻样品,在处理

14 d 时 PL 的表达量显著低于空白组,但是随着保鲜时间的增加,PL 的相对表达量明显升高;用茶多酚涂膜 + 超高压处理的天麻样品,在处理 14 d 时的表达量极显著高于空白对照组,并且随着保鲜时间的增加,其表达量迅速降低 (处理 21 d 左右),之后有所上升,但表达水平的变化差异不明显 (表 2)。

表 2 PL 的 mRNA 相对表达量

处理	不同处理时间 PL 的相对表达量				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白	1	11.00 ± 0.19	30.06 ± 2.02	6.08 ± 0.07	12.73 ± 0.13
茶多酚涂膜	1	0.10 ± 0.05 ***	0.05 ± 0.09 **	0.60 ± 0.09 **	0.22 ± 0.12 ***
超高压处理	1	4.53 ± 1.15 *	134.83 ± 8.21 **	266.80 ± 10.23 **	174.25 ± 10.25 *
茶 + 超	1	146.02 ± 10.25 **	0.62 ± 0.02 **	4.87 ± 0.08 *	6.45 ± 0.08 *

注: \* 表示与对照相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示与对照相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), \*\*\* 表示与对照相比差异十分显著 ( $P < 0.001$ )。下表同。

2.6 PME 编码基因的相对表达量

果胶甲酯酶可以降解植物细胞壁中的果胶,在植物中普遍表达。在处理时间为 14 d 时,茶多酚涂膜的天麻样品中 PME 的表达量低于空白对照组,而在处理时间超过 35 d 后则高于空白对照组;经茶多

酚涂膜 + 超高压处理的样品在处理前 21 d 均低于空白对照组,在处理 35 d 时略有升高;超高压处理样品 PME 的相对表达量表现为先升高后降低的趋势(表 3)。

表 3 PME 的 mRNA 相对表达量

处理	不同处理时间 PME 的相对表达量				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白	1	10.59 ± 1.32	1.50 ± 0.09	0.10 ± 0.01	3.89 ± 0.15
茶多酚涂膜	1	5.50 ± 0.58 *	0.46 ± 0.03 *	0.70 ± 0.13	36.50 ± 3.16 **
超高压处理	1	7.21 ± 0.32 *	15.03 ± 2.10 **	17.39 ± 2.21 **	1.37 ± 0.01
茶 + 超	1	1.32 ± 0.11 **	0.30 ± 0.01 **	0.86 ± 0.01 *	13.93 ± 1.04 *

2.7 POD 编码基因的相对表达量

过氧化物酶具有抗氧化性,经 qRCR 检测发现,处理 14 d 时,3 种不同处理方式的天麻样品中 POD 编码基因的相对表达量均低于空白对照组,但在处理 21 d 时,经超高压处理的天麻样品中 POD 编码基因的相对表达量极显著高于空白对照组,其他 2 种则与空白组差异不大;在处理 28 d 时,天麻样品

中 POD 编码基因的相对表达量均高于空白组,且茶多酚涂膜的天麻样品中 POD 编码基因的相对表达量提高了 20 倍;在处理 35 d 时,茶多酚涂膜、超高压处理的天麻样品中 POD 编码基因的相对表达量显著低于空白对照组,而茶多酚涂膜 + 超高压处理的天麻样品中 POD 的相对表达量与空白组略接近(表 4)。

表 4 POD 的 mRNA 相对表达量

处理	不同处理时间 POD 的表达量				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白	1	7.24 ± 0.13	0.24 ± 0.02	0.93 ± 0.01	5.66 ± 0.16
茶多酚涂膜	1	5.12 ± 0.04	0.11 ± 0.01	20.32 ± 3.21 **	0.99 ± 0.04 **
超高压处理	1	3.42 ± 0.11 *	5.94 ± 0.21 **	11.71 ± 2.10 **	0.07 ± 0.01 **
茶 + 超	1	1.62 ± 0.13 **	0.23 ± 0.02	4.99 ± 0.04 *	3.78 ± 0.02

2.8 Papain 编码基因

为了分析 Papain 在天麻软化过程中的表达情况,用 qPCR 检测 Papain 编码基因的表达水平。由表 5 可以看出,茶多酚涂膜处理的天麻样品的 Papain 编码基因相对表达量在处理前 28 d 均低于空白组,但在处理 35 d 后则略高于空白组;在超高

压处理下,天麻样品的 Papain 编码基因的相对表达量远远高于空白对照组,在处理 35 d 时提高 to 处理 7 d 时的 437 倍左右;在茶多酚涂膜 + 超高压处理下,天麻样品的 Papain 编码基因相对表达量在处理 14 d 时高于空白对照组,但在处理 21 d 时迅速降低,随后又缓慢提高,但都低于对照。

表 5 Papain 的 mRNA 相对表达量

处理	不同处理时间 Papain 的相对表达量				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白	1	3.77 ± 0.03	27.76 ± 3.82	3.81 ± 0.26	5.74 ± 0.21
茶多酚涂膜	1	3.00 ± 0.02	0.04 ± 0.01 **	0.14 ± 0.03 *	6.11 ± 0.52
超高压处理	1	25.02 ± 3.42 **	201.55 ± 17.30 **	423.14 ± 34.23 ***	436.55 ± 37.89 **
茶 + 超	1	11.47 ± 4.32 *	0.18 ± 0.01	0.80 ± 0.01 *	1.27 ± 0.03

2.9 Cathepsin 编码基因的相对表达量

Cathepsin 的主要功能是降解蛋白质,经 qPCR

检测发现,茶多酚涂膜处理的天麻样品 Cathepsin 编码基因的相对表达量始终低于空白对照组;在超高



压处理下,天麻样品的 Cathepsin 编码基因的相对表达量先升高后降低,且远远高于空白对照组;在茶多酚涂膜+超高压处理下,天麻样品的 Cathepsin 编码基因的相对表达量在处理 14 d 时提高

到处理 7 d 时的 103 倍,在处理 21 d 时提高至处理 7 d 时的 8 倍;在处理 35 d 时上

升到处理 7 d 时的 232 倍(表 6)。

表 6 不同处理时间 Cathepsin 的 mRNA 相对表达量

处理	不同处理时间 Cathepsin 的 mRNA 相对表达量				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
空白	1	1.90 ± 0.43	7.04 ± 0.45	4.89 ± 0.22	14.57 ± 2.54
茶多酚涂膜	1	0.40 ± 0.01 *	2.97 ± 0.32 *	1.58 ± 0.12	0.85 ± 0.17 **
超高压处理	1	58.69 ± 3.98 **	243.87 ± 26.47 ***	230.72 ± 28.04 ***	86.82 ± 13.44 **
茶+超	1	102.89 ± 6.34 ***	8.43 ± 2.04	165.99 ± 19.55 **	232.32 ± 18.9 **

3 讨论

近年来,关于天麻保鲜的研究主要集中在生理生化指标测定方面,随着科学技术的发展,相关研究正逐步向生物技术靠拢<sup>[17]</sup>。大量研究发现,果蔬的软化与细胞壁有密切关系,植物细胞壁的主要成分为纤维素、果胶,而高等植物细胞壁中果胶含量较高,是植物细胞间质的重要成分<sup>[18]</sup>,因此,与植物细胞壁有关的酶与天麻的软化程度密切相关<sup>[19]</sup>。目前关于天麻软化相关酶的报道较少,本试验选取与天麻同科或同属植物软化相关酶的基因序列,用 BLAST 进行序列比对,选取高度保守的序列,用 Primer 5.0 工具,每个基因设计 2~3 对引物,共设计 22 对引物,经过普通 PCR 扩增筛选及 qPCR 筛选,最终选取 PL、PME、Papain、POD 和 Cathepsin 等 5 种软化酶进行分析,分别在 3 种不同包装方式的天麻样品中检测了上述软化酶的表达差异。在天麻软化过程中,这 5 个基因的 mRNA 表达水平均受到影响,果胶裂解酶在经茶多酚涂膜后表达量显著降低,说明这种处理方式抑制了 PL 的表达,保鲜效果较好;而在经过 3 种不同包装方式处理后,PME 的表达水平变化以显著为主,说明 PME 的表达可能不受这 3 种包装方式的影响;经 3 种不同方式处理的天麻样品贮藏 35 d 时 POD 的相对表达量均低于空白组,说明 POD 减缓了天麻的氧化程度,具有较好的保鲜效果;经超高压处理后,Papain 的相对表达量升高,说明经过这种方式促进了 Papain 的表达,天麻软化程度加深,但经过茶多酚涂膜+超高压处理后的天麻 Papain 的相对表达量比超高压处理的天麻的表达量低,进一步说明茶多酚涂膜的保鲜效果较好;茶多酚涂膜的天麻样品组织蛋白酶的相

对表达量始终低于空白组,而其他处理方式的 Cathepsin 相对表达量升高,说明茶多酚涂膜有利于天麻的保鲜。综上所述,茶多酚对天麻保鲜的效果较好,而超高压处理反而促进了天麻的软化,推测可能是超高压处理时的温度、压强和处理时间不佳造成的;在分子水平上,天麻软化过程是由多个基因共同调控的,而本试验仅选取且研究了一小部分基因,不能够完全展现天麻在保鲜过程中的软化调控机制,天麻的软化相关基因的调控机制还需进一步探索,本试验的结果可为进一步的研究奠定基础,为天麻保鲜研究提供参考。

参考文献:

[1]曹 森,王 瑞,李 莹,等.不同保鲜剂处理对鲜天麻贮藏品质的影响[J].食品研究与开发,2019,40(23):71-76.  
[2]孙海燕,马 骏,郝丹青,等.超高压处理对鲜切天麻保鲜效果的影响[J].保鲜与加工,2019,19(5):53-58,65.  
[3]卢 琪,薛淑静,杨 德,等.乌红天麻干燥工艺研究[J].食品工业科技,2021,42(5):166-169,176.  
[4]张鑫雨.山楂果胶的体外抗氧化和抗糖基化活性及其应用研究[D].沈阳:辽宁大学,2019.  
[5]王 刚,贾展慧,张计育,等.‘拂李’果实软化相关基因 *PsPG* 的克隆与表达分析[J].植物资源与环境学报,2017,26(4):60-66.  
[6]李婷婷.1-MCP 复合壳聚糖涂膜抑制冷藏草莓软化机制的研究[D].合肥:安徽农业大学,2019.  
[7]Ren Y Y, Sun P P, Wang X X, et al. Degradation of cell wall polysaccharides and change of related enzyme activities with fruit softening in *Annona squamosa* during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 166: 111203.  
[8]周 敏,蒋 丹,刘玥秀,等. P119 驱动 amiRNA 介导的 *PL* 基因沉默对草莓果实硬度的影响[J]. 植物研究, 2019, 39(3): 441-449.  
[9]Ge Y H, Bin D, Li C Y, et al. Application of sodium silicate retards apple softening by suppressing the activity of enzymes related to cell wall degradation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,

孙钰洁,刁春友,闫晓阳,等. 江苏省蔬菜中农药残留超标风险状况分析及对策建议[J]. 江苏农业科学,2022,50(17):205-210.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.033

# 江苏省蔬菜中农药残留超标风险状况分析及对策建议

孙钰洁,刁春友,闫晓阳,王 晶,徐炜枫,韩 凯

(江苏省农产品质量检验检测中心,江苏南京 210036)

**摘要:**为了解江苏省蔬菜中农药残留超标风险状况,并提出针对性对策建议,搜集汇总 2019—2021 年江苏省蔬菜安全质量风险监测、监督检查及个人委托共计 25 197 份蔬菜样品农药残留检测结果,通过统计分析,得到以下几点结论:4 个季度中,农残超标风险由高到低的顺序是一季度、四季度、二季度、三季度。超标频次排名前 10 位的农药是毒死蜱、腐霉利、啉虫脲、多菌灵、阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐、烯酰吗啉、氟氯氰菊酯、吡虫啉、灭蝇胺。超标农药中氧乐果、氟虫腈有不可接受慢性摄入风险;腐霉利、啉虫脲、氟虫腈、克百威、多菌灵、灭蝇胺有不可接受急性摄入风险。超标率排名前 10 位的蔬菜是芹菜、普通白菜、茼蒿、萝卜、油麦菜、韭菜、茎用莴苣、辣椒、菠菜、蕹菜;超标率排名前 10 位的蔬菜按苏南、苏中、苏北区域统计,超标农药品种极少超过 5 个。这几点结论为采取加强设施栽培蔬菜绿色防控技术的推广应用、加强低风险用药技术的推广应用等针对性风险防控措施提供了可靠依据。

**关键词:**江苏省;蔬菜;农药残留超标风险;慢性摄入风险;急性摄入风险;分析及对策建议

**中图分类号:**S481<sup>+</sup>.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)17-0205-06

蔬菜在我国居民膳食结构中占据重要的地位,因此成为仅次于粮食生产的第二大种植作物<sup>[1]</sup>。多年来,经过多方努力,蔬菜质量安全水平得到极大提高,江苏省检测合格率稳定在 98% 以上。但由于大部分蔬菜易发生病虫害,加上种植规模大和种

植年份增加,病虫害发生基数不断累积,发生情况不断加重,防治压力仍在加大,农药使用量控减难度和进一步管控农药超标风险难度也有增无减<sup>[2]</sup>。分析蔬菜农药残留超标风险状况,可为采取针对性农药残留超标风险管控措施提供可靠的依据<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 蔬菜样品和抽样方法

本研究数据来源于 2019—2021 年江苏省省级蔬菜质量安全风险监测、省市级监督检查及个人委托,共计 25 197 份蔬菜样品的检测结果。蔬菜样品皆为江苏省内生产量和消费量较大的品种,调味蔬

收稿日期:2022-05-31

基金项目:江苏省省级农产品质量安全专项风险监测项目(编号:2019-SJ-021、2020-SJ-020-1、2021-SJ-068-1)。

作者简介:孙钰洁(1985—),女,江苏扬州人,硕士,高级农艺师,主要从事农产品质量安全方面的研究。E-mail:261668163@qq.com。  
通信作者:韩 凯,硕士,高级农艺师,主要从事农产品质量安全方面的研究。E-mail:2832526312@qq.com。

2019,99(4):1828-1833.

[10] Paniagua C, Ric - Varas P, García - Gago J A, et al. Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(22): 7103-7117.

[11] Meng G, Fan W Y, Rasmussen S K. Characterisation of the class III peroxidase gene family in carrot taproots and its role in anthocyanin and lignin accumulation [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 167: 245-256.

[12] 关正萍,郭少珏,肖春玲,等. 低温处理对鲜切马铃薯片保鲜的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(15):230-234.

[13] 谢正林,庄炜杰,许俊齐,等. 木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶对牛肉的嫩化效果研究[J]. 天津农业科学,2019,25(10):64-67.

[14] Tatsuki M, Sawamura Y, Yaegaki H, et al. The storage temperature affects flesh firmness and gene expression patterns of cell wall -

modifying enzymes in stony hard peaches [J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 181: 111658.

[15] 廖光联,钟 敏,黄春辉,等. 果实糖代谢及其相关酶基因研究进展[J]. 江西农业大学学报,2020,42(1):187-195.

[16] Portakal S H, Kanat B, Sayan M, et al. A novel method for conserved sequence extraction with prospective mutation prediction for SARS - CoV - 2 PCR primer design [J]. Journal of Virological Methods, 2021, 293: 114146.

[17] 王小璐. 24-表油菜素内酯对猕猴桃果实冷藏品质的影响及其机理[D]. 西安:西北大学,2020.

[18] 王志华,王文辉,姜云斌,等. 不同采收期对苹果常温贮藏品质和衰老的影响[J]. 农业工程学报,2020,36(7):300-306.

[19] 邹 金. 赤霉素处理下甜樱桃果实转录组分析及成熟软化相关基因表达分析[D]. 雅安:四川农业大学,2019.