

杨俊,何文,钟玉蝶,等. 树冠覆膜对柑橘春见果实品质影响的转录组分析[J]. 江苏农业科学,2025,53(22):59-65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.22.007

# 树冠覆膜对柑橘春见果实品质影响的转录组分析

杨俊<sup>1</sup>,何文<sup>2</sup>,钟玉蝶<sup>3</sup>,伏晓科<sup>1</sup>,李斌斌<sup>1</sup>,向娟<sup>1</sup>

(1. 眉山职业技术学院,四川眉山 620020; 2. 四川农业大学园艺学院,四川成都 611130; 3. 四川省成都市农业技术推广总站,四川成都 610041)

**摘要:**为阐明树冠覆膜对春见柑橘果实品质的影响,比较套袋结合树冠覆膜(PF)与常规套袋(CK)处理下果实的生理特性及转录组差异。测定对比了2种处理下的树冠光照度和叶片SPAD值,分析果实外观(单果重、果皮厚度和可食率等)和内在品质(可溶性固形物、维生素C和可滴定酸含量等)差异。转录组测序后,利用差异表达基因筛选和加权基因共表达网络(WGCNA)解析转录水平差异。结果表明,覆膜处理显著降低树冠光照度(降幅41.7%),虽未显著抑制叶绿素合成(SPAD值无显著差异),但单果重增加21.3%,同时果皮增厚、可食率降低,且覆膜处理提高了维生素C含量。转录分析发现,覆膜仅诱导92个差异表达基因,其中ABA信号通路关键基因PP2C(MSYJ079030)显著上调,WGCNA分析证实ABA在覆膜果实发育中起核心调控作用。果皮增厚可能与木质素合成酶基因COMT(MSYJ095360)相关,而鉴定到的关键转录因子bHLH(MSYJ223830)和ERF(MSYJ114220)可作为分子标记辅助育种候选基因。表明高糖品种可以通过缩短覆膜周期以平衡果皮发育与糖积累。

**关键词:**树冠覆膜;果实品质;加权基因网络;次级代谢;激素信号

**中图分类号:**S188;S666.04 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)22-0059-07

柑橘(*Citrus*)是世界和我国最重要的水果之一<sup>[1]</sup>。春见(*Citrus reticulata* cv. Chunjian)因其高糖、果大且丰产备受消费者青睐,但因在四川地区成熟期为次年2—3月,易受到低温冻害<sup>[2-3]</sup>。近年来,树冠覆膜技术已在四川地区广泛使用,表现出良好的防寒保护效果<sup>[4-5]</sup>。覆膜可以提高树冠日间温度和昼夜温差,但因光照度降低会造成净光合速率普遍下降<sup>[6-9]</sup>。有关树冠覆膜对柑橘果实品质的影响已有报道,如覆膜可延长砂糖橘果实的采收期<sup>[10]</sup>,显著增加沃柑果皮脱落酸(ABA)含量促进果皮着色<sup>[11]</sup>,但其转录调控机制的研究尚不完善。本研究以红橘砧春见为试材,对比套袋处理结合树冠覆膜(PF)与常规套袋(CK)处理对果实外观及内在品质的影响并结合转录组分析,旨在阐明覆膜对春见实品质的影响。研究成果将为树冠覆膜技术的优化和柑橘品质改良的分子育种提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及处理

试验于2024年11月中旬开始进行果实套袋结合单行树冠覆膜(PF),以不覆膜为对照(CK),在四川省眉山市眉山职业技术学院实践基地进行,试验材料为生长一致的10年生红橘砧春见,株行距为3 m×4 m,常规肥水管理。2025年4月7日,每个处理从每株树的东南西北4个方向各采集3个大小相近、健康完整的果实,每10株为1个重复,共计3个生物学重复。同时,在2025年4月7日下午2点使用照度计测定(德力西)光照度,叶片SPAD值使用SPAD-502Plus叶绿素计(柯尼卡美能达)测定。

### 1.2 果实外观品质分析

擦净果皮后,使用百分之一电子天平(单位用g表示)测定单果重。使用C-400 colorimeter色差计(柯尼卡美能达)测定果皮的 $L^*$ 值(亮度)、 $a^*$ 值(红色度)和 $b^*$ 值(黄色度)。

### 1.3 果实内在品质分析

在每个样果对称部位切取2块,去果皮用纱布包裹后挤压果汁于洁净干燥的烧杯中,混合搅拌均匀后用于测定相关指标。使用PAL-1手持式折光仪(ATAGO)测定可溶性固形物含量。采用0.1 mol/L NaOH滴定法测定可滴定酸含量,采用

收稿日期:2025-06-09

基金项目:四川省科普培训项目(科普作品创作类)(编号:2025JDKP0118);眉山市指导性科技计划(编号:2023KJZD083)。

作者简介:杨俊(1976—),男,四川丹棱人,硕士,副教授,主要从事果树栽培与技术推广研究。E-mail:scmsyangjun@qq.com。

通信作者:伏晓科,硕士,讲师,主要从事果树栽培与采后生理研究。E-mail:1175912581@qq.com。

2,6-二氯酚靛酚滴定法测定维生素 C 含量<sup>[12]</sup>。

### 1.4 RNA 提取、文库构建及生物信息学分析

使用天根生化科技(北京)有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取各个样品的总 RNA。反转录为 cDNA, -80 ℃ 保存,用于建库测序及 qRT-PCR。质量检测合格后,使用 MGI-T7 测序平台对 6 个样品进行测序。

测序得到的原始数据,经 Trimmomatic 软件进行质量控制处理后<sup>[13]</sup>,使用 hisat2 软件将 clean reads 比对到 *Citrus reticulata*(v1.0)参考基因组<sup>[14]</sup>,利用 R 包 htseq-count<sup>[15]</sup>、GenomicFeatures 和 DESeq2 分别计算 reads counts 数、FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 和差异基因 ( $q < 0.1$  and  $|\log_2(\text{fold-change})| >$

1.0)<sup>[16-17]</sup>,使用 WGCNA 对基因进行模块分析<sup>[18]</sup>,利用 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 对 DEGs (differentially expressed genes) 进行富集分析。

### 1.5 定量分析

引物经 Primer 5 设计完成,具体信息见表 1,内参基因选用 GAPC2<sup>[19]</sup>,所有引物由生工生物工程(上海)股份公司合成。实时定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 在 CFX96 Touch™ 荧光 PCR 检测系统(美国伯乐公司)上完成。体系(10 μL)的配制和程序设置根据 PerfectStart™ Green qPCR SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司)的操作说明进行。基因的表达量数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  计算。

表 1 6 个差异表达基因 qRT-PCR 的引物序列

基因名称	基因注释	引物序列(5'→3')
MSYJ223830	bHLH 转录因子家族成员	F:TTTGTCTAGCCGAATGCCG;R:TGGCGCCATTGTTCTTCACA
MSYJ114220	AP2/ERF 转录因子家族成员	F:ATGACAAAGAAGCCCGCAAG;R:GGAAAAGAGAAGGAAGGGGAC
MSYJ079030	PP2C	F:GGTTGTACGGCTCCTGCTTC;R:GAGCTGCTGCCTCTGTGACA
MSYJ040640	细胞分裂素降解酶	F:TCCACACAGGTGAGCTGCCT;R:CCCACGGTAAGGTGGAGGT
MSYJ095360	木质素合成关键酶 COMT	F:GGCCTTGCACCCGTCTGTAA;R:ATTTCATCCCGTAGGCCATGT
MSYJ221820	黄酮醇糖基转移酶	F:TGGTTGCCGGTCTTGTGG;R:GTTGCAGGGAACCCATCGGG

### 1.6 数据统计与分析

数据统计和分析使用 Excel 和 IBM SPSS Statistics 20.0 软件进行,图表使用 GraphPad Prism (v 10.2.0) 和 TBtools 绘制。

## 2 结果与分析

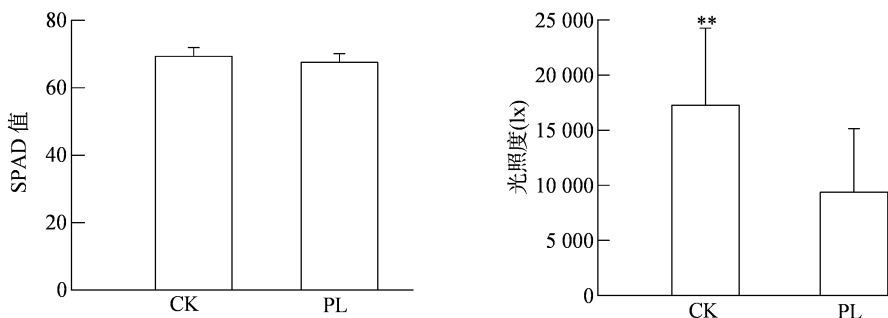
### 2.1 覆膜对光照度及春见叶片 SPAD 值的影响

如图 1-A 所示,树冠覆膜(PL)对叶片 SPAD 值无显著差异,但无覆膜(CK)的叶片 SPAD 值(69.31)略高于 PL 的叶片 SPAD 值(67.52)。树冠

覆膜造成树冠白天的光照度显著低于 CK,分别为 9 362、16 067 lx(图 1-B)。说明覆膜会直接阻挡照射到树冠的阳光,但未显著影响叶片叶绿素含量。

### 2.2 覆膜对果实外观品质的影响

由图 2 可知,PL 处理较 CK 处理的果实单果重极显著提高 21.3%,PL 处理和 CK 处理分别为 322.6、212.8 g,表明覆膜可能促进了果实膨大。2 个处理的果形指数(纵径/横径)均接近球形(0.97~1.03),无显著差异。但 PL 处理果实的果皮厚度(3.63~6.93 mm)高于 CK 处理(2.72~4.36 mm),



果实套袋结合单行树冠覆膜(PF),以不覆膜为对照(CK),\*表示具有显著差异( $P < 0.05$ ),\*\*表示具有极显著差异( $P < 0.01$ ),下同

图 1 覆膜对“春见”叶片 SPAD 值(A)和光照度(B)的影响

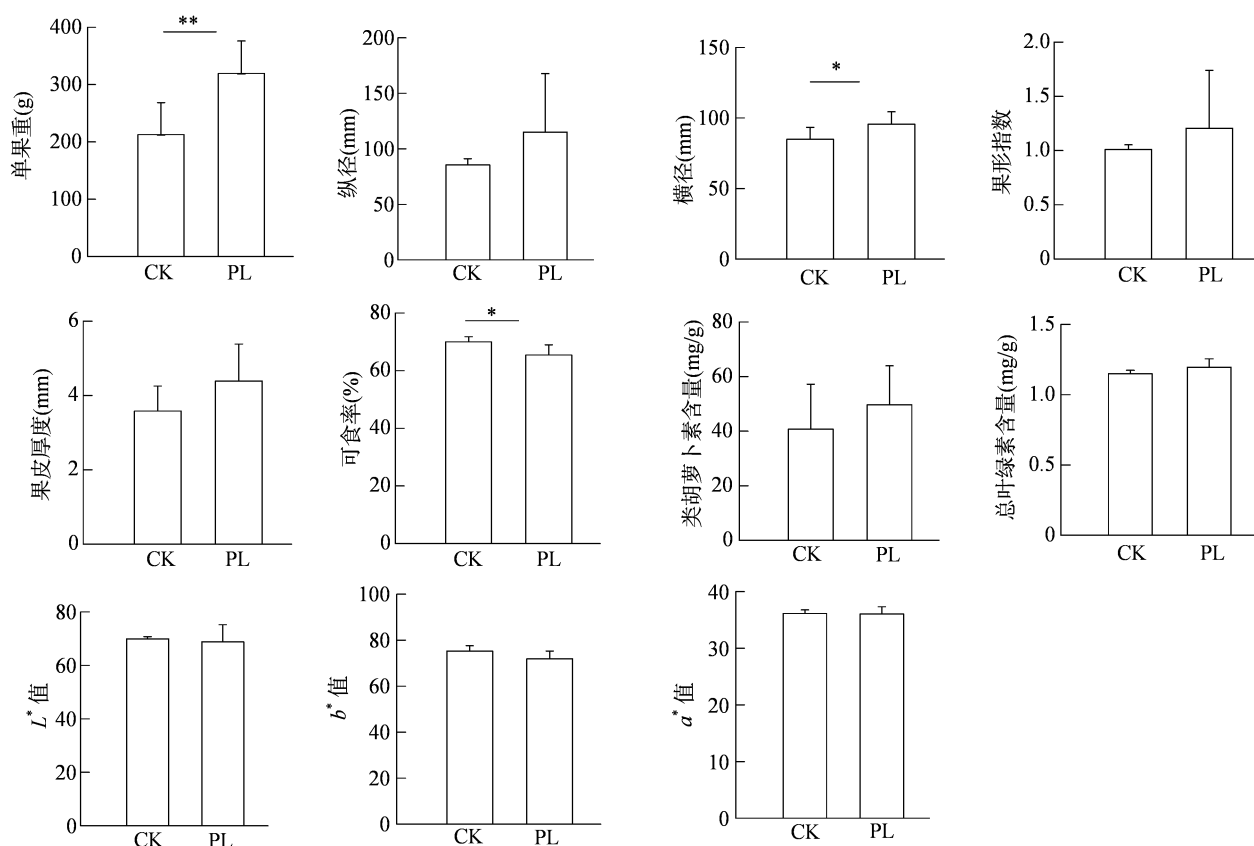


图2 覆膜对春见果实外观品质的影响

因此造成了可食率(67.7% ~71.5%)低于 CK 处理(60.7% ~72.4%)。果皮类胡萝卜素含量和叶绿素含量在 2 个处理之间无显著差异,且果实外观色泽( $L^*$  值、 $a^*$  值、 $b^*$  值)无显著差异。

### 2.3 覆膜对果实内在品质的影响

由图 3 可知,CK 处理的可溶性固形物含量范围为 12.7% ~14.5%,显著高于 PL 处理的 9.9% ~14.3% (PL 组均值降低约 8.6%)。2 个处理的果实可滴定酸含量差异较小,但 CK 处理的果实因糖含量稳定且酸度适中,固酸比整体较高(22.7 ~53.7);PL 处理的果实糖分波动大且存在高酸样本,固酸比变异幅度较大(18.0 ~56.8),因此覆膜可能导致果实成熟度不一致。PL 处理的维生素 C 含量最高值达 55.73 mg/100 g,较 CK 组最高值(35.75 mg/100 g)高 56%,表明覆膜可能促进了抗坏血酸的积累。2 个处理果肉的类胡萝卜素和叶绿素含量无显著差异。

### 2.4 差异表达 mRNA 分析

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 与 RNA 测序 (RNA-Seq) 的基因表达水平基本一致,且呈现良好的正相关关系( $r^2 = 0.98$ )。转录组结果分析表

明,共有 92 个 mRNA 差异表达 ( $|\log_2(\text{fold change})| > 1.0$ )。其中,PL 较 CK 有 42 个 mRNA 上调表达,50 个 mRNA 下调表达(图 4),其中包含 2 个转录因子,分别为 *bHLH* 基因 (MSYJ223830) 和 *ERF* 基因 (MSYJ114220)。这些基因可能在光照影响柑橘品质调控中起关键作用。

对差异基因进行 KEGG 富集分析(图 5),结果表明次级代谢物生物合成 (ko01110) 途径富集程度最高,包含 12 个基因(占差异表达基因的 63.2%),其中 *CKX* (MSYJ040640) 为细胞分裂素降解酶,可能参与调控果实细胞分裂,木质素合成关键酶基因 *COMT* (MSYJ095360) 可能与果皮增厚直接相关,黄酮醇糖基转移酶基因 *FG2* (MSYJ221820) 可能影响果实色泽。植物激素信号 (ko04075) 中编码蛋白磷酸酶 *2CPP2C* (MSYJ079030) 基因参与 ABA 信号传导,可能在果实发育过程中起关键调控作用。

### 2.5 加权基因共表达网络分析

对 PL 处理和 CK 果实样品的 6 个转录组数据进行分析,将表达矩阵中变异度较低的基因进行过滤后,选取 5 878 个基因进行 WGCNA 分析,共获得 19 个基因共表达模块(图 6),各模块中所包含的基

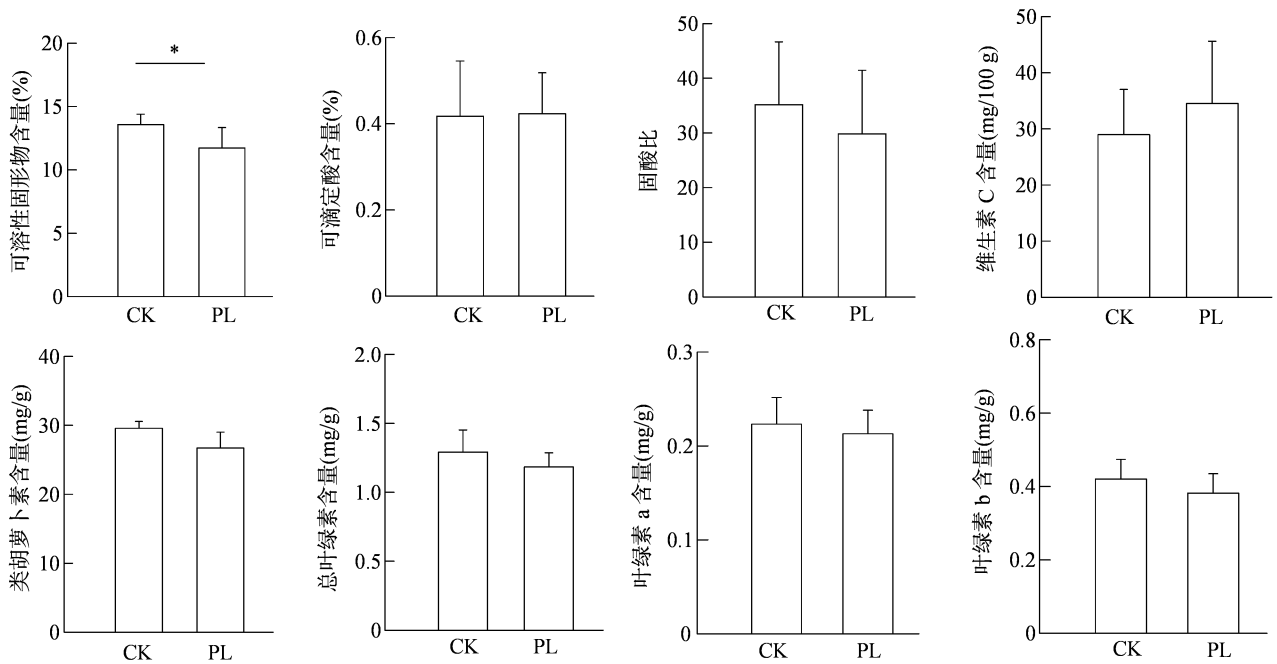


图3 覆膜对春见果实内在品质的影响

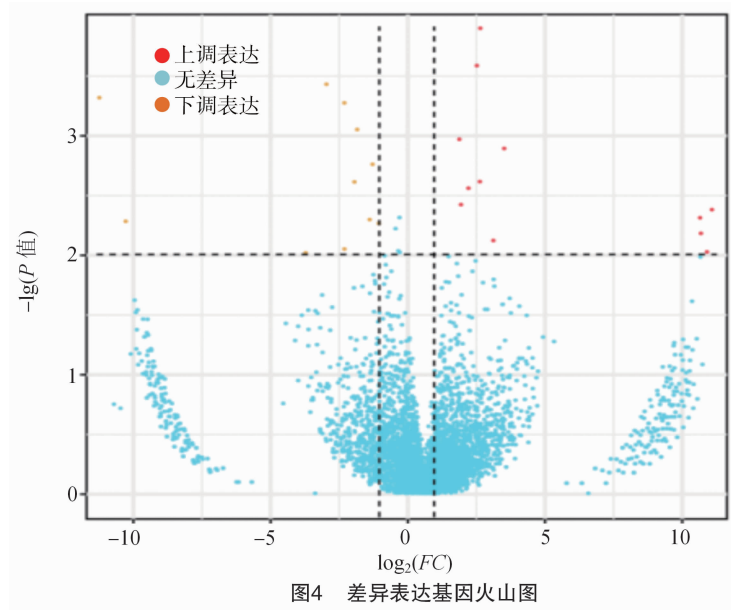


图4 差异表达基因火山图

因数量差异显著(1 ~ 3 069 个基因),其中 turquoise 模块中的基因数量最多(3 069 个),grey 模块中的基因数量最少(1 个)。

进一步与内在品质进行关联分析,结果显示 green 模块内基因正调控可溶性固形物含量,yellow 模块内基因正调控固酸比。同时,nightblue 模块内基因同时与可滴定酸含量( $R=0.80$ )和维生素 C 含量( $R=-0.88$ )显著相关,暗示其可能参与果实酸代谢的调控通路。后续将重点挖掘 green 和 nightblue 模块中的核心调控基因及其潜在功能。

## 2.6 基因共表达模块的 KEGG 分析

通过 KEGG 通路富集分析 green 模块,在候选基因集中鉴定到 70 条显著富集的代谢通路( $P < 0.05$ )。其中氨基酸酰基-tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)通路富集程度最高,包含 4 个关键基因:甲硫氨酰-tRNA 合成酶(MSYJ223730)、谷氨酰-tRNA 合成酶(MSYJ197790)、组氨酰-tRNA 合成酶(MSYJ286640)、赖氨酰-tRNA 合成酶(MSYJ082790)基因。12 个基因富集于次生代谢物生物合成通路(biosynthesis of secondary metabolites),

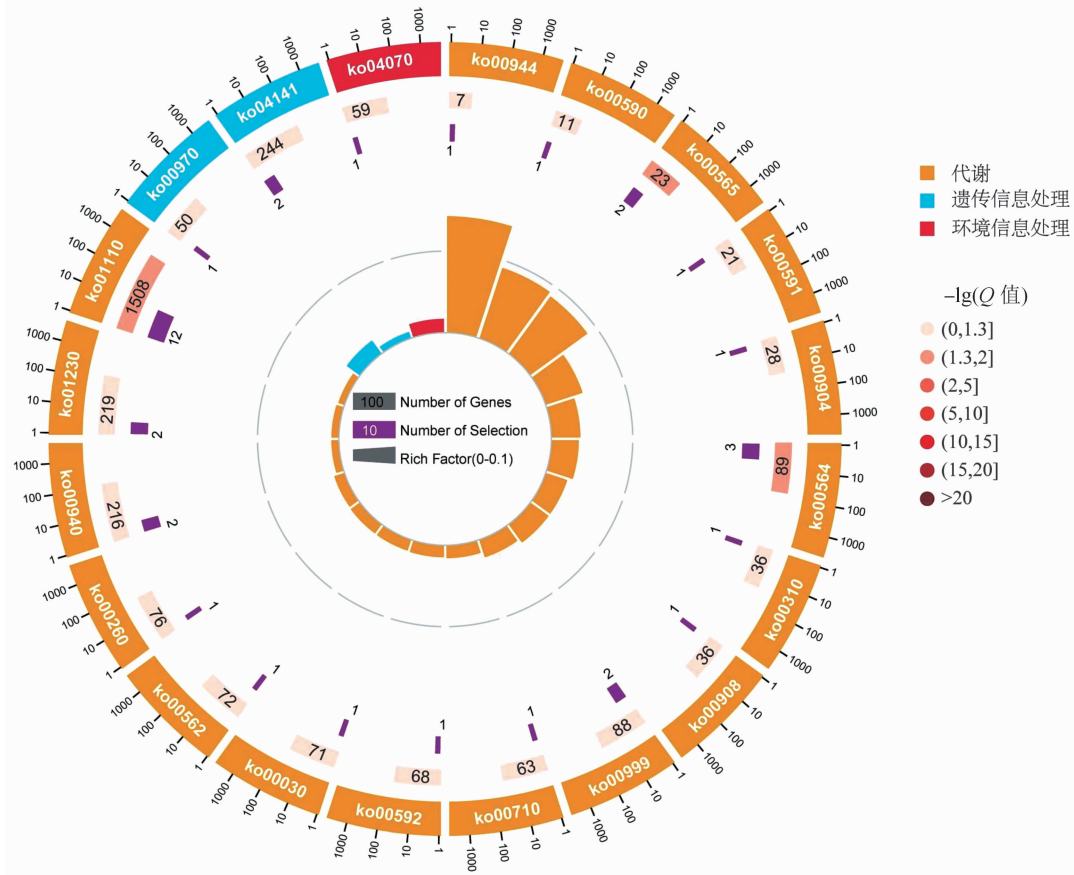
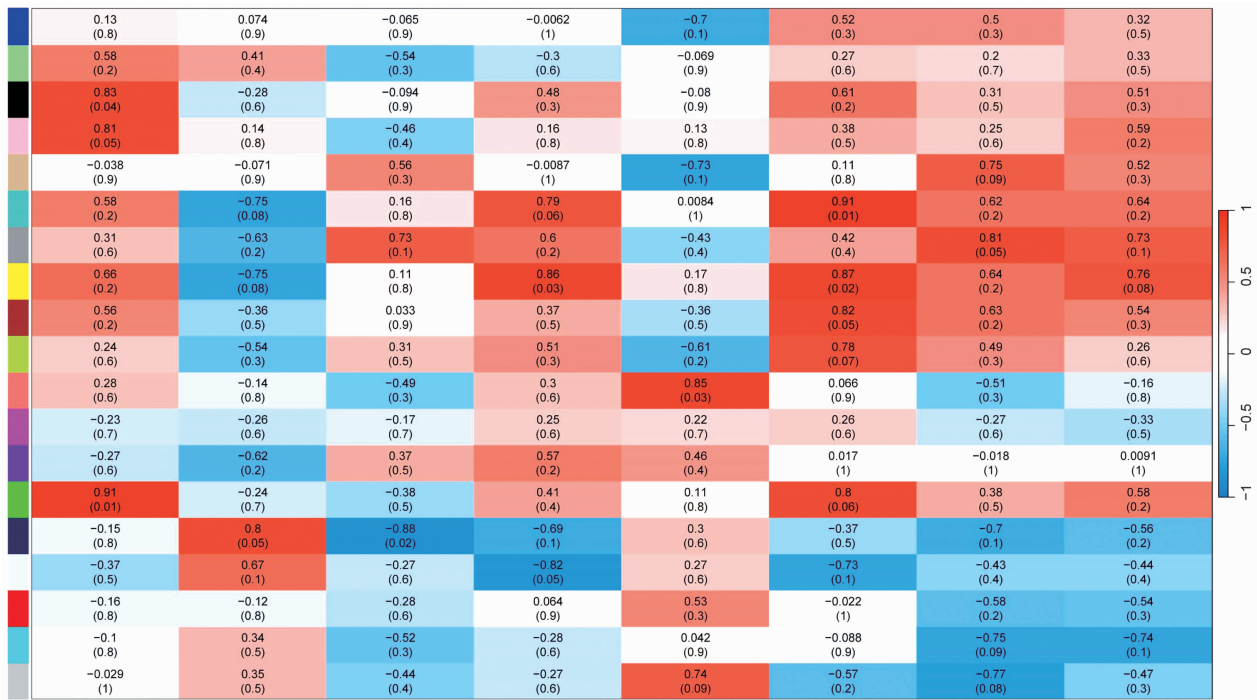


图5 差异基因的 KEGG 富集分析



横坐标代表不同表型，纵坐标代表不同模块。图中每组数据表示模块与表型的相关性系数  $R$  值及显著性  $P$  值(括号内)。

红色代表模块与表型具有正相关，蓝色代表模块与表型呈负相关

图6 模块与表型的相关性分析

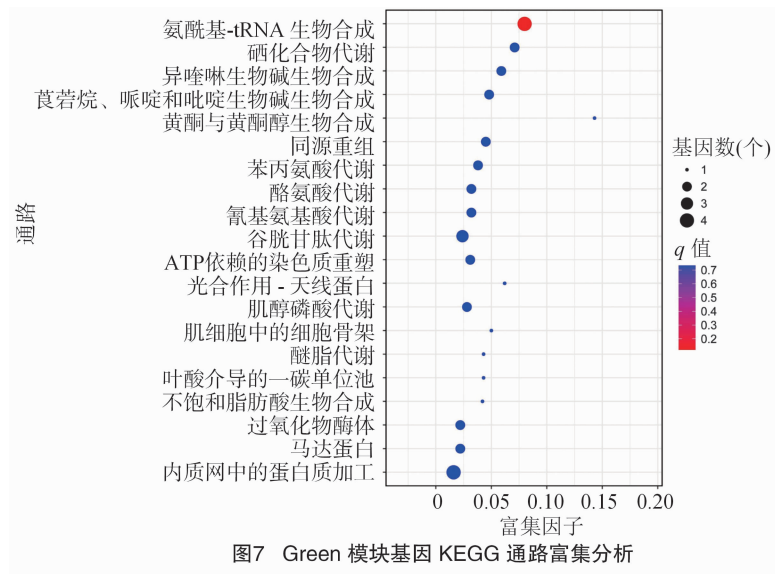


图7 Green 模块基因 KEGG 通路富集分析

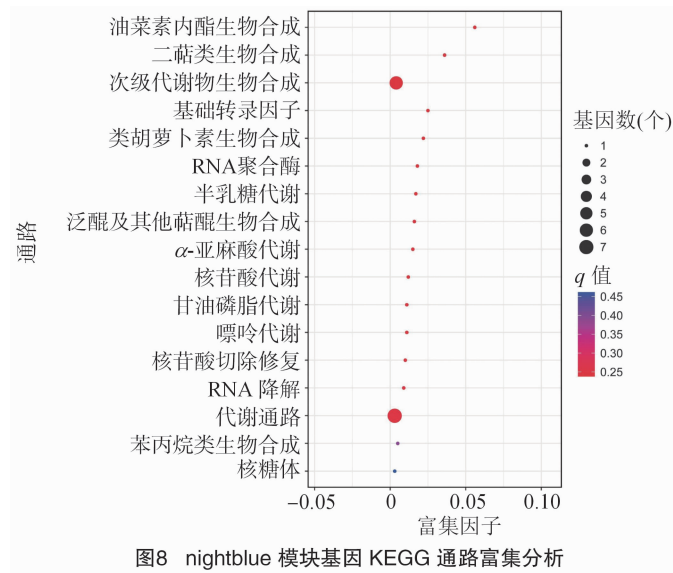


图8 nightblue 模块基因 KEGG 通路富集分析

包括类黄酮合成关键酶黄酮醇-O-葡萄糖基转移酶 (MSYJ185610)、苯丙烷合成酶莽草酸羟基肉桂酰转移酶 (MSYJ074890) 基因。

通过 KEGG 通路富集分析 nightblue 模块, 鉴定到 17 条显著富集的代谢通路 ( $P < 0.05$ )。其中油菜素内酯生物合成 (brassinosteroid biosynthesis) 通路富集程度最高 ( $P = 0.036$ ), 包含关键基因催化油菜素内酯合成关键步骤 CYP92A6 羟化酶 (MSYJ012480), 其他重要富集通路包括: 二萜类生物合成 (diterpenoid biosynthesis,  $P = 0.056$ )、参与赤霉素合成的赤霉素 3 $\beta$ -双加氧酶 (MSYJ104260)、赤霉素合成酶 (MSYJ104260)、脱落酸合成关键酶 NCED (MSYJ169960) 等。

### 3 讨论与结论

树冠覆膜是柑橘抵抗低温胁迫的有效手段之一, 但覆膜对果实品质影响的相关研究仍较少。本试验结果显示, 树冠覆膜 (PL) 通过显著改变树冠微环境 (如光照度) 对春见果实品质产生了复杂影响。覆膜使到达树冠的光照度降低约 41.7%, 结果与其他研究结果<sup>[8]</sup>类似。尽管叶片 SPAD 值在 PL 处理和对照 (CK) 间无统计学差异, 但 CK 处理的叶片 SPAD 值略高, 表明持续弱光环境下, 叶片可能发生轻微的适应性调整, 但未达到显著抑制叶绿素合成的程度, 这与范七君等在金柑上的观察<sup>[8]</sup>不同, 可能是春见叶片更加适应弱光。

PL 处理对果实色泽影响不大,这可能是因为 2 个处理均采用了套袋技术。PL 处理的果实维生素 C 含量较 CK 处理高,该结果与在砂糖橘上的研究结果<sup>[20]</sup>类似。本研究表明,覆膜可显著提高单果重,但会增加果皮厚度。其中 *CKX*(MSYJ040640)可能参与调控果实细胞分裂,影响果实发育进程<sup>[21]</sup>; 差异基因 *COMT*(MSYJ095360)是木质素合成关键酶<sup>[22]</sup>,其可能与果皮增厚直接相关。对样品进行 RNA-Seq 分析,结果显示差异表达基因仅为 92 个,表明覆膜对果实的转录调控影响并不大。内源激素直接调控果实生长发育<sup>[23]</sup>。值得注意的是,编码蛋白磷酸酶 2C(MSYJ079030)基因 *PP2C* 在本试验中差异表达( $\log_2 FC = 3.80$ ),其参与 ABA 信号传导<sup>[24]</sup>,WGCNA 结果也表明 ABA 可能在覆膜条件下的果实发育过程中起关键调控作用。同时,差异基因中鉴定出 2 个转录因子 *bHLH* 基因(MSYJ223830)和 *ERF* 基因(MSYJ114220)<sup>[25-26]</sup>,可能是本试验中差异性状的关键调控转录因子。本研究为柑橘覆膜技术优化及靶向育种提供了理论支撑。

本试验结果表明,针对高糖需求品种可缩短覆膜周期以平衡果皮发育与糖积累,ABA 在覆膜条件下的果实发育中起关键调控作用。转录水平分析结果表明,2 个转录因子 *bHLH* 基因(MSYJ223830)和 *ERF* 基因(MSYJ114220)可作为分子标记辅助选择。未来需结合蛋白质组及代谢组,解析覆膜影响品质的转录后调控网络,并在多发育时期、多品种中验证调控基因功能。

#### 参考文献:

- [1] 邓秀新. 中国柑橘育种 60 年回顾与展望[J]. 园艺学报,2022,49(10):2063-2074.
- [2] 曾瑶,杨万云,陈德勇,等. 2020/2021 年冬季眉山晚熟柑桔冻害调查[J]. 中国南方果树,2021,50(5):50-53.
- [3] 杨万云,曾瑶,彭良志,等. 四川眉山晚熟柑橘果实冻害调查与影响因素分析[J]. 中国南方果树,2022,51(6):1-9,15.
- [4] 曾瑶,周上铃,尹杭,等. 新型环保防寒布对春见晚熟橘橙防冻效果的影响[J]. 果树学报,2023,40(2):252-261.
- [5] 陈婷婷. 不同覆膜方式对柑橘产量及品质的影响[J]. 特种经济动植物,2023,26(2):13-15.
- [6] 王振兴,彭良志,淳长品,等. 树冠直接覆膜对清见橘橙树冠内环境因子的影响[J]. 果树学报,2011,28(2):199-203.
- [7] 范七君,陈传武,刘萍,等. 树冠覆膜对砂糖橘光合作用及果实品质的影响[J]. 中国农学通报,2021,37(22):57-62.
- [8] 范七君,陈传武,邓崇岭,等. 树冠覆膜对金柑光合作用及果实品质的影响[J]. 广西植物,2020,40(7):1046-1053.
- [9] 曹金华,张书芬,朱家成,等. 越冬期覆膜对甘蓝型冬油菜生长及产量的影响[J]. 江苏农业学报,2023,39(7):1492-1500.
- [10] 唐艳,刘萍,陈传武,等. 树冠覆膜对砂糖橘留树过程中品质变化的影响[J]. 南方农业学报,2018,49(11):2256-2262.
- [11] 范七君,牛英,陈传武,等. 树冠覆膜对沃柑果实颜色及激素含量的影响[J]. 南方园艺,2024,35(1):1-5.
- [12] 熊庆娥. 植物生理学实验教程[M]. 成都:四川科学技术出版社,2003.
- [13] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [14] Wang L, He F, Huang Y, et al. Genome of wild mandarin and domestication history of mandarin[J]. Molecular Plant, 2018, 11(8):1024-1037.
- [15] Anders S, Pyl P T, Huber W. HTSeq: a Python framework to work with high-throughput sequencing data[J]. Bioinformatics, 2015, 31(2):166-169.
- [16] Lawrence M, Huber W, Pagès H, et al. Software for computing and annotating genomic ranges[J]. PLoS Computational Biology, 2013, 9(8):e1003118.
- [17] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12):550.
- [18] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9:559.
- [19] Mafra V, Kubo K S, Alves-Ferreira M, et al. Reference genes for accurate transcript normalization in *Citrus* genotypes under different experimental conditions[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e31263.
- [20] 麦适秋,梅正敏,罗世杏,等. 盖膜期间砂糖橘果实品质变化规律的研究[J]. 广西植物,2014,34(4):561-564,466.
- [21] 李旭飞,杨盛迪,李松琦,等. 葡萄 *VICKX4* 表达特性分析与转录调控预测[J]. 中国农业科学,2023,56(1):144-155.
- [22] Guillaumie S, Goffner D, Barbier O, et al. Expression of cell wall related genes in basal and ear internodes of silking brown-midrib-3, caffeic acid *O*-methyltransferase (*COMT*) down-regulated, and normal maize plants[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8:71.
- [23] Koshita Y, Takahara T. Effect of water stress on flower-bud formation and plant hormone content of *Satsuma* mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 99(3/4):301-307.
- [24] Romero P, Lafuente M T, Rodrigo M J. The *Citrus* ABA signalosome: identification and transcriptional regulation during sweet orange fruit ripening and leaf dehydration[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(13):4931-4945.
- [25] Liu W, Li Q W, Wang Y, et al. Ethylene response factor AtERF72 negatively regulates *Arabidopsis thaliana* response to iron deficiency[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 491(3):862-868.
- [26] Ding Y, Liu N, Virilouvet L, et al. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13:229.