

# 苹果红色芽变香气组分及脂肪酸代谢相关酶活性分析

王传增<sup>1,2</sup>, 张艳敏<sup>1</sup>, 徐玉亭<sup>1</sup>, 董飞<sup>1</sup>, 宋杨<sup>1</sup>, 刘美艳<sup>1</sup>, 刘金<sup>1</sup>,  
陈学森<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> 山东农业大学作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; <sup>2</sup> 山东省果树研究所, 山东泰安 271000)

**摘要:** 利用固相微萃取 (SPME) 气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用技术, 分析了富士、国光与红将军等苹果品种及其红色芽变品系的果实香气成分; 进一步研究了国光及其红色芽变品系果实发育期间香气脂肪酸代谢途径相关酶的活性。①从 8 个参试苹果品种成熟果实中共鉴定出共 8 类 116 种香气成分, 酯类 67 种 (57.8%), 占绝对优势; ②红色芽变品系与其对照相比, 香气成分种类无规律性变化, 但共有组分的含量、特征香气成分的香气值总和、酯类含量及香气总含量等均明显高于各自的对照; ③在果实发育末期, 红色芽变的脂肪酸代谢途径 4 个关键酶活性均呈上升趋势, 且高于对照。

**关键词:** 苹果; 红色芽变; 香气成分; 代谢酶

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 12-2447-10

## Analysis of Aroma Components and Related Enzymes of Fatty Acid Metabolism of Red Bud Sports

WANG Chuan-zeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan-min<sup>1</sup>, XU Yu-ting<sup>1</sup>, DONG Fei<sup>1</sup>, SONG Yang<sup>1</sup>, LIU Mei-yan<sup>1</sup>,  
LIU Jin<sup>1</sup>, and CHEN Xue-sen<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; <sup>2</sup>Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000, China)

**Abstract:** Apple fruit aroma components of 4 bud sport variants of Fuji, Rall and Red Fuji together with that of their respective mother plants as the control were analyzed by solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The activity changes of enzymes related with aroma and fatty acids metabolism in the growth stage was further characterized in Rall and its bud sport variant, which was aimed to provide the fundamental information for the study on bud sports formation mechanisms and sports variant identification. The results showed that: ①116 aroma components, categorized as 8 different species, were found out from the mature fruits of 8 investigated cultivars, among which 67 were fatty acid, amounting to 57.8% in this revealed aroma ingredients, being absolutely predominant in the identified aroma substances; ②No regular changes can be drawn out in the respects of aroma species after comparing aroma components of the variant with their control, but the

收稿日期: 2012-06-21; 修回日期: 2012-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171932); 国家重点基础研究发展计划项目 (2011CB100606)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenxs@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8249338)

content of the shared components both existed in the variants and its mother plants, the total aroma value of characteristic aroma components, ester contents and total aroma content in the variant is significantly higher than that in their respective control; ③ In the late period of fruit development, the activity of 4 key enzymes in fatty acid metabolism in the red sport variant assumes the increasing trend and is higher than that in its control.

**Key words:** apple; red bud sport; aroma component; metabolizing enzyme

已有的研究表明,果实香气物质的组分种类及其含量是风味品质的重要构成因素之一(Elena & Sara, 1998; Daryl et al., 2009),但田长平等(2010)研究发现,1-MCP处理有效抑制了黄金梨贮藏期间醛类、醇类总量的下降以及酯类总量的增加,从而维持较好的贮藏品质。‘泰山早霞’是早熟红色苹果新品种(陈学森等,2008),近几年的观察发现,一旦‘泰山早霞’着色面积达到2/3以上,并有明显的果香,果肉就已明显变绵,甚至果皮爆裂,失去商品价值;王海波等(2007, 2008)、刘超超等(2011)及刘金(2012)进一步的研究结果表明,‘泰山早霞’果实发育后期有一个明显的乙烯释放高峰,伴随着PG酶等活性升高,果实硬度下降以及酯类与花青苷含量增大;在果实刚开始着色时采收并用1-MCP处理,可有效抑制乙烯释放、PG酶活性升高、果实硬度下降以及酯类与花青苷含量增大,从而维持较好的质地品质。上述研究表明,‘泰山早霞’苹果的质地品质、外观品质及风味品质之间存在一定联系,可能均受乙烯的调控。

芽变选种是培育优良新品种的有效途径。在已报道的苹果芽变品种中,红色芽变品种占70%以上(陈学森等,1994;过国南等,2003)。因此,深入探讨红色芽变机理,对苹果品种的有效改良具有重要意义。果实红色芽变机理已有较多研究报道,刘晓静等(2009)研究表明,‘国光’苹果红色芽变花青苷含量及其相关酶活性明显高于其母本对照;Xu等(2012)进一步研究发现,在果实发育后期‘国光’红色芽变果皮中*MdMYB1*表达水平的上升引起花青苷合成结构基因表达量不同程度的上调,是最终导致花青苷含量高的直接原因。但有关苹果红色芽变在香气组分及其含量上是否与母本存在差异,尚未见报道,值得进一步研究。

已有的报道表明,LOX、HPL、ADH和AAT是酯类物质生物合成(乜兰春等,2005)和脂肪酸代谢途径(Echeverría et al., 2004a)的关键酶;田长平等(2010)研究表明,黄金梨1-MCP处理后其脂肪酸代谢途径关键酶LOX、HPL、ADH、AAT活性均显著低于对照,是其酯类物质合成下降的主要原因。本试验中分析了苹果红色芽变及其母本对照香气组分的差异;并在此基础上进一步探讨了香气代谢脂肪酸途径相关酶活性的差异,旨在为揭示苹果红色芽变机理提供基本资料,并为优质苹果芽变品种选育及加快苹果芽变育种进程提供依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器设备

试验于2009—2011年在山东农业大学作物生物学国家重点实验室进行。香气组分分析材料为富士5623芽变、富士1621芽变、红将军3136芽变、国光芽变及各自红色芽变的母本作对照,共计8个试材的成熟果实;脂肪酸代谢相关酶活性测定试验材料为国光芽变及国光。自6月14日起每隔30 d采1次样,9月14日后每隔10 d采1次直至10月24日采收,每次采10个果。果实采下后立即放入冰盒带回。

试材均采自山东省龙口市东江镇王村张家集体果园,立地条件一致,常规管理。试验采用的仪

器为日本岛津公司生产的 GC-MS QP2010Plus 气相色谱—质谱联用仪, 日本岛津 UV-2450/2550 紫外可见分光光度计。磁力搅拌加热板、固相微萃取器手柄及 SPME 纤维萃取头 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS 均为美国 Supelco 公司产品。

## 1.2 芽变及对照香气成分分析

### 1.2.1 顶空固相微萃取方法

取新鲜果实洗净切碎后准确称取 40 g 放入 100 mL 锥形瓶中, 加入内标物 3-壬酮 ( $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , 加盖封口后放在 50  $^{\circ}\text{C}$  磁力搅拌加热板上平衡 10 min。将纤维萃取头插入 250  $^{\circ}\text{C}$  的 GC 进样口老化 20 min, 然后插入已平衡好的样品瓶中萃取 35 min, 再插入 GC 进样口, 230  $^{\circ}\text{C}$  解吸 2 min, 进行 GC-MS 检测。

### 1.2.2 气相色谱质谱分析条件

参照陈美霞等 (2004) 的方法并略做修改: 利用 Shimadzu GC/MS-QP2010 气相色谱—质谱联用仪。色谱条件: 色谱柱 Rtx-1MS (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) 柱; 进样口温度 200  $^{\circ}\text{C}$ ; 柱温: 初始温度 35  $^{\circ}\text{C}$  保持 2 min, 以 6  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升至 120  $^{\circ}\text{C}$  保持 1 min, 然后以 10  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升至 180  $^{\circ}\text{C}$  以后以 20  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升至 230  $^{\circ}\text{C}$  保持 5 min。质谱条件: 载气为 He 气, 流量 1.03 mL  $\cdot \text{min}^{-1}$ , 电离方式 EI, 电子能量 70 eV。离子源温度 200  $^{\circ}\text{C}$ , 扫描质量范围: 45 ~ 450 amu。进样: 不分流进样。

### 1.2.3 定性与定量分析

定性方法: 得到 GC-MS 分析总离子流图 (TIC) 后, 经计算机检索同时与 NIST05 质谱库相匹配, 并结合人工图谱解析及资料分析, 确认香味物质的各种化学成分。定量方法: 按峰面积归一化法求得各成分相对质量百分含量, 并选择 3-壬酮为内标进行定量。利用前人报道的香气阈值 (Echeverría et al., 2004b, 2008; Mehinagic et al., 2006; López et al., 2007) 来计算香气物质的香气值, 通过香气值确定特征香气成分。香气值 (马永昆 等, 2009) 为某种化合物的含量与该化合物香气阈值的比值, 香气值大于 1 的成分称为特征香气 (张春雨 等, 2009; 付蕾 等, 2010)。

## 1.3 脂肪酸代谢途径相关酶活性测定方法

脂氧合酶 (LOX) 活性测定参照陈昆松等 (2003) 的方法, 略作修改: 取 2.0 g 果肉组织, 液氮充分研磨呈粉末状, 加入 5 mL 经 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 50 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0), 充分混匀、浸提, 15 000 r  $\cdot \text{min}^{-1}$  (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 离心 15 min, 上清液用于 LOX 活性测定。3 mL 反应体系中含有 25  $\mu\text{L}$  反应底物——亚油酸钠母液, 2.775 mL 100 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  醋酸缓冲液 (pH 5.5), 粗酶液 0.2 mL, 反应温度 30  $^{\circ}\text{C}$ , 于 234 nm 下测定 LOX 活性。加入粗酶液后 15 s 开始计时, 记录 1 min 内 OD 值变化, 酶活性以  $\Delta\text{OD}_{234} \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$  表示。

氢过氧化物裂解酶 (HPL) 活性测定参照 Salas 等 (1999) 的方法, 略作修改: 取 2.0 g 果肉冷冻组织置于研钵内, 液氮充分研磨呈粉末状, 加入 5 mL 经 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的提取液, 果肉与提取液的匀浆物充分混匀、浸提, 15 000 r  $\cdot \text{min}^{-1}$  (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 离心 30 min, 上清液用于 HPL 活性测定。酶活性测定所用的反应底物为氢过氧化亚油酸钠, 采用 3.5 mL 反应体系, 其中含 2 mL 分析缓冲液, 反应底物液 0.75 mL, 1.6 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  NADH 0.15 mL, 0.1 mL ADH 酶液 (0.5 mg  $\cdot \text{mL}^{-1}$  硼酸缓冲液, pH 8.6), 粗酶液 0.5 mL, 反应温度 30  $^{\circ}\text{C}$ , 于 340 nm 下测定 HPL 活性。加酶液后 15 s 开始计时, 记录 1 min 内 OD 值变化, 酶活性以  $\Delta\text{OD}_{340} \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$  表示。

醇脱氢酶 (ADH) 活性测定参照 Echeverría 等 (2004) 的方法加以改进: 取 2.0 g 果肉冷冻组织置于研钵内, 液氮充分研磨呈粉末状, 加入 3 mL 经 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的提取液, 充分混匀、浸提, 15 000 r  $\cdot \text{min}^{-1}$  (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 离心 30 min, 上清液用于 ADH 活性测定。采用 3 mL 反应体系, 其中 2.4 mL MES-Tris 缓

冲液 (pH 6.5), 0.15 mL  $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NADH, 0.15 mL  $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醛, 0.3 mL 粗酶液, 反应温度  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 于 340 nm 下测定 ADH 活性。加酶液后 15 s 开始计时, 记录 1 min 内 OD 值变化, 酶活性以  $\Delta\text{OD}_{340} \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$  表示。

酰基转移酶 (AAT) 活性测定参照 Echeverria 等 (2004) 的方法略作修改: 取 3.0 g 果肉, 加 0.1 g PVPP 和 6 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0), 在冰浴中充分研磨匀浆。15 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 离心 30 min, 上清液用于酶活性测定。反应体系由  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0)、 $11.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酰 - CoA、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  丁醇和 0.6 mL 酶液组成。在  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下反应 15 min 后, 加入 150  $\mu\text{L}$   $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  5,5 - 二硫代双硝基苯甲酸 (DTNB), 室温下放置 10 min, 于 412 nm 下测定 AAT 活性。加酶液后 15 s 开始计时, 记录 1 min 内 OD 值变化, 酶活性以  $\Delta\text{OD}_{412} \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$  表示。

以上 4 种酶活性测定时 OD 值每变化 1 个单位记为 1 U。均重复 3 次, 取平均值。

数据采用 Excel 软件进行统计处理, 差异显著性分析采用 DPS3.0 数据分析软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 红色芽变与对照品种香气成分比较分析

#### 2.1.1 香气组分及含量

各芽变及各自母本对照共 8 个参试苹果品种果实由 GC - MS 分析后, 各组分经计算机检索同时与 NIST library 谱库比对, 共鉴定出 8 类 116 种香气成分, 包括酯类 67 种、醇类 15 种、萜烯类 6 种、醚类 2 种、醛类 5 种、烷烃类 12 种、酮类 3 种和杂环类 6 种, 其中含量大于  $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  的列入表 1。由表 1 可以看出, 在 52 种成分中, 8 个参试材料均能检测到的有 2 - 甲基丁酸乙酯、丁酸丁酯和己酸乙酯等 10 种成分; 仅在富士 5623、富士 1621、红将军 3136 及其对照 6 个材料均能检测到的有乙酸丁酯及丙酸丁酯等 7 种成分。在这 17 种成分中, 有 13 种成分在红色芽变中的含量高于各自对照。

表 1 不同苹果品种及红色芽变主要香气组分  
Table 1 Main aromatic components of apple cultivars and red bud sports

化合物名称 Compound	含量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) Content						
	富士 5623 Fuji 5623	5623 对照 5623 control	国光芽变 Ralls sport	国光 Ralls	富士 1621 Fuji 1621	1621 对照 1621 control	红将军 3136 Red General 3136
酯类 Esters							
丁酸乙酯 Ethyl butanoate	0.0061	0.0020	0.0158	0.0102	0.0071	0.0019	0.0018
丙酸丙酯 Propyl propionate	0.0072	0.0022			0.0123		0.0016
乙酸丁酯 1-butyl acetate	0.0320	0.0125			0.0335	0.0077	0.0509
2 - 甲基丁酸乙酯 2-methyl ethyl butanoate	0.0093	0.0014	0.0262	0.0090	0.0150	0.0029	0.0039
2 - 甲基乙酸丁酯 2-methyl butyl acetate	0.2515	0.1932			0.1374	0.1381	0.1573
丁酸丙酯 Propyl butanoate	0.0145	0.0059			0.0243	0.0013	0.0068
丙酸丁酯 Butyl propionate	0.0172	0.0148	0.0006		0.0182	0.0047	0.0179
乙酸戊酯 Pentyl acetate	0.0106	0.0070			0.0097	0.0054	0.0109
3 - 甲基乙酸 - 2 - 丁烯酯 3-methyl-2-buten-1-ol acetate	0.0027	0.0017					0.0028
2 - 甲基 - 丁酸丙酯 Propyl 2-methyl butanoate	0.0315	0.0072			0.0524	0.0140	0.0144

续表 1

化合物名称 Compound	含量/ (μg · g <sup>-1</sup> ) Content							
	富士 5623 Fuji 5623	5623 对照 5623 control	国光芽变 Ralls sport	国光 Ralls	富士 1621 Fuji 1621	1621 对照 1621 control	红将军 3136 Red General 3136	3136 对照 3136 control
2 - 甲基丙酸丁酯 2-methyl butyl propionate	0.0187	0.0365			0.0115		0.013	0.0029
丁酸丁酯 Butyl butanoate	0.0179	0.0090	0.0011	0.0011	0.0324	0.0045	0.0418	0.0058
己酸乙酯 Ethyl hexanoate	0.0448	0.0101	0.0561	0.0264	0.0424	0.0083	0.0239	0.0036
乙酸己酯 Hexyl acetate	0.219	0.1952	0.0017	0.0066	0.4964	0.4024	0.2530	
乙酸 - 4 - 己烯酯 4-hexen-1-ol acetate		0.0268						
乙酸 2 - 己烯酯 2-hexen-1-ol acetate	0.0552	0.0781			0.0115		0.0965	0.1084
2 - 甲基丁酸丁酯 2-methyl butyl butanoate	0.0478	0.0114	0.0009	0.0009	0.0911	0.0109	0.0943	0.0433
己酸丙酯 Propyl hexanoate	0.0238	0.0077			0.0866	0.0044	0.0017	
2 - 甲基丁酸 2 - 甲基丁酯 2-methyl butyl 2-methylbutanoate	0.0226	0.0176			0.0324	0.007	0.0286	0.0110
丙酸己酯 Hexyl propanoate	0.0606	0.0623	0.0306	0.0085	0.1688	0.1111	0.0549	0.0208
丙酸 - (E) - 2 - 己烯酯 (E)-2-hexenyl propanoate	0.0089	0.0224			0.0318	0.0371	0.0159	0.0061
3 - 甲基丁酸丁酯 2-methyl butyl butanoate		0.0079	0.001	0.0017			0.0086	0.0164
2 - 甲基丁酸戊酯 Pentyl 2-methyl butanoate	0.0067	0.0011			0.0153	0.0016	0.0142	0.0023
丁酸己酯 Hexyl butanoate	0.1041	0.0642	0.0405	0.0345	0.3742	0.0930	0.1737	0.0280
2 - 甲基丁酸己酯 Hexyl 2-methyl butyrate	0.1654	0.0562	0.0471	0.0348	0.5488	0.1019	0.3133	0.0474
2 - 甲基己酸丁酯 2-methyl butyl hexanoate	0.0087	0.0057			0.0332	0.0050	0.0076	0.0011
2 - 甲基丙酸己酯 2-methyl hexyl propionate		0.0014			0.0043		0.0113	
丁酸 - (E) - 2 - 己烯酯 (E)-2-hexenyl butyrate		0.0190	0.0005		0.0676	0.0305	0.0309	0.0088
辛酸丙酯 Propyl octanoate	0.0020				0.0150			
己酸己酯 Hexyl hexanoate	0.0885	0.0328	0.0261	0.0152	0.3285	0.0617	0.0720	0.0092
甲酸己酯 Hexyl formate						0.0746		0.0400
乙酸 - (Z) - 3 - 己烯酯 (Z)-3-hexenyl acetate						0.0224		
己酸 - (E) - 2 - 己烯酯 (E)-2-hexenyl hexanoate						0.0094	0.0105	0.0023
己酸辛酯 Octyl hexanoate					0.0414			
乙酸 - (E) - 2 - 己烯酯 (E)-2-hexenyl acetate					0.1362	0.1602	0.0300	
己酸甲酯 Methyl hexanoate							0.0192	
辛酸异戊酯 Isoamyl octanoate					0.0111	0.0016	0.0006	
庚酸辛酯 Octyl heptanoate					0.0107	0.0022	0.0014	
醇类 Alcohols								
正己醇 1-hexanol	0.0576	0.0588			0.1016		0.0090	0.0071
(E) - 2 - 己烯 - 1 - 醇 (E)-2-Hexen-1-ol	0.0112	0.0119	0.0512	0.0413	0.0287			
2 - 甲基 - 1 - 丁醇 2-methyl-1-butanol	0.0213	0.0179	0.0059		0.0195	0.0101	0.0097	0.0088
烷烃类 Alkanes								
4,7 - 二甲基十一烷 4,7-dimethylundecane	0.0014							
十四烷 Tetradecane	0.0065	0.0041	0.0008	0.0017	0.0137	0.0076		
反式 3,6 - 二甲基 - 3,6 二乙 基 - 三环[3.1.0.0(2,4)] 己烷 (E)-3,6-diethyl-3,6-dimethyl- tricyclo[3.1.0.0(2,4)] hexane	0.0007				0.0937	0.0568		

续表 1

化合物名称 Compound	含量/ (μg · g <sup>-1</sup> ) Content							
	富士 5623 Fuji 5623	5623 对照 5623 control	国光芽变 Ralls sport	国光 Ralls	富士 1621 Fuji 1621	1621 对照 1621 control	红将军 3136 Red General 3136	3136 对照 3136 control
2,6,10,15 - 四甲基十七烷 2,6,10,15-tetramethyl heptadecane	0.0008				0.0133	0.0041	0.0007	
醛类 Aldehydes								
己醛 Hexanal	0.0014	0.0024	0.0051	0.0089	0.0038	0.0030	0.0013	0.0014
2 - 己烯醛 2-hexenal	0.0023	0.0035	0.0210	0.0162		0.0046		0.0017
萜烯类 Terpenes								
α - 法尼烯 α-farnesene	0.6631	0.1238	0.0370	0.0290	1.9250	0.4305	0.3569	0.0138
4,11,11 - 三甲基 - 8 - 亚 甲基 -, 双环[7.2.0] - 4 - 十一烯 4,11,11-trimethyl-8-methylene- Bicyclo[7.2.0]-undec-4-ene					0.0336			

2.1.2 特征香气成分及其香气值

香气组分含量与其香气阈值的比值大于 1 的为其特征香气, 表 2 列出了参试品种的特征香气及其香气值。由表 2 可以看出, 8 个参试品种共有 6 种特征香气成分, 4 个红色芽变品系特征香气值总和明显高于各自对照。

表 2 不同苹果品种及其红色芽变特征香气成分及其香气值  
Table 2 Character impact volatile constituents and odor units in apple cultivars and red bud sports

化合物名称 Compound	香气阈值/ (ng · g <sup>-1</sup> ) Odor threshold	香气值 Odor units							
		富士 5623 Fuji 5623	5623 对照 5623 control	国光芽变 Ralls sport	国光 Ralls	富士 1621 Fuji 1621	1621 对照 1621 control	红将军 3136 Red General 3136	3136 对照 3136 control
2 - 甲基乙酸丁酯 2-methyl butyl acetate	11	22.86**	17.56			12.49**	12.55	14.30**	9.73
己酸乙酯 Ethyl hexanoate	1	44.80**	10.10	56.10**	26.40	42.40**	8.30	23.90**	3.60
乙酸己酯 Hexyl acetate	2	109.50**	97.60		3.30	248.20**	201.20	126.50**	
2 - 甲基丁酸丁酯 2-methyl butyl butanoate	17	2.81				5.36**		5.55**	2.55
2 - 己烯醛 2-hexenal	17			1.24					
丁酸己酯 Hexyl butanoate	250					1.50			
香气值总和 Total odor units		179.98**	125.26	57.34**	29.70	309.95**	222.05	170.25**	15.87

注: 不同苹果品种与其红色芽变之间特征香气值差异显著性检验采用 *t* 检测法, \*表示 0.05 水平, \*\*表示 0.01 水平。下同。

Note: The odor units of different apple cultivars and red bud sports were tested with *t*-test method, \* indicates 0.05 evel, \*\* indicates 0.01 level. The same below.

2.1.3 香气种类数及各种类含量

表 3 列出了 8 个参试品种 (系) 的香气类别数, 可以看出, 芽变品系与其对照的香气成分种类数无规律性的变化。但 4 个红色芽变的酯类含量和香气总含量均明显高于各自的对照母株 (表 4), 如富士 1621 芽变酯类含量和总含量分别为 2.9356 μg · g<sup>-1</sup> 和 5.2273 μg · g<sup>-1</sup>, 而母本对照 1621 酯类含量和总含量为 1.3530 μg · g<sup>-1</sup> 和 1.9057 μg · g<sup>-1</sup>, 差异极显著; 芽变的萜烯类和醇类组分含量均高于或略高于各自对照; 醛类物质除红将军 3136 芽变高于对照, 其余芽变醛类物质均低于各自对照。

表 3 不同苹果品种及红色芽变香气类别  
Table 3 Aromatic categories of apple cultivars and red bud sports

化合物类别 Category	种类数 Number		国光芽变 Ralls sport	国光 Ralls	富士 1621 Fuji 1621	1621 对照 1621 control	红将军 3136 Red General 3136	3136 对照 3136 control
	富士 5623 Fuji 5623	5623 对照 5623 control						
酯类 Esters	36	38	21**	16	37	37	42**	32
醇类 Alcohols	4*	7	9**	6	4	3	5	5
烷烃类 Alkanes	6*	3	1	1	5	7	3	3
醛类 Aldehydes	3	3	3	4	1	3	2	2
萜烯类 Terpenes	3	1	1	3	3	3	1	1
酮类 Ketones	1	3	2	1		1		
醚类 Ethers				1			2	
杂环类 Heterocycles	1	1	4	3		1		
总种类数 Total number	54	56	41**	35	50*	55	55**	43

表 4 不同苹果品种及红色芽变各类别香气总含量  
Table 4 Total aroma content of different categories in apple cultivars and red bud sports

化合物类别 Category	含量/ (μg · g <sup>-1</sup> ) Content		国光芽变 Ralls sport	国光 Ralls	富士 1621 Fuji 1621	1621 对照 1621 control	红将军 3136 Red General 3136	3136 对照 3136 control
	富士 5623 Fuji 5623	5623 对照 5623 control						
酯类 Esters	1.2983*	0.9358	0.2684**	0.1626	2.9356**	1.3530	1.6067**	0.5158
醇类 Alcohols	0.0975	0.0964	0.0705*	0.0522	0.1555**	0.0169	0.0245	0.0221
烷烃类 Alkanes	0.0207	0.0117	0.0008**	0.0017	0.1705**	0.0908	0.0047	0.0045
醛类 Aldehydes	0.0045*	0.007	0.0273	0.0316	0.0038**	0.0098	0.0048**	0.0030
萜烯类 Terpenes	0.6667**	0.1238	0.0370	0.0315	1.9619**	0.4305	0.3569**	0.0138
酮类 Ketones	0.0006**	0.0040	0.0032	0.0019		0.0019		
醚类 Ethers				0.0034			0.0081	
杂环类 Heterocycles	0.0010**	0.0023	0.0129**	0.0050		0.0028		
总含量 Total Content	2.0843**	1.1811	0.4201**	0.2891	5.2273**	1.9057	2.0056**	0.5592

2.2 红色芽变与对照品种脂肪酸代谢相关酶活性比较分析

国光及其红色芽变香气合成脂肪酸代谢途径 4 种相关酶活性的变化趋势见图 1。

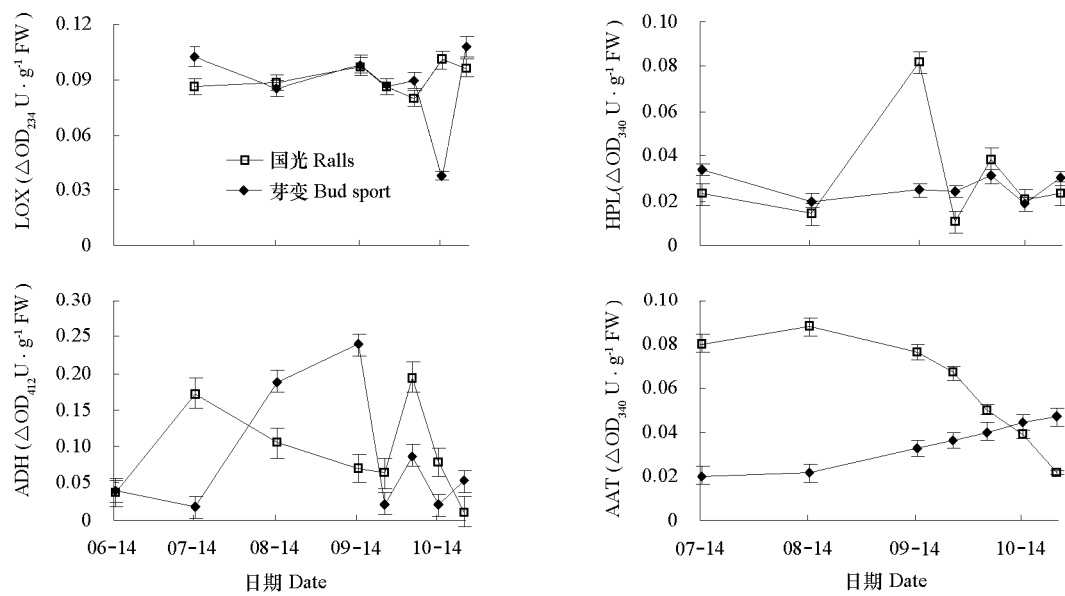


图 1 国光及其红色芽变果实发育过程中果皮的 LOX、HPL、ADH 和 AAT 活性的变化  
Fig. 1 Activities of LOX, HPL, ADH and AAT in 'Ralls' and its red bud sport during fruit development

从图 1 可以看出,芽变和母本对照的 LOX 酶活性的前期变化都不明显,10 月 4 日后芽变的 LOX 酶活性下降后又迅速升高,而对照略微上升后呈下降趋势;芽变和母本对照的 HPL 酶活性明显不同,芽变在整个生长期变化不大,后期呈上升趋势,而对照整个生长期酶活性波动较大;芽变和母本对照的 ADH 均呈现波浪形变化趋势,发育后期芽变呈上升趋势,对照则呈下降趋势;芽变和母本对照的 AAT 酶活性差异明显,母本对照的酶活性呈先略微上升后迅速下降的趋势,芽变则呈现逐渐上升的趋势,并在后期高于对照。

综合 4 个酶活性变化趋势可以看出,在果实发育末期,芽变的酶活性均呈上升趋势,并高于对照。酶活性上升加速脂肪酸途径代谢过程,最终使代谢途径末端的酯类物质积累,这也与芽变果实香味物质中酯类物质高于对照结果一致。

### 3 讨论

芽变(sport)及芽变选种是基于体细胞分生组织中遗传物质的自然突变,这种突变往往仅发生在 1~2 个基因位点,特别适合对无性繁殖园艺植物目前生产上的优良品种个别不良性状进行有效改良,优中选优。因此,与多个基因位点发生基因重组与交换的杂交育种比较,芽变选种虽然具有其局限性,但同时具有其他育种途径不可替代的有效性,近几年报道的苹果优良芽变品系就有 200 余个,其中元帅系的浓红、短枝型芽变有 130 个,有效推动了苹果品种更新换代和产业发展(陈学森等,1994;过国南等,2003)。因此,进一步探讨果树芽变机理及芽变选种的特点对果树品种改良具有重要意义。

大量的调研发现,芽变品系不仅突变基因所控制的性状发生变异,其他相关性状也发生相应的变异,表现出芽变的多效性,即“一因多效”现象。刘晓静等(2009)研究表明,‘国光’苹果红色芽变不仅果面着色明显优于母本对照,花青苷含量及其相关酶活性高于对照,而且花柱基部红色,与母本对照明显不同,显然这种相关变异是由于生理上的“一因多效”的缘故。本研究结果表明,芽变品系与其对照的香气成分种类数无规律性的变化,但 8 个参试苹果品种(系)共有组分的含量、特征香气成分的香气值总和、酯类含量及香气总含量,芽变品系均明显高于各自的对照;进一步的试验表明在果实发育后期,红色芽变的脂肪酸代谢途径 4 个关键酶活性均呈上升趋势,且高于对照,可能是红色芽变果实中酯类物质含量高的原因。本试验中参试的苹果红色芽变品系花青苷与香气合成同步提升不一定是“一因多效”,有可能是几个邻近的基因同时发生了突变,也有可能存在其他调控机制,有待进一步研究。

李秀菊等(1998)对套袋红富士色泽与激素含量变化研究发现,乙烯生产量较高时,花青素含量也达较高水平,呈显著正相关,表明乙烯生成与花青苷的积累密切相关。采用乙烯抑制剂 1-MCP 对苹果(Mohamed & Anton, 2002)、梨(MacLean et al., 2007)、葡萄(Chervin et al., 2004)等果实处理,结果表明果实花青苷的积累时间延迟,花青苷的积累量明显减少。田长平等(2010)研究发现,1-MCP 处理有效抑制了黄金梨贮藏期间醛类、醇类总量的下降以及酯类总量的增加,从而维持较好的贮藏品质,因此认为香气物质种类及含量可作为果实耐贮性评价的指标之一;在生产实践发现,有的苹果红色芽变品种(系)的贮藏性有所下降,并有“好看好吃不耐放”的说法;本研究结果表明,不仅芽变品系特征香气成分的香气值总和、酯类及香气总含量均明显高于各自的对照,而且富士和国光的红色芽变品系的醛类物质含量均明显低于各自对照。因此认为,参试的苹果红色芽变品系花青苷与香气物质生物合成同步提升可能都与乙烯有关,进一步探讨苹果红色芽变品系的耐贮性、乙烯释放量及其信号传递与花青苷及香气代谢之间的关系,对丰富苹果芽变机理有重要意义,是今后研究的重点和切入点。



在苹果红色芽变品种生产上, 要注意适期采收, 适度着色, 在较好外观与风味品质的同时, 维持较好的贮藏品质。

## References

- Chen Kun-song, Xu Chang-jie, Xu Wen-ping, Wu Min, Zhang Shang-long. 2003. Improved method for detecting lipoxygenase activity from kiwifruit and peach fruit. *Journal of Fruit Science*, 20 (6): 436 - 438. (in Chinese)
- 陈昆松, 徐昌杰, 许文平, 吴敏, 张上隆. 2003. 猕猴桃和桃果实脂氧合酶活性测定方法的建立. *果树学报*, 20 (6): 436 - 438.
- Chen Mei-xia, Chen Xue-sen, Feng Bao-chun. 2004. GC - MS Analysis of fruit aroma components of two apricot cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (5): 663 - 665. (in Chinese)
- 陈美霞, 陈学森, 冯宝春. 2004. 两个杏品种果实香气成分的气相色谱-质谱分析. *园艺学报*, 31 (5): 663 - 665.
- Chen Xue-sen, Xin Pei-gang, Du Xin-ge, Yang Chuan-you, Wen Ji-hua. 1994. Effect of Delicious and Golden Delicious on the breeding and selection of new apple varieties. *Journal of Shandong Agricultural University*, 25 (2): 236 - 248. (in Chinese)
- 陈学森, 辛培刚, 杜欣阁, 杨传友, 温吉华. 1994. 元帅和金帅在苹果新品种选育中的作用. *山东农业大学学报*, 25 (2): 236 - 248.
- Chen Xue-sen, Xin Pei-gang, Zhang Tai-yan, Zhang Yan-min, Peng Fu-tian, Zhou Chao-hua, Jiang Yuan-mao, Chen Xiao-liu, Wang Hai-bo. 2008. A new very early-ripening apple cultivar 'Taishan Zaoxia'. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (1): 148. (in Chinese)
- 陈学森, 辛培刚, 张太岩, 张艳敏, 彭福田, 周朝华, 姜远茂, 陈晓流, 王海波. 2008. 极早熟苹果新品种 '泰山早霞'. *园艺学报*, 35 (1): 148.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan J-P, Latch A, Lamon J, Bouzayen M. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci*, 167: 1301 - 1305.
- Daryl D Rowan, Martin B Hunt, Peter A. 2009. Alspach heritability and genetic and phenotypic correlations of apple (*Malus × domestica*) fruit volatiles in a genetically diverse breeding population. *J Agric Food Chem*, 57 (17): 7944 - 7952.
- Elena Ibanez, Sara Lopez-Sebastian. 1998. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 63 (2): 281 - 286.
- Echeverria G, Graell J, López M L, Lara I. 2004a. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31: 217 - 227.
- Echeverria G, Fuentes T, Graell J, Lara I, López M L. 2004b. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 29 - 44.
- Echeverria G, Graell J, Lara I, López M L. 2008. Physicochemical measurements in 'Mondial Gala' apples stored at different atmospheres: Influence on consumer acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 50: 135 - 144.
- Fu Lei, Liu Zheng-sheng, Sun Xin-yang, Zhu Shu-hua. 2010. Study of four coating materials of SPME fiber on extraction of aroma compounds in strawberry. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (21): 4473 - 4481. (in Chinese)
- 付蕾, 刘正生, 孙鑫洋, 朱树华. 2010. 4 种纤维头对草莓香气成分的萃取效果. *中国农业科学*, 43 (21): 4473 - 4481.
- Guo Guo-nan, Yan Zhen-li, Zhang Shun-ni. 2003. Retrospect of the apple improvement in China and suggestion for apple breeding in future. *Journal of Fruit Science*, 20 (2): 127 - 134. (in Chinese)
- 过国南, 阎振立, 张顺妮. 2003. 我国建国以来苹果品种选育研究的回顾及今后育种的发展方向. *果树学报*, 20 (2): 127 - 134.
- Liu Chao-chao, Wei Jing-li, Xu Yu-ting, Jiao Qi-qing, Sun Hai-bing, Wang Chuan-zeng, Chen Xue-sen. 2011. Preliminary study on firmness and related physiological indices of three early-ripening apple cultivar during late development of the fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (1): 133 - 138. (in Chinese)
- 刘超超, 魏景利, 徐玉亭, 焦其庆, 孙海兵, 王传增, 陈学森. 2011. 苹果 3 个早熟品种果实发育后期硬度及其相关生理指标的初步研究. *园艺学报*, 38 (1): 133 - 138.
- Liu Jin, Wei Jing-li, Liu Mei-yan, Song Yang, Feng Shou-qian, Wang Chuan-zeng, Chen Xue-sen. 2012. The relationships between the enzyme activity of anthocyaninbiosynthesis ethylene release and anthocyanin accumulation in fruits of precocious apple cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (7): 1235 - 1242. (in Chinese)
- 刘金, 魏景立, 刘美艳, 宋杨, 冯守千, 王传增, 陈学森. 2012. 早熟苹果花青苷积累与其相关酶活性及乙烯生成之间的关系. *园*

- 艺学报, 39 (7): 1235 - 1242.
- Liu Xiao-jing, Feng Bao-chun, Feng Shou-qian, Wang Hai-bo, Shi Jun, Wang Na, Chen Wei-yi, Chen Xue-sen. 2009. Studies on anthocyanin biosynthesis and activities of related enzymes of 'Ralls' and its bud mutation. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (9): 1249 - 1254. (in Chinese)
- 刘晓静, 冯宝春, 冯守千, 王海波, 石俊, 王娜, 陈为一, 陈学森. 2009. '国光' 苹果及其红色芽变花青苷合成与相关酶活性的研究. *园艺学报*, 36 (9): 1249 - 1254.
- Li Xiu-ju, Liu Yong-sheng, Shu Huai-rui. 1998. Effects of bagging on color and hormone contents in apple fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 25 (3): 209 - 213. (in Chinese)
- 李秀菊, 刘用生, 束怀瑞. 1998. 红富士苹果套袋果实色泽与激素含量的变化. *园艺学报*, 25 (3): 209 - 213.
- López M L, Villatoro C, Fuentes T, Graell J, Lara I, Echeverría G. 2007. Volatile compounds, quality parameters and consumer acceptance of 'Pink Lady' apples stored in different conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 43: 55 - 66.
- MacLean D D, Murr D P, DeEl J R, Mackay A B, Kupferman E M. 2007. Inhibition of PAL, CHS, and ERS1 in 'Red d'Anjou' pear (*Pyrus communis* L.) by 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 46 - 55.
- Ma Yong-kun, Li Xiang-bo, Jiang Jia-kui. 2009. Determination of representative aroma components of natural apple essence by GC - MS combined with gc-olfactory. *Food Science*, 30 (8): 231 - 234. (in Chinese)
- 马永昆, 李祥波, 蒋家奎. 2009. 基于 GC - MS 和嗅闻仪联用的天然苹果香精关键香气成分分析. *食品科学*, 30 (8): 231 - 234.
- Mehinagic E, Royer G, Symoneaux R, Jourjon F, Prost C. 2006. Characterization of odor-active volatiles in apples: Influence of cultivar and maturity stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2678 - 2687.
- Mohamed A A, Anton de Jager. 2002. Formation of flavonoids especially anthocyanin and chlorogenic acid in 'Jonagold' apple skin: Influences of growth regulators and fruit maturity. *Scientia Horticulturae*, 93: 257 - 266.
- Nie Lan-chun, Sun Jian-she, Di Bao. 2005. Changes in amino acid and fatty acid contents as well as activity of some related enzymes in apple fruit during aroma production. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 31 (6): 663 - 667. (in Chinese)
- 乜兰春, 孙建设, 邸葆. 2005. 苹果果实香气产生过程中氨基酸和脂肪酸含量及一些相关酶活性的变化. *植物生理与分子生物学报*, 31 (6): 663 - 667.
- Salas J, Sanchez J. 1999. Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Science*, (143): 19 - 26.
- Tian Chang-ping, Wang Yan-ling, Liu Zun-chun, Wang Chuan-zeng, Sun Jia-zheng, Wang Na, Chen Xue-sen. 2010. Effect of 1-methylcyclopropene and nitric oxide on main fruit quality of 'Whangkeumbae' pear and related enzymes of fatty acid metabolism during storage. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (14): 2962 - 2972. (in Chinese)
- 田长平, 王延玲, 刘遵春, 王传增, 孙家正, 王娜, 陈学森. 2010. 1-MCP 和 NO 处理对黄金梨主要贮藏品质指标及脂肪酸代谢酶活性的影响. *中国农业科学*, 43 (14): 2962 - 2972.
- Wang Hai-bo, Chen Xue-sen, Xin Pei-gang, Feng Tao, Shi Jun, Ci Zhi-juan. 2007. GC - MS analysis of volatile components in several early apple cultivars. *Journal of Fruit Science*, 24 (1): 11 - 15. (in Chinese)
- 王海波, 陈学森, 辛培刚, 冯涛, 石俊, 慈志娟. 2007. 几个早熟苹果品种香气成分的 GC - MS 分析. *果树学报*, 24 (1): 11 - 15.
- Wang Hai-bo, Chen Xue-sen, Zhang Chun-yu, Liu Chong-qi, Wu Chuan-jin, Tian Chang-ping, Wang Chao. 2008. Changes of aroma component during fruit maturation of two early apple cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (10): 1419 - 1424. (in Chinese)
- 王海波, 陈学森, 张春雨, 刘崇琪, 吴传金, 田长平, 王超. 2008. 两个早熟苹果品种不同成熟阶段果实香气成分的变化. *园艺学报*, 35 (10): 1419 - 1424.
- Xu Y T, Feng S Q, Jiao Q Q, Liu C C, Zhang W W, Chen W Y, Chen X S. 2012. Comparison of *MdMYB1* sequences and expression of anthocyanin biosynthetic and regulatory genes between *Malus domestica* Borkh. cultivar 'Ralls' and its blushed sport. *Euphytica*, 185 (2): 157 - 170.
- Zhang Chun-yu, Li Ya-dong, Chen Xue-sen, Zhang Zhi-dong, Liu Hai-guang, Wu Lin. 2009. GC/MS analysis of volatile components in high bush blueberry cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (2): 187 - 194. (in Chinese)
- 张春雨, 李亚东, 陈学森, 张志东, 刘海广, 吴林. 2009. 高丛越橘果实香气成分的 GC/MS 分析. *园艺学报*, 36 (2): 187 - 194.