

两个耐贮性不同的红肉苹果株系果实硬度与香气成分及相关酶活性与基因表达差异分析

刘静轩, 许海峰, 王得云, 张宗营, 王意程, 左卫芳, 王楠, 姜生辉, 毛志泉, 陈学森*

(山东农业大学作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

摘要: 以‘红心7号’和‘红心9号’两个红肉苹果新品系的成熟果实为试材, 检测贮藏期间硬度与香气成分及其相关酶活性与基因表达量。‘红心9号’苹果贮藏期间果实硬度极显著低于‘红心7号’, 而乙烯释放速率极显著高于‘红心7号’; 总香气物质、酯类含量及 *AAT1*、*AAT2* 和 *LOX* 基因表达量均极显著高于‘红心7号’, 而在贮藏后期 (90~120 d) 果实醇类与醛类含量及 *HPL* 和 *ADH* 基因表达量均极显著低于‘红心7号’; *PG*、*XET*、*PME*、*AM*、 α -*L-Af* 和 β -*Gal* 等6个果实软化相关基因表达量及其酶活性大都极显著高于‘红心7号’。上述结果表明乙烯释放速率和酯类含量高及酯类生物合成和果实软化相关基因上调表达可能是导致‘红心9号’苹果贮藏期间果实硬度显著低于‘红心7号’的主要原因。香气物质种类、含量及其变化能作为果实贮藏品质评价的指标之一。

关键词: 苹果; 红肉; 香气成分; 硬度; 基因表达; 酶活性

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 02-0330-13

Changes of Firmness, Aroma, Cell Wall-modifying Enzyme Activities and Analysis of Related-gene Expression in 2 Red Flesh Apple Strains During Fruit Storage

LIU Jingxuan, XU Haifeng, WANG Deyun, ZHANG Zongying, WANG Yicheng, ZUO Weifang, WANG Nan, JIANG Shenghui, MAO Zhiqian, and CHEN Xuesen*

(State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Using 2 red flesh apple strains ‘Hongxin 7’ and ‘Hongxin 9’ as experimental materials, we investigated volatile components, firmness, cell wall-modifying enzyme activities and gene expression related to aroma and firmness. The results showed that during fruit storage, the firmness in ‘Hongxin 9’ was significantly lower than in ‘Hongxin 7’ while the ethylene production rate in ‘Hongxin 9’ was significantly higher than in ‘Hongxin 7’. The contents of ester and total aroma as well as the expression of *AAT1*, *AAT2*, *LOX* in ‘Hongxin 9’ were significantly higher than in ‘Hongxin 7’ during fruit storage, however, in the later period of storage (90 - 120 d), the contents of alcohols and aldehydes and the expression of *HPL* and *ADH* in ‘Hongxin 9’ were significantly lower than in ‘Hongxin 7’. The cell

收稿日期: 2016-08-23; **修回日期:** 2016-12-05

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303093); 国家自然科学基金项目 (31572091)

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

wall-modifying enzyme activities and related-gene expression of *PG*, *XET*, *PME*, *AM*, α -*L-Af* and β -*Gal* in ‘Hongxin 9’ were significantly higher than in ‘Hongxin 7’ during fruit storage. All results indicated that the main reason causing the firmness in ‘Hongxin 9’ was lower than in ‘Hongxin 7’ during fruit storage was of a high level in the ethylene production rate and ester content and the up-regulated expression of ester biosynthesis related genes and cell wall related genes. Meanwhile, the change, types, content of aroma compounds can be used as one of the evaluation indicators of fruit quality during storage.

Keywords: apple; red flesh; volatile component; firmness; gene expression; enzyme activity

苹果果实含有较多的人体容易吸收的游离多酚, 在抗氧化、预防心脑血管疾病及抗肿瘤等方面均具有较好的作用(陈学森等, 2010; 许海峰等, 2016)。

中国是世界上最大的苹果资源、生产和消费大国, 目前生产上的主栽品种是‘红富士’, 约占70%, 存在品种单一及生产成本高等诸多问题, 苹果产业的转型升级需要特色多样化的品种支撑(陈学森等, 2015; 陈学森和王志刚, 2016)。

Velasco等(2010)、Steven等(2012)及陈学森等(2014a)对苹果基因组测序、世界范围内3 000余份红肉苹果种质资源R6基因型鉴定与分类以及新疆红肉苹果杂种后代遗传变异的研究结果表明, 新疆野苹果及其红肉变型(*Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana*)是世界栽培及红肉苹果的祖先种, 不仅遗传多样性丰富, 而且是品质育种的珍贵基因库。因此, 有效利用新疆野苹果资源开展功能型苹果育种, 对新疆野苹果资源保护与利用、栽培品种遗传基础拓展、苹果产业的转型升级及改进人类健康具有重要意义, 符合保护自然、利用自然、回归自然的发展理念(陈学森等, 2015)。为加速育种进程, 本课题组创建了高效育种技术体系, 并及时地以性状基本稳定的后代株系为试材, 进行品质性状评价及发育机理的研究, 已取得了诸多重要进展, 为完善新品种选育方案提供了科学依据(王立霞等, 2014; 张芮等, 2015; 许海峰等, 2016)。

香气物质组成及含量不仅是功能型苹果果实风味品质的重要构成因素, 同时有可能是果实贮藏品质评价的指标之一(Dixon & Hewett, 2000; Oshita et al., 2000)。涂正顺等(2001)研究表明, 猕猴桃采后从硬果期至食用期, 主要醛类和醇类物质减少, 而高级不饱和酯类等增加; Bellincontro等(2005)以氮气和1-MCP处理‘Royal Gem’桃果实的研究结果表明, 桃果实香气物质的合成明显受乙烯的调控, 其合成直接依赖乙烯, 属乙烯依赖型, 这种作用机制在‘湖景蜜露’桃果实中也被发现(张晓萌, 2005; Zhang et al., 2011); 1-MCP处理明显抑制了香蕉和苹果果实中乙烯和酯类物质释放, 而对醛类物质影响不大, 说明酯类物质的生物合成受乙烯调控(Golding et al., 1998; Mattheis et al., 2005), 这与在梨(周鑫, 2015)、甜瓜(李岩, 2012)、杧果(Lalel et al., 2003)等呼吸跃变果实上得到的结果一致。

本课题组在研究中发现, 从新疆红肉苹果与其他品种的BC₁群体中选育出的‘红心7号’和‘红心9号’两个红肉苹果新品系果实类黄酮含量高, 并且‘红心7号’的耐贮性明显优于‘红心9号’, 但有关这两个优系贮藏品质差异的机理, 目前尚未见研究报道。因此, 以‘红心7号’和‘红心9号’的成熟果实为试材, 检测贮藏期间香气成分与硬度变化及其相关酶活性与基因表达量, 探讨两个优系贮藏品质差异的机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

试验于 2014—2016 年在山东农业大学作物生物学国家重点实验室和聊城市冠县果树育种基地 (N 36°29', E 115°27') 进行, 试验地为沙壤土, 地势平坦, 管理条件一致。

材料为新疆红肉苹果 (*Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana*) 与 ‘富士’、‘金冠’、‘新红星’ 和 ‘寒富’ 等品种杂种一代群体中的红肉株系混合花粉与 ‘嘎拉’ 苹果的杂种后代中选出的两个红肉型株系——‘红心 7 号’ 和 ‘红心 9 号’。两份试材的树龄均为 5 年生, 生长结果正常。于 2014 年 7 月 28 日即果实成熟期采收, 采后立即运回实验室, 散掉田间热后, 挑选果形端正, 大小一致, 无病虫害及机械损伤的果实于 $(0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 冷库中贮藏。

采收当天测定相关指标, 贮藏期间 30 d 取样 1 次, 每次取 9 个果实, 设 3 次生物学重复, 用于硬度、乙烯、香气含量、相关酶活性与基因表达量的测定。

1.2 果实硬度与乙烯释放量的测定

使用英国 Stable MicroSystems 公司生产的 TA.XT plus 型质构仪测定果实硬度, P/2 柱状探头 (直径 2 mm), 测前速度为 $2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, 测定速度为 $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, 测后速度为 $5 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, 穿刺深度为 10 mm, 最小感知力为 10 g。数据采用质构仪自带软件 Texture Exponent 32 自动分析计算。

采用岛津 GC-9A 型气相色谱仪测定乙烯释放速率 (高利平等, 2013)。

1.3 香气物质的提取与检测

参照王传增等 (2013) 的方法, 使用美国 Supelco 公司生产的固相微萃取器手柄及 SPME 纤维萃取头 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 进行萃取。果实洗净切碎后准确称取 20 g 放入 50 mL 锥形瓶中, 加入内标物 3-壬酮 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 μL , 加盖封口后平衡 10 min, 再插入事先老化好的纤维萃取头萃取 35 min, 进行 GC-MS 检测。

香气物质的检测利用 Shimadzu GC/MS-QP2010 气相色谱—质谱联用仪。定性方法: 用计算机检索并与 NIST05 质谱库相匹配, 结合人工图谱解析及资料分析确定相关香气物质成分。定量方法: 选择浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3-壬酮为内标, 其体积为 5 μL , 并用 SIM (选择离子检测) 方式定量。计算公式为: 香气物质各组分的含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) = [各组分的峰面积/内标的峰面积 \times 内标浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) \times 1 000]/样品量 (g)。

1.4 果实软化相关酶活性的测定

酶液提取参照 Zhou 等 (2000) 的方法。

果胶甲酯酶 (PME) 活性测定参照韩雅珊 (1996) 的方法, 淀粉酶 (AM) 活性测定参照《生物化学实验技术原理和方法》(王宪泽, 2002) 中的方法。

多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 活性测定参照 Gross (1982) 的方法。

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) 活性测定和 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 活性测定参照 Brummell 等 (2004) 的方法。

葡聚糖内糖基转移酶 (XET) 活性测定参照 Sulová 等 (1995) 的方法。

1.5 相关基因的实时荧光定量分析

果肉组织总 RNA 的提取采用 CWBIO 公司生产的 OmniPlant RNA Kit (DNase I) 试剂盒提取, 采用 TransGen Biotech 公司生产的 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒将所提 RNA 合成 cDNA, -20 ℃ 保存。

使用 iCycler iQ5 实时定量 PCR 仪器 (Bio-Rad, USA) 进行 Real-time PCR 检测, 试剂盒为 Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)。反应体系为 20 μL, 含 SYBR Green Mix 10 μL, cDNA 模板 (50 ng · μL⁻¹) 2 μL, ddH₂O 6 μL, 上下游引物 (5 μmol · L⁻¹) 各 1 μL。运行程序为: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 5 s, 55 ~ 60 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 65 ℃ 孵育 20 s, 溶解温度从 55 ℃ 到 95 ℃ 每升高 0.5 ℃ 保持 1 min。每个样品设平行重复 3 次。

设计特异性引物 (表 1), 并以苹果肌动蛋白基因 *Actin* 作为内参。采用 2^{-ΔΔCT} 公式 (Kenneth & Thomas, 2001) 进行数据计算。

表 1 苹果果实软化相关酶基因的 Real-time 荧光定量 PCR 引物设计
Table 1 Primers of softening-related enzyme genes in apple fruit for the qPCR amplification

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')
<i>PG</i> (NM_001293928.1)	GGCTTATCCTTCATACACG TGATGTTGCTATCCACC
<i>PME</i> (AY530907.1)	GCTGCCGCCGTGTTCCAAAAC CCGAGGGAGAACGCCTGTCTG
<i>XET</i> (NM_001302275.1)	CACACGCGGCGGACTTGTGAA GGAAATCCTTGCGGGAAGCGC
<i>AM</i> (XM_008352993.2)	ACGAACATCAGCCACAGGAC CCGAACAACTCAGAAAACG
<i>α-L-Af</i> (NM_001294121.1)	AGAAACGCCTATCCTGAC CACGGCATACTCGCTCAC
<i>β-Gal</i> (L29451.1)	AAGAACGGAAAGTCCCCAC TCCAATGACCCATACACGG
<i>ADH</i> (NM_001328893.1)	CCACCACAAGCAAATGAA ACCAACACTCTCCACAAT
<i>HPL</i> (XM_008348495.2)	TAGGAGGGAAGTGAGAGG AGAGAAACAAAGCGAGGT
<i>LOX</i> (D88434.1)	GATGGTCTCCTCGTATGG CTTCGTGTCCCTTATTCTTG
<i>AAT₁</i> (AY707098.2)	GCTGGATTGCTCTTGTTT TGGTTACTGGATGCGTAT
<i>AAT₂</i> (AY517491.1)	GGATTACTCAGGAACCTAA GACACAACCTCTACATTGC
<i>Actin</i>	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC

1.6 数据分析

对数据进行邓肯氏多重检测。

2 结果与分析

2.1 ‘红心 7 号’和‘红心 9 号’苹果贮藏期间硬度的变化

由图 1 可知, ‘红心 7 号’与 ‘红心 9 号’果实硬度在贮藏期均呈下降趋势, 且在 0 ~ 30 d 快速下降; ‘红心 7 号’的硬度极显著高于 ‘红心 9 号’, 在贮藏 120 d 时, 果实硬度为 0.406 kg, 仍保持硬脆特性; ‘红心 9 号’在贮藏 120 d 时, 硬度仅为 0.295 kg, 已软化发绵。

2.2 ‘红心 7 号’和‘红心 9 号’苹果贮藏期间乙烯释放速率的变化

由图 2 可以看出, 贮藏 30 ~ 120 d, ‘红心 9 号’苹果果实乙烯释放速率均极显著高于 ‘红心 7 号’, 并且在 120 d 有一个明显的释放高峰, 而 ‘红心 7 号’在 150 d 达到高峰。

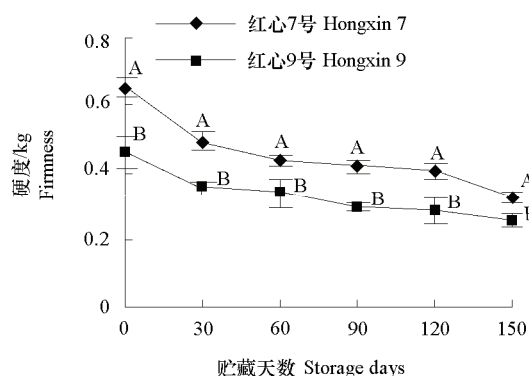


图1 ‘红心7号’和‘红心9号’苹果贮藏期间硬度的变化

Fig. 1 Changes of flesh firmness with fruit texture softening in apple

$P \leq 0.01$.

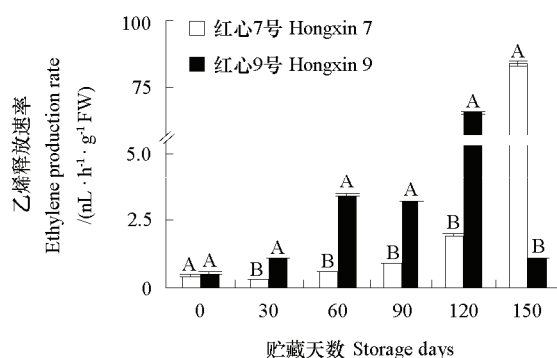


图2 ‘红心7号’和‘红心9号’苹果贮藏期间乙烯释放速率的变化

Fig. 2 Changes of ethylene production rate with fruit texture softening in apple

$P \leq 0.01$.

2.3 ‘红心7号’和‘红心9号’苹果贮藏期间香气物质含量的变化

‘红心9号’苹果贮藏期间(0~120 d)果实香气物质总含量和酯类含量均极显著高于‘红心7号’,而醇类在贮藏60~120 d,与醛类在90~120 d极显著低于‘红心7号’(图3)。

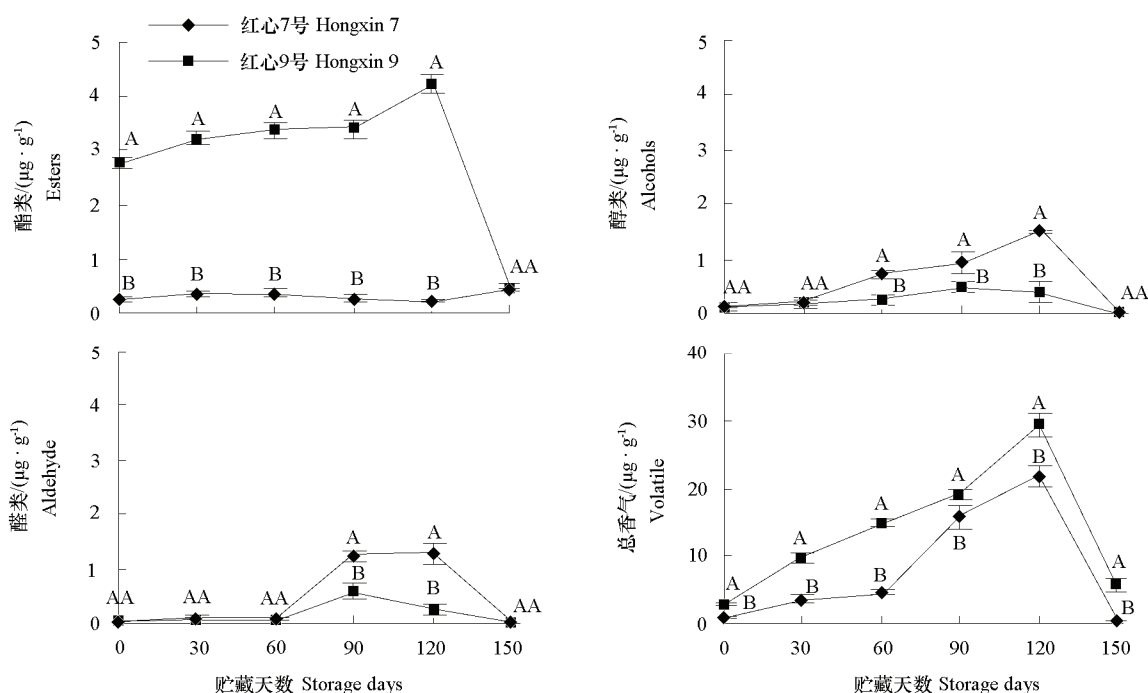


图3 ‘红心7号’和‘红心9号’苹果贮藏期间果实总香气物质及各主要组分含量的变化

Fig. 3 Changes of contents of total aroma and main components with fruit texture softening in apple

$P \leq 0.01$.

2.4 ‘红心7号’与‘红心9号’苹果贮藏期间软化相关酶活性的变化

由图4可以看出,测试的6个酶之间存在明显差异。‘红心9号’贮藏0~120 d的多聚半乳糖

醛酸酶 (PG)、葡聚糖内糖基转移酶 (XET)、果胶甲酯酶 (PME) 和淀粉酶 (AM) 活性大都极显著高于 ‘红心 7 号’, 并在 90 d 或 120 d 出现一个明显的活性高峰; 两株系 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Af) 和 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 活性变化趋势基本一致, 且大多显著高于 ‘红心 7 号’。

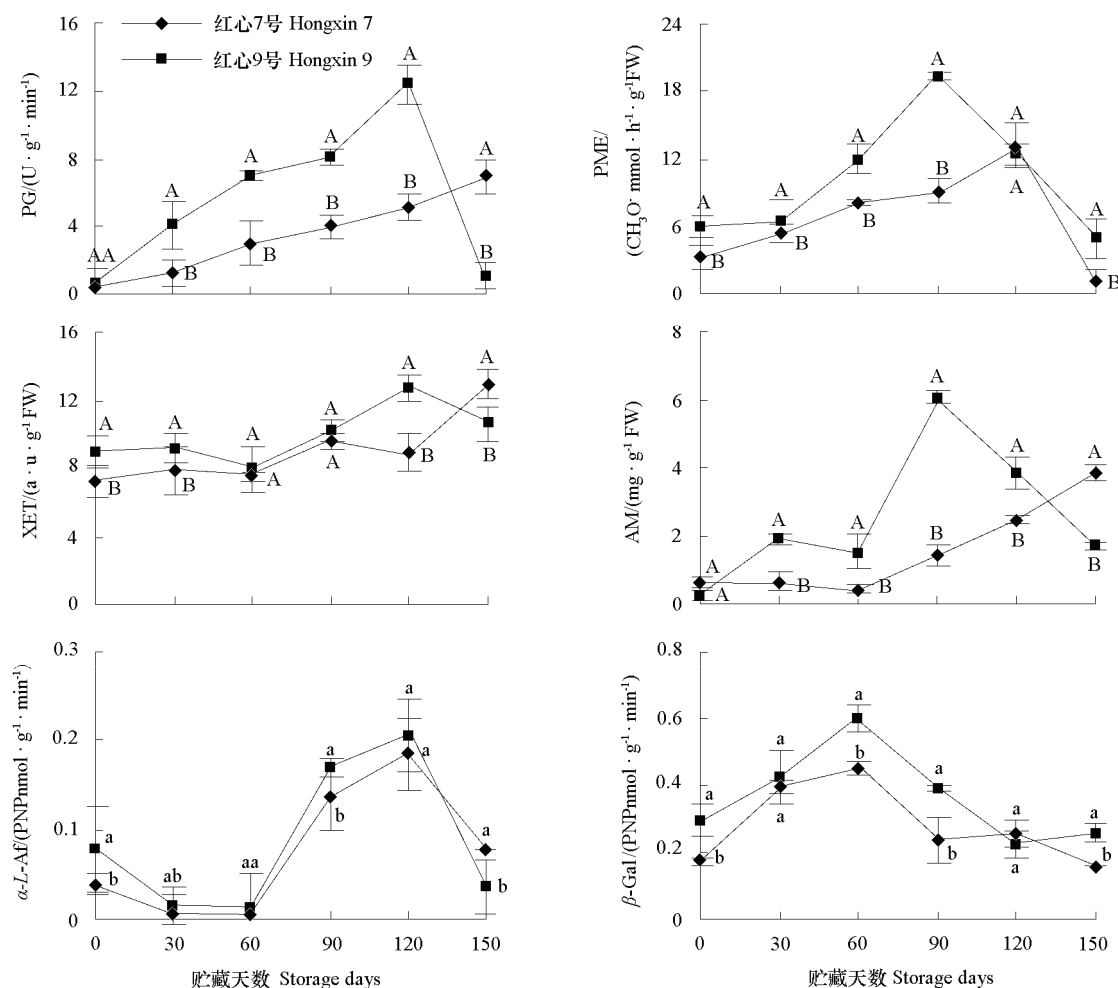


图4 ‘红心 7 号’与‘红心 9 号’苹果贮藏期间软化相关酶活性的变化

Fig. 4 Changes of PG, PME, XET, AM, α -L-Af, β -Gal activities in apple fruit during development and softening

$P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$.

2.5 ‘红心 7 号’和‘红心 9 号’苹果贮藏期间香气物质合成和果实软化相关基因表达分析

由图 5 可以看出, 在测试的 5 个香气物质合成相关基因 *AAT1*、*AAT2*、*LOX*、*HPL* 和 *ADH* 中, ‘红心 9 号’贮藏期间 *AAT1*、*AAT2*、*LOX* 表达量均极显著高于 ‘红心 7 号’, 并在 90 d 或 120 d 出现一个明显的表达量高峰, 而 ‘红心 9 号’贮藏后期 (120 ~ 150 d) *HPL* 和 *ADH* 表达量极显著低于 ‘红心 7 号’; ‘红心 9 号’贮藏期间 *PG*、*XET*、*PME* 和 β -Gal 等 6 个果实软化相关基因表达量极显著高于 ‘红心 7 号’, 并在 60 ~ 120 d 出现 1 个表达高峰; ‘红心 9 号’*AM* 与 α -L-Af 表达量分别在 60 ~ 90 d 与 90 ~ 120 d 极显著高于 ‘红心 7 号’, 并分别在 90 d 和 120 d 出现 1 个明显的表达量高峰。

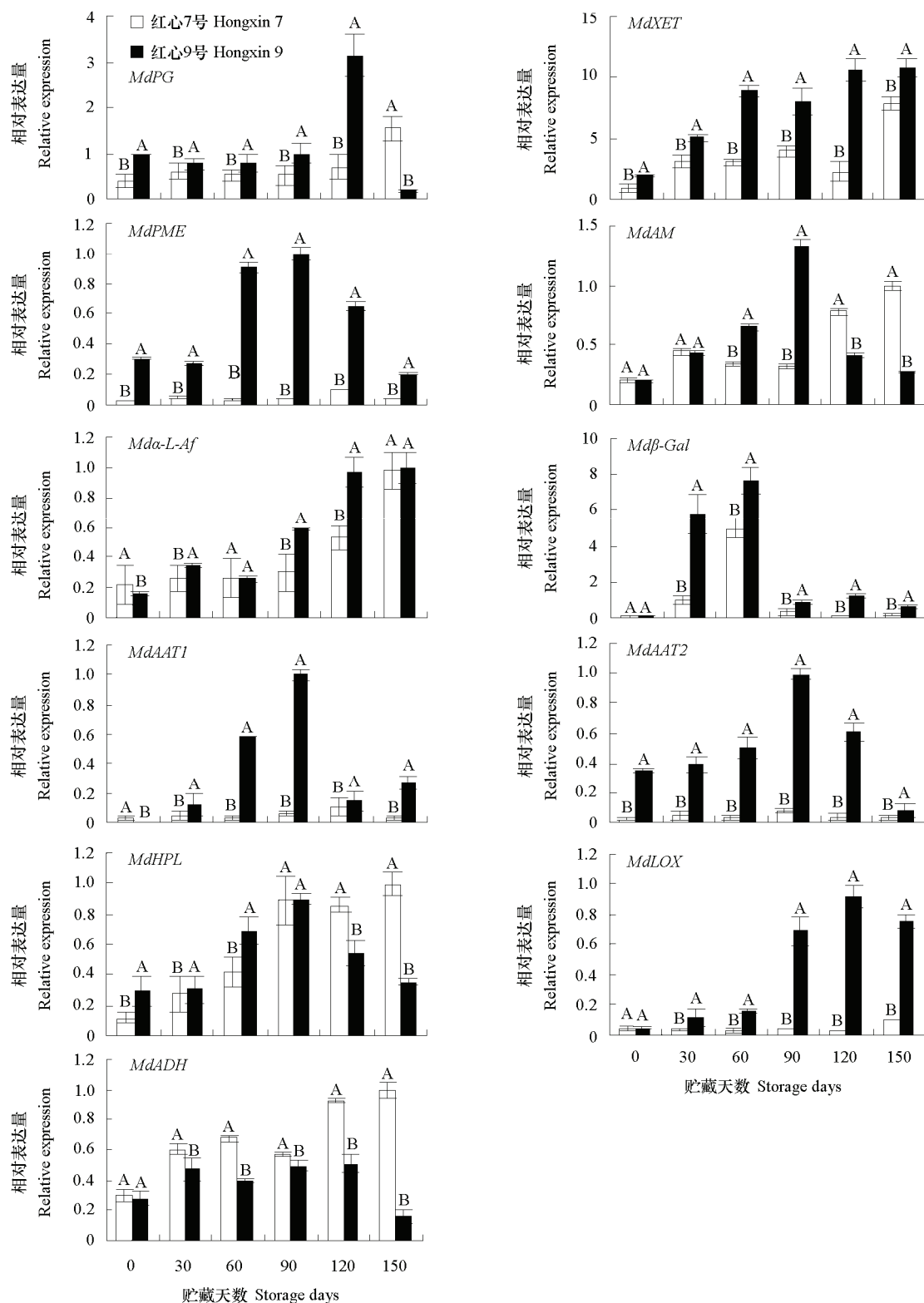


图5 ‘红心7号’与‘红心9号’苹果果实贮藏期间香气合成和质地发育相关基因表达量的变化

Fig. 5 Changes of relative genes expression of aroma and texture in apple fruit during storage period

$P \leq 0.01$.

3 讨论

3.1 果实硬度变化与乙烯释放及果实软化相关基因表达量的关系

研究发现, 在果实近成熟时, ‘金冠’和‘嘎拉’苹果硬度下降较快, 而‘富士’下降速率较慢; 随着贮藏时间的延长, 虽然3个品种的果实硬度均呈下降趋势, 但‘富士’硬度一直最高, 且下降速率较慢, 对乙烯的反应不敏感, 而‘金冠’和‘嘎拉’硬度迅速降低, 显著受到乙烯的调控(魏建梅等, 2008; 魏建梅和马锋旺, 2009)。陈学森等(2014b)的研究结果表明, 果实发育后期乙烯生物合成基因 *ACO*、*ACS* 和 *PG*、*PME*、 β -*Gal*、 α -*L-Af*、*XET* 等明显上调表达是导致‘乔纳金’苹果果实硬度显著低于其脆肉芽变的主要原因; 刘超超等(2011)的研究表明, 果实发育后期乙烯释放高峰的到来及多聚半乳糖醛酸酶(*PG*)活性的上升可能是‘泰山早霞’苹果果实发育后期硬度快速下降的主要因素; 刘美艳等(2012)的研究发现, 1-MCP 处理显著抑制了‘泰山早霞’苹果果实乙烯的释放及 *PG*、*PME*、 β -*Gal*、 α -*L-Af* 及 *LOX* 等多种基因的表达, 对于延缓其果实软化具有明显效应; 而 Zhang 等(2015)进一步采用 SSH 技术及 qRT-PCR 验证和相关性分析表明, ‘泰山早霞’苹果果实质地发育、花青苷及香气合成均受乙烯调控, 属乙烯极敏感型。上述研究结果表明, 虽然苹果果实的质地发育及其变化均受乙烯调控, 但不同品种对乙烯的敏感性存在明显差异, 据此可将已做过相关研究的苹果品种分为乙烯迟钝型(富士)、乙烯敏感型(金帅和嘎拉等)及乙烯极敏感型(泰山早霞)等3种类型。

苹果中, 只有 *MdACS1* 和 *MdACS3a* 在苹果果实中特异表达并与果实成熟有直接关系(李通等, 2012)。从‘金冠’苹果基因组文库中分离到 *MdACS1-1* 和 *MdACS1-2* 两个 *MdACS1* 的等位基因, *MdACS1-2* 因其启动子区反转录转座子 *SINE* 的存在导致 *MdACS1-2* 的转录活性大大降低(Sunako et al., 1999); 进一步的研究表明, *MdACS1* 与果实内源乙烯生成量相关, *MdACS1-2/-2* 纯合型品种在贮藏期间乙烯生成量较低, *MdACS1-1/-1* 纯合型品种的乙烯生成量则较高, 并且基因分离符合孟德尔遗传规律(Harada et al., 2000; Oraguzie et al., 2004)。鉴定发现, ‘泰山早霞’苹果 *ACS1* 基因型为 *ACS1-1/-1* 纯合子, 而‘富士’和‘金帅’分别为 *ACS1-2/-2* 纯合子和 *ACS1-1/-2* 杂合子, 为上述不同苹果品种乙烯敏感类型划分提供了分子证据(张宗营, 2016)。

张芮等(2015)以新疆红肉苹果杂交后代中‘红绵2号’和‘红脆2号’不同发育时期的果实为试材进行研究发现, ‘红绵2号’发育后期有一个明显的乙烯释放高峰, 所检测的乙烯生物合成及果实软化相关的34个基因中, 有 *PL*、*AF1*、*EG2* 及 *XET1* 等15个基因主要在果实发育前期上调表达, 有 *ACS1*、*ACO1* 和 *ACO2* 及 *PG* 和 *XET2* 等8个基因主要在果实发育后期上调表达, 这与‘泰山早霞’基本一致, 但发育前期相关基因的上调表达与‘泰山早霞’明显不同(Zhang et al., 2015)。因此, 除了乙烯信号因子外, 可能还有 *RIN* 等其他调控因子参与苹果果实软化调控, 有待进一步研究(田世平, 2013)。

‘红心7号’与‘红心9号’果实硬度在贮藏前期均呈快速下降趋势, 这与‘嘎拉’苹果的变化趋势(魏建梅等, 2008)基本一致; ‘红心9号’果实贮藏期间的硬度均极显著低于‘红心7号’, 而乙烯释放速率及 *PG*、*XET*、*PME*、*AM*、 α -*L-Af* 和 β -*Gal* 等6个果实软化相关基因表达量及其酶活性大都极显著地高于‘红心7号’。上述研究结果表明, 从回交后代分离群体(BC_1)中能够选育出对乙烯敏感性差、耐贮性较好、质地品质符合要求的新品系。

3.2 果实硬度与香气成分含量及生物合成相关基因表达量的关系

香气物质组成及含量不仅是果实风味品质的重要构成因素,也可能是果实耐贮性评价的重要指标之一(Oshita et al., 2000)。研究表明,贮藏性比较差的‘泰山早霞’果实发育过程中的香气成分始终以酯类为主,成熟期‘泰山早霞’果实酯类含量是‘辽伏’的 3.5 倍(王海波 等, 2008); ‘乔纳金’果实酯类化合物的种类数与含量分别是其脆肉芽变的 1.5 倍和 1.2 倍,而醇类和醛类化合物含量分别仅是其脆肉芽变的 15.1%和 14.3%(陈学森 等, 2014b);在香蕉、桃及苹果上进行的试验发现, 1-MCP 处理显著抑制了果实内源乙烯的产生及酯类物质的合成(Golding et al., 1998; Bellincontro et al., 2005; Mattheis et al., 2005);以‘黄金’梨和‘泰山早霞’苹果为试材进行的研究表明, 1-MCP 处理有效抑制了贮藏期间果实乙烯释放及醛类和醇类含量的下降以及酯类含量的增加,从而维持较好的贮藏品质(田长平 等, 2010)。

大多数植物香气物质的形成主要是通过脂肪酸途径,即亚油酸和亚麻酸在 LOX 作用下形成氢过氧化物,氢过氧化物在 HPL 的作用下形成己醛或己烯醛,醛在 ADH 的作用下形成相应的醇,醇在 AAT 的作用下形成相应的酯(Schwab et al., 2008; 席万鹏 等, 2013)。研究发现,不同种类的果实中 ADH 基因表达具有明显的差异,在苹果(Schaffer et al., 2007)和桃(Zhang et al., 2010)中,基因表达水平在采后成熟衰老进程中下降,而番茄(Longhurst et al., 1994)、甜瓜(Manriquez et al., 2006)和杏(González-Agüero et al., 2009)成熟过程中基因表达增强。Schaffer 等(2007)在‘皇家嘎拉’苹果中找到了 11 个 LOX 基因与 15 个 AAT 基因,其中乙烯通过调控 AAT 基因的表达进而调控酯类的合成(Defilippil et al., 2005a, 2005b; El-Sharkawy et al., 2005); MdLOX1a 和 MdLOX5e 参与果实中香气物质的产生,并且都在果实贮藏期间表达(Vogt et al., 2013)。Zhang 等(2010)的研究表明,随着桃果实采后成熟衰老, HPL 基因表达水平不断下降,并伴随着 C6 醛含量的显著减少。在本研究中,‘红心 9 号’果实贮藏期间的硬度均极显著低于‘红心 7 号’,香气物质总含量和酯类含量及 AAT1、AAT2 和 LOX 基因表达量均极显著高于‘红心 7 号’,贮藏后期(90~120 d)果实醇类与醛类含量及 HPL 和 ADH 基因表达量均极显著地低于‘红心 7 号’,表明‘红心 9 号’苹果贮藏期间果实硬度显著低于‘红心 7 号’可能与酯类含量高及酯类生物合成和果实软化相关基因的上调表达有关,这与已有的研究结果基本一致。因此,香气物质种类、含量及其变化可以作为果实贮藏品质评价的指标之一。

进一步以果实质地存在明显差异的红肉苹果新品系为试材,探讨乙烯信号因子与酯类生物合成和质地发育相关基因在蛋白-蛋白和蛋白-DNA 等不同层面的互作关系及其调控网络,阐释不同苹果新品系果实质地品质差异的分子机理,是今后重要的切入点。

References

- Bellincontro A, Morganti F, De Santis D, Botondi R, Mencarelli F. 2005. Inhibition of ethylene via different ways affects LOX and ADH activities, and related volatiles compounds in peach (cv. ‘Royal Gem’). Acta Horticulturae, 682: 445 - 452.
- Brummell D A, Dal C V, Crisosto C H, Labavitch J M. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. J Exp Bot, 55: 2029 - 2039.
- Chen Xue-sen, Guo Wen-wu, Xu Juan, Cong Pei-hua, Wang Li-rong, Liu Chong-huai, Li Xiu-gen, Wu Shu-jing, Yao Yu-xin, Chen Xiao-liu. 2015. Genetic improvement and promotion of fruit quality of main fruit trees. Scientia Agricultura Sinica, 48 (17): 3524 - 3540. (in Chinese)
- 陈学森, 郭文武, 徐娟, 丛佩华, 王力荣, 刘崇怀, 李秀根, 吴树敬, 姚玉新, 陈晓流. 2015. 主要果树果实品质遗传改良与提升实践. 中国农业科学, 48 (17): 3524 - 3540.
- Chen Xue-sen, Han Ming-yu, Su Gei-lin, Liu Feng-zhi, Guo Guo-nan, Jiang Yuan-mao, Mao Zhi-quan, Peng Fu-tian, Shu Huai-rui. 2010. Discussion

- on today's world apple industry trends and the suggestions on sustainable and efficient development of apple industry in China. *Journal of Fruit Science*, 27 (4): 598 - 604. (in Chinese)
- 陈学森, 韩明玉, 苏桂林, 刘凤之, 过国南, 姜远茂, 毛志泉, 彭福田, 束怀瑞. 2010. 当今世界苹果产业发展趋势及我国苹果产业优质高效发展意见. *果树学报*, 27 (4): 598 - 604.
- Chen Xue-sen, Song Jun, Gao Li-ping, Ji Xiao-hao, Zhang Yan-min, Li Min, Liu Da-liang, Zhang Rui. 2014b. Developing mechanism of fruits texture in 'Jonagold' apple and its crisp flesh sport. *Scientia Agricultura Sinica*, 47 (4): 727 - 735. (in Chinese)
- 陈学森, 宋君, 高利平, 冀晓昊, 张艳敏, 李敏, 刘大亮, 张芮. 2014b. '乔纳金'苹果及其脆肉芽变果实质地发育机理. *中国农业科学*, 47 (4): 727 - 735.
- Chen Xue-sen, Wang Zhi-gang. 2016. Problem research and related suggestions of shandong apple "sell fruit is difficult". *Deciduous Fruits*, 48 (4): 1 - 3. (in Chinese)
- 陈学森, 王志刚. 2016. 关于山东苹果“卖果难”问题调研及相关建议. *落叶果树*, 48 (4): 1 - 3.
- Chen Xue-sen, Zhang Jing, Liu Da-liang, Ji Xiao-hao, Zhang Zong-ying, Zhang Rui, Mao Zhi-quan, Zhang Yan-min, Wang Li-xia, Li Min. 2014a. Genetic variation of F_1 population between *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana* and apple varieties and evaluation on fruit characters of functional apple excellent strains. *Scientia Agricultura Sinica*, 47 (11): 2193 - 2204. (in Chinese)
- 陈学森, 张晶, 刘大亮, 冀晓昊, 张宗营, 张芮, 毛志泉, 张艳敏, 王立霞, 李敏. 2014a. 新疆红肉苹果杂种一代的遗传变异及功能型苹果优株评价. *中国农业科学*, 47 (11): 2193 - 2204.
- Defilippi B G, Dandekar A M, Kader A A. 2005b. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *J Agric Food Chem*, 53: 3133 - 3141.
- Defilippi B G, Kader A A, Dandekar A M. 2005a. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Science*, 168 (5): 1199 - 1210.
- Dixon J, Hewett E W. 2000. Factors affecting apple aroma flavour volatile concentration: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, (28): 155 - 173.
- El-Sharkawy I, Manríquez D, Flores F, Regad F, Bouzayen M, Latché A, Pech J C. 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, 59 (2): 345 - 362.
- Gao Li-ping, Ji Xiao-hao, Zhang Yan-min, Song Jun, Li Min, Liu Da-liang, Zhang Rui, Chen Xue-sen. 2013. The preliminary study on the enzymes activity related to fruit texture of the fruit of soft/crisp strains from the cross progenies of 'Fuji' and *Malus sieversii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (6): 1153 - 1161. (in Chinese)
- 高利平, 冀晓昊, 张艳敏, 宋君, 李敏, 刘大亮, 张芮, 陈学森. 2013. 新疆红肉苹果杂交后代绵/脆肉株系果实质地差异相关酶活性的初步研究. *园艺学报*, 40 (6): 1153 - 1161.
- Golding J B, Shearer D, Wyllie S G S, Mc Glasson W B. 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 14: 87 - 98.
- González-Aguero M, Troncoso S, Gudenschwager O, Campos-Vargas R, Moya-León M A, Defilippi B G. 2009. Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (5): 435 - 440.
- Gross K C. 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *HortScience*, 17: 933 - 934.
- Han Ya-shan. 1996. Instruction in food chemistry experiment. Beijing: China Agricultural University Press. (in Chinese)
- 韩雅珊. 1996. 食品化学实验指导. 北京: 中国农业出版社.
- Harada T, Sunako T, Wakasa Y, Soejima J, Satoh T, Niizeki M. 2000. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 (5): 742 - 746.
- Kenneth J L, Thomas D S. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.

- Lalel H J D, Singh Z, Tan S C. 2003. Aroma volatiles production during fruit ripening of 'Kensington Pride' mango. *Postharvest Biology and Technology*, 27 (3): 323 - 336.
- Li Tong, Zhang Zhi-hong, Wang Ai-de. 2012. The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes in apple fruit ripening. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (9): 1665 - 1672. (in Chinese)
- 李 通, 张志宏, 王爱德. 2012. 苹果果实成熟过程中 ACC 合成酶基因作用机理研究进展. *园艺学报*, 39 (9): 1665 - 1672.
- Li Yan. 2012. Effect and regulation of ethylene in the biosynthesis of aroma volatiles in oriental sweet melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino) [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 李 岩. 2012. 乙烯在薄皮甜瓜果实香气物质合成中的作用与调控[博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- 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 Mei-yan, Wei Jing-li, Liu Jin, Fang Long, Song Yang, Cui Mei, Wang Chuan-zeng, Chen Xue-sen. 2012. The regulation of 1-methylcyclopropene on softening and expression of relevant genes in 'Taishan Zaoxia' apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (5): 845 - 852. (in Chinese)
- 刘美艳, 魏景利, 刘 金, 房 龙, 宋 杨, 崔 美, 王传增, 陈学森. 2012. '泰山早霞' 苹果采后 1 - 甲基环丙烯处理对其软化及相关基因表达的影响. *园艺学报*, 39 (5): 845 - 852.
- Longhurst T, Lee E, Hinde R, Brady C, Speirs J. 1994. Structure of the tomato *Adh2* gene and *Adh2* pseudogenes, and a study of *Adh2* gene expression in fruit. *Plant Molecular Biology*, 26 (4): 1073 - 1084.
- Manriquez D, El-Sharkawy I, Flores F, El-Yahyaoui F, Regad F, Bouzayen M, Latché A, Pech J C. 2006. Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant Molecular Biology*, 61 (4 - 5): 675 - 685.
- Mattheis J P, Fan X T, Argenta L C. 2005. Interactive responses of gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (53): 4510 - 4516.
- Oraguzie N C, Iwanami H, Soejima J, Harada T, Hall A. 2004. Inheritance of the *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (8): 1526 - 1533.
- Oshita S, Shima K, Haruta T, Seo Y, Kawagoe Y, Nakayama S, Takahara H. 2000. Discrimination of odors emanating from 'La France' pear by semi-conducting polymer sensors. *Computers and Electronics in Agriculture*, (26): 209 - 216.
- Schaffer R J, Friel E N, Souleyre E J F, Bolitho K, Thodey K, Ledger S, Bowen J H, Ma J H, Nain B, Cohen D, Gleave A P, Crowhurst R N, Schaffer, R. J, Friel E N, Souleyre E J F, Bolitho K, Thodey K, Ledger S, Bowen J H, Ma J H, Nain B, Cohen D, Gleave A P, Crowhurst R N, Janssen B J, Yao J L, Newcomb R D. 2007. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 144 (4): 1899 - 1912.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54 (4): 712 - 732.
- Steven van Nocker, Garrett Berry, James Najdowski, Roberto Michelutti, Margie Luffman, Philip Forsline, Nihad Alsmairat, Randy Beaudry, Muralaeddharan G Nair, Matthew Ordidge. 2012. Genetic diversity of red-fleshed apples (*Malus*). *Euphytica*, 185: 281 - 293.
- Sulová Z, Lednická M, Farkas V. 1995. A colorimetric assay for xyloglucan-endotransglycosylase from germinating seeds. *Analytical Biochemistry*, 229: 80 - 85.
- Sunako T, Sakuraba W, Senda M, Akada S, Ishikawa R, Niizeki M, Harada T. 1999. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol*, 119: 1297 - 1303.
- 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.
- Tian Shi-ping. 2013. Molecular mechanisms of fruit ripening and senescence. Chinese Bulletin of Botany, 48 (5): 481 - 488. (in Chinese)
- 田世平. 2013. 果实成熟和衰老的分子调控机制. 植物学报, 48 (5): 481 - 488.
- Tu Zheng-shun, Li Hua, Wang Hua, Li Ke-chang, Lu Jia-lan. 2001. The changes of aroma components in kiwifruit after harvest. Acta Horticulturae Sinica, 28 (6): 512 - 516. (in chinese)
- 涂正顺, 李华, 王华, 李可昌, 卢家烂. 2001. 猕猴桃果实采后香气成分的变化. 园艺学报, 28 (6): 512 - 516.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S K, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoid M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald L M, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell J T, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu V T, King S T, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan A C, Bus V, Chagne D, Crowhurst R N, Gleave A P, Lavezzo E, Fawcett J A, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens R P, Durel C E, Gutin A, Bumgarner R E, Gardiner S E, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). Nat Genet, 42: 833 - 839.
- Vogt J, Schiller D, Ulrich D, Schwab W, Dunemann F. 2013. Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus × domestica*). Tree Genet Genomes, 9: 1493 - 1511.
- Wang Chuan-zeng, Zhang Yan-min, Xu Yu-ting, Dong Fei, Song Yang, Liu Mei-yan, Liu Jin, Chen Xue-sen. 2013. Analysis of aroma components and related enzymes of fatty acid metabolism of red bud sports. Acta Horticulturae Sinica, 39 (12): 2447 - 2456. (in Chinese)
- 王传增, 张艳敏, 徐玉亭, 董飞, 宋杨, 刘美艳, 刘金, 陈学森. 2013. 苹果红色芽变香气组分及脂肪酸代谢相关酶活性分析. 园艺学报, 39 (12): 2447 - 2456.
- 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.
- Wang Li-xia, Ji Xiao-hao, An Meng-meng, Zhang Zong-ying, Wang Yan-ting, Wang Chuan-zeng, Wu Yu-sen, Wu Shu-jing, Chen Xue-sen. 2014. Evaluation on apple fruit flavor quality of several functional superior apple strains. Journal of Fruit Science, 3 (5): 753 - 759. (in Chinese)
- 王立霞, 冀晓昊, 安萌萌, 张宗营, 王艳廷, 王传增, 吴玉森, 吴树敬, 陈学森. 2014. 几个功能型苹果优株果实风味品质评价. 果树学报, 3 (5): 753 - 759.
- Wang Xian-ze. 2002. Biochemical principles and methods of experimental techniques. Beijing: China Agricultural University Press. (in Chinese)
- 王宪泽. 2002. 生物化学实验技术原理和方法. 北京: 中国农业大学出版社.
- Wei Jian-mei, Liu Chang-jiang, Zhu Xiang-qiu, Yuan Jun-wei. 2008. Changes of lipoxygenase activity of apple at softening stage and ethylene regulation after harvest. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 12 (7): 27 - 30. (in Chinese)
- 魏建梅, 刘长江, 朱向秋, 袁军伟. 2008. 苹果果实发育成熟软化过程中脂氧合酶活性变化及采后乙烯调控. 河北农业科学, 12 (7): 27 - 30.
- Wei Jian-mei, Ma Feng-wang. 2009. The characteristics of β -Gal and LOX activities in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit and their relation to fruit softening. Acta Horticulturae Sinica, 36 (5): 631 - 638. (in Chinese)
- 魏建梅, 马锋旺. 2009. 苹果果实 β -Gal 和 LOX 活性变化特性及其与果实软化的关系. 园艺学报, 36 (5): 631 - 638.
- Xi Wan-peng, Yu Song-lin, Zhou Zhi-qin. 2013. Advances in aroma compounds biosynthesis of peach fruit. Acta Horticulturae Sinica, 40 (9): 1679 - 1690. (in Chinese)
- 席万鹏, 郁松林, 周志钦. 2013. 桃果实香气物质生物合成研究进展. 园艺学报, 40 (9): 1679 - 1690.
- Xu Hai-feng, Wang Nan, Jiang Sheng-hui, Wang Yi-cheng, Liu Jing-xuan, Qu Chang-zhi, Wang De-yun, Zuo Wei-fang, Zhang Jing, Ji Xiao-hao, Zhang Zong-ying, Mao Zhi-quan, Chen Xue-sen. 2016. Comparison of content and analysis of biosynthesis-related genes in flavonoid among

- four strains of *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana* F₁ population. Scientia Agricultura Sinica, 49 (16): 3174 - 3187. (in Chinese)
- 许海峰, 王楠, 姜生辉, 王意程, 刘静轩, 曲常志, 王得云, 左卫芳, 张晶, 冀晓昊, 张宗营, 毛志泉, 陈学森. 2016. 新疆红肉苹果杂种一代4个株系类黄酮含量比较及其合成相关基因表达分析. 中国农业科学, 49 (16): 3174 - 3187.
- Zhang B, Shen J Y, Wei W W, Xi W P, Xu C J, Ferguson I, Chen K S. 2010. Expression of genes associated with aroma formation derived from the fatty acid pathway during peach fruit ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (10): 6157 - 6165.
- Zhang B, Xi W P, Wei W W, Shen J Y, Ferguson I, Chen K S. 2011. Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature storage and subsequent shelf-life of peach fruit. Postharvest Biology and Technology, 60 (1): 7 - 16.
- Zhang Rui, Zhang Zong-ying, Gao Li-ping, Ji Xiao-hao, Mao Zhi-quan, Xu Hai-feng, Wang Nan, Wu Shu-jing, Chen Xue-sen. 2015. Study on the molecular mechanism controlling differences in fruit texture formation of apple soft/crisp strains. Scientia Agricultura Sinica, 48 (18): 3676 - 3688. (in Chinese)
- 张芮, 张宗营, 高利平, 冀晓昊, 毛志泉, 许海峰, 王楠, 吴树敬, 陈学森. 2015. 苹果绵肉与脆肉株系果实质地差异的分子机理. 中国农业科学, 48 (18): 3676 - 3688.
- Zhang Xiao-meng. 2005. Physiological studies on aroma volatile formation in peach fruit [M. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 张晓萌. 2005. 桃果实成熟过程中香气成分形成及其生理机制研究 [硕士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Zhang Z Y, Jiang S H, Wang N, Li M, Ji X H, Sun S S, Liu J X, Wang D Y, Xu H F, Qi S M, Wu S J, Fei Z J, Feng S Q, Chen X S. 2016. Identification of differentially expressed genes associated with apple fruit ripening and softening by suppression subtractive hybridization. PLoS ONE, doi: 10.1371/journal.pone.0146061.
- Zhang Zong-ying. 2016. Isolation and function characterization of genes associated with fruit ripening and softening in 'Taishanzaoxia' apple (*Malus domestica* Borkh.) [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 张宗营. 2016. '泰山早霞' 苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 果实成熟软化相关基因的分离与功能鉴定 [博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Zhou H W, Sonogo L, Khalchitski A, Ben-Arie R, Lers A, Lurie S. 2000. Cell wall enzymes and cell wall changes in 'Flavortop' nectarines: mRNA abundance, enzyme activity, and changes in pectic and neutral polymers during ripening and in woolly fruit. J Am Soc Hortic Sci, 125: 630 - 637.
- Zhou Xin. 2015. Research on the effects and molecular mechanism of refrigeration on and 1-MCP treatment on aroma-related esters of Nanguo pears and regulation measures [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 周鑫. 2015. 冷藏及1-MCP处理对南果梨酯类香气影响的分子机制及香气“唤醒”研究 [博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.