

代谢组和转录组分析揭示白长果桑独特香味物质组成及其合成途径

武华周^{1,2}, 皇晶晶^{1,2}, 娄德钊¹, 耿涛¹, 林培群¹, 王树昌^{1*}

1. 热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572024; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所(农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室), 海南海口 571101; 3. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228

摘要: 桑葚是一种营养丰富、药食同源果树, 深受消费者的喜爱。香气是桑葚感官品质的重要因素, 对消费者的购买行为起到重要作用。白长果是一种非常独特的桑葚品种, 它能散发出浓烈的类似于奶油的香味, 有巨大的潜在市场价值, 但关于这种香味形成的关键代谢物和机制尚不清楚。本研究利用 GC-MS 和 RNA-seq 技术, 检测白长果和无特殊香味的红长果桑的关键香味物质(VOCs)和基因表达情况。结果表明: 2个桑葚品种共检测出661种挥发性代谢物, 其中多数在白长果桑中有更高的相对含量, 且47种仅在白长果桑中存在, 表明白长果桑含有丰富的VOCs。312种代谢物被鉴定为差异代谢物; 结合VOCs感官注释信息和相对含量, 其中70种候选VOCs被注释为与甜、香、椰子味和奶油味的感官形成有关, 可能是白长果桑独特香气形成的关键代谢物; 利用相对气味活性值(rOAV)分析, 最终确定 γ -萘内酯为白长果桑特殊香气形成的关键VOC; 通过RNA-seq鉴定19个与酯类合成相关的关键结构基因(包括AAT、ACX、ALDH、CYP、EHL、FAD、HPL、LOX), 这些结构基因多在白长果桑果实中的高表达, 可能是形成其特殊奶油香味的主要因素。本研究为不同种类桑葚的香气差异研究提供依据, 为后续桑葚的品种改良提供新思路。

关键词: 挥发性代谢物; 相对气味活性值; γ -萘内酯; 转录组

中图分类号: S663.9 文献标志码: A

Unique Flavor Substance Composition and Its Synthetic Pathway of Baichang Mulberry Revealed by Metabolome and Transcriptome Analyses

WU Huazhou^{1,2}, HUANG Jingjing^{1,2}, LOU Dezha¹, GENG Tao¹, LIN Peiqun¹, WANG Shuchang^{1*}

1. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan, 572024, China; 2. Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science (Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests), Haikou, Hainan, 571101, China; 3. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Mulberry is a fruit tree with rich nutrition and dual functions of food and medicine, which is deeply loved by consumers. The fragrance is a significant factor in the sensory quality of mulberries, playing a crucial role in consumer purchasing behavior. Mulberry Baichang is a unique variety that emits a strong, creamy fragrance, which has enormous potential market value. However, the key metabolites and mechanisms responsible for the formation of this fragrance are still unclear. In this study, we utilized GC-MS and RNA-seq technology to examine the volatile organic compounds (VOCs) and gene expression in Baichang and Hongchang, which lacking a distinct fragrance. The results showed that

收稿日期 2024-12-16; 接受日期 2024-12-20

基金项目 热带作物生物育种全国重点实验室科研项目(No. NKLTBCBXTD15); 国家蚕桑产业技术体系项目(No. CARS-18); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No. 1630042024023)。

作者简介 武华周(1987—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 桑资源收集与评价。*通信作者(Corresponding author): 王树昌(WANG Shuchang), E-mail: wangshuchang2001@163.com。

661 volatile metabolites were detected in both varieties. Most of these were found in higher relative amounts in Baichang, with 47 types being present only in Baichang, suggesting a rich composition of VOCs in this variety. A total of 312 metabolites were identified as differential metabolites; combining the sensory annotation information and relative content of VOCs, 70 candidate VOCs were annotated as being related to the formation of “sweet, waxy, coconut and oily” sensations. These could potentially be the key metabolites contributing to the unique aroma of Baichang. The relative odor activity value (rOAV) analysis revealed that 5-hexyldihydro-2(3H)-furanone (also known as γ -decalactone) was the key VOC contributing to the formation of the special aroma of Baichang. Using RNA-seq, 19 key structural genes related to ester synthesis were screened, including *AAT*, *ACX*, *ALDH*, *CYP*, *EHL*, *FAD*, *HPL* and *LOX*. The high expression levels of these structural genes in Baichang may contribute to the unique creamy aroma of this variety; however, the underlying mechanisms require further investigation. This study would provide insights into the aroma differences among different kinds of mulberries.

Keywords: volatile organic compounds; rOAV; 2(3H)-furanone, 5-hexyldihydro; RNA-seq

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.006

香气是判断水果风味品质的重要指标之一,具有诱人香味的水果能增强消费者的购买欲望^[1]。不同品种的水果具有不同的香气特征,而具有独特的风味品质的产品更容易在市场竞争中胜出。桑葚果实汁水丰沛、口味甜美、营养充足,既可以鲜食,也可以加工成桑葚酒、桑葚饮品或其他桑葚产品,深受市场的青睐。近期本课题组发现一种新的白长果桑,在成熟时能散发出独特的类似奶油的香味,这在其他品种桑葚中不常见。作为差异明显的品种,该桑葚具有巨大的育种价值和潜在商业价值。

水果的香味主要由挥发性物质 (volatile organic compounds, VOCs) 决定, VOCs 的种类包括酯类、醇类、醛类、酮类、萜类和杂环化合物等^[2-3]。虽然 VOCs 只占果实重量的很小一部分,但是对水果的香气起着决定性作用,对果实的口感也有一定影响。不同的 VOCs 给人以不同的风味感官,因此, VOCs 对香气成分的贡献不仅仅取决于浓度,还与 VOCs 的阈值密切相关^[4]。对于单一 VOC 来说,其浓度和阈值共同决定了其对香气构成的贡献,通常用香气强度值 (odor activity value, OAV) 来衡量^[5]。

已有的研究显示,酯类是 VOCs 中重要组成部分,对很多水果的感官风味起到决定性作用。如欧洲梨 (*Pyrus spp*) 的主要香味来源则是十烯二酸甲酯和己基酯^[6]; 在桃子 (*Prunus persica*) 已经被鉴定出的 100 多种 VOCs 中,酯类对其香味有着决定性的影响^[7-8]。挥发性酯类通常在果实成熟期积累更多,并为多种果实如草莓 (*Fragaria × ananassa*)、香蕉 (*Musa acuminata*) 和苹果 (*Malus domestica*) 等提供独特的水果风味^[9-10]。植物中

酯类通过脂肪酸途径合成,涉及多个结构基因,包括丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase, PDC)、乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH)、酰基载体蛋白酰基转移酶 (acyl carrier protein-acyltransferase, ACP)、脂肪酸脱氢酶 (fatty acid desaturase, FAD)、酯酰辅酶 A 氧化酶 (acyl-CoA oxidase, ACX)、细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP)、脂肪酸羟化酶 (fatty acid hydroxylase, FAH)、脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX)、环氧化物水解酶 (epoxide hydrolase, EHL)、裂解酶 (hydroperoxide lyase, HPL)、乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 和乙酰转移酶 (acetyltransferase, AAT) 等^[11-14]。

本研究利用 GC-MS 技术检测白长果桑和无特殊香味的红长果桑果实的 VOCs 和基因表达情况,筛选决定白长果桑特殊香气的关键 VOCs,并通过转录组鉴定与香气形成的关键结构基因。本研究将为桑葚香气的形成机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究使用的试验材料为白长果桑 (BC) 和红长果桑 (HC) 的果实,栽培于中国热带农业科学研究院环境与植物保护研究所种质资源圃 (海南儋州,中国)。每个品种选取 9 株生长状况良好的壮年树,每 3 棵作为 1 个生物学重复,每株取 10~15 个完熟果实作为样品。取样后立即液氮冷冻, -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 挥发性代谢组检测与分析 将研磨均匀的 500 mg 样品加入顶空瓶中,再依次加入饱和 NaCl

溶液、10 μL (50 $\mu\text{g/mL}$) 内标溶液, 进行全自动顶空固相微萃取 (HS-SPME) 后备用。萃取条件: 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温, 5 min 震荡, 120 μm DVB/CWR/PDMS 萃取头置于样品顶空瓶中萃取 15 min, 250 $^{\circ}\text{C}$ 下解析 5 min, 进行 GC-MS 分离鉴定。取样前, 萃取头在 Fiber Conditioning Station 中进行 5 min 老化, 温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。色谱条件为 DB-5MS 毛细管柱, 载气为高纯氦气, 恒流流速设定为 1.2 mL/min, 进样口设定温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 不分流进样, 溶剂延迟 3.5 min。程序升温设置, 40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3.5 min, 以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 100 $^{\circ}\text{C}$, 再以 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 180 $^{\circ}\text{C}$, 最后以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。质谱条件设置为: 电子轰击离子源 (EI), 离子源设定温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 四级杆设定温度为 150 $^{\circ}\text{C}$, 质谱接口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$, 电子能量 70 eV。扫描方式为选择离子检测模式 (SIM), 定性定量离子精准扫描 (GB 23200.8—2016)。

使用 MassHunter 软件处理质谱分析后的下机原始数据, 基于 Metatware 公司自建数据库进行定性定量分析。利用主成分分析 (PCA) 对样品中代谢物的差异性和可靠性进行分析验证。使用 R 软件绘制聚类热图, 利用 cor 函数计算皮尔逊相关系数。以 $\text{VIP}>1$ 和 $\text{Fold Change}\geq 2$ 和 $\text{Fold Change}\geq 0.5$ 为标准筛选差异代谢物, 使用 LRI & odour database、Flavornet and human odor space 和 Flavor Ingredient Library 数据库对 VOCs 的感官风味特征注释。通过 R 包计算 VOCs 的相对气味活度值 (relative odor activity value, rOAV) 值^[15]。

1.2.2 转录组测序与分析 取 1.1 的样品用于转录组测序 (RNA-seq), 测序由武汉迈特维尔公司完成。使用 CTAB 法提取样品 RNA, 利用片段化后的 mRNA 和随机引物进行 cDNA 合成, 然后在其两端加上接头并进行纯化。

每个样品建立 1 个测序文库, 用 Illumina Hiseq X 进行测序, 并通过边合成边测序的方法进行双端测序。

对所测读序 (read) 进行过滤, 然后组装转录本, 所用程序为 Trinity, 主要参数为 “min_kmer_cov2”, 最后将最长的转录本指定为元基因 (unigene)。采用 DESeq R 包 (1.10.1) 分析 2 组间的差异表达, $|\log_2(\text{Fold Change})|>1$ 且 $P\text{-value}<0.05$ 视为差异表达基因 (differential expression genes, DEGs)。RNA-seq 的原始数据以以下 ID 号提交给 NCBI: PRJNA1084918 和 PRJNA1142089。

1.2.3 qRT-PCR 分析 首先, 用天根 RNA 试剂盒提取 1.1 的样品 RNA; 接着使用天根 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒反转录合成 cDNA; 以酯类合成途径基因脂肪酸脱氢酶 (fatty acid desaturase, FAD)、酯酰辅酶 A 氧化酶 (acyl-CoA oxidase, ACX)、脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX)、环氧化物水解酶 (epoxide hydrolase, EHL) 和乙酰转移酶 (acetyltransferase, AAT) 基因为目的基因, 使用 Primer 3.0 (<https://primer3.ut.ee/>) 软件设计基因的 qPCR 引物 (表 1), 然后通过 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 反应, 反应体系 (20 μL): 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL , primer1 0.4 μL , primer2 0.4 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 7.2 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。以桑树肌动蛋白 (Actin) 为内参基因^[16]。按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算。

1.3 数据处理

本研究主要使用 TBtools 软件^[17]和迈维云平台 (<https://cloud.metware.cn>) 进行热图绘制和数据分析。采用 SPSS 27.0 软件进行独立样本 t 检验分析, $P\text{-value}<0.05$ 和 $P\text{-value}<0.01$ 被认为具有

表 1 本试验所用引物
Tab. 1 Sequences of the Q-PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
Actin	GAGGGCCGTGTCCCCAGCATCGTC	TCTTTTGTATTGAGCCTCATCCCCT
M.alba_G0015845-FAD	TGCCAAGCAGCACCAAGT	GGGCGGGATGGCTTTCTT
M.alba_G0000938-EHL	GTCTTCCTGGTGGGCCAC	AGCGACGCTGAGGTTGAC
M.alba_G0006382-ACX	CGAAGGACGATCACCGGG	AGTAGCGGAAGGGCCTGA
M.alba_G0004770-AAT	TCAGCGGACCTGCAAAGG	TAGCATGCACCGTTGGCA
M.alba_G0014496-LOX	CCTGACAAGGGTCCGCAG	GTGGGTGCTCTGCCAGTT
M.alba_G0008183-EHL	ACGGCCCCGTGATCCTAT	CGAGTGAAGCCAAGGCCA

统计学意义，并使用“*”和“**”表示。

2 结果与分析

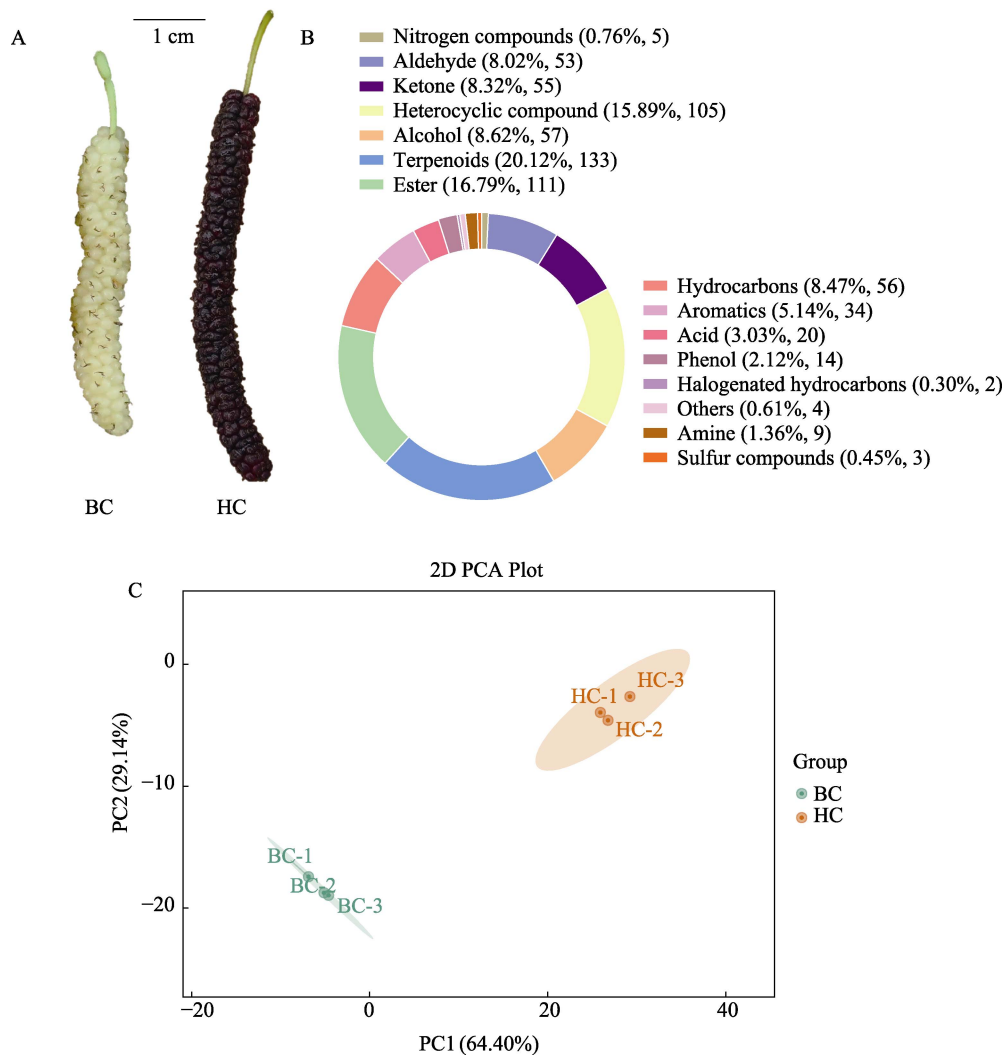
2.1 白长果桑和红长果桑成熟果实代谢组分析

白长果桑和红长果桑的成熟果实如图 1A 所示。在 2 个种类的桑葚成熟果实中共鉴定出 661 种挥发性代谢产物，分为 15 个种类，其中萜烯类 (terpenoids) 数量最多，为 133 个，占全部挥发性代谢产物种类的 20.12%，其次为酯类 (ester) 和杂环化合物 (heterocyclic compound)，分别占总量的 16.79%和 15.89%，其余为含氮化合物 (nitrogen compounds)、醛类 (aldehyde)、酮类 (ketone)、醇类 (alcohol)、烃类 (hydrocarbons)、芳烃 (aromatics)、酸类 (acid)、苯酚 (phenol)、

卤代烃 (halogenated hydrocarbons)、胺类 (amine)、硫化物 (sulfur compounds) 等成分 (图 1B)。有 47 种挥发性代谢物仅在白长果桑中被检测出，表明其香气成分可能更丰富。主成分分析 (PCA) 显示，同一桑葚种类之间的 3 个重复相互靠拢，表明样品的重复性良好；2 组之间呈明显的分离趋势，表明 2 个品种的 VOCs 差异较大；其中第一主成分决定了 64.40%的变异率，第二主成分决定了 29.14%的变异率 (图 1C)。

2.2 差异挥发性代谢物分析

2 个桑葚品种共鉴定出 312 种差异代谢物。相比于白长果桑，红长果桑多数差异代谢物 (290 种) 下调，仅有 22 种差异代谢物上调，这可能是白长果桑更有特色香气成分的成因。根据感官体



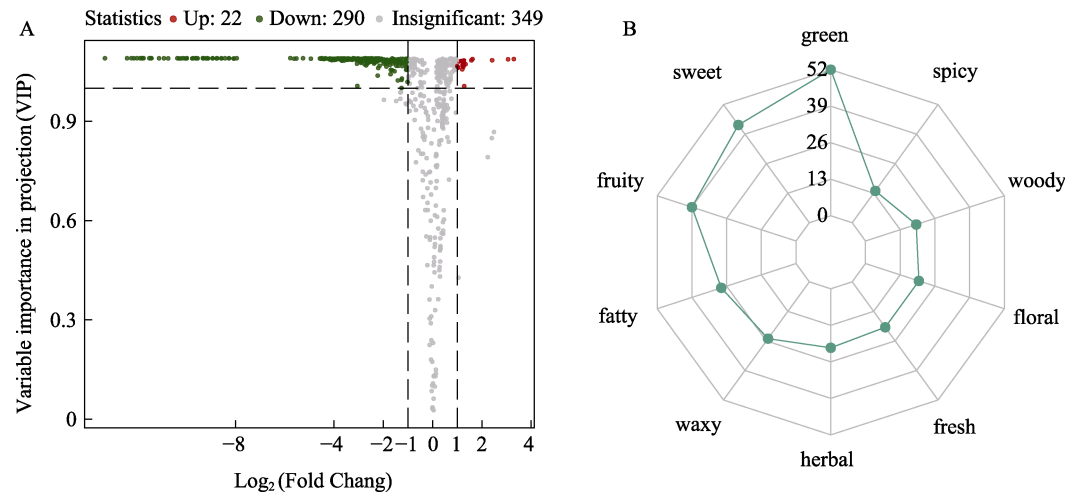
A: 桑葚果实表型；B: 不同种类挥发性代谢物种类；C: PCA 分析。
A: Two mulberry fruit varieties; B: VOC category statistics; C: PCA analysis.
图 1 2 个品种桑葚果实和挥发性代谢组特征
Fig. 1 Phenotypic and volatile metabolome characteristics of two mulberry varieties

验，白长果桑具有香味，而红长果桑不含香味，所以影响白长果桑香味的关键代谢物很可能属于下调差异代谢物（图 2A）。通过对 2 个品种桑葚的差异代谢物进行感官风味特征注释，发现青香（green）、辛辣香（spicy）、木香（woody）、花香（floral）、清香（fresh）、草香（herbal）、蜡香（waxy）、脂肪香（fatty）、果味（fruity）、甜味

（sweet）为排名前十的差异代谢物感官风味，其中青香、甜味、果味、脂肪香 4 种感官风味中含有的差异代谢物数量最多（图 2B）。

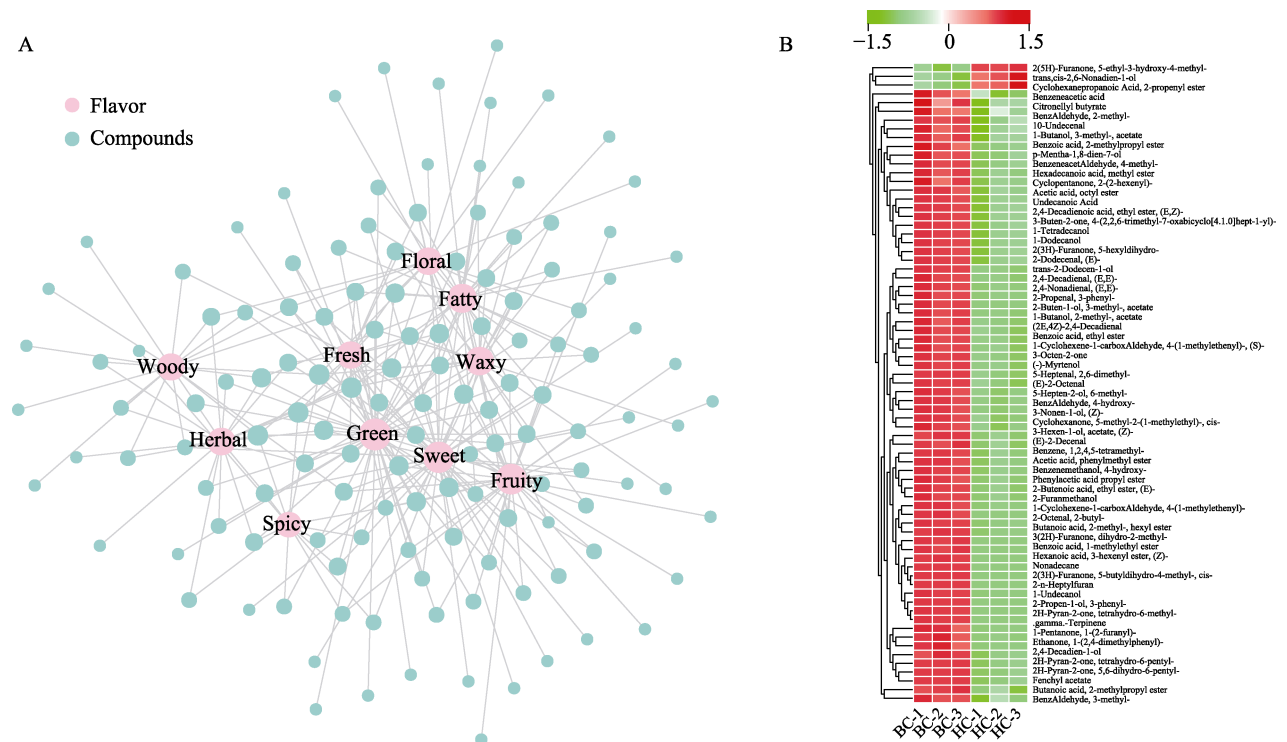
2.3 香气成分的关键差异代谢物筛选

通过绘制感官风味网络图确定每种感官风味的关键差异代谢物（图 3A）。甜味、蜡香、椰子油（coconut oily）几种感官风味与白长果桑的嗅



A: 差异代谢物火山图；B: 香气物质种类分布风味轮图（BC vs HC）。
A: Volcano plot of differential VOCs in BC vs. HC group; B: Flavor wheel analysis of differential VOCs in BC vs HC group.

图 2 差异代谢物分析
Fig. 2 Differential VOCs analysis in BC vs HC group



A: 感官特征与差异挥发性代谢物的网络图；B: 候选关键 VOC 相对含量分布热图。
A: Sensory flavor network diagram of different volatile organic compounds (VOCs); B: Relative content of candidate key different VOCs.

图 3 关键代谢物差异分析和筛选
Fig. 3 Key metabolite differential analysis and screening

觉体验一致, 基于这 4 种感官风味, 共筛选出 73 种相关联的差异代谢物。白长果桑在嗅觉感官上有较为浓郁的奶香味, 因此, 白长果桑中与香味相关的关键差异代谢物的相对含量更高。5-乙基-3-羟基-4-甲基-2(5H)-呋喃酮 [2(5H)-Furanone, 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-], trans, cis-2,6-Nonadien-1-ol、1-Nonanol 三种物质的含量在红长果桑中更高, 表明其不是形成白长果桑香味的关键物质, 而其余 70 种差异代谢物在白长果桑中相对含量更高, 可能是造成 2 个种类桑葚果实香味差异的候选关键代谢物质 (图 3B)。

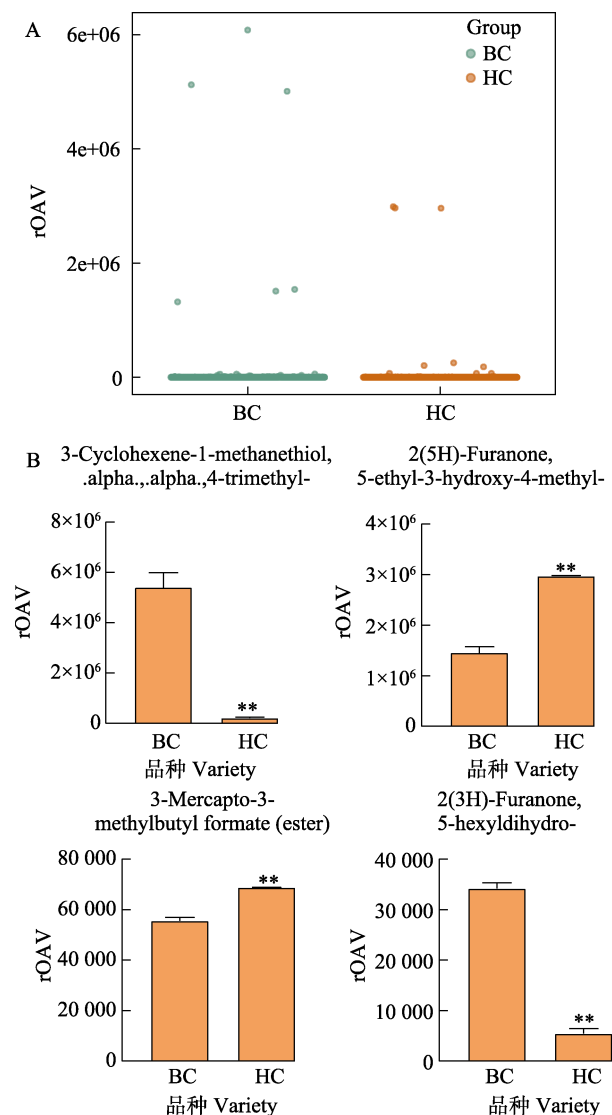
2.4 相对气味活度值 (rOAV) 分析

相对气味活度值 (rOAV) 可以阐明每种香气化合物对果实整体香气特征的贡献, 与差异代谢物的含量结合分析, 可以进一步寻找到造成白长果桑和红长果桑香味存在差异的关键物质。由图 4 可知, 对白长果桑香味影响最大的 4 种物质分别是 1-对孟烯-8-硫醇 (3-Cyclohexene-1-methanethiol, $\alpha,\alpha,\alpha,4$ -trimethyl-), 5-乙基-3-羟基-4-甲基-2(5H)-呋喃酮、3-巯基-3-甲基丁基甲酸酯 [3-Mercapto-3-methylbutyl formate (ester)]、 γ -萹内酯 [2(3H)-Furanone 5-hexyldihydro-]。其中 5-乙基-3-羟基-4-甲基-2(5H)-呋喃酮、3-巯基-3-甲基丁基甲酸酯的 rOAV 值在红长果桑中高, 而在白长果桑中低, 与白长果桑香味浓郁而红长果桑无明显香味的嗅觉感官体验不相符。因此, 推测这 2 种物质不是造成 2 个桑葚品种香味差异的关键物质。1-对孟烯-8-硫醇的气味注释为硫磺味、芳香味、柚子味、树脂味和木头味, 与白长果桑实际的奶香味嗅觉感受相差甚远。综合分析, 推测 γ -萹内酯为白长果桑奶香味来源的主要物质, 也是形成 2 种桑葚气味差异的关键代谢产物。

2.5 转录组测序和差异基因分析

通过转录组分析, 6 个桑葚果实样品分别获得 42 731 000~51 231 176 个 raw reads, 过滤后分别得到 41 862 788~49 701 590 个 clean reads 和 6.28~7.46 Gb 的 clean base。所有样品的错误率均为 0.02%, Q20 含量在 98.06%~98.14%之间, Q30 含量在 94.42%~94.76%之间, GC 含量在 46.3%~47.04%之间。相关性分析显示样品重复性较好 (图 5A)。差异分析显示, 在 BC vs HC 比较组中, 有 1823 个基因上调, 2352 个基因下调 (图 5B)。

GO 分析将差异基因归类与生物过程 (biological process BP)、细胞组成 (cellular component



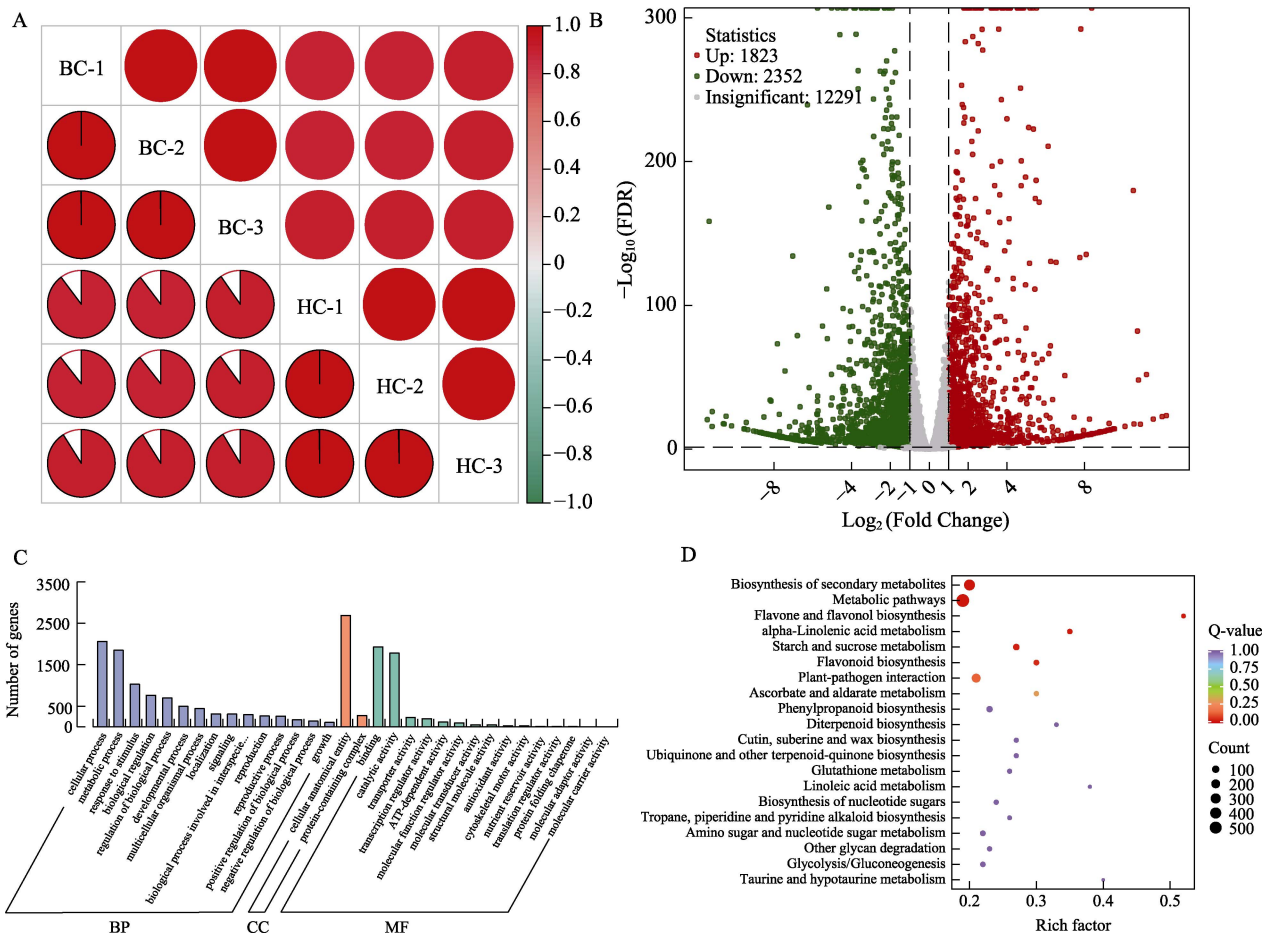
A: 挥发性香味物质的相对气味活度值分析; B: 关键挥发性物质的相对气味活度值差异分析, **表示极显著相关 ($P < 0.01$)。

A: Analysis of relative odor activity value (rOAVs) of VOCs; B: Difference analysis of relative odor activity value (rOAVs) of key volatile VOCs. ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 4 2 种桑树关键挥发性香味物质的 rOAV 分析

Fig. 4 rOAV analysis of key volatile aroma compounds in two mulberry trees

CC) 和分子功能 (molecular function MF) 3 个条目, 在 3 个比较组合中, 生物过程中注释基因数量最多的为细胞过程 (cellular process) (基因数目为 2063 个), 细胞组成中注释基因数量最多的为 cellular anatomical entity (基因数目为 2689 个), 分子功能中注释基因数量最多的为 binding (基因数目为 1932 个) (图 5C)。KEGG 分析将差异基因被富集到多个代谢通路, 包括 biosynthesis of secondary metabolites、metabolic pathways、flavone and flavonol biosynthesis、 α -



A: 样品的皮尔逊相关系数; B: 差异基因火山图; C: 差异基因 GO 分析; D: 差异基因 KEGG 富集分析。
A: Pearson correlation coefficient of the samples; B: Gene ontology (GO) analysis of DEGs; C: Volcano plots of DEGs;
D: Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis of DEGs.

图 5 差异基因分析

Fig. 5 Analysis of differential expression genes in BC vs. HC group

Linolenic acid metabolism、Starch and sucrose metabolism 等, 显示了 2 个品种在基因表达层面的巨大差异 (图 5D)。

2.6 桑葚发育过程中 Lactones (内脂) 合成途径基因表达情况

本研究从差异基因中筛选了与酯类合成相关的结构基因, 包括 1 个乙酰转移酶基因 *AAT* (M.alba_G0004770)、1 个酯酰辅酶 A 氧化酶 *ACX* (M.alba_G0004521)、3 个乙醛脱氢酶 *ALDH* (M.alba_G0000606、M.alba_G0019840 和 M.alba_G0013314)、4 个细胞色素 P450 酶 *CYP* (novel.128、M.alba_G0014072、M.alba_G0006952 和 M.alba_G0003440)、4 个环氧化物水解酶 *EHL* (M.alba_G0008184、M.alba_G0005973、M.alba_G0000938 和 M.alba_G0010612)、3 个脂肪酸脱氢酶 *FAD* (novel.4905、M.alba_G0000805 和 M.alba_G0009644)、1 个裂解酶 *HPL* (M.alba_

G0002152) 和 2 个脂氧合酶 *LOX* (M.alba_G0015824 和 M.alba_G0014496)。在这些结构基因中, 多数成员在白长果品种中高表达, 少部分在红长果品种中高表达 (附表 1)。如相较于红长果桑, M.alba_G0000606 (*ALDH*) 在白长果桑中的表达上调了 14.50 倍, M.alba_G0014072 (*CYP*) 上调 11.14 倍, M.alba_G0004521 (*ACX*) 上调了 7.06 倍, M.alba_G0004770 (*AAT*) 上调了 2.71 倍等 (图 6)。这些基因可能是白长果桑独特香气成分形成的关键因素。qPCR 验证基因表达结果与转录组结果趋势一致 (图 7)。

3 讨论

香味是衡量水果品质重要的标准之一, 它影响着水果的价格及销量, 一些能散发出迷人香气的新品种水果往往更容易得到消费者的偏爱^[18-19]。香味不仅对鲜食水果有着深远的影响, 对其后续加

工制品,如果酒、罐头、水果冻干、果酱等生产同样意义重大^[20-21]。部分香味物质如内酯类物质,还可以用于制作香水、食用香精或药品等^[22]。果实的香气通常由 VOCs 的种类、不同含量和各组分的气味阈值共同决定^[23]。水果中的 VOCs 以其中萜类、酯类和脂肪酸衍生物最为常见^[24]。ZHU 等^[25]对 3 个栽培品种桑葚 (*Morus nigra*, *Morus macroura*, *Morus alba*) 香气成分的研究显示, Hexanal、(E)-2-Hexenal、Benzaldehyde、Methyl benzoate、Ethyl benzoate、Ethyl acetate、Ethyl butanoate、Ethyl hexanoate、methional、3-mercaptohexyl acetate 等是桑葚香气形成的主要物质。然而,至今还无相关研究报道存在明显奶油香味的桑葚品种。本研究以白长果桑和红长果桑 2 个种类桑葚为样本,共检测到 661 种 VOCs,其中包括大量的酯类、萜类、醛类和杂环化合物,这和人研究是相似的。然而 γ -萘内酯仅在白长果桑中具有较高的相对含量,在其他品种中未见报道,显示了其在香气组分上的特殊性,具有较大的潜在市场价值^[26-27]。

γ -萘内酯的气味被认为具有浓郁的奶油、坚果和焦糖的香气,是对桃子香气贡献最大的挥发性物质,它使得桃子区别于其他水果^[28-29]。然而,就感官而言,白长果桑散发的香气浓郁而独特,与桃子并不相同,这可能是由于二者其他成分的 VOCs 组成与含量不同所导致的。王娟等^[30]研究了 8 个草莓品系的香气成分,发现 γ -萘内酯对京桃香草莓的独特香味形成有决定性作用。 γ -萘内酯除了是水果香味的重要组成成分之外,还是香料和食品工业中最广泛使用的内酯之一^[31]。

酯在植物中的合成途径尚未被完全解析,脂肪酸(FAs)被认为是酯类合成的主要前体,香蕉、草莓、甜瓜(*Cucumis melo*)果实的香气主要由脂肪酸衍生物导致^[10, 32]。目前已经有报道了一些脂肪酸途径的关键的结构基因,包括脂肪酸去饱和酶(FAD)、醇脱氢酶(ADH)、脂氧合酶(LOX)和乙酰转移酶(AAT)等^[33]。百香果(*Passiflora edulis*)上的研究显示脂肪酸通路中的 ACX13/14/15/20、ADH13/26/33、ALDH1/4/21、HPL4/6、FAD13/50/52/53/55、PeLOX5/18、PeFAE6、PeFAH2、PeCYP7/13、PeEHL13/15、PeACP-AP1/5/6/7、PeAAT3 可能参与酯类合成的调控^[14]。AdFAD1、AdALDH2、AdAAT17 参与了猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)成熟过程中酯类合成的调

控^[34]。1-MCP 显著调控梨酯类和 VOCs 的释放,调控 AATs 和 LOX 的表达^[35]。AAT 催化了酯生物合成的最后一步,通常果实的成熟水平和酯类含量同步增加^[36]。杏(*Prunus armeniaca*)、木瓜(*Carica papaya*)、猕猴桃、葡萄(*Vitis vinifera*)和草莓等多种水果种的 AATs 已被克隆和功能验证^[9, 37-40]。PENG 等^[41]利用产油酵母表达系统证实了 PpAAT1 能催化 γ -萘内酯的合成。本研究中,多数脂肪酸途径的结构基因在白长果桑果实中高表达,其中也包含 1 个 AAT(M.alba_G0004770)。这些基因的高表达可能导致了白长果桑拥有更复杂的香气组成和独特香味。

关于挥发性酯类的调控,多数集中在转录因子对脂肪酸途径的关键结构基因的转录调控上。ZHANG 等^[34]通过双荧光素酶试验证明了 AdNAC5 和 AdDof4 分别激活和抑制了 AdFAD1 启动子活性,进而调控猕猴桃酯类的合成。NAC 转录因子可以激活 AAT 表达,催化多种果实中挥发性酯类的形成,如桃中 PpNAC1 激活 PpAAT1 的表达,苹果中 MdNAC5 激活 MdAAT1 的表达。CAO 等^[36]的研究表明这种调控受到表观遗传的调控,与果树成熟过程中抑制标记 H3K27me3 的去除密切相关。关于桑葚中 γ -萘内酯合成的调控机制有待于进一步探究。

4 结论

本研究利用 HS-SPME 萃取和 GC-MS 技术检测白长果桑和红长果桑的挥发性代谢物,并通过 RNA-seq 筛选影响白长果桑香气形成的关键基因。从代谢组中共检测出 661 种挥发性代谢物,其中 47 种为白长果桑特有,共筛选到 312 种为差异代谢物,结合其相对含量、感官注释和 rOAV 分析,最终确定了 γ -萘内酯为白长果桑特殊香气形成的关键 VOC。通过 RNA-seq,鉴定了 19 个与酯类合成相关的关键结构基因,包括 AAT、ACX、ALDH、CYP、EHL、FAD、HPL 和 LOX,这些结构基因在白长果桑果实中的高表达,可能是形成其特殊奶油香味的主要因素。本研究为不同种类桑葚的香气差异研究提供了依据,为后续桑葚的品种改良提供了新思路。

参考文献

- [1] ZHU J, CHEN F, WANG L, NIU Y, CHEN H X, WANG H

- L, XIAO Z. Characterization of the key aroma volatile compounds in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) using gas chromatography-olfactometry (GC-O) and odor activity value (OAV)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(24): 4990-4999.
- [2] GOFF S A, KLEE H J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value?[J]. *Science*, 2006, 311(5762): 815-819.
- [3] PICHERSKY E, GERSHENZON J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(3): 237-243.
- [4] KLEE H J. Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology[J]. *New Phytologist*, 2010, 187(1): 44-56.
- [5] HE Y L, QIN H Y, WEN J L, CAO W Y, YAN Y P, SUN Y N, YUAN P Q, SUN B W, FAN S T, LU W P, LI C Y. Characterization of key compounds of organic acids and aroma volatiles in fruits of different *Actinidia arguta* resources based on high-performance liquid chromatography (HPLC) and headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS)[J]. *Foods*, 2023, 12(19): 3615.
- [6] RAPPARINI F, PREDIERI S. Pear fruit volatiles[J]. *Horticultural Reviews*, 2002, 28: 237-324.
- [7] EDUARDO I, CHIETERA G, BASSI D, ROSSINI L, VECCHIETTI A. Identification of key odor volatile compounds in the essential oil of nine peach accessions[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(7): 1146-1154.
- [8] JIA H, HIRANO K, OKAMOTO G. Effects of fertilizer levels on tree growth and fruit quality of 'Hakuho' peaches (*Prunus persica*)[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1999, 68(3): 487-493.
- [9] BEEKWILDER J, ALVAREZ-HUERTA M, NEEF E, VERSTAPPEN F W, BOUWMEESTER H J, AHARONI A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(4): 1865-1878.
- [10] SOULEYRE E J, CHAGNE D, CHEN X, TOMES S, TURNER R M, WANG M Y, MADDUMAGE R, HUNT M B, WINZ R A, WIEDOW C. The AAT 1 locus is critical for the biosynthesis of esters contributing to 'ripe apple' flavour in 'Royal Gala' and 'Granny Smith' apples[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(6): 903-915.
- [11] ECHEVERRIA G, GRAELL J, LÓPEZ M L, LARA I. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 31(3): 217-227.
- [12] LI X, TIEMAN D, LIU Z, CHEN K, KLEE H J. Identification of a lipase gene with a role in tomato fruit short-chain fatty acid-derived flavor volatiles by genome-wide association[J]. *The Plant Journal*, 2020, 104(3): 631-644.
- [13] SONG J, BANGERTH F. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2003, 30(2): 113-121.
- [14] XIA Z Q, HUANG D M, ZHANG S K, WANG W Q, MA F N, WU B, XU Y, XU B Q, CHEN D, ZOU M L, XU H Y, ZHOU X C, ZHAN R L, SONG S. Chromosome-scale genome assembly provides insights into the evolution and flavor synthesis of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)[J]. *Horticulture Research*, 2023, 1: 259-272.
- [15] YUE Y, WANG C, CHEN Y S, ZHENG M M, ZHANG Y, DENG Q C, ZHOU Q. Aroma characteristics of flaxseed milk via GC-MS-O and odor activity value calculation: impacts and selection of different flaxseed varieties[J]. *Food Chemistry*, 2024, 432: 137095.
- [16] DAI F W, ZHAO X T, TANG C M, WANG Z J, KUANG Z S, LI Z Y, HUANG J, LUO G Q. Identification and validation of reference genes for qRT-PCR analysis in mulberry (*Morus alba* L.)[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194129.
- [17] GONG P, SHEN Q T, ZHANG M Z, QIAO R, JIANG J, SU L L, ZHAO S W, FU S, MA Y, GE L H, WANG Y Q, LOZANO-DURÁN R, WANG A M, LI F F, ZHOU X P. Plant and animal positive-sense single-stranded RNA viruses encode small proteins important for viral infection in their negative-sense strand[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1794-1810.
- [18] LU H F, ZHAO H F, ZHONG T L, CHEN D W, WU Y Q, XIE Z W. Molecular regulatory mechanisms affecting fruit aroma[J]. *Foods*, 2024, 13(12): 1870.
- [19] NUZZI M, LO SCALZO R, TESTONI A, RIZZOLO A. Evaluation of fruit aroma quality: comparison between gas chromatography-olfactometry (GC-O) and odour activity value (OAV) aroma patterns of strawberries[J]. *Food Analytical Methods*, 2008, 1(4): 270-282.
- [20] EL HADI M A M, ZHANG F J, WU F F, ZHOU C H, TAO J. Advances in fruit aroma volatile research[J]. *Molecules*, 2013, 18(7): 8200-8229.
- [21] SIEGMUND B. Biogenesis of aroma compounds: flavour formation in fruits and vegetables[M]. Amsterdam: Elsevier, 2015: 127-149.
- [22] SARTORI S K, DIAZ M A N, DIAZ-MUÑOZ G. Lactones: classification, synthesis, biological activities, and industrial applications[J]. *Tetrahedron*, 2021, 84: 132001.
- [23] NIU Y W, ZHU Q, XIAO Z B. Characterization of percep-

- tual interactions among ester aroma compounds found in Chinese Moutai Baijiu by gas chromatography-olfactometry, odor intensity, olfactory threshold and odor activity value[J]. Food Research International, 2020, 131: 108986.
- [24] LIU J, YIN X, KOU C X, THIMMAPPA R, HUA X, XUE Z Y. Classification, biosynthesis and biological function of triterpene esters in plants[J]. Plant Communications, 2024, 5(4): 100845.
- [25] ZHU J C, WANG L Y, XIAO B Z, NIU Y W. Characterization of the key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography-olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and flame photometric detection (FPD)[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 775-785.
- [26] ELMAC Y, ALTUĞ T. Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002, 82(6): 632-635.
- [27] FENG Y M, LIU M, OUYANG Y A, ZHAO X F, JU Y L, FANG Y L. Comparative study of aromatic compounds in fruit wines from raspberry, strawberry, and mulberry in central Shaanxi area[J]. Food & Nutrition Research, 2015, 59(1): 29290.
- [28] PENG B, YU M M, ZHANG B B, XU J L, MA R. Differences in PpAAT1 activity in high-and low-aroma peach varieties affect γ -decalactone production[J]. Plant Physiology, 2020, 182(4): 2065-2080.
- [29] ZHANG L P, LI H Y, GAO L, QI Y J, FU W Y, LI X W, ZHOU X, GAO Q K, GAO Z S, JIA H J. Acyl-CoA oxidase1 is involved in γ -decalactone release from peach (*Prunus persica*) fruit[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36: 829-842.
- [30] 王娟, 孙瑞, 王桂霞, 常琳琳, 孙健, 钟传飞, 董静, 张运涛, ULRICH D. 8个草莓品种(系)果实特征香气成分比较分析[J]. 果树学报, 2018, 35(8): 967-976.
- WANG J, SUN R, WANG G X, CHANG L L, SUN J, ZHONG C F, DONG J, ZHANG Y T, ULRICH D. Comparative analysis of characteristic aroma components in fruits of eight strawberry cultivars (lines)[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(8): 967-976. (in Chinese)
- [31] WACHÉ Y, AGUEDO M, NICAUD J M, BELIN J M. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2003, 61: 393-404.
- [32] EL-SHARKAWY I, MANRIQUEZ D, FLORES F B, REGAD F, BOUZAYEN M, LANCHE A, PECH J C. 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[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59: 345-362.
- [33] ZHOU D D, SUN Y, LI M Y, ZHU T, TU K. Postharvest hot air and UV-C treatments enhance aroma-related volatiles by simulating the lipoxygenase pathway in peaches during cold storage[J]. Food Chemistry, 2019, 292: 294-303.
- [34] ZHANG A D, ZHANG Q Y, LI J Z, GONG H S, FAN X G, YANG Y Q, LIU X Q, YIN X R. Transcriptome co-expression network analysis identifies key genes and regulators of ripening kiwifruit ester biosynthesis[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20: 1-12.
- [35] LI G P, JIA H J, LI J H, LI H X, TENG Y W. Effects of 1-MCP on volatile production and transcription of ester biosynthesis related genes under cold storage in 'Ruanerli' pear fruit (*Pyrus ussuriensis* Maxim.)[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 111: 168-174.
- [36] CAO X M, WEI C Y, DUAN W Y, GAO Y, KUANG J F, LIU M C, CHEN K S, KLEE H, ZHANG B. Transcriptional and epigenetic analysis reveals that NAC transcription factors regulate fruit flavor ester biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2021, 106(3): 785-800.
- [37] BALBONTIN C, GAETE-EASTMAN C, FUENTES L, FIGUEROA C R, HERRERA R, MANRIQUEZ D, LANCHE A, PECH J C, MOYA-LEÓN M A. VpAAT1, a gene encoding an alcohol acyltransferase, is involved in ester biosynthesis during ripening of mountain papaya fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(8): 5114-5121.
- [38] GONZÁLEZ-AGÜERO M, TRONCOSO S, GUDENSCHEWAGER O, CAMPOS-VARGAS R, MOYA-LEÓN M A, DEFILIPPI B G. Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.)[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47(5): 435-440.
- [39] GÜNTHER C S, CHERVIN C, MARSH K B, NEWCOMB R D, SOULEYRE E J. Characterisation of two alcohol acyltransferases from kiwifruit (*Actinidia* spp.) reveals distinct substrate preferences[J]. Phytochemistry, 2011, 72(8): 700-710.
- [40] WANG J H, LUCA V D. The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including 'foxy' methylanthranilate[J]. The Plant Journal, 2005, 44(4): 606-619.
- [41] PENG B, XU J L, CAI Z X, ZHANG B B, YU M L, MA R J. Different roles of the five alcohol acyltransferases in peach fruit aroma development[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2020, 145(6): 374-381.