

## 桔水桠柑果肉挥发性物质及萜烯类合成途径基因表达特征

Changes in volatile compounds and expression pattern of genes involved in terpenoid biosynthesis in pulp of Ponkan fruit during section-drying

姚世响<sup>1,2</sup> 曹琦<sup>1</sup> 谢姣<sup>1</sup> 邓丽莉<sup>1,2</sup> 曾凯芳<sup>1,2</sup>

YAO Shi-xiang<sup>1,2</sup> CAO Qi<sup>1</sup> XIE Jiao<sup>1</sup> DENG Li-li<sup>1,2</sup> ZENG Kai-fang<sup>1,2</sup>

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715)

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Engineering Research Center of Regional Food, Chongqing 400715, China)

**摘要:**运用 GC-MS 和 RNA-Seq 技术研究桠柑果实在发生桔水时,果肉挥发性物质组分及含量和萜烯类化合物合成途径相关基因表达的变化特征。研究结果发现:① 桠柑果肉挥发性组分共 13 种,其中萜烯类物质 7 种,相对含量超过 85%;② 桠柑桔水时,果肉挥发性物质含量降为正常果实的 32%,其中萜烯类物质下降为正常果实的 22%,另外挥发性物质的组分种类不变,有 5 种挥发性物质的含量发生显著改变,分别是  $\beta$ -月桂烯、 $d$ -柠檬烯、 $\gamma$ -松油烯、瓦伦西亚烯和十二醛;③ 鉴定到 8 个萜烯类化合物合成途径的差异表达基因,在桔水时全部下调。研究表明桠柑桔水时果肉挥发性物质的含量显著下调,与萜烯类合成途径相关基因表达降低密切相关,为进一步深入研究桠柑桔水发生的分子机制提供依据。

**关键词:**挥发性物质;桠柑果肉;桔水;气相色谱-质谱法;高通量测序技术

**Abstract:** Both GC-MS and RNA-Seq were employed to investigate the changes in volatile compounds and expression pattern of genes involved in biosynthesis pathway of terpenoid in the pulp of Ponkan fruit during section-drying process. The results were as follows: ① 13 volatile components were identified from pulp of Ponkan fruit, among which seven components were terpenoid, accounting for more

than 85% of the total volatile contents. ② The volatile constituents in pulp were same between normal and disordered fruits. In fruits affected by section-drying, the content of total volatiles and terpenoid decreased to 32% and 22%, respectively, of normal fruits. A total of five volatiles including  $\beta$ -myrcene,  $d$ -limonene,  $\gamma$ -terpinene, valencene and dodecanal showed a significant decrease in content during the section-drying process. ③ Eight differentially expressed genes involved in terpenoid biosynthesis pathway were identified, all of which were decreased in disordered fruits. The present study elucidated that the volatile constituents in pulp of Ponkan fruits decreased upon section-drying, which was quite closely related to the decreasing expression of genes involved in terpenoid synthesis. Moreover, this study provided invaluable information for further research to reveal the molecular mechanism underlying section-drying in citrus fruits.

**Keywords:** volatiles compounds; Ponkan pulp; section-drying; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); RNA-Seq

桔水常称粒化,是柑橘的一种常见生理性病害,多发生于采后贮藏中<sup>[1]</sup>。桔水果实在外观方面与正常果实并无二致,果皮表面新鲜,但果肉品质显著劣变,糖酸风味变淡,严重时不堪食用。桔水是当前影响柑橘果实贮藏寿命的重要因子,严重制约柑橘的商品价值。自 1934 年报道柑橘桔水至今,已过去 80 多年,科学家<sup>[2-5]</sup>从多方面对柑橘桔水进行了研究,但对桔水的发生机制仍无明确结论。

柑橘果肉的香气物质来源于果实中合成的挥发性物质<sup>[6]</sup>。目前对不同柑橘果实挥发性物质的分析研究发现萜烯类物质是含量最大的一类<sup>[7-8]</sup>。对柑橘萜烯类物质代谢途径的研究是近年的研究热点<sup>[9-10]</sup>。尽管柑橘在贮藏后期发生桔水时,会普遍伴随着香气物质的变淡,但这种现象缺

**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号:31601520);重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目(编号:cstc2016shms-ztx80005);中国博士后科学基金(编号:2016M592620);重庆市博士后科研项目特别资助(编号:Xm2016119);中央高校基本科研业务费专项资金资助(编号:XDJK2016C060,SWU115083)

**作者简介:**姚世响,男,西南大学讲师,博士。

**通信作者:**曾凯芳(1972—),女,西南大学教授,博士。

E-mail: zengkai-fang@hotmail.com

**收稿日期:**2017-10-18

乏试验证据的支撑。椪柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan)含糖量高、香气浓郁,深受消费喜爱,在重庆地区有较大面积的栽培<sup>[11]</sup>。本研究拟以椪柑为试验材料,运用气相-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)技术和高通量测序技术(RNA-Sequencing, RNA-Seq),分析椪柑枯水时果肉挥发性物质和萜烯类化合物合成相关基因及基因表达的变化模式,探讨挥发性物质与椪柑枯水的关系及其机制,对阐明椪柑枯水的发生机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

椪柑:2015年12月于重庆市北碚区柑橘果园采收完全成熟的椪柑果实(*C. reticulata* Blanco cv. Ponkan)。果实采收后迅速运回实验室,挑选大小、性状和色泽一致的果实,经咪唑啉和2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)保鲜处理后,单果用聚乙烯薄膜套袋后贮藏于冷库(8~10℃)。在贮藏期间,定期取样观察枯水发生情况,在贮藏90 d后选择没有枯水症状的果实作为对照组,橘瓣大部分枯水的果实作为枯水样品;

癸酸乙酯:>98%,上海西格玛奥德里奇公司;

甲基叔丁基醚(methyl tert-butyl ether, MTBE):色谱纯,上海西格玛奥德里奇公司。

### 1.2 仪器与设备

气相色谱质谱联用仪:GCMS-QP2010 plus型,日本岛津制作所;

真空离心浓缩仪:ZLS-1型,湖南赫西仪器装备有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 GC-MS样品制备 准确称取1.00 g果肉样品,研磨成粉末。加入42.5 μg 癸酸乙酯(内标)和5 mL MTBE,充分混匀后于低温超声60 min<sup>[12]</sup>。将有机相进行真空离心浓缩,然后用微孔滤膜(直径0.22 μm)过滤,供上机分析。

#### 1.3.2 气相-质谱(GC-MS)条件

(1) 气相:DB-5MS 石英毛细管柱(长30 m、内径0.25 mm、厚0.25 μm)为色谱柱。升温程序:以3℃/min升温至50℃(停留1 min),以2℃/min升温至70℃(停留3 min),以3℃/min升温至160℃(停留2 min),以8℃/min升温至220℃(停留2 min);高纯度氮气作为载气,流速为0.80 mL/min;进样口温度:250℃;采用不分流进样模式。

(2) 质谱:EI源,接口温度250℃,电子能量70 eV;离子源温度230℃;扫描范围30~400(*m/z*)。

1.3.3 挥发性物质的鉴定与定量 GC-MS获得的质谱图基于数据库(NIST08和NIST08S)进行检索,对挥发性物质进行鉴定,用内标法对各挥发性组分进行定量。

1.3.4 RNA-Seq分析 椪柑样品RNA用TRIzol试剂提取。cDNA文库用Ultra RNA Kit for Illumina试剂盒构建。高通量测序用Illumina HiSeq完成。测序数据用TopHat v2.0.12软件与基因组序列进行比对,参考基因组用*Citrus clementina*数据(<https://www.citrusgenomedb.org/>

analysis/156)。用FPKM(number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced)表示基因表达水平。

### 1.4 数据分析与处理

挥发性成分含量的差异显著性用 $t$ 检验进行统计学判断( $P<0.05$ )。基因表达数据的差异显著性用校正的 $P$ 值进行统计学判断。用Excel 2010软件进行作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 椪柑果肉挥发性物质组分的鉴定

图1为果肉正常果实果肉的TIC图(总离子色谱图)。由表1可知,本次试验共鉴定出13种挥发性物质,其中7种萜烯类物质、1种醇类物质、3种醛类物质和2种酯类物质。果肉挥发性物质组分似乎要少于果皮,本课题组用相同的GC-MS条件从椪柑果皮中鉴定了52种挥发性组分<sup>[8]</sup>;另外前人<sup>[13-14]</sup>在印度东北地区和日本高知县的椪柑果皮中分别鉴定到37和39种挥发性组分。本研究鉴定的椪柑果肉挥发性物质组分相对较少,可能与果皮和果肉的差异相关,因为果皮油胞层可以大量合成主要成分为挥发性物质的精油;另外也与椪柑果实已经贮藏3个月有关,果实在贮藏中后期挥发性物质含量会逐渐降低,在研究中也观察到此时椪柑果实香气较淡。

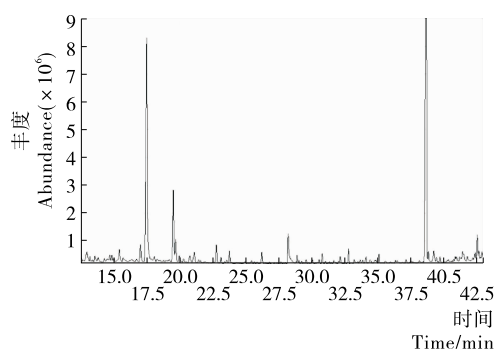


图1 椪柑果肉挥发性物质总离子色谱图

Figure 1 Total ion current chromatogram of volatile compounds in juice sacs of Ponkan fruit

### 2.2 枯水对椪柑果肉挥发性物质组分及含量的影响

由表1可知,正常和枯水椪柑果肉中的挥发性组分均为13种,组分种类完全相同,表明挥发性物质的组成在枯水时没有发生改变。正常椪柑果实中萜烯类物质是最主要的挥发性物质,其相对含量高达88%,*d*-柠檬烯的相对含量为75%,表明*d*-柠檬烯是椪柑果实中丰度最高的萜烯类挥发性物质组分。这种挥发性物质的组成特征在莽山野柑<sup>[6]</sup>、柠檬<sup>[15]</sup>、脐橙<sup>[8]</sup>和柚类果实<sup>[16]</sup>也有类似的报道。本研究用内标法对挥发性组分进行定量分析,结果显示,枯水椪柑果肉的挥发性物质总量仅为正常果实的32%( $P<0.05$ ),其中*d*-柠檬烯含量仅为正常果实的13%( $P<0.05$ )。13种挥发性组分中的5种在枯水时的含量有显著性变化( $P<0.05$ )。

2.2.1 萜烯类物质 由表1可知,本研究共鉴定到7种萜烯类物质,其中单萜烯类有4种,分别为水芹烯、 $\beta$ -月桂烯、

表 1 椪柑果肉挥发性物质在正常果实和桔水果实中的含量<sup>†</sup>

Table 1 Contents of volatile compounds in juice sacs from normal or granulated Ponkan fruit

| 种类  | 出峰时间/min | 物质名称  | 相对峰面积(×100)   |              | 比值/%  |
|-----|----------|-------|---------------|--------------|-------|
|     |          |       | 正常            | 桔水           |       |
| 萜烯类 | 13.6     | 水芹烯   | 0.624±0.086   | 0.535±0.107  | 85.7  |
|     | 14.7     | β-月桂烯 | 1.086±0.309   | 0.084±0.019* | 77.3  |
|     | 17.5     | d-柠檬烯 | 48.120±12.650 | 6.315±0.130* | 13.1  |
|     | 19.7     | γ-松油烯 | 3.826±0.757   | 1.580±0.105* | 41.3  |
|     | 35.6     | α-古巴烯 | 0.325±0.108   | 0.285±0.095  | 87.7  |
|     | 42.6     | 瓦伦西亚烯 | 1.979±0.427   | 3.225±0.161* | 163.0 |
|     | 42.8     | α-芹子烯 | 0.399±0.027   | 0.428±0.180  | 107.3 |
| 醇类  | 22.8     | 芳樟醇   | 1.650±0.113   | 1.498±0.219  | 90.8  |
|     | 23.1     | 壬醛    | 1.402±0.793   | 0.989±0.212  | 70.5  |
| 醛类  | 30.8     | 柠檬醛   | 1.511±0.604   | 1.330±0.318  | 88.0  |
|     | 39.2     | 十二醛   | 2.553±0.194   | 3.730±0.576* | 146.1 |
| 酯类  | 36.5     | 乙酸香茅酯 | 0.286±0.040   | 0.329±0.033  | 115.0 |
|     | 37.8     | 乙酸香叶酯 | 0.091±0.009   | 0.080±0.024  | 87.9  |

<sup>†</sup> “\*”表示差异显著,P<0.05。

d-柠檬烯和 γ-松油烯,倍半萜烯类有 3 种,分别为 α-古巴烯、瓦伦西亚烯和 α-芹子烯。这 7 种萜烯类物在果肉中的相对含量在桔水时降为正常果实的 22.1%(P<0.05)。其中单萜烯类物质组分 β-月桂烯、d-柠檬烯和 γ-松油烯在桔水时含量显著降低,分别为正常果实的 77.3%,13.1%,41.3%,而水芹烯的含量在桔水时没有明显改变。倍半萜烯类物质组分瓦伦西亚烯含量在桔水时升高为对照果实的 163%(P<0.05),而 α-古巴烯和 α-芹子烯的含量则没有发生明显改变。

2.2.2 醇类物质和醛类物质 由表 1 可知,本研究鉴定到 1 种醇类物质,即芳樟醇。芳樟醇为萜烯类衍生物,其含量在桔水时降低为正常果实的 90.8%,但这种差异并不具备统计学显著性(P>0.05)。本研究还鉴定并定量了 3 种醛类物质,相对含量在桔水时为正常果实的 110.7%,其中壬醛和柠檬醛含量分别为正常果实的 70.5%和 88.0%,但这种差异性并没有统计学意义的显著性(P>0.05)。十二醛相对含量在桔水时则显著升高,变为正常果实的 146.1%(表 1)。

2.2.3 酯类物质 本研究鉴定到 2 种酯类物质:乙酸香茅酯和乙酸香叶酯。这 2 种酯类挥发性物质的含量在桔水时分别为对照果实的 115.0%和 87.9%(P>0.05),因此酯类物质总量在桔水没有发生显著性变化(见表 1)。

2.3 桔水对椪柑果肉萜烯类合成途径基因表达的影响

椪柑果肉挥发性物质在桔水时降低为正常果实的 32%,其中相对含量为 88%的萜烯类物质在桔水时降低为正常果实的 22%。这意味着萜烯类物质含量的降低是椪柑果实桔水时挥发性物质含量减少的主要原因。为分析萜烯类化合物含量降低的原因,本研究采用高通量测序技术对椪柑果实桔水时基因的表达特征进行系统分析,共鉴定出 8 个桔水特异性表达的萜烯类物质合成途径关键酶的编码基因,表达量

均显著下降,分别是 ACAT2(gene encoding acetoacetyl-CoA thiolase,乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶基因)、DXR(gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase,1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因)、HDS(gene encoding 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase,4-羟基-3-甲基-2-丁烯-焦磷酸合成酶基因)、HDR(gene encoding 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase,4-羟基-3-甲基-2-邻苯基二磷酸还原酶基因)、KAO2(gene encoding ent-kaurenoic acid hydroxylase,贝壳杉烯酸羟化酶基因)、KAO3(gene encoding ent-kaurenoic acid hydroxylase,贝壳杉烯酸羟化酶基因)、CYP82G1(gene encoding cytochrome P450 monooxygenase,细胞色素 P450 单加氧酶基因)、TCS(terpenoidcyclases,萜类环化酶基因)。

2.3.1 萜类骨架代谢合成途径基因 本研究共鉴定出 4 个萜烯类骨架代谢合成途径的差异表达基因,见图 2。萜烯类化合物主要通过甲羟戊酸(Mevalonate,MVA)途径和 2C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate,MEP)途径合成,异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate,IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸酯(dimethylallyl diphosphate,DMAPP)是萜烯类物质合成的前体。本研究鉴定到基因 ACAT2(CICLE\_v10015452mg),其编码的乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶负责在 IPP 合成途径中将两分子乙酰辅酶 A 合成乙酰乙酰辅酶 A。ACAT2 在桔水时表达量由正常果实的 61.5 下降到 44.9(P<0.05)。本研究鉴定到一个编码 DXR(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase,1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶)的基因 DXR(CICLE\_v10028082mg),参与 MEP 合成途径。DXR 在桔水时表达量显著下调(P<0.05),由正常果实的 207.4 下降至桔水果实的 99.3。HDS 催化 1-羟基-2-甲基-2-丁烯-4-焦磷酸(1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate,HMBPP)的合成。本研究鉴定到一个编码 HDS 的基因 HDS(CICLE\_v10027881mg),表达量在桔水时显著下调(P<0.05),由正常果实的 154.5 下降至桔水果实的 84.8。本研究还鉴定到 HDR(CICLE\_v10028384mg),编码的 4-羟基-3-甲基-2-邻苯基二磷酸还原酶参与催化 HMBPP 生成 IPP 的反应。HDR 在桔水时表达量由正常果实的 67.9 下降至 52.0(P<0.05)。

2.3.2 二萜合成途径基因 本研究共鉴定出 3 个二萜合成途径中的差异表达基因,见图 3。它们分别是编码贝壳杉烯酸羟化酶(ent-kaurenoic acid hydroxylase,KAO)和细胞色素 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenase,CYP82G1)的 KAO2、KAO3 和 CYP82G1。这 3 个基因在桔水时均呈显著下降的趋势(P<0.05),表达量从正常果实中的 11.0,47.0,113.3 下降为桔水果实中的 4.9,27.3,48.9。

2.3.3 萜类物质合成途径其它基因 本研究还鉴定到编码萜类环化酶(terpenoidcyclases,TCS)的基因 TCS,见图 4。萜类环化酶又称萜类合成酶,是一类包括单萜合成酶、倍半萜合成酶和二萜合成酶在内的一大类酶家族。本研究鉴定的 TCS 在桔水表达量显著下降(P<0.05),从正常果实中的

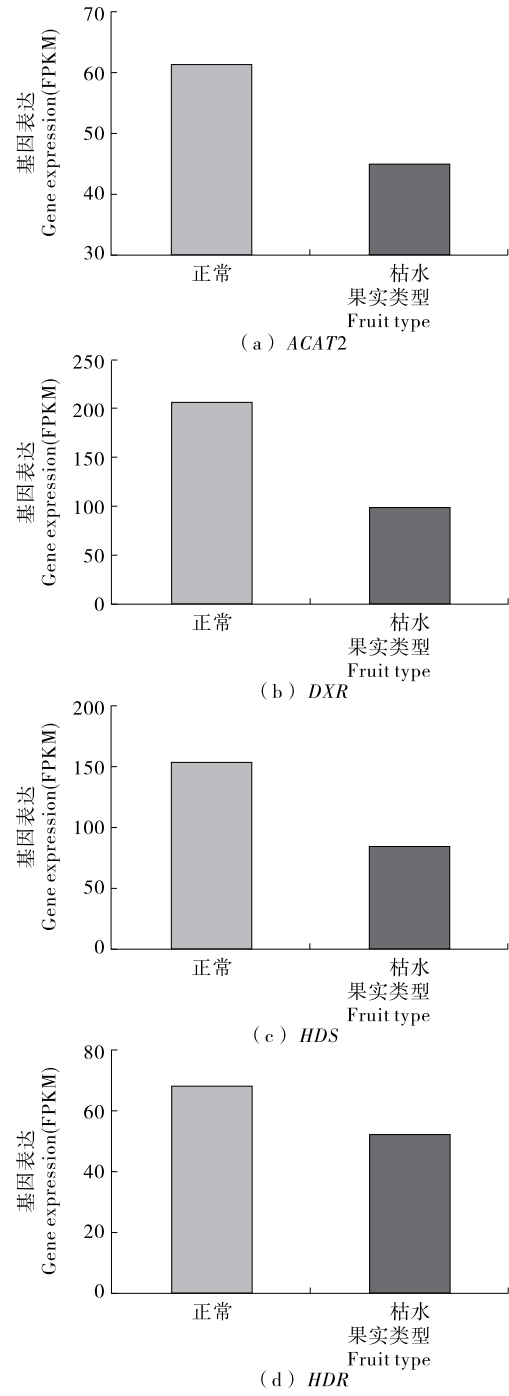


图 2 萜烯类骨架代谢合成途径基因在椪柑果肉 枯水时的表达特征

Figure 2 Changes in expression pattern of genes involved in biosynthesis pathway of terpenoid backbone in pulp of Ponkan fruit during section-drying

5.8 下降为枯水果实中的 3.2。

果实挥发性物质的含量与其合成和降解速度密切相关，当合成减慢而降解加快时，总量必然减少。本研究基于以上基因表达结果得出结论：萜烯类物质合成途径在枯水时显著下调，是椪柑果实香气丧失和挥发性物质含量降低的重要原因。本研究所鉴定的挥发性物质组分和萜烯类合成途径差异表达基因的数量分别为 13 种和 8 个，数量较少。这可能

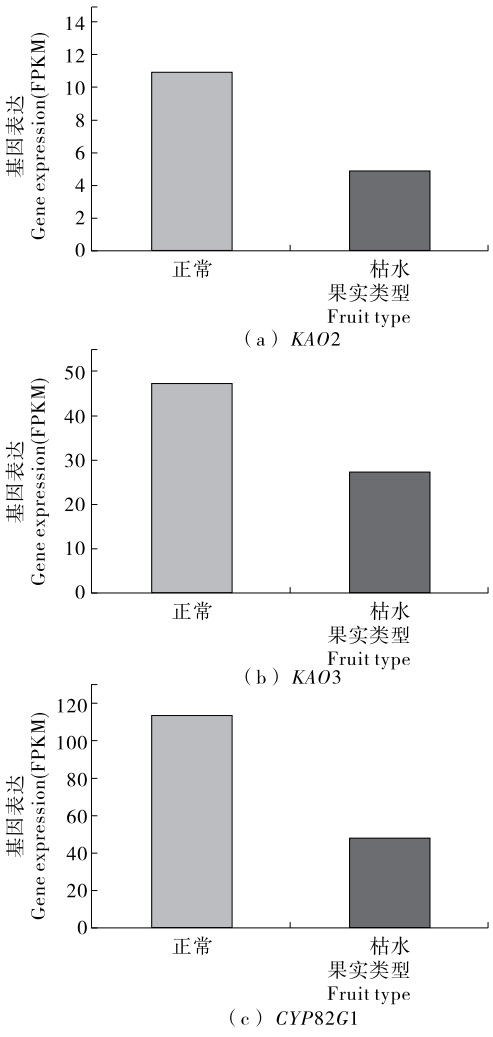


图 3 二萜合成途径相关基因在椪柑果肉枯水时的表达特征  
Figure 3 Changes in expression pattern of genes involved in biosynthesis pathway of diterpenoid in pulp of Ponkan fruit during section-drying

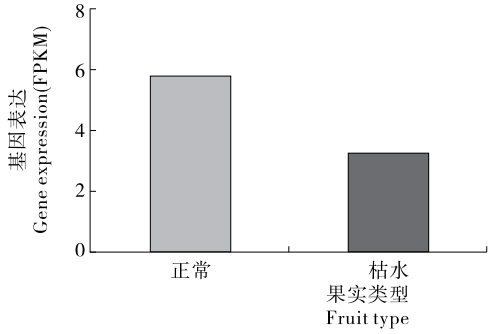


图 4 萜类环化酶基因在椪柑果肉枯水时的表达特征  
Figure 4 Change in expression pattern of gene encoding terpenoid cyclases (TCS) in pulp of Ponkan fruit during section-drying

与试验样品有关，果实已经贮藏 3 个月，香味偏淡，如果比较分析贮藏前与贮藏后的果实，可能会鉴定到更多的挥发性物质种类和萜烯合成相关的差异表达基因。本研究的结果基于贮藏后的正常和枯水果之间的比较，在以后研究中可对果

实内部正常汁胞和桔水汁胞进行比较, 结果能更好地反映桔水时的生理状态<sup>[17]</sup>。

本研究结果为后续深入研究柑桔果实的桔水机制提供了新的思路。一方面, 可以从挥发性物质合成途径的相关基因入手, 探讨其在桔水时表达量下降的调控机制, 可以利用酵母单杂交技术筛选上游转录因子, 最终解析桔水时挥发性物质合成的分子机制。另一方面, 借助高通量代谢组学技术<sup>[18]</sup>, 高通量测序技术<sup>[19]</sup>、鸟枪法蛋白质组学技术<sup>[20]</sup>等, 分析不同柑桔种类中不同桔水程度的汁胞挥发性物质的变化规律、转录组和蛋白质组的动态变化模式, 在组学水平分析柑桔桔水的分子网络及调控机制。

### 3 结论

本研究发现桔水与正常柑桔果实相比, 果肉挥发性物质的含量显著降低, 但是组分种类没有变化。基因表达分析的结果表明萜烯类化合物合成的相关基因 (*ACAT2*、*DXR*、*HDS*、*HDR*、*KA02*、*KA03*、*CYP82G1*、*TCS*) 在桔水时表达量下调, 意味着萜烯类物质的合成在桔水时受到抑制, 这是柑桔桔水时挥发性物质降低的重要原因。本研究揭示了柑桔果肉挥发性物质在桔水时的降解特征, 并分析萜烯类物质代谢途径相关基因的表达特征, 初步阐明了柑桔桔水时挥发性物质降低的生物学机制。萜烯类合成途径相关基因的表达在桔水时为何下降, 目前还不清楚, 对其调控机制的研究是未来的重点。

### 参考文献

- [1] RITENOUR M A, ALBRIGO L G, BURNS J K. Granulation in Florida citrus[J]. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 2004, 117: 358-361.
- [2] 丁健. 柑橘果实粒化变异体的遗传背景及其性状形成的机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009: 17.
- [3] WU Jia-ling, PAN Teng-fei, GUO Zhi-xiong, et al. Specific lignin accumulation in granulated juice sacs of *Citrus maxima*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(50): 12 082-12 089.
- [4] ZHANG Jing, WANG Miao, CHENG Fan-sheng, et al. Identification of microRNAs correlated with citrus granulation based on bioinformatics and molecular biology analysis[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 118: 59-67.
- [5] BURNS J K, ACHOR D S. Cell-wall changes in juice vesicles associated with section drying in stored late-harvested grapefruit[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1989, 114(2): 283-287.
- [6] LIU Cui-hua, CHENG Yun-jiang, ZHANG Hong-yan, et al. Volatile constituents of wild citrus Mangshanyegan (*Citrus nobilis* Lauriro) peel oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(10): 2 617-2 628.
- [7] 张涵, 鲁周民, 王锦涛, 等. 4 种主要柑橘类香气成分比较[J]. 食品科学, 2017(4): 192-196.
- [8] XIE Jiao, DENG Li-li, ZHOU Ya-han, et al. Analysis of changes in volatile constituents and expression of genes involved in terpenoid metabolism in oleocellosis peel[J]. Food Chemistry, 2017, 243: 269-276.
- [9] LI Xiang, XU Ya-ying, SHEN Shu-ling, et al. Transcription factor CitERF71 activates the terpene synthase gene *CitTPS16* involved in the synthesis of E-geraniol in sweet orange fruit[J]. J Exp Bot, 2017, 68(17): 4 929-4 938.
- [10] 冯桂蓉, 谢姣, 邓丽莉, 等. 柑橘果实萜烯类挥发性物质研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 200-204.
- [11] 姚世响, 谢姣, 曾凯芳. 温州蜜柑和椪柑橘络主要矿物质元素含量的比较分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2017(4): 1 250-1 253.
- [12] DING Yu-duan, CHANG Ji-wei, MA Qiao-li, et al. Network analysis of postharvest senescence process in citrus fruits revealed by transcriptomic and metabolomic profiling[J]. Plant Physiology, 2015, 168(1): 357-642.
- [13] CHUTIA M, BHUYAN P, PATHAK M. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(3): 777-780.
- [14] SAWAMURA M, THI M T N, ONISHI Y, et al. Characteristic odor components of *Citrus reticulata* Blanco (ponkan) cold-pressed oil[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004, 68(8): 1 690-1 697.
- [15] LOTA M L, DE ROCCA S D, TOMI F, et al. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(4): 796-805.
- [16] NJOROGI S M, KOAZE H, KARANJA P N, et al. Volatile constituents of redblush grapefruit (*Citrus paradisi*) and pummelo (*Citrus grandis*) peel essential oils from Kenya[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(25): 9 790-9 794.
- [17] YAO Shi-xiang, CAO Qi, XIE Jiao, et al. Alteration of sugar and organic acid metabolism in postharvest granulation of Ponkan fruit revealed by transcriptome profiling[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 139: 2-11.
- [18] 吴超. 高产油微藻基于基因组的初级代谢网络重构和代谢流分析[D]. 北京: 清华大学, 2015: 8-9.
- [19] VANBUREN R, BRYANT D, EDGER P P, et al. Single-molecule sequencing of the desiccation-tolerant grass *Oropetium thomaeanum*[J]. Nature, 2015, 527(7 579): 508-511.
- [20] 姚世响. 稳定同位素标记水稻幼苗的定量蛋白质组学新方法的研究[D]. 北京: 清华大学, 2015: 4-10.