

# 桃果实醇酰基转移酶基因的克隆及 对外源乙烯的响应表达

王贵章<sup>1</sup>, 陈新<sup>2</sup>, 赵天田<sup>1</sup>, 梁丽松<sup>1</sup>, 马庆华<sup>1</sup>, 王贵禧<sup>1\*</sup>

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091  
2. 山东省果树研究所, 山东省果树生物技术育种重点实验室, 山东 泰安 271000)

**摘要:**为研究桃果实酯类香气的生物合成, 克隆了桃醇酰基转移酶基因 *AAT*, 并研究了外源乙烯对该基因 mRNA 转录水平的影响。根据桃基因组测序结果, 采用 RACE 和反转录 PCR 技术克隆到 1 个与醇酰基转移酶基因同源的 cDNA, 序列全长 1 486 bp, CDS 区长度为 1 353 bp, 编码 450 个氨基酸, 命名为 *PpAAT2*。*PpAAT2* 蛋白属于 PLN02481 超级家族, 含有植物转移酶基因 2 个高度保守结构域 HXXXD 和 D(N)F(V)GWG。基因位于桃第 5 条染色体, BAC 注释为 1 条包含 1 个内含子的 mRNA 序列转录链, CDS 区有 2 处碱基突变, 其中, 555 bp 处碱基由 C 突变为 G, 导致丙氨酸突变为缬氨酸。*AAT* 基因响应乙烯表达, 0 °C 冷藏桃施加外源乙烯促进 *AAT* 基因表达水平; 该基因在叶片、花和成熟果肉中均表达, 且在叶片和花中的表达丰度比果实高, 推测其在不同的生理过程中均发挥作用。

**关键词:**桃果实; 醇酰基转移酶基因; 酯类; 外源乙烯

中图分类号: S662.1

文献标识码: A

## Cloning, Characterization and Expression of Alcohol Acyltransferase Gene which Responses to Exogenous Ethylene in Peach Fruit

WANG Gui-zhang<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, ZHAO Tian-tian<sup>1</sup>, LIANG Li-song<sup>1</sup>, MA Qing-hua<sup>1</sup>, WANG Gui-xi<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Shandong Institute of Pomology, Shandong Provincial Key Laboratory of Fruit Tree Biotechnology Breeding, Taian 271000, Shandong, China)

**Abstract:** This research cloned and analyzed the alcohol acyl-transferase gene *AAT* from peach, and detected the response of the gene to exogenous ethylene. Based on the peach genome published (Genome ID: *ppa005625m*), the specific primers were designed and the full-length of the gene was cloned using RACE PCR. The content of ester volatiles were determined by GC-MS from the storage peach fruits. The full-length of *AAT* was obtained with 1 486 bp and the open reading frame (ORF) was 1 353 bp. Bioinformation analysis indicated that this gene encoded 450 amino acids, containing three conserved domains LXXYYPLAGR, HXXXD and D(N)F(V)GWG of plant transferase gene, which belonging to PLN02481 super family. The gene was named as *PpAAT2* and mapped in the 5th peach chromosome. BAC annotation presented that the gene was the mRNA transcription chain containing 2 exons separated by 1 introns with 3 447 bp. C mutated to G in *PpAAT2* on seq 555 bp, resulting alanine to valine. *PpAAT2* gene expressed in response to exogenous ethylene which promoted *PpAAT2* gene expression level in 0 °C cold-storage peach fruits. *PpAAT2* gene expressed in leaves, flowers and ripe flesh, suggesting that the gene played

收稿日期: 2013-11-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071834)

作者简介: 王贵章, 女, 博士研究生, 主要从事经济林产品贮藏保鲜研究. Email: wwgz2003@tom.com.

\* 通讯作者: 王贵禧, 博士生导师. 研究员. Email: wanggx0114@126.com

a role in various physiological processes.

**Key words:** peach fruit; alcohol acyl-transferase gene (*AAT*); esters; exogenous ethylene

桃(*Prunus persica* L. Batsch)是我国广泛种植的重要园艺植物之一,据联合国粮农组织(FAO 2011)最新统计数据显示,在我国的栽培面积已逾 73 万 km<sup>2</sup>,产量达 1 152 万 t。香气是桃果实特征风味品质的重要组成部分,在很大程度上影响着鲜食桃产品及其制成品的品质,而贮藏桃果实的香味是评价其品质的一个重要因子,也成为吸引消费者的重要因素<sup>[1]</sup>。研究发现,‘大久保’桃在采后 3 d 进入完熟状态,风味品质达到最佳<sup>[2]</sup>,一旦完成后熟便不耐贮藏,很快腐烂变质。目前,延长市场供应期的主要措施之一是采用低温冷藏<sup>[3]</sup>;但桃果实在低温下易发生冷害,一个明显的特征是香味变淡甚至丧失,直接导致食用品质下降<sup>[4-5]</sup>。因此,研究低温贮藏桃果实芳香成分的生物合成调节具有重要意义。

不同水果的特有香味是不同挥发性成分组合的结果<sup>[6]</sup>,它不仅取决于品种本身的遗传性状和发育阶段<sup>[7-9]</sup>,而且受外界因素的调控,如栽培管理措施、采收时间、采后贮藏方式等。如采后贮藏温度会影响草莓(*Fragaria ananassa* Duchesne)的芳香物质合成,5 ℃和 10 ℃较 0 ℃贮藏条件能产生更多的芳香族化合物<sup>[10]</sup>;在桃果实采收前套袋,可以促进果香型物质尤其是  $\gamma$ -癸内酯的合成<sup>[11]</sup>。桃果实中挥发性香气成分复杂,已鉴定出的有 100 种,主要是酯类、内酯类、醛类、醇类、酸酐类和烷烃类等<sup>[12-14]</sup>。酯类和内酯类使果实散发甜美的果香气息<sup>[15-16]</sup>,而乙醇酰基转移酶 *AAT*(Alcohol acyltransferase)(EC 2.3.1.84)是酯类香气合成过程的关键酶,它催化脂肪酸途径中最后一个酰基由醇转化为酯<sup>[17-18]</sup>。

由于 *AAT* 酶在酯类香气生物合成中发挥重要作用,因此,相应基因的研究对深入了解果实香气品质具有很高的商业价值。目前,果实中酯类合成相关基因 *AAT* 的研究取得了较大进展,已陆续从杏(*Prunus armeniaca* Maxim)<sup>[19]</sup>、猕猴桃(*Actinidia* spp.)<sup>[20]</sup>、甜瓜(*Cucumis melo* (L.) Naud)<sup>[21-22]</sup>、草莓<sup>[23-24]</sup>、苹果(*Malus domestica* Schneid)<sup>[25]</sup>、木瓜(*Chaenomeles sinensis* Koehne)<sup>[26]</sup>、香蕉(*Musa sapientum* Kuntze)<sup>[17]</sup>、桃<sup>[27]</sup>等水果中克隆、分离得到 *AAT* 基因。*AAT* 蛋白属于酰基转移酶 BAHD 超级家族成员,在氨基酸序列中部有植物酰基转移酶高度保守的 HXXXD 活性位点<sup>[21]</sup>和 D(N)F(V)GWG 结构

域<sup>[28,21]</sup>,活性位点氨基酸的定点突变会导致酶的催化功能缺失<sup>[29-30]</sup>。*AAT* 基因在转录水平的表达通常是随着果实的成熟而提高,而在反义的 ACO 甜瓜品种中,*AAT* 基因的表达并不随果实的成熟而有所变化<sup>[21]</sup>,表明 *AAT* 基因转录表达水平与乙烯合成有关。

关于乙烯对正常后熟果实酯类香气的调节不乏报道,研究表明,乙烯通过调节乙醇酰基转移酶活性,从而调控苹果果实中酯类物质的合成<sup>[25,31]</sup>。木瓜中大多数酯类的产生也依赖乙烯,在果实成熟过程中施加乙烯利可以促进酯类的产生<sup>[32]</sup>。Xi 等<sup>[33]</sup>研究发现,在 20 ℃条件下,桃果实内酯类物质的产生随着乙烯跃变的发生而快速积累;但在冷藏条件下,桃果实的乙烯代谢受阻<sup>[34]</sup>,从而影响了香气成份的释放。目前,对桃果实香气的研究主要集中在香气成份种类、合成途径和限速关键酶方面,关于贮藏过程中影响香气合成的因素研究不多,尤其是冷藏过程中香气的变淡丧失问题目前仍无有效的解决办法。本研究用外源乙烯处理 0 ℃冷藏条件下的‘大久保’桃果实,对酯类合成相关基因 *AAT* 的表达水平进行分析,以期揭示乙烯对冷藏桃果实酯类香气合成在转录水平的调节作用。

本实验室前期研究发现,桃果实在贮藏过程中香气成分发生变化,0 ℃低温下某些重要香气物质的合成受到抑制,而用外源乙烯处理后能明显改善果实品质,唤醒某些香气成分的合成,从而达到改善果实风味品质的目的。本研究首次从桃果实中扩增 *AAT* 基因全长,并进行序列分析。重点讨论外源乙烯对 0 ℃冷藏桃果实中酯类香气合成代谢的关键基因 *AAT* 在 mRNA 水平上的表达调控作用,外源乙烯处理能够通过调节 *AAT* 的表达,从而对低温抑制的酯类香气合成起到一定的恢复作用,研究结果为深入探讨桃果实酯类香气代谢及调控机制丰富数据,也为今后桃果实采后保鲜技术的发展提供理论指导。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料及处理方法

1.1.1 试验材料 试验以北京地区的主栽桃品种‘大久保’为材料,于 2010 年 8 月 13 日果实商业成

成熟期采自北京市平谷区,采收后立即带回实验室。选取大小均匀、果皮着色基本一致、无明显缺陷的果实进行处理。果实成熟度的划分参考 NY/T242-2000(中华人民共和国农业行业标准)。在当年4月花期,于同一果园中采摘‘大久保’的幼叶和花,采集后立即投入液氮中,带回实验室置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于不同组织中的基因表达检测。

**1.1.2 处理方法** 根据本实验室前期研究结果<sup>[35]</sup>,设计2个对照,即常温贮藏桃( $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d,记为CK1)和 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷库贮藏桃( $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏30 d,记为CK2)。在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷库中贮藏至15 d后开始,每日向贮藏袋内注射外源乙烯,使袋内乙烯的浓度保持在 $50 \sim 80\ \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[36]</sup>,至贮藏结束(记为T)。所有处理的果实均密封保存在 $0.04\text{ mm}$ 聚乙烯塑料袋内,每24 h开袋换气1次,以保证袋内的氧气和二氧化碳浓度相同。取样时从袋中随机取10个果,从去皮后的果实四面各取1 cm厚的果肉切片混合,鲜样用于测定芳香挥发物成分,其余果肉组织用液氮速冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于研究AAT基因响应外源乙烯的表达模式,重复3次。

### 1.2 RNA提取和cDNA合成

‘大久保’桃叶片、花和果肉组织总RNA的提取,使用EASYspin植物RNA快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)按照说明书进行操作。以不含RNA酶的DNaseI消化残留的基因组DNA(北京天根生化科技有限公司)纯化mRNA。总

RNA纯度和浓度则通过NanoDrop ND-8000进行检测,并经 $1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的完整性。使用SMART™ RACE试剂盒进行反转录,得到第1链cDNA,以备基因的RACE-PCR扩增。

### 1.3 基因的分离与序列分析

根据GDR([http://www.rosaceae.org/gb/gbrowse/prunus\\_persica/](http://www.rosaceae.org/gb/gbrowse/prunus_persica/))中公布的核苷酸序列,使用Primer Premier 5设计特异引物AAT-3P和AAT-5P,5' RACE正向引物TGATGGCCGAGCTTTA-AGTCCTC和3' RACE反向引物CTCCGAGATCTG-GACGAGC均由试剂盒中提供。根据RACE试剂盒的说明书采用Touch down PCR程序分别进行3'末端和5'末端扩增,将回收的PCR产物克隆到pMD19-T vector(TaKaRa公司)上,热击法转化感受态细胞*E. coli* DH5 $\alpha$ (Promega公司),通过蓝白斑筛选获得重组子,送上海美吉生物医药科技有限公司(北京分公司)进行测序。将获得的序列进行人工拼接,得到基因的理论全长,从两端分别设计特异引物AAT-F和AAT-R,使用KODFX高保真酶(TOYOBO公司)扩增全长cDNA的ORF,反应体系如下:PCR缓冲液 $12.5\ \mu\text{L}$ ,dNTP5  $\mu\text{L}$ ,上游和下游引物各 $0.75\ \mu\text{L}$ ,cDNA模板 $4\ \mu\text{L}$ ,KOD FX1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O补足至 $25\ \mu\text{L}$ 。PCR扩增遵循如下程序: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火15 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min,5个循环; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min,30个循环; $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR产物的回收、连接、转化及测序方法同上。

表1 桃中AAT基因扩增及实时荧光定量PCR所需引物

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	引物作用	目的片段长度/bp
AAT-3P	TCGCCTGACATGTGGAGGCTTCATC	56	3'末端扩增	995
AAT-5P	AGTGGACTTGACACAGAAGTCCAC	55	5'末端扩增	1 034
AAT-F	ATGGGGAGTCAITTTTGTGCAAT	50	ORF扩增	1 353
AAT-R	TTATTTAGATATCTCCTCGACATGCT			
AATQF	GGATAAAGAGTACATGCAATCAC	51	实时荧光定量	200
AATQR	TGTTGTCTCGGACATAGAAGCT			
TEF2F	GGTGTGACGATGAAGAGTGATG	53	内参基因	129
TEF2R	TGAAGGAGAGGGAAGGTGAAAG			

测序的核苷酸用DNAMAN软件进行拼接,通过NCBI中提供的ORF Finder查找开放阅读框,Primer Premier5翻译成氨基酸序列;通过ExPASy的ProtParam及ProtScale在线工具完成对预测蛋白质的理化参数及亲疏水性分析;NCBI在线查找保守结构域<sup>[37]</sup>,使用在线工具ChloroP预测蛋白质的叶绿体转运信号肽;通过

PredicProtein分析蛋白质的二级结构。

利用MEGA5软件对GenBank中收录的具代表性的同源序列进行聚类分析,并构建其同苹果、草莓、杏等20个物种同源序列的系统进化树,使用目前普遍使用的基于距离矩阵的近邻相连法(NJ)构建无根进化树<sup>[38]</sup>,Bootstrap重复计算1 000次。

以稀释的反转录 cDNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR 反应 (ABI7500, 美国),用 Primer3 在线软件设计引物 AATQF 和 AATQR (表 1),以 *TEF2* 作为内参基因<sup>[39]</sup>,分析外源乙烯对 *AAT* 基因表达模式的影响及该基因在不同组织中的表达特性。使用 TaKaRa 的实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>™</sup>,用 25  $\mu$ L 反应体系,方法参照说明书。表达数据分析使用 ABI7500 系统软件,用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[40]</sup> 分析靶基因的相对表达差异,重复 3 次。

#### 1.4 酯类挥发物检测

‘大久保’桃果实中酯类挥发物的提取采用顶空固相微萃取 (SPME) 法,萃取头型号为 PDMS100  $\mu$ m (美国 SUPELCO 公司)<sup>[41]</sup>。取 5 g 桃果肉组织鲜样加入饱和的 NaCl 溶液匀浆化,40  $^{\circ}$ C 顶空吸附 30 min。气相色谱-质谱分析使用美国 Thermo TRACE GC100 气质联用仪。色谱条件:HP-5 30 m  $\times$  0.1 mm  $\times$  0.33  $\mu$ m 毛细管柱,进样口温度 220  $^{\circ}$ C,程序升温模式为起始温度 50  $^{\circ}$ C,保留时间 2 min,以 6  $^{\circ}$ C  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 升至 220  $^{\circ}$ C,保留 10 min,载气 N<sub>2</sub>。质谱条件: Finnigan Trace GC ultra/ Finnigan Trace DSQ,电离方式 EI,电离电压 70 eV,离子源温度 200  $^{\circ}$ C,质谱接口温度 250  $^{\circ}$ C,全扫描模式,扫描范围:29 ~ 540 amu。经计算机检索及与质谱库 (NIST02) 对照匹配,结合文献资料分析,确定芳香物质,利用峰面积归一法,计算酯类物质的相对质量百分含量。

#### 1.5 ‘大久保’桃果实贮藏过程中乙烯的产生及果肉硬度测定

‘大久保’桃果肉硬度用 TA-XTPLUS (英国) 质构仪进行测定,探头直径 5 mm<sup>[42]</sup>;参照胡花丽等<sup>[43]</sup> 的方法,用 SQ-206 型气相色谱仪 (北京瑞利分析仪器厂) 测定乙烯释放速率。

#### 1.6 试验设计与统计分析

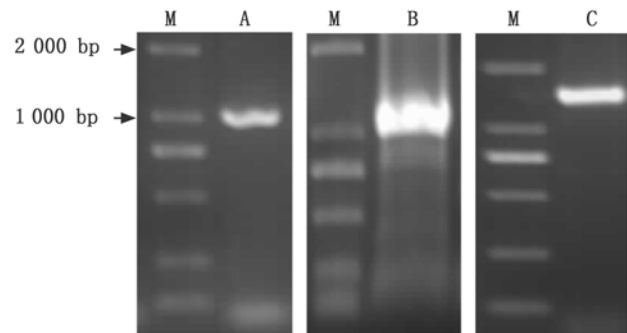
试验采用完全随机设计,用 EXCEL2003 处理试验数据,运用 OriginPro8.6 (OriginLab Co., Northampton, MA, USA) 软件进行统计及作图,数据的差异显著性分析是基于 5% 水平的最小差异显著 (LSD) 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AAT* 基因克隆及序列分析

通过查找与比对,以桃基因组 DNA 数据库中注释的转移酶序列 ppa005625 m 为参考,分别设计末端扩增的特异引物,以‘大久保’桃果肉组织的 cDNA 为模板进行 RACE-PCR 扩增,PCR 产物经过克

隆和测序,获得长度分别为 995 bp 的 3' 末端 (图 1 A) 和 1 034 bp 的 5' 末端 (图 1 B),将 2 条序列进行拼接,发现 2 条序列有一段完全重叠区域,说明克隆得到的是目地基因的 3' 端和 5' 端。利用 ORF Finder 工具对拼接序列进行分析,得到基因的开放读码框长度为 1 353 bp,5' 非编码区长度为 42 bp,3' 非编码区长度为 91 bp。在拼接后序列 ORF 的起始密码子和终止密码子处分别设计特异引物,扩增并测序,得到长 1 353 bp 的开放读码框序列 (图 1 C)。将该基因在桃全基因组数据库中进行相似性搜索,发现该 cDNA 序列与数据库中参考序列的 3' 和 5' 非编码区一致,在 CDS 区有 2 处碱基差异,555 bp 处碱基由 C 突变为 G,导致丙氨酸 (A) 突变为缬氨酸 (V),在 635 bp 处为同义突变。该基因位于桃第 5 条染色体的 1 981 580 ~ 1 986 968 位置, BAC 注释为含 1 个长 3 447 bp 内含子的 mRNA 序列转录链。



M: D2000 marker; A: 3' RACE 扩增产物;  
B: 5' RACE 扩增产物; C: ORF 扩增产物

图 1 ‘大久保’桃 PpAAT2 基因 PCR 扩增电泳图

扩增到的序列其最大开放阅读框编码为 450 个氨基酸 (图 2), 蛋白质分子量为 50.17 KD, 理论等电点  $PI = 5.77$ , 命名为 *PpAAT2*。通过 TMHMM 2.0 的跨膜预测发现: *PpAAT2* 蛋白位于细胞膜外, 无明显跨膜结构; 结合亚细胞定位预测结果, 推断 *PpAAT2* 在细胞质中合成后不经转运肽转运, 直接在合成部位行使催化作用。

### 2.2 推导氨基酸序列的分子进化分析

将推导的氨基酸与苹果、草莓、葡萄、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Heynh)、杨树 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) 等已完成基因组测序物种的酰基转移酶及经过试验验证的 *AAT* 序列进行比对, 发现 *PpAAT2* 属于 PLN02481 超级家族, 具有植物酰基转移酶家族的高度保守结构域 HXXXD (171-175 氨基酸残基) 活性位点和 D(N)F(V)GWG (392-397 氨基酸残基) 结构域<sup>[21]</sup>, 同时具有 BAHD 酰基转移酶

家族的保守序列 LXXYYPLAGR<sup>[24]</sup> (73-82 氨基酸残基)(图3)。

```

1      AGTCATTTTGTGCAATAATACAGGCCCTCGCAGTGTGTGAGATGGTTTCATTGTGCCCTCTACTGTTCCGGTG
1      M G S L C P L L F P V
76     AACCGTTTCGAGCCGGAACCTTATAACACCCGGCGAAGCCAACGCCTATTGAAACCAAGCAGCTGTCGGATATAGAC
26     N R F E P E L I T P A K P T P I E T K Q L S D I D
151    GACCAGGACGGCCTTCGGTTTCATTTCCAGTCAATCATATCTTATAAAAACAATCCTTCAATGAAAGGAAACGAC
51     D Q D G L R F H F P V I I S Y K N N P S M K G N D
226    GCCGTTATGGTGATCAGGGAAGCACTGAGTAGGGCACTAGTGTATTACTACCCTTTGGCTGGTAGACTCAGGGAG
76     A V M V I R E A L S R A L V Y Y Y P L A G R L R E
301    GGGCCCAACAGAAAGCTTATGGTGAATGCAATGGAGAAGGTGTCTTGTTCATAGAGGCTAATGCTGACGTCACG
101    G P N R K L M V E C N G E G V L F I E A N A D V T
376    CTTGAGCAACTTGGGGACAGAATTCTACCCCGTGTCTGTCTTAGAGGAGTTCCTGTCTAATCCCCCTGGTTCT
126    L E Q L G D R I L P C P V L E E F L S N P P G S
451    GATGGTATTCTTGGTTGCCCTTTGCTGTTAGTTCAGGTAACCTCGCCTGACATGTGGAGGCTTCATCTTTGGATTG
151    D G I L G C P L L L V Q V T R L T C G G F I F G L
526    CGCATAAACACGCAATGTGTGATGCACTGGGTTGGCTAAATCTTGAATGCAATGGGGAGATGGCCCAAGGA
176    R I N H A M C D A V G L A K F L N A I G E M A Q G
601    GCAGATTCACTATCAGTGCCTCCAGTGTGGGCACGAGAGCTCCTCAATGTGAGAGATCCACCAACAGTTACACGT
201    A D S L S V P P V W A R E L L N V R D P P T V T R
676    TGGCATTACGAATACGACCAATTGCTTGTGATTACAAGGCTCCTTCATTGCAGCAATTGACCAATCAAACATGGCC
226    W H Y E Y D Q L L D S Q G S F I A A I D Q S N M A
751    CAACGATCCTTCTATTTCCGGTCCACAGCAGATCAGAGCCCTCAGGAACATCTTCCACCCACCTTTCCACTTGC
251    Q R S F Y F G P Q Q I R A L R K H L P P H L S T C
826    TCCTCATTGAGCTCATAACAGCCTCGCTCTGGAGATCCGGACACTTTCACTGAGACTGAATCCAAAAGACACT
276    S S F E L I T A C V W R C R T L S L R L N P K D T
901    GTTCCGATTTCTCGCGGTCAACGCTCGCGGGAAGAGCATAAATGATCTTTGTCTTCCCTCGGGATTCTACGGC
301    V R I S C A V N A R G K S I N D L C L P S G F Y G
976    AATGCGTTTAGTATCCCAACTGCGGTTTCAACGGTGAAGTCTGTGTGCAAGTCCACTGGGATATGGTGTGGAG
326    N A F S I P T A V S T V E L L C A S P L G Y G V E
1051   TTGGTGAGGAAGTCCAAGGCTCAGATGGATAAAGAGTACATGCAATCACTGGCTGATTTTTTCGTGATCAGAGGA
351    L V R K S K A Q M D K E Y M Q S L A D F F V I R G
1126   CGGCCTCCGCTTCCAATGGGATGGAATGTTTTATAGTTTCTGATAATAGACATACCGGTTTTGGAGAGTTTGAT
376    R P P L P M G W N V F I V S D N R H T G F G E F D
1201   GTTGGTGGGGGAAGACCATTATTTGCTGGACTTGCAGAGCGTTTCAGTATGATCAGCTTCTATGTCCGAGACAAC
401    V G W G R P L F A G L A R A F S M I S F Y V R D N
1276   AACCAAGAAGAGGAATTTGGAACCTTGGTGCCCATATGCTTCCCAAGTACGAGTTTGGAGAGGTTTGGAGGAGG
426    N Q E E E F G T L V P I C L P S T S L E R F E E E
1351   CTAAGAAGATGACATTGGAGCATGTGAGGAGATATCTAAATAAGATGTAAGGCTTATGTGTCTGATTAATTA
451    L K K M T L E H V E E I S K *
1426   ACTCTAGTTGCTTGTGTTGTGTGGGCTATCATTCTATGGTGGGTGTGGGTTTGTTTTC

```

图中下划线字母为起始密码子; \* 表示终止密码子; 斜体阴影为 AAT 推导氨基酸的保守结构域; 粗线边框为碱基和氨基酸突变位点。

图2 *PpAAT2* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列分析

为进一步分析 *PpAAT2* 与植物酰基转移酶基因的进化关系, 笔者对 GenBank 中登录的与 *PpAAT2* 同源的杏、苹果、西洋梨等其它植物同源性较高的氨基酸序列进行大分子进化分析, 通过 MEGA5.1 软件构建相应的系统发育树(图4)。通过对 19 个物种的 22 条序列的同源氨基酸比对发现, *PpAAT2* 基因的氨基酸序列与杏 *PaAAT* 基因的同源性最高, 为 85.81%, 与苹果 *MdAAT* 基因的同源性为 60.26%。从图4还看出: 这些物种的 AAT 基因编码的蛋白质共形成 4 个分支, 桃与杏 (*PaAAT*)<sup>[19]</sup>、草莓 (*FaAAT*)<sup>[24]</sup>、甜瓜 (*CmAAT1*)<sup>[21]</sup> 等水果中酯类合成相关的 AAT 基因编码氨基酸聚为 1 枝, 康乃馨和葡萄聚为 1 枝, 甜瓜 (*CmAAT3*)、蓖麻 (*RcAAT*) 和毛果杨 (*PtrAAT2*) 聚为 1 枝, 而高粱、粟、毛果杨、苜蓿、大豆等作物为同一起源, 聚为 1 枝。由图4可见, 这些

基因存在较大的种内差异, 此结果与同源性分析结果一致。

### 2.3 冷藏桃中 AAT 基因对外源乙烯的响应及不同组织中的表达差异

由图5A可见: 低温下 *PpAAT2* 基因的相对表达量比常温贮藏桃 (CK1) 中表达量高, 表明低温有助于 AAT 基因在转录水平的表达, 而在 0℃ 条件下施加外源乙烯后, AAT 基因的表达量进一步增加, 是不加乙烯处理桃果实中表达量的 3.5 倍, 表明外源乙烯对‘大久保’桃果实中 *PpAAT2* 基因的表达有促进作用。通过对不同组织中 AAT 基因的检测发现, AAT 在‘大久保’桃叶片、花和果实中均有表达, 叶片和花中的表达量显著高于果实中的, 花中的表达量最高, 是果实中的 5 倍。

<i>PpAA7</i>	--MGSLCPLLPVNRPEPELITP-----	AKPTPIETKQLSDIDDQD--GLRFHPFVLIISYKN-----	NFMSMG--NDAVMVIREALS	71	
<i>PaaAT</i>	--Vg--CPLLPVNRPEPELITP-----	AKPTPIETKQLSDIDDQD--GLRFHPFV-----	NP-SMGK--NDAVMVIREALS	69	
<i>FaaAT</i>	-----	-----	-----	25	
<i>MdaAT</i>	-----	AKPTIQEAKFLSDIDDQE--GLRFQVPMICYD-----	NP-SLNKN--CNPKVVIREALS	66	
<i>CmaAT1</i>	-----	ANPITPYEFKQLSDVDDQ--SLRQLQFPVNIYPH-----	NP-SLEG--RDPVKVKEAIG	70	
<i>CmaAT2</i>	<b>METHQITDFSPVQRKQPELIAP</b>	<b>ANPITPYEFKQLSDVDDQ--SLRQLQPLVNIYH</b>	<b>NP-SLEG--RDPVKVKEAIG</b>	<b>73</b>	
<i>RcaAT</i>	-----	SSPAIKHQRKYLCLLDQITPTIYPIIFPMN-----	-----	70	
<i>PcaAT</i>	-----	AKPTIQEAKFLSDIDDQE--GLRFQVPMICYD-----	NP-SLNKN--RNPVKVKEALS	67	
<i>SlaAT</i>	-----	MTKLRVVSVVCRIS--QKF-----	SSSKIKQLTPWDLQLLTVDPQKGLFFRKPPEQP--	KELAKSSSEIINRLKLSVLS	71
<i>DcaAT</i>	-----	MSIQIKQSTMVRP-----	AETPMKSLVLSKIDMLRTPYSHTGAVLIYKQPDNNE--	NIHPSSSMYFDANLIEALS	72
<i>GaaAT</i>	-----	MEAVQLMSTITIKAA--SSMN-----	YNDNSWQIDLPWDLQFFHIGSIQRGLLFRKE-----	KNT--EYQCIIEHLQHSLS	67
<i>SbaAT</i>	-----	MG--GAVYVQVSRMVRP--CF--	YKXGNGCGPKAEE--DSEWVLPWDLRISVQYIQKGLLFPKP--	SVGDMDLQVNALQSSFA	85
<i>SlaAT</i>	-----	MGKATVGVVSRMVRP--EPATS--	PDGGPPEEIMLPHDLRMIADVQKGLVLPK--	QTGGEAHLVDLSSSFA	76
<i>TcaAT</i>	-----	MGGRYISSTIIVQA--ANH-----	KGKTERVELTPWDLQLLTVGSIQKGLIFPKPKQPQ--	ERQGTNYLIIHHLNLSLS	71
<i>PtraAT1</i>	-----	MAKTRLLSSTMVQA--ITD-----	KYDTERIELTQCDLKLIVDAIQKGLLFLPKPSLE--	DNNS--LIQHLKLSLS	66
<i>MtaAT</i>	-----	MGAVRVLSSDTIKAA--PKS-----	SDQITLHLPWDLRFLVSTNKGGLLYHHP-----	VVA--TIQIRLRHLSL	60
<i>VvaAT</i>	-----	KVYVSLKWFIFPFA-----	SEPTDPPSLSESDQIGTC--TIIHVPVTFYKH--	SQD--WIMKQGDILAT--LRDLSL	65
<i>CmaAT3</i>	-----	MEKVLSKETIIP-----	SEPTPHQLPQLSLLDQSPMLYIPIPLLYFMKSS--	YQHDDHKAIAATKLSLS	67
<i>PtraAT2</i>	-----	MDVSIISRELKIP-----	SSPSIHLSPFLSLLDQFPFTIYQVMMVFFPKNN--	QDFKGLQ--ISIQKLSLS	66
<i>CaaAT</i>	-----	MAPIEIISITIIQA--PSN-----	ININSIQIHLTPWDLFCLPVEIQKGLLHNP--	QNTKDLNQHNLKLSLS	68
<i>CbaAT</i>	-----	MAHDQSLSPFCVCRKPELIRP-----	AKQTFHEPKLSDVDEQE--GLRFQIPVQIQYKHN--	NESMQE--RDPVQVIRREGIA	72
<i>PpaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVECNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>VLEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>157</b>
<i>PaaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVECNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>VLEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>111</b>
<i>FaaAT</i>	<b>KALQFYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCIGEGILFVEANAE--VILDELGAAILPCCP--</b>	<b>FLDGLFNFVPGSDGILG--</b>	<b>SPLCLQVTRLCGGF</b>	<b>155</b>
<i>MdaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>CmaAT1</i>	<b>KALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>150</b>
<i>CmaAT2</i>	<b>KALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>RcaAT</i>	<b>KALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>PcaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>SlaAT</i>	<b>DILMHPFLAGLRREGPNRK</b>	<b>GTSSFFVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>157</b>
<i>SbaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>SlaAT</i>	<b>SILAFYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>NTVSSHVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>161</b>
<i>TcaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>PtraAT1</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>MtaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>VvaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>CmaAT3</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>PtraAT2</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>CaaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>
<i>CbaAT</i>	<b>RALVYTYPLAGLRREGPNRK</b>	<b>LMVDCNAGEVLIIEAMAD--VILEQLGDRILPCCP--</b>	<b>LEEFLLSNPPGSDGILG--</b>	<b>CPILLVQVTRLCGGF</b>	<b>156</b>

图 3 PpAA7 与其它植物酰基转移酶蛋白序列的同源性分析 (植物酰基转移酶蛋白活性位点的保守结构域用方框标出)

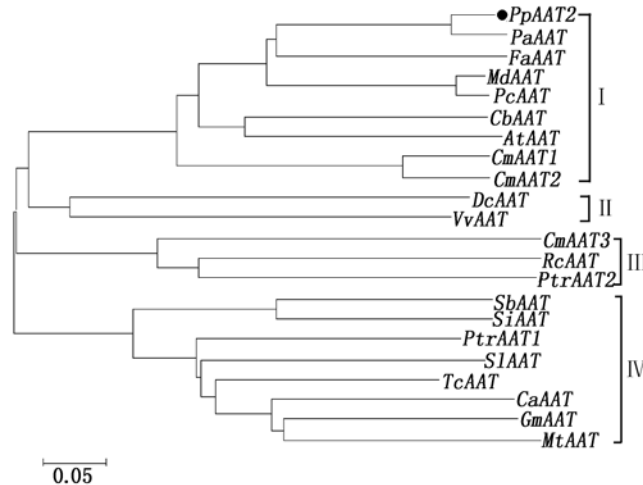


图4 ‘大久保’桃 PpAAT2 氨基酸序列与其他植物转移酶家族蛋白的系统进化树分析

杏; PaAAT(EU784138); 苹果; MdAAT(AAS79797); 西洋梨 (*Pyrus communis* L.): PcAAT(AY534530); 仙女扇 (*Clarkia breweri* Green): CbAAT(AF500200); 拟南芥; AtAAT(NM\_121760); 草莓; FaAAT(JN089766); 甜瓜; CmAAT1(CAA94432); 甜瓜 CmAAT2(EU431334); 甜瓜 CmAAT3(AAW51126); 康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* Burm): DcAAT(O23917); 葡萄 (*Vitis vinifera* Kuntze): VvAAT(XP\_002269790); 高粱 (*Sorghum bicolor* Moench): SbaAAT(XP\_002444907); 粟 (*Setaria italica* Beauv): SiaAAT(XP\_004972479); 番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mull): SIAAT(XP\_004231858); 毛果杨; PtrAAT1(ABK94986); 毛果杨 PtrAAT2(XP\_002317521); 可可 (*Theobroma cacao* Ducke): TcAAT(EOX91480); 鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* Bornm): CaAAT(XP\_004509127); 大豆 (*Glycine max* Wang): GmAAT(XP\_003550055); 苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn): MtAAT(XP\_003604999); 蓖麻 (*Ricinus communis* L.): RcAAT(XP\_002529587); ‘大久保’桃: PpAAT2, 用●标出。

### 2.4 不同处理桃果实酯类挥发物分析

AAT 是调控 LOX 途径中酯类物质合成的最后一个环节,催化脂酰辅酶 A 中的酰基,使醇转化为相应的酯<sup>[17,44-45]</sup>,本研究对不同处理桃果实酯类物质的含量进行了测定,以进一步确定 AAT 与桃果实酯类物质合成的关系。从常温贮藏桃(CK1)、0℃冷库贮藏桃(CK2)和外源乙烯处理桃(T)果实中共检测到4种酯类芳香挥发物质,分别是乙酸己酯、(邻)氨基苯甲酸-1,5-二甲基-1-乙炔基-4-己烯酯、戊二酸二丁酯与乙酸乙酯,在不同贮藏条件下的桃果实中4种物质的含量(表2)表明:低温对乙酸乙酯的合成有促进作用,外源乙烯处理后乙酸乙酯的含量在贮藏至30d时没有升高反而低于不加乙烯处理的桃果实;(邻)氨基苯甲酸-1,5-二甲基-1-乙炔基-4-己烯酯在外源乙烯作用下,其含量比CK2有明显的上升;乙酸己

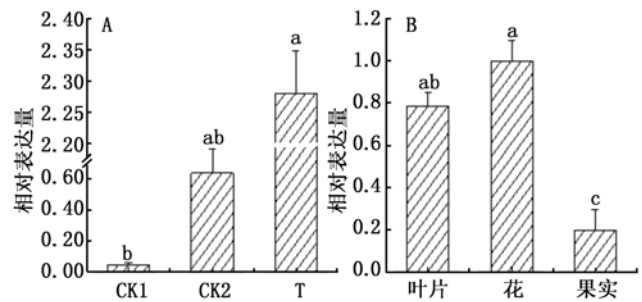


图5 不同贮藏条件及组织器官中 PpAAT2 基因的表达差异  
误差棒为试验重复3次产生的标准误差,柱形图上方标注的不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),相同字母表示差异不显著,下同;B图中的果实与A图中CK1为同一样品,都为常温下贮藏3d的桃果实;A图中CK2和T分别代表0℃贮藏30d和0℃贮藏15d加外源乙烯处理至30d的桃果实;B图中叶片和花分别为同年4月采摘于同一果园中样品。

酯和戊二酸二丁酯的合成在低温下均被抑制,外源乙烯作用后其合成有回升,但趋势不明显。

表2 不同贮藏条件下‘大久保’桃果实中4种酯类芳香挥发物的含量

酯类挥发物质	相对质量分数/%		
	CK1	CK2	T
乙酸己酯	3.04 ± 0.11a	0.90 ± 0.08b	0.91 ± 0.06b
(邻)氨基苯甲酸-1,5-二甲基-1-乙炔基-4-己烯酯	0.56 ± 0.15a	0.16 ± 0.03b	0.35 ± 0.06ab
戊二酸二丁酯	6.43 ± 0.33a	0.38 ± 0.14b	0.40 ± 0.05b
乙酸乙酯	2.07 ± 0.23ab	3.65 ± 0.37a	2.89 ± 0.32ab

注:CK1代表常温贮藏3d,CK2代表0℃贮藏30d,T代表0℃贮藏15d加外源乙烯处理至30d。表中数值为平均值±标准误差,同行不同字母表示处理间差异显著,相同字母表示差异不显著。



## 2.5 不同处理对桃果实乙烯产生及果实硬度的影响

对不同处理桃果实乙烯释放量和果实硬度的测定(图6A)可见:常温贮藏3 d的‘大久保’桃果实中乙烯的释放量显著高于0℃贮藏30 d的桃果实,二者相差近80倍,可见,0℃低温贮藏导致果实中乙烯释放量大幅降低。此外,外源乙烯处理的桃果实不能代表自身的乙烯释放量,故数据没有列出。对桃果肉硬度进行测定(图6B)发现:与常温贮藏3 d(CK1)的桃果肉硬度相比,低温贮藏桃(CK2)的果肉硬度较高,而施加外源乙烯处理(T)的桃果肉硬度略低于CK2,表明外源乙烯处理对促进冷藏桃果实的软化有一定作用。

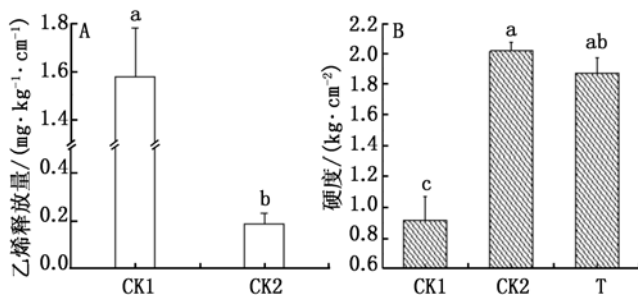


图6 不同贮藏条件下果实中乙烯的释放量及果肉硬度差异

## 3 结论与讨论

乙烯与果实成熟的密切关系已为人熟知<sup>[46-49]</sup>,乙烯在转录水平调控果实软化相关基因的表达,从而促进桃果实的后熟和软化<sup>[50]</sup>。常温贮藏3 d时,‘大久保’桃的乙烯释放量达到高峰,此时,果肉变软,达到最佳食用状态<sup>[35]</sup>。本研究发现,桃于0℃贮藏30 d时,果肉仍保持较高的硬度,当施加外源乙烯后,果肉硬度相应降低,适当浓度的外源乙烯可以促进冷藏桃果实软化。Ortiz等<sup>[51]</sup>研究发现,乙烯水平影响桃果实香气尤其是酯类物质的合成。在0℃贮藏30 d时,桃内源乙烯释放量较对照(CK1)显著降低。在检测到的4种酯类挥发成分中,乙酸己酯、(邻)氨基苯甲酸-1,5-二甲基-1-乙烯基-4-己烯酯和戊二酸二丁酯在0℃贮藏30 d时含量比常温对照(CK1)低;而施加外源乙烯后,上述3种酯类物质的含量比CK2有不同程度的增加。乙烯与酯类挥发物质存在正相关性,表明‘大久保’桃果实在贮藏过程中酯类物质的产生受乙烯的调节,低温抑制乙烯的释放进而抑制酯类物质的产生,而外源乙烯可唤醒受低温抑制的酯类物质释放。乙酸乙酯的变化趋势与其它3种酯类相反,施加外源乙烯处理至30 d时其含量

比CK2低。乙烯并不是抑制乙酸乙酯的合成,而是低温延缓了其合成高峰出现的时间<sup>[2]</sup>。本文仅测定了冷藏30 d时酯类物质的释放,今后尚需对低温下乙烯与乙酸乙酯合成的关系进行研究。

挥发性酯类物质使果实散发出香甜气息<sup>[52]</sup>。研究认为,果实中的酯类物质主要是通过脂肪酸途径合成<sup>[28,18]</sup>,进一步的研究证实亚麻酸和亚油酸等前体物质经过多种酶的催化,最终在乙醇酰基转移酶(AAT)作用下分别以脂酰辅酶A和醇作为底物而合成相应的酯<sup>[25,44]</sup>。本研究从‘大久保’桃果肉中克隆到1个与AAT高度同源的基因,该基因编码区长度为1353 bp,编码450个氨基酸,蛋白质分子量为50.17 KD,理论等电点PI=5.77,命名为PpAAT2。将不同种属AAT基因编码的氨基酸序列进行聚类后发现,桃PpAAT2与杏<sup>[19]</sup>、甜瓜<sup>[21]</sup>、草莓<sup>[24]</sup>等AAT编码的氨基酸聚为一簇,为直系同源基因,已经研究报道这三者中的AAT与酯类合成关系密切,暗示本研究获得的PpAAT2基因可能是与桃酯类合成相关的基因,关于该基因调控酯类合成的功能尚需进一步的实验验证。在0℃低温下,PpAAT2的表达水平比常温高,但乙酸己酯、(邻)氨基苯甲酸-1,5-二甲基-1-乙烯基-4-己烯酯、戊二酸二丁酯释放量降低,推测这可能与AAT底物特异性有关,桃中可能存在其它AAT基因家族成员调控酯类合成,外源乙烯促进了调控基因的表达,从而提高了相应3种酯类物质的含量。体外酶促反应实验证实,桃PpAAT1能特异的将乙酰辅酶A与醇结合形成乙酸酯类物质<sup>[27,45]</sup>,证明了桃AAT基因是以家族的形式存在,且它们的反应底物具有特异性。草莓中也得出类似的结果,AAT通过催化多种底物特异结合形成不同的酯类如丁酸己酯、乙酸辛酯、己酸甲酯等<sup>[23]</sup>。AAT催化合成酯的含量除受相关基因的表达调控外,还受限于底物的供应。本研究发现,在3个不同贮藏条件下,PpAAT2的相对表达水平为CK1<CK2<T,而乙酸乙酯的释放量则为CK2>T>CK1;低温冷藏桃果实施加外源乙烯后,尽管PpAAT2基因相对表达水平较单纯低温贮藏高3.5倍,但乙酸乙酯的释放量却比单纯低温贮藏桃的低,且常温贮藏桃中乙酸乙酯含量也比单纯低温贮藏桃的少。据报道,桃果实在成熟前以“青草型”香气醇类和醛类为主,成熟后以“果香型”香气酯类和内酯类为主,而果实成熟后芳香物质的变化主要是含量发生变化,合成的醇类和醛类物质的比重降低<sup>[45]</sup>。常温下,乙酸乙酯合成量比单纯0℃贮



藏少,推测可能与常温贮藏桃果实中酯类合成的前体物质缺失有关。研究发现,在桃果实采后成熟过程中,与醇合成密切相关的乙醇脱氢酶(ADH)表达水平降低<sup>[18, 53]</sup>,醇类减少,使酯类合成的前体物质减少。此结论在苹果果实中得到验证,当醇缺乏时,相应的酯类合成受到影响,醇类和乙酰 CoA 的供应量对酯类合成起着重要作用<sup>[54]</sup>。施加外源乙烯(T)后,乙酸乙酯的含量比 CK2 贮藏桃的低,可能是由于乙烯的反馈抑制作用。此外,本文通过对该基因进行组织特异性检测发现,*PpAAT2* 在果实、花及叶片中均有表达,且叶片中表达量显著高于果实,推测 *AAT* 可能参与不同的生理过程,是控制多性状的基因。King 等<sup>[55]</sup> 研究表明,*AAT* 与矮牵牛花瓣表皮覆盖的阻断水分流失的蜡酯合成有关。

采用冷藏结合适宜浓度的外源乙烯处理可唤醒低温代谢障碍的重要香气物质释放,从而改善桃果实品质,提高贮藏保鲜效果。该结果可为明确桃 *AAT2* 基因的生物学功能奠定基础,同时也为提高桃果实的采后贮藏品质提供一定的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds[J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 712 - 732
- [2] 李杨昕. 大久保桃果实特征香气物质低温代谢障碍的基础研究[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2010
- [3] 蔡 琰, 余美丽, 邢宏杰, 等. 低温预贮处理对冷藏水蜜桃冷害和品质的影响[J]. *农业工程学报*, 2010, 26(6): 334 - 338
- [4] Lurie S, Crisosto C H. Chilling injury in peach and nectarine[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2005, 37(3): 195 - 208
- [5] Cantin C M, Crisosto C H, Oguniwin E A, et al. Chilling injury susceptibility in an intra-specific peach ((*Prunus persica* (L.) Batsch) progeny)[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 58(2): 79 - 87
- [6] Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, et al. Enhanced Levels of the Aroma and Flavor Compound S-Linalool by Metabolic Engineering of the Terpenoid Pathway in Tomato Fruits[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 1256 - 1265
- [7] Engel K H, Ramming J D W, Flath R A, et al. Investigation of Volatile Constituents in Nectarines. 2. Changes in Aroma Composition during Nectarine Maturation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36(5): 1003 - 1006
- [8] Staudt M, Jackson B, El-aouni H, et al. Volatile organic compound emissions induced by the aphid *Myzus persicae* differ among resistant and susceptible peach cultivars and a wild relative[J]. *Tree Physiology*, 2010, 30(10): 1320 - 1334
- [9] Lombardo V A, Osorio S, Borsani J, et al. Metabolic Profiling during Peach Fruit Development and Ripening Reveals the Metabolic Networks That Underpin Each Developmental Stage[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 1696 - 1710
- [10] Ayala-Zavala J F, Wang S Y, Wang C Y, et al. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2004, 37(7): 687 - 695
- [11] Li Bin, JiaHui-juan, Zhang Xiao-meng. Effects of Fruit Pre-harvest Bagging on Fruit Quality of Peach (*Prunus persica* Batsch cv. Hu-jingmilu)[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(3): 287 - 292
- [12] Wang Y J, Yang C X, Li S H, et al. Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HP-SPME with GC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1): 356 - 364
- [13] Eduardo I, Chietera G, Bassi D, et al. 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
- [14] 李 明, 王利平, 张 阳, 等. 水蜜桃品种间果香成分的固相微萃取-气质联用分析[J]. *园艺学报*, 2006, 33(5): 1071 - 1074
- [15] Vermin G, Vermin E, Vermin C, et al. Extraction and GC-MS-SPEMCA data bank analysis of the aroma of *Psidium guajava* L. fruit from Egypt[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 1991, 6(2): 143 - 148
- [16] Xu Y, Fan W L, Qian M C. Characterization of Aroma Compounds in Apple Cider Using Solvent-Assisted Flavor Evaporation and Headspace Solid-Phase Microextraction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(8): 3051 - 3057
- [17] Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, et al. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(4): 1865 - 1878
- [18] Zhang B, Shen J Y, Wei W W, et al. Expression of Genes Associated with Aroma Formation Derived from the Fatty Acid Pathway during Peach Fruit Ripening[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 58(10): 6157 - 6165
- [19] González-Agüero M, Troncoso S, Gudenschwager O, et al. Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(5): 435 - 440
- [20] Günther C S, Chervin C, Marsh K B, et al. Characterisation of two alcohol acyltransferases from kiwifruit (*Actinidia* spp.) reveals distinct substrate preferences[J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(8): 700 - 710
- [21] El-Sharkawy I, Manríquez D, Flores F B, et al. 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(2): 345 - 362
- [22] 冯燕青, 赵 聪, 马乐园, 等. 甜瓜果实醇酰基转移酶基因的克隆及表达分析[J]. *山东农业科学*, 2009(5): 1 - 3
- [23] Aharoni A, Keizer L C P, Bouwmeester H J, et al. Identification of the SAAT Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(5): 647 - 661
- [24] Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E, et al. The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis[J]. *Journal of Experimental Bota-*

- ny, 2012, 63(11): 4275–4290
- [25] Souleyre E J F, Greenwood D R, Friel E N, *et al.* An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), *MpAAT1*, produces esters involved in apple fruit flavor[J]. *FEBS Journal*, 2005, 272(12): 3132–3144
- [26] Balbontín C, Gaete-Eastman C, Fuentes L, *et al.* *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
- [27] Xi W P, Zhang B, Shen J Y, *et al.* Intermittent warming alleviated the loss of peach fruit aroma-related esters by regulation of AAT during cold storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012a, 74:42–48
- [28] Yahyaoui F E L, Wongs-Aree C, Latché A, *et al.* Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(9): 2359–2366
- [29] Morales-Quintana L, Fuentes L, Gaete-Eastman C, *et al.* Structural characterization and substrate specificity of *VpAAT1* protein related to ester biosynthesis in mountain papaya fruit[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2010, 29(5): 635–642
- [30] Morales-Quintana L, Nuñez-Tobar M X, Moya-León M A, *et al.* Molecular Dynamics Simulation and Site-Directed Mutagenesis of Alcohol Acyltransferase: A Proposed Mechanism of Catalysis[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2013, 53(10): 2689–2700
- [31] Defilippi B G, Kader A A, Dandekar A M. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene[J]. *Plant Science*, 2005, 168(5): 1199–1210
- [32] Balbontín C, Gaete-Eastman C, Vergara M, *et al.* Treatment with 1-MCP and the role of ethylene in aroma development of mountain papaya fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 43(1): 67–77
- [33] Xi W P, Zhang B, Liang L, *et al.* Postharvest temperature influences volatile lactone production via regulation of acyl-CoA oxidases in peach fruit Plant[J]. *Cell and Environment*, 2012b, 35(3): 534–545
- [34] Aly M M, El-Agamy S Z A, Biggs R H. Ethylene production and firmness of peach and nectarine fruits as related to storage[J]. *Proc Fla State Hort Soc*, 1981(94): 291–294
- [35] 李杨昕, 王贵禧, 梁丽松. ‘大久保’桃常温贮藏过程中香气成分变化及其与乙烯释放的关系[J]. *园艺学报*, 2011, 38(1): 35–42
- [36] 胡花丽, 梁丽松, 王贵禧, 等. 外源乙烯对 CA 贮藏桃果实 MDA 含量、PPO 和 LOX 活性变化的影响[J]. *西北林学院学报*, 2007, 22(3): 38–42
- [37] Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson J B, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(1): 225–229
- [38] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- [39] Tong Z G, Gao Z H, Wang F, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 71 (doi:10.1186/1471-2199-10-71)
- [40] Livak K J and Schmittgen T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method[J]. *Methods*, 2001(25): 402–408
- [41] 魏好程. 桃果实采后贮藏保鲜及其品质控制的研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2005
- [42] Camps C, Guilermín P, Mauget J C, *et al.* Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits[J]. *Journal of Texture Studies*, 2005, 36(4): 387–401
- [43] 胡花丽, 梁丽松, 李鹏霞, 等. 外源乙烯对 CA 贮藏桃果实内源乙烯生物合成的影响[J]. *保鲜与加工*, 2008(48): 34–37
- [44] Sánchez G, Venegas-Calerón M, Salas J J, *et al.* An integrative “omics” approach identifies new candidate genes to impact aroma volatiles in peach fruit[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 343 (doi: 10.1186/1471-2164-14-343)
- [45] 席万鹏, 郁松林, 周志钦. 桃果实香气物质生物合成研究进展[J]. *园艺学报*, 2013, 40(9): 1679–1690
- [46] Burg S P, Burg E A. Role of Ethylene in Fruit Ripening[J]. *Plant Physiol*, 1962, 37(2): 179–189
- [47] Saltveit M E. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 1999, 15(3): 279–292
- [48] Nath P, Trivedi P K, Sane V A, *et al.* Role of Ethylene in Fruit Ripening[M]// Khan N A. *Ethylene Action in Plants* Germany Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006: 151–186 (10.1007/978-3-540-32846-9\_8)
- [49] Barry C S, Giovannoni J J. Ethylene and Fruit Ripening[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2007, 26(2): 143–159
- [50] Hayama H, Shimada T, Fujii H, *et al.* Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(15): 4071–4077
- [51] Ortiz A, Graell J, López M L, *et al.* Volatile ester-synthesising capacity in ‘Tardibelle’ peach fruit in response to controlled atmosphere and 1-MCP treatment[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(3): 698–704
- [52] Vendramini A L, Trugo L C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity[J]. *Food Chemistry*, 2000, 71(2): 195–198
- [53] Schaffer R J, Friel E N, Souleyre E J F, *et al.* A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(4): 1899–1912
- [54] Li D P, Xu Y F, Xu G M, *et al.* Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (*MdAAT2*) from apple (cv. Golden Delicious) [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(7): 658–667
- [55] King A, Nam J W, Han J, *et al.* Cuticular wax biosynthesis in petunia petals; cloning and characterization of an alcohol-acyltransferase that synthesizes wax-esters[J]. *Planta*, 2007, 226(2): 381–394