

张圆圆, 刘文敬, 张斌斌, 等. 桃内酯芳香物质合成相关的环氧化物水解酶候选基因的鉴别[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 178-186.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.021

桃内酯芳香物质合成相关的环氧化物水解酶候选基因的鉴别

张圆圆¹, 刘文敬^{1,2}, 张斌斌¹, 马瑞娟¹, 俞明亮¹

(1.江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 环氧化物水解酶(EH)因其重要的生物学功能而在哺乳动物以及诸多植物中被广泛关注,更是果实典型“桃香”气味——内酯芳香物质生物合成的一个重要酶,但在桃等果实中的研究较少且鲜有该家族成员的系统报道或生物学功能的解析。为鉴别桃果实中与内酯芳香物质合成相关的环氧化物水解酶家族成员,本研究使用了同源序列比对和关键词搜索等方法,在桃中共筛选获得7个环氧化物水解酶家族成员。序列比对分析结果表明,这7个成员均有典型的 α/β 水解酶折叠结构和环氧化物水解酶保守的序列片段。进化树分析结果显示,桃的环氧化物水解酶成员与拟南芥、烟草等其他物种中已被鉴别的环氧化物水解酶成员的亲缘关系很近。基因表达分析结果显示,在桃的发育成熟进程中7个EH基因均在果实的中果皮表达,在果实发育前期均呈现较高的表达水平,转录模式包括3种类型。综合已报道的内酯芳香物质的生物合成通路以及前人指出的内酯芳香物质含量在果实成熟期开始显著增加的变化规律,推测桃环氧化物水解酶成员的表达量可能与内酯芳香物质的积累负相关。本研究结果为后续深入挖掘桃或者其他果实环氧化物水解酶家族成员的生物学功能尤其是参与内酯芳香物质合成的分子机理提供了参考。

关键词: 桃; 内酯芳香物质; 环氧化物水解酶

中图分类号: S662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)01-0178-09

Identification of candidate epoxide hydrolase genes involved in the biosynthesis of lactone volatile compounds in peach (*Prunus persica* L.)

ZHANG Yuan-yuan¹, LIU Wen-jing^{1,2}, ZHANG Bin-bin¹, MA Rui-juan¹, YU Ming-liang¹

(1. Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Epoxide hydrolases (EHs) were extensively characterized in mammals and numerous plant species for their multiple biological functions, and acted as one important enzyme in the biosynthesis of lactones—a group of volatile compounds which endowed fruit a typical peach-like aroma. However, there were few reports on the family members or biological functions of epoxide hydrolases in peach or other fruits. To identify the EH members involved in the biosynthesis of lactone volatile compounds in peach fruit, homologous sequence alignment and keyword search were used in this study. A

total of seven EH family members were screened in peach, and sequence alignment analysis showed that they all had the typical α/β -hydrolase fold structure and conserved sequences. Phylogenetic tree analysis showed that EH members in peach were closely related to the identified EH members in *Arabidopsis*, tobacco and other plant species.

收稿日期: 2022-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32002020); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-30); 江苏现代农业(桃)产业技术体系项目[JATS(2020)379, JATS(2021)425]

作者简介: 张圆圆(1990-), 女, 河南平顶山人, 博士, 助理研究员, 从事果实芳香品质研究。(E-mail) 20190021@jaas.ac.cn

The results of gene expression analysis indicated that these *EH* genes were expressed in the mesocarp of peach fruit during the development and maturation, and showed a high expression level in the early stages of fruit development. The transcription patterns included three types. Based on the reported biosynthetic pathways of lactones and the fact that the content of lactones began to increase significantly at fruit ripening stages, it was speculated that the expression levels of the epoxide hydrolase genes may be negatively correlated with the contents of lactones volatile compounds. Overall, these results lay a foundation for further exploration of the biological functions of *EH* family members in peach or other fruits, especially the molecular mechanism involved in the biosynthesis of lactone volatile compounds.

Key words: peach; lactones volatile compounds; epoxide hydrolases

在桃果实上百种挥发性芳香物质中,内酯是赋予其典型“桃香”气味的重要贡献组分,亦是桃果实芳香品质研究和改良的重点。目前已知的内酯合成途径包括经由饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸的2条支路^[1],其中不饱和脂肪酸支路通过一个重要酶——环氧化物水解酶(*EH*)的作用产生羟基脂肪酸,最终在自身环化或醇酰基转移酶的作用下产生内酯。Schöttler 和 Boland^[2]指出环氧化物水解酶在成熟桃和草莓果实的内酯芳香组分的形成中发挥关键作用,该酶在油桃果实中具有催化活性且催化产物通过后续代谢最终形成了内酯物质,由此推测不饱和脂肪酸如亚油酸和亚麻酸的环氧化作用可能是果实中发生饱和脂肪酸衍生物氧化的一种普遍途径,并最终产生了 γ -内酯物质和 δ -内酯物质。

环氧化物水解酶存在于所有生物中,是一类能立体选择地将水分子加成到环氧底物上生成相应的1,2-二醇类的酶,具有 α/β 水解酶折叠蛋白质结构,其活性位点包括核心结构(通常由2个天冬氨酸残基和1个组氨酸残基构成)和帽子结构^[3-5]。由于诸多被 *EH* 催化的脂类基质生物活性强,因此 *EH* 在植物和动物中具有重要而多样的生物学作用,如参与宿主防御和发育控制等,对生理系统有着深远的影响。根据细胞定位的不同和底物的特异性,高等生物中不同的环氧化物水解酶被分为7种亚型,包括可溶性环氧化物水解酶(*sEH*)、微粒体环氧化物水解酶(*mEH*)、保幼激素环氧化物水解酶(*JhEH*)、胆固醇环氧化物水解酶(*ChEH*)、羟环氧化物水解酶、白三烯 A4 环氧化物水解酶(*LAH*)和柠檬烯环氧化物水解酶(*LEH*),且不同类型和来源的环氧化物水解酶的蛋白质相对分子质量大小明显不同^[6-8]。

环氧化物水解酶广泛分布于发芽的种子、根、果实、块茎和叶等组织中,并在大豆、绿豆、拟南芥、马铃薯、普通烟草等多种植物中被广泛研究^[9-18]。在植物环氧化物水解酶中,有关 *sEH* 的相关研究目前

报道较多。*sEH* 定位于细胞质基质和乙醛酸循环体,以羧基酸和环氧脂肪酸等为催化底物,蛋白质相对分子质量约35 000,一般以单体或二聚体蛋白质的形式存在^[4,6]。在模式植物拟南芥中,目前已有 *EH* 成员 *AtSEH* 和 *AtEH1* 等获得报道,为其他植物 *EH* 的研究提供了借鉴。Kiyosue 等^[10]从干旱胁迫处理的拟南芥中分离获得 *AtSEH* 基因的 cDNA 序列,研究发现该基因的表达受到生长素和干旱胁迫的诱导并呈现组织特异性表达模式,其编码的可溶性环氧化物水解酶的蛋白质相对分子质量预测为36 423。Pineau 等^[18]的研究结果表明,*AtEH1* 酶蛋白定位于细胞质,具有环氧化物水解酶保守的核心催化位点,参与了角质的形成。除拟南芥外,马铃薯也是植物中 *EH* 研究较为深入的物种。Mowbray 等^[13]通过 X 射线衍射的方法揭示了马铃薯环氧化物水解酶 *StEH1* 的蛋白质结构,这是植物环氧化物水解酶结构首次被报道,并促进了其后马铃薯 *EH* 及其变种蛋白质结构研究的逐步深入^[14,17]。此外,本氏烟草中过氧化物酶体靶向的 *EH* 成员 *NbEH2.1* 和 *NbEH2.2* 能够特异地参与细菌等病原体的防御^[15];环氧化物水解酶 *NbEH1.1* 和 *NbEH2.1* 来自2个进化分支,生化功能分析结果表明,这2种酶具有不同的底物特异性,*EH1* 可能通过在胁迫环境下产生信号物质激活植物的应激反应来发挥功能,*EH2* 则可能参与角质单体的形成^[16]。

近年来,环氧化物水解酶作为桃果实内酯芳香物质合成的参与酶在多项研究中获得关注。Vecchietti 等^[19]创建了多基因型多发育阶段的桃外果皮和中果皮的表达序列标签数据库,并结合公共数据库的桃表达序列标签信息,通过综合分析芳香物质的合成和转录模式筛选出了与芳香相关的重要基因,其中包含1个内酯合成的关键基因——环氧化物水解酶编码基因,可从果实材料中克隆获得该环氧化物水解酶编码基因1 350 bp 的全长序列。基于

Bolero 桃与 OroA 桃的芳香差异极大的特点, Pirona 等^[20]对这 2 种基因型的桃构建了微阵列数据以分析桃果实在 3 个发育成熟阶段中基因的表达量变化, 发现 2 个环氧化物水解酶基因 *EPH2* (ppa008854m) 和 *EPH3* (ppa009153m) 在 2 种桃的发育成熟阶段呈现差异表达模式。Li 等^[21]以溶质桃为试验材料通过基因表达分析鉴定与芳香相关的基因, 发现 *ppa007004m*、*ppa008918m*、*ppa008854m*、*ppa008756m*、*ppa013585m* 等环氧化物水解酶基因在果实的不同发育阶段以及 4 个品种之间呈现差异表达。

目前, 有关桃果实内酯合成相关环氧化物水解酶基因的报道呈零星分布, 多由差异表达基因分析获得, 且不同研究涉及的环氧化物水解酶基因成员之间存在重叠, 鲜有文献系统报道桃 *EH* 基因家族成员的构成和序列特征或深入解析其具体的生物学功能等。本研究筛选获得了桃 *EH* 家族候选成员, 对候选成员编码的氨基酸序列和蛋白质结构进行了分析, 并分析了果实发育成熟过程中各成员基因的表达量变化, 鉴别桃果实中内酯合成相关的候选环氧化物水解酶成员, 以期为深入研究果实环氧化物水解酶的生物学功能和果实内酯芳香物质合成的分子机理提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以 2020 年取自国家果树种质南京桃资源圃的白花水蜜 (*Prunus persica* L.) 的桃果实为试验材料。对 S1~S4 发育成熟阶段 (分别对应盛花后 43 d, 77 d, 115 d, 144 d) 的桃果实依次进行采收, 选取大小和色泽一致且无机械伤的果实用于研究。每个生物学重复选取 6 个果实, 设置 3 组生物学重复。中果皮部位切碎后速冻于液氮, 样品存放于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 RNeasy Pure 试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司产品] 提取 S1~S4 发育成熟阶段桃果实样品的总 RNA。凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

使用 PrimeScript 反转录试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司产品] 去除基因组 DNA 残留, 并对 1 µg 的 RNA 进行 cDNA 合成。合成的 cDNA 经过 DEPC (焦碳酸二乙酯) 稀释后作为后续实时荧光定量 PCR 的模板。

1.3 桃 *EH* 家族候选成员搜索与蛋白质保守结构域分析

基于 JGI (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库, 参考已报道的桃 (*Prunus persica* L.) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 的 *EH* 家族成员^[10,18,20-21] 的蛋白质氨基酸序列, 通过同源序列比对、 α/β 水解酶结构家族成员搜索、可溶性环氧化物水解酶的关键词搜索等方法获得桃 *EH* 家族的候选成员; 使用 NCBI 数据库的 CCD 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析桃 *EH* 家族候选成员的保守结构域 (表 1)。

表 1 桃 *EH* 家族候选成员信息

Table 1 Candidate epoxide hydrolase family members in peach (*Prunus persica* L.)

基因名称	基因编号	编码的氨基酸序列长度 (aa)	MhpC 结构域的位置
<i>PpEH1</i>	Prupe.4G043200	339	34~338
<i>PpEH2</i>	Prupe.7G162300	317	9~314
<i>PpEH3</i>	Prupe.7G162400	320	12~316
<i>PpEH4</i>	Prupe.3G156500	315	9~313
<i>PpEH5</i>	Prupe.3G156600	315	9~313
<i>PpEH6</i>	Prupe.3G156700	314	9~312
<i>PpEH7</i>	Prupe.3G156800	313	9~311

1.4 氨基酸序列与蛋白质结构分析

利用 ESPript3.0 在线工具 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/index.php>)^[22] 进行桃 *EH* 候选成员与其他物种已报道的 *EH* 成员的氨基酸序列的比对与蛋白质结构的分析。

1.5 系统进化树构建

采用 Clustalx 软件进行桃 *EH* 候选成员的蛋白质氨基酸序列和其他物种已报道的 *EH* 成员的比对, 采用 Figtree (version 1.3.1) 软件进行系统进化树的构建。

1.6 RT-qPCR 分析

采用实时荧光定量 PCR 方法, 利用 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司产品] 检测桃 *EH* 家族候选基因在 S1~S4 发育成熟阶段的表达量变化。反应体系包括 SYBR PCR 预混液 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司产品] 10.0 µl, RT-qPCR 上下游引物各 1.0 µl, 灭菌 DEPC 水 6.0

μl , 稀释的 cDNA 模板 $2.0 \mu\text{l}$ 。根据 *EH* 基因成员的编码区碱基序列, 利用 NCBI/Primer-BLAST 在线设计各基因相应的 RT-qPCR 引物, 经过熔解曲线分析和回收产物测序分析等方法检验引物的扩增特异性^[23]。以 *PpTEF2* 基因为内参基因^[24], 设定 S1 阶段的各基因相对表达量为 1, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量。RT-qPCR 引物序列见表 2。

表 2 本研究所采用的 RT-qPCR 引物

Table 2 RT-qPCR primers used in this study

基因名称	引物序列(5'→3')
<i>PpEH1</i>	FP: GCGCACTTGATGCGAAAACA RP: CCACCAAGTCCATGATCTCCT
<i>PpEH2</i>	FP: GGTGCCCTCAATTATTTTCGTACA RP: TGTCACTACAATCAACTTTGC
<i>PpEH3</i>	FP: GCCTTGTCCTCCCAACCTTGAA RP: TGTTCACGCAGGAAGGAAAGT
<i>PpEH4</i>	FP: CATGGACTTGCTTGACACTGC RP: GCAATGGAAAATGGAGTCCG
<i>PpEH5</i>	FP: CGAGGATTTCCATTAACTGATCCA RP: CGCAAGTAGTCTCGACCC
<i>PpEH6</i>	FP: TCAGCTAGTCTGCTCTCCTTCT RP: ATGCAACACCCAGCCAGTTA
<i>PpEH7</i>	FP: TCCTCTGCCACCATGGTTTT RP: GTTTTCTATAGGAACTTGCACTG

1.7 统计分析与图表制作

使用 Microsoft excel 2019 计算标准差, 使用 Origin8.0 进行相关图表的制作。

2 结果与分析

2.1 桃 *EH* 家族候选成员的筛选和氨基酸序列比对

通过蛋白质保守结构域分析, 首先从相关序列中筛选出属于 α/β 水解酶结构超级家族的成员, 它们均具有保守的 MhpC (Pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase) 结构域。随后参考马铃薯环氧化物水解酶 *StEH1* 的蛋白质结构 (蛋白质 PDB 编号: 2CJP), 通过氨基酸序列比对和蛋白质结构分析鉴别出 7 个蛋白质具有环氧化物水解酶保守的 α/β 水解酶折叠结构域, 将其命名为 *PpEH1* ~ *PpEH7*, 其编码的基因为桃 *EH* 家族的候选基因 (表 1)。桃 *EH* 家族候选成员所编码的蛋白质中, 蛋白质氨基酸序列最短为 313 个氨基酸 (*PpEH7*), 最长为 339 个氨基酸 (*PpEH1*)。这些成员的 MhpC 结构域的位置存在差异。

将桃与已报道的其他物种 *EH* 成员的氨基酸序

列进行比对分析, 发现它们的 α/β 水解酶结构呈现较大的相似性, 氨基酸序列的平均相似度达到 60.35%。桃的 *EH* 成员均具有标准的 α/β 水解酶折叠结构, 8 条 β 片层被多个 α 螺旋结构包围, 而高度保守的三联体组成了催化残基, 包括位于 $\beta 5$ 之后的亲核氨基酸 (天冬氨酸), 位于最后一个 β 片层之后的负责活化水分子的组氨酸以及辅佐组氨酸的位于 $\beta 7$ 片层之后的酸性催化残基 (天冬氨酸) (图 1)。三位一体的结构之外, 2 个氧阴离子洞位置的氨基酸在桃 *EH* 成员之间非常保守, 包括 $\beta 3$ 附近的色氨酸和 $\beta 5$ 亲核天冬氨酸旁的色氨酸 (*PpEH3*) 或苯丙氨酸。同时, 所有比对的 *EH* 成员在 $\beta 4$ 结束的位置上有保守的 RGYG (D/L) (S/T) 序列片段。

2.2 桃 *EH* 家族候选成员的蛋白质进化树分析

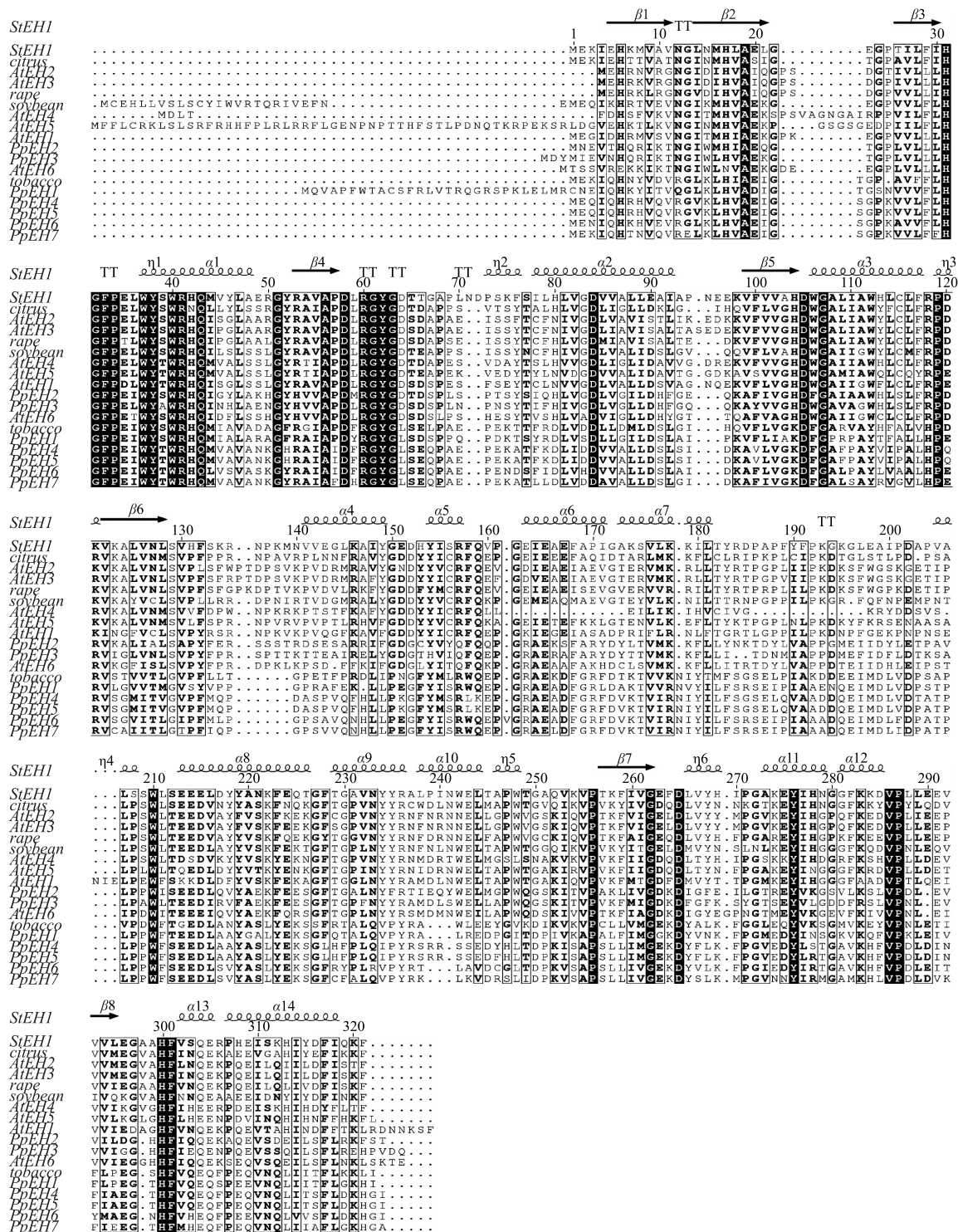
利用 Figtree1.3.1 软件构建桃和其他植物 *EH* 成员的蛋白质系统进化树 (图 2)。在进化树的 3 个分支中, 拟南芥的 2 个 *EH* 成员 (*AtEH4* 和 *AtEH5*) 位于第一分支, 马铃薯、粗皮柠檬、大豆和油菜的 4 个 *EH* 蛋白与拟南芥的 2 个 *EH* 成员 (*AtEH2* 和 *AtEH3*) 共同位于第二分支, 桃的 7 个 *EH* 成员、拟南芥的 2 个 *EH* 成员 (*AtEH1* 和 *AtEH6*) 和烟草的 *EH* 成员共同聚类在第三分支。

在第二分支, 马铃薯和粗皮柠檬的 *EH* 成员聚类在一起, 大豆、油菜和拟南芥的 2 个 *EH* 成员聚类在一起, 具有较近的亲缘关系。在第三分支, *PpEH1*、*PpEH4*、*PpEH5*、*PpEH6*、*PpEH7* 和烟草 *EH* 成员聚类在一起, *PpEH2*、*PpEH3* 和拟南芥 *AtEH6* 聚类在一起, 且上述 *EH* 成员均与 *AtEH1* 亲缘关系很近。

2.3 桃 *EH* 家族候选基因在果实发育成熟阶段的表达模式

从果实的第一次快速膨大期至成熟期, 7 个 *EH* 基因均有表达, 在发育成熟阶段前期呈现了较高的表达水平, 在整个发育成熟进程中呈现整体逐渐下调的表达趋势 (图 3)。

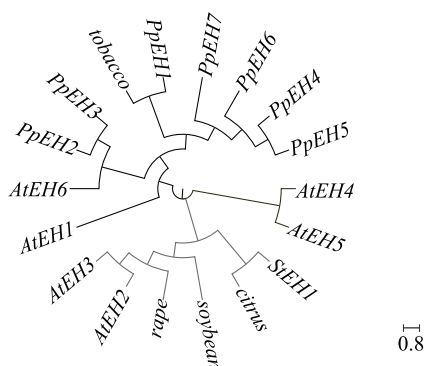
桃 *EH* 家族候选基因表达变化分为 3 种模式。模式 I 表现为 3 个基因 (*PpEH1*、*PpEH3*、*PpEH6*) 的表达量伴随果实发育成熟进程逐步下调, 模式 II 表现为 1 个基因 (*PpEH2*) 的表达量在发育成熟阶段的前期上调而后期下调, 模式 III 表现为 3 个基因 (*PpEH4*、*PpEH5*、*PpEH7*) 的表达量在发育成熟阶段的前期有下调和上调趋势而随后下调, 整体呈现下调趋势。



StEH1 (GenBank 登录号 75102548); 马铃薯环氧化物水解酶; *citrus* (GenBank 登录号 46090792); 粗皮柠檬环氧化物水解酶; *AtEH1* ~ *AtEH6* (GenBank 登录号依次为 AT3G05600, AT2G26750, AT2G26740, AT4G15955, AT4G15960, AT3G51000.1); 拟南芥环氧化物水解酶; *rape* (GenBank 登录号 22208299); 油菜环氧化物水解酶; *soybean* (GenBank 登录号 1304226); 大豆环氧化物水解酶; *tobacco* (GenBank 登录号 1354848); 烟草环氧化物水解酶; *PpEH1* ~ *PpEH7*; 桃环氧化物水解酶。波形表示 α 螺旋; 箭头表示 β 链; TT 字母表示严格的 β 链; 黑底白字表示不同氨基酸序列之间严格保守的氨基酸残基; 框形标注相似度高于 70% 的氨基酸残基。

图 1 基于蛋白质结构的桃和其他植物环氧化物水解酶成员的氨基酸序列比对

Fig.1 Amino acid sequence alignment of the epoxide hydrolase members in peach and other plant species based on protein structure



StEH1 (GenBank 登录号 75102548): 马铃薯环氧化物水解酶; *citrus* (GenBank 登录号 46090792): 粗皮柠檬环氧化物水解酶; *AtEH1*~*AtEH6* (GenBank 登录号依次为 AT3G05600、AT2G26750、AT2G26740、AT4G15955、AT4G15960、AT3G51000.1): 拟南芥环氧化物水解酶; *rape* (GenBank 登录号 22208299): 油菜环氧化物水解酶; *soybean* (GenBank 登录号 1304226): 大豆环氧化物水解酶; *tobacco* (GenBank 登录号 1354848): 烟草环氧化物水解酶; *PpEH1*~*PpEH7*: 桃环氧化物水解酶。利用 clustalx 软件进行环氧化物水解酶氨基酸序列的比对, 由 Figtree (1.3.1) 软件构建系统进化树。

图2 桃与其他植物的环氧化物水解酶的蛋白质进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of epoxide hydrolases in peach and other plant species

表达模式 I 的 3 个基因在 S1 阶段的表达量最高, 而在 S4 阶段的表达量下调至 S1 阶段的 4.5% 以下, 是整个发育成熟阶段表达量的最低值。模式 II 的 *EH* 基因 *PpEH2* 存在一个上调表达过程, 最高表达量出现在 S2 阶段, 最低表达量出现在 S4 阶段, S4 阶段的基因表达量下调至 S2 表达量的 2.3%。模式 III 中, *PpEH4* 在 S4 阶段的基因表达量下调至最高表达量 (S3 阶段) 的 37.2%, *PpEH5* 在 S4 阶段的基因表达量下调至最高表达量 (S3 阶段) 的 31.9%; *PpEH7* 在 S4 阶段的基因表达量下调至最高表达量 (S1 阶段) 的 8.5%, 下调幅度最大。综合上述分析, 桃的 *EH* 家族基因在 S4 阶段之前均具有较高的表达水平, 在成熟期 S4 阶段的基因表达水平相对前期呈现显著的下调; 结合前人研究所报道的内酯芳香物质的含量在成熟后显著增加的规律, 可知这些 *EH* 基因表达量可能与内酯芳香物质的积累负相关。

3 讨论

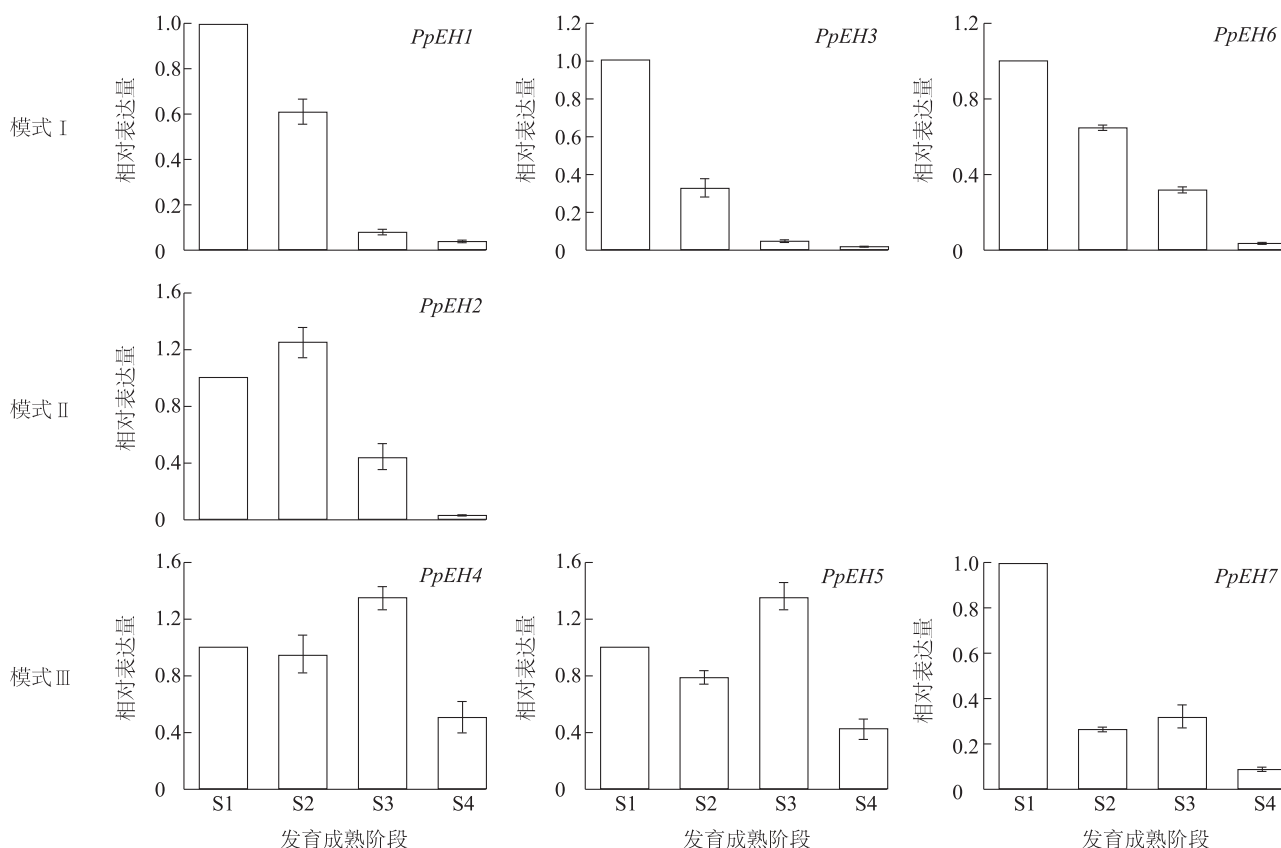
3.1 环氧化物水解酶的结构特征

环氧化物水解酶具有 α/β 水解酶折叠结构, 属

于包含有酯酶、蛋白酶、脂肪酶、脱卤酶、裂解酶等功能的 α/β 水解酶超级家族中的一类^[25-26]。标准的 α/β 水解酶折叠是由几乎平行的 8 条 β 片层 (其中只有第二个 β 片层与其他片层反向平行) 和包围在两边的多个 α 螺旋共同组成的, 且 α/β 水解酶的催化残基都是由 1 个高度保守的三联体组成。根据贾佳^[27] 统计的 *EH* 家族的核心催化位点的特征, *EHs* 除了上述三联体结构之外, 在质子供体、氧阴离子洞位置的氨基酸的选择也具有高度保守性, 且在 $\beta 4$ 结束的位置存在保守片段 GXGXS (甘氨酸-可变氨基酸-甘氨酸-可变氨基酸-丝氨酸)。本研究中, 我们鉴别的 7 个桃的 *EH* 家族候选成员均具有标准的 α/β 水解酶折叠结构, 与马铃薯、柑橘、烟草、拟南芥等其他植物中所报道的 *EH* 成员结构的相似度高, 且催化残基包括 2 个天冬氨酸和 1 个组氨酸。在质子供体的氨基酸选择上, 除了 *PpEH3* 之外, 分析的其他 *EH* 成员位于 $\alpha 5$ 螺旋的质子供体均为酪氨酸。本研究所涉及的 *EH* 成员的氧阴离子洞位置的氨基酸的选择均很保守, 且具有 GXGX (甘氨酸-可变氨基酸-甘氨酸-可变氨基酸) 的保守片段, 与贾佳^[27] 的结论一致。

3.2 植物环氧化物水解酶的生物學功能

环氧化物水解酶在生物体系中发挥着重要的作用, 包括外源化合物代谢、信号调节、细胞保护等, 在哺乳动物中的研究相对深入, 在植物中的研究略为滞后。Neuteboom 等^[28] 鉴别了在菠萝根部呈现组织特异表达的基因, 其中 *PFE258* 是长为 1 199 bp 的环氧化物酶基因。大戟属植物 (*Euphorbia lagascae*) 的种子胚乳中含有高水平的环氧化脂肪酸-羟基乙酸, 而环氧化物水解酶参与了种子萌发过程中羟基乙酸的氧化过程, Edqvist 和 Farbos^[29] 从该植物中分离到了这种酶, 并发现其编码基因的表达受到种子萌发过程的诱导, 而且外源激素如生长素和乙烯等的刺激也可增加该基因的转录。郑柳城和朱宏波^[30] 通过在水稻蛋白质组数据库中进行 BLAST 搜索, 获得了 10 个水溶性环氧化物水解酶, 并对编码这些酶的基因开展了表达模式分析、蛋白质氨基酸序列联配、三级结构预测等生物信息学分析, 预测了它们可能具有与抗逆相关的重要功能。在拟南芥中, 近期有研究关注了一些 *EH* 的生物學功能, 并证明 *EH* 参与了宿主防御的重要功能。AtEH1 参与角质的形成^[18], 催化水解 C18 脂肪酸环氧化物生成邻



S1: 盛花后 43 d; S2: 盛花后 77 d; S3: 盛花后 115 d; S4: 盛花后 144 d。

图3 桃环氧化物水解酶家族候选基因在果实发育成熟阶段的表达模式

Fig.3 Expression patterns of candidate genes of epoxide hydrolase family in peach during fruit development and maturation

二醇;在敲除了 *AtEH1* 基因的拟南芥突变体中,叶片和种子角质中 C18 脂肪酸环氧化物含量会升高,并伴随邻二醇产物含量的降低。现有研究结果强调了植物 EH 在植物抗逆性方面的重要功能。

3.3 桃果实环氧化物水解酶基因的表达分析

目前涉及果实 EH 鉴别和生物学功能的研究较少,其中桃果实 EH 参与内酯芳香物质合成的相关研究备受关注。Pirrona 等^[20]报道了 2 个可能的 EH 成员,其中 *EPH3* (编号: ppa009153m) 的保守结构域分析结果显示其属于 HAD 水解酶超家族,而 *EPH2* (编号: ppa008854m) 对应于本研究所鉴别的 *PpEH2*。Pirrona 等^[20]对更为芳香的溶质品种 Bolero 桃和香气较弱的溶质品种 OroA 桃开展研究,发现 *EPH2* 在 Bolero 桃果实发育前期上调表达,在 Bolero 和 OroA 桃果实的发育后期均呈现下调表达。本研究所用品种白花水蜜为溶质桃而且香气浓郁,在该品种果实发育的 S2 阶段 *PpEH2* 有明显的上调表达,且在整个成熟期呈现下调表达,类似于 Bolero

桃的表达趋势,与 Pirrona 等^[20]的研究结果一致。Li 等^[21]报道了若干可能的 EH 成员,其中 *EPH2* (编号: ppa008854m) 对应于本研究所鉴别的 *PpEH2*,且与 Pirrona 等^[20]所报道的 *EPH2* 是同一个基因; *EPH1* (编号: ppa008918m) 对应于本研究所鉴别的 *PpEH6*;但所报道的基因编号为 ppa007004m 和 ppa013585m 基因编码的不属于 α/β 水解酶结构家族,另一个基因编号为 ppa008756m 基因编码的不具有 EH 家族的保守蛋白质结构。本研究结果表明 *PpEH6* 和 *PpEH2* 在成熟期 S4 阶段相比于 S3 阶段表达量呈现下调趋势,而 Li 等^[21]更精细地分析了这 2 个基因在 HJ1 阶段(成熟早期)、HJ2 阶段(商业采收成熟期)、HJ3 阶段(完全成熟期)表达量的变化: *EPH1* (对应本研究的 *PpEH6*) 在湖景蜜露果实 HJ2 阶段相比 HJ1 阶段表达量呈现下调的趋势, *EPH2* (对应本研究的 *PpEH2*) 在 HJ2 阶段表达下调后在 HJ3 阶段又呈现上调趋势。

有研究结果表明,内酯芳香物质伴随桃果实的

成熟逐渐积累。Zhang 等^[31]分析了内酯物质在湖景蜜露和奉化玉露桃果实不同发育成熟阶段(S0:未成熟阶段;S1:早期成熟阶段;S2:商业采收成熟阶段;S3:完全成熟阶段)的含量变化,发现 γ -癸内酯是其中含量最高的内酯物质,且该内酯在2个品种桃果实中的含量均在S1阶段呈现显著增加,在S3阶段达到最高。Peng 等^[32]对盛花后114~132 d的Fenghuayulu桃果实每隔2 d进行1次取样,并对芳香物质进行检测,发现从花后124 d开始可以在果实中检测到 γ -癸内酯,且在随后的阶段中含量逐渐上升,在最后一个取样点 γ -癸内酯含量达到最高。结合本研究的基因表达分析结果,在桃果实中表达的7个EH基因在成熟期的S3阶段均有一定的表达量,可能与内酯的合成相关联。由于内酯的合成通路尚未完全阐明,而环氧化物水解酶在内酯合成通路的中游发挥作用,因此EH成员催化特征的鉴别、各EH成员催化产物的明确、EH产物是否以及如何作为前体物质参与内酯的合成等将是后续研究需要解决的关键问题。同时需要注意桃的EH是否具有多重生物学功能,如在其他物种中所报道的参与逆境防御的功能等。

综上所述,本研究系统鉴别出7个桃的EH家族成员,序列特征分析结果表明它们具有典型的 α/β 水解酶折叠结构,属于环氧化物水解酶家族。进化树分析结果显示,桃的EH成员与拟南芥、烟草、油菜、大豆、粗皮柠檬等物种的EH的聚类很近。基因表达分析结果显示,它们均在果实的S1~S4发育成熟阶段表达,表达模式分为3种,基本呈现成熟前期表达量较高而在整个成熟期整体表达量下调的总趋势,与内酯芳香物质的积累负相关。本研究对于桃环氧化物水解酶家族成员的构成、进化关系和基因表达模式进行了系统分析,为后续桃乃至其他果实中内酯物质合成相关的EH成员的深入研究提供参考。

参考文献:

- [1] 王贵章,王贵禧,梁丽松,等. 桃果实芳香挥发物及其生物合成研究进展[J]. 食品科学,2014,35(17):278-284.
- [2] SCHÖTTLER M, BOLAND W. Biosynthesis of dodecano-4-lactone in ripening fruits: crucial role of an epoxide-hydrolase in enantioselective generation of aroma components of the nectarine (*Prunus persica* var. *nucipersica*) and the strawberry (*Fragaria ananassa*) [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1996, 79: 1488-1496.
- [3] ZOU J, HALLBERG B M, BERGFORS T, et al. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases [J]. *Structure*, 2000, 8(2): 111-122.
- [4] 盛艳曼. 环氧化物水解酶产生菌的筛选及其发酵条件和对苯基缩水甘油醚类化合物拆分条件的研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2010.
- [5] 陈文静. 绿豆环氧化物水解酶催化环氧苯乙烯不对称水解反应[D]. 广州:华南理工大学,2012.
- [6] NEWMAN J W, MORISSEAU C, HAMMOCK B D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism [J]. *Progress in Lipid Research*, 2005, 44(1): 1-51.
- [7] MORISSEAU C. Role of epoxide hydrolase in lipid metabolism [J]. *Biochimie*, 2013, 95(1): 91-95.
- [8] 娄文勇,赵莹,彭飞,等. 环氧化物水解酶的研究进展[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),2017,49(6): 1-6.
- [9] BLÉE E, SCHUBER F. Occurrence of fatty acid epoxide hydrolases in soybean (*Glycine max*). Purification and characterization of the soluble form [J]. *Biochemical Journal*, 1992, 282(3): 711-714.
- [10] KIYOSUE T, BEETHAM J K, PINOT F, et al. Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress [J]. *The Plant Journal*, 1994, 6(2): 259-269.
- [11] MORISSEAU C, BEETHAM J K, PINOT F, et al. Cress and potato soluble epoxide hydrolases: purification, biochemical characterization, and comparison to mammalian enzymes [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 378(2): 321-332.
- [12] SUMMERER S, HANANO A, UTSUMI S, et al. Stereochemical features of the hydrolysis of 9,10-epoxystearic acid catalysed by plant and mammalian epoxide hydrolases [J]. *Biochemical Journal*, 2002, 366(2): 471-480.
- [13] MOWBRAY S L, ELFSTRÖM L T, AHLGREN K M, et al. X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes [J]. *Protein Science*, 2006, 15(7): 1628-1637.
- [14] THOMAEUS A, NAWORYTA A, MOWBRAY S L, et al. Removal of distal protein-water hydrogen bonds in a plant epoxide hydrolase increases catalytic turnover but decreases thermostability [J]. *Protein Science*, 2008, 17: 1275-1284.
- [15] WIJEKOON C P, GOODWIN P H, VALLIANI M, et al. The role of a putative peroxisomal-targeted epoxide hydrolase of *Nicotiana benthamiana* in interactions with *Colletotrichum destructivum*, *C. orbiculare* or *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [J]. *Plant Science*, 2011, 181(2): 177-187.
- [16] HUANG F C, SCHWAB W. Molecular characterization of *NbEH1* and *NbEH2*, two epoxide hydrolases from *Nicotiana benthamiana* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 90: 6-15.
- [17] CARLSSON Å J, BAUER P, DOBRITZSCH D, et al. Laboratory evolved enzymes provide snapshots of the development of enantioconvergence in enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis [J]. *Chembi-*

- ochem, 2016, 17(18): 1693-1697.
- [18] PINEAU E, XU L, RENAULT H, et al. *Arabidopsis thaliana* epoxide hydrolase1 (AtEH1) is a cytosolic epoxide hydrolase involved in the synthesis of poly-hydroxylated cutin monomers [J]. New Phytologist, 2017, 215: 173-186.
- [19] VECCHIETTI A, LAZZARI B, ORTUGNO C, et al. Comparative analysis of expressed sequence tags from tissues in ripening stages of peach (*Prunus persica* L. Batsch) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2009, 5(3): 377-391.
- [20] PIRONA R, VECCHIETTI A, LAZZARI B, et al. Expression profiling of genes involved in the formation of aroma in two peach genotypes [J]. Plant Biology, 2013, 15(3): 443-451.
- [21] LI X W, JIANG J, ZHANG L P, et al. Identification of volatile and softening-related genes using digital gene expression profiles in melting peach [J]. Tree Genetics & Genomes, 2015, 11: 1-15.
- [22] ROBERT X, GOUET P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(1): 320-324.
- [23] ZHANG Y Y, YIN X R, XIAO Y W, et al. An ethylene response factor-MYB transcription complex regulates furaneol biosynthesis by activating *quinone oxidoreductase* expression in strawberry [J]. Plant Physiology, 2018, 178(1): 189-201.
- [24] 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: 1-13.
- [25] OLLIS D L, CHEAH E, CYGLER M, et al. The α/β hydrolase fold [J]. Protein Engineering Design & Selection, 1992, 5(3): 197-211.
- [26] 徐丽诗. α/β 水解酶亚家族共进化网络的算法优化及功能预测 [D]. 上海: 上海交通大学, 2016.
- [27] 贾 佳. 环氧化物水解酶序列识别和分类模型的构建 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [28] NEUTEBOOM L W, KUNIMITSU W Y, WEBB D, et al. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development [J]. Plant Science, 2002, 163(5): 1021-1035.
- [29] EDQVIST J, FARBOS I. A germination-specific epoxide hydrolase from *Euphorbia lagascae* [J]. Planta, 2003, 216: 403-412.
- [30] 郑柳城, 朱宏波. 水稻水溶性环氧化物水解酶的生物信息学分析 [J]. 生物信息学, 2009, 7(2): 108-112, 139.
- [31] ZHANG L P, LI H Y, GAO L, et al. Acyl-CoA oxidase 1 is involved in γ -decalactone release from peach (*Prunus persica*) fruit [J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(6): 829-842.
- [32] PENG B, YU M L, ZHANG B B, et al. Differences in PpAAT1 Activity in high- and low-aroma peach varieties affect γ -decalactone production [J]. Plant Physiology, 2020, 182(4): 2065-2080.

(责任编辑: 陈海霞)