

10种蔷薇科果树AAT基因家族鉴定、特性与表达分析

温思为¹, 张黄伟¹, 岳超², 李梦^{1*}

(¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²江苏中烟工业有限责任公司, 南京 210019)

摘要:【目的】利用生物信息学对10种蔷薇科果树的AAT基因家族进行分析,为果实香气调控的候选基因鉴定提供前期基础。【方法】基于10种蔷薇科果树的全基因组测序结果,应用保守结构域鉴定不同果树的AAT基因家族,分析其理化性质、保守域结构、亚组分类、进化关系、内含子与外显子结构、染色体定位等信息。【结果】10种蔷薇科果树中共鉴定出46个AAT基因序列,分别为中国白梨4个、梅4个、桃8个、苹果7个、西洋梨4个、杜梨6个、甜樱桃2个、森林草莓1个、凤梨草莓7个以及黑树莓3个,各物种AAT基因随机分布在染色体上。通过聚类分析,将这46条基因序列分为4个区组;亚细胞定位与理化性质分析显示,AAT蛋白主要定位于细胞质上,整体在弱酸性至弱碱性的范围内,为亲水性蛋白,同时大部分蛋白呈现不稳定的状态。通过共线性与表达分析,发现蔷薇科果树AAT基因家族在其进化过程中主要受纯化选择作用的影响。【结论】在10种蔷薇科果树中,共鉴定出46个AAT基因家族序列,最少的为森林草莓(1个),最多的为桃(8个)。AAT基因家族的各序列结构相对保守,受纯化作用的影响明显。

关键词:蔷薇科;醇酰基转移酶;AAT;基因家族;香气物质

中图分类号:S66 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2021)07-1029-15

Identification, characterization and expression analysis of alcohol acetyltransferase (AAT) gene family in 10 Rosaceae fruit trees

WEN Siwei¹, ZHANG Huangwei¹, YUE Chao², LI Meng^{1*}

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China; ²China Tobacco Jiangsu Industrial Co., Ltd., Nanjing 210019, Jiangsu, China)

Abstract: 【Objective】Alcohol acetyltransferase (AAT) is a key enzyme that promotes the formation of ester aroma substances. Genes encoding AAT enzymes exist in different fruits, which can selectively release different substrates and heterologous AATase, and regulate the biosynthesis of volatile esters. In this study, we performed AAT gene family analysis of 10 Rosaceae fruit species to illustrate various properties of their families, in order to provide preliminaries for functional validation of candidate genes for fruit aroma regulation. 【Methods】Based on the AATase structural domains, we retrieved the genome database of 10 Rosaceae species (*Pyrus bretschneideri*, *Pyrus communis*, *Pyrus betulifolia*, *Malus domestica*, *Prunus Persica*, *Prunus mume*, *Prunus avium*, *Fragaria vesca*, *Rubus occidentalis*, *Fragaria × ananassa*) to identify the AAT genes. Then the phylogenetic tree of AAT genes of Rosaceae species was generated with neighbor-joining method using MEGAX software. After that, the AAT gene structures were analyzed by online analysis software GSDS 2.0. And, we used the online tool ExPASy to analyzed physicochemical properties of AAT proteins, including the number of amino acids, molecular weight, isoelectric point, grand average of hydropathicity, aliphatic index and instability index. Sub-cellular localization was predicted by online website CELLO, and protein motif was analyzed by MEME database. Mapdraw was employed to perform the chromosome map, which could help analyzing the distribution of AAT genes on the chromosome. MCScanX was used to detect the collinearity of

收稿日期:2020-12-24 接受日期:2021-04-15

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(KYYJ202117)

作者简介:温思为,女,本科,研究方向为果树基因组学。Tel:15365183156, E-mail:wensiwei98@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:025-84395262, E-mail:mli@njau.edu.cn

the *AAT* genes. Multiple sequence alignment analysis was performed using Muscle, ParaAT, which led to further use of KaKs_Calculator2.0 software to calculate Ks and Ka/Ks values between synteny sequences. Finally, Dangshansuli and Nanguoli were taken as examples to analyze the relationship between volatile aromatic compounds and *AAT* activity during the growth and development of pear fruit. **【Results】**In this study, we totally identified 46 genes, including 4 from Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*), 4 from plum (*Prunus mume*), 8 from peach (*Prunus Persica*), 7 from apple (*Malus domestica*), 4 from European pear (*Pyrus communis*), 6 from du pear (*Pyrus betulifolia*), 2 from sweet cherry (*Prunus avium*), 1 from woodland strawberry (*Fragaria vesca*), 7 from pineapple strawberry (*Fragaria × ananassa*), and 3 from black raspberry (*Rubus occidentalis*). By means of a dendrogram, these 46 genes were divided into 4 regional groups, which could be found because all branches had *AAT* genes from different species. Analysis of the gene structure map represented that all 41 sequences had introns, except for five sequences without introns, and the structural composition of each sequence was relatively complex. The results of subcellular localization and physicochemical properties revealed that the *AAT* proteins were mainly localized in the cytoplasm, with an overall range of weakly acidic to weakly basic, hydrophilic proteins and most of them were unstable. Through the chromosome map, it could be found that the *AAT* genes were randomly distributed on the chromosome 2 *AAT* genes were distributed on the same chromosome in apple, plum, Chinese white pear, European pear, du pear, sweet cherry, and pineapple strawberry. 3 and 4 genes were distributed on one chromosome in peach, and 5 were distributed on one chromosome in pineapple and strawberry. Through MCScanX, we found 37 pairs of collinearity relationships in total. Among them, 8 pairs of colinear relationships were found within species, 1 pair in Chinese white pear, 1 pair in plum, 1 pair in sweet cherry, and 5 pairs in pineapple strawberry. Specially, *FaAAT1* had the most synteny sequences within species. Furthermore, 29 pairs of collinear relationships were found between species, Chinese white pear and peach had collinear relationships with five species, and European pear, apple, plum and pineapple strawberry had collinear relationships with four species. It could be found that the expansion of *AAT* gene family had the phenomenon of tandem duplication and fragment duplication in the process of polyploidization. The Ka/Ks values of homologous gene pairs in the Rosaceae *AAT* gene family were all less than 1, indicating that they were mainly influenced by the effect of purifying selection during the evolutionary process. In the two pear species, the activity of *AAT* increased with the growth and development of the fruits. Considering former research of Qin, the *AAT* activity of Dangshansuli with lower content of volatile aroma compounds was lower than that of Nanguoli with higher content, and the increase of *AAT* activity increased the production of lactones in the fruits. **【Conclusion】** 46 *AAT* genes were identified in 10 Rosaceae species, and only 1 was found in woodland strawberry and 8 were found in peach. The structure of *AAT* genes were relatively conserved and were significantly affected by purification effects. There were differences in *AAT* activity among different species, and their gene expression was positively correlated with the production of esters.

Key words: Rosaceae; Alcohol acetyltransferase; *AAT*; Gene family; Aroma substance

在世界范围内,蔷薇科约有124个属3300个种,而我国有51个属1000余个种。蔷薇科植物在中国广泛分布,有着重要的经济价值。较为熟悉的大部分温带果树,如苹果、白梨、桃、梅、西洋梨等都属于蔷薇科,是果品消费市场的重要组成部分,与果品生产息息相关。

风味是一种重要的品质指标,由糖、酸和香气物质的综合作用形成。根据相应的感官结果,可将香气物质分为果香型、甜香型、青香型、辛香型、木香型、醛香型等^[1-2]。香气阈值则是人体嗅觉器官所能感受到该香气物质的最低浓度值,而香味活性值(OAV)为香气物质的浓度与香气阈值的比值,比值

越高,表明香气物质是特征性物质,对果实的风味起主要作用^[3-4]。

香气物质作为品质指标,在果实的成熟过程中,是通过一系列酶修饰前体物质(如脂肪酸、氨基酸等)形成的,同时其属于果实的次级代谢产物,由上千种挥发性化合物组成,主要包括酚类、酯类、醛类、萜类、醇类及含硫化合物等^[5-6]。不同树种或同一树种的不同品种间,香气物质的组成成分不同,如葡萄有460种,苹果有350多种,而香蕉较少,约为230种^[4,7-9]。

香气物质生物合成途径分为3类,分别为脂肪酸途径、萜类合成途径和氨基酸途径,其中起关键性作用的酶主要为脂肪酸途径的脂氧合酶(LOX)、过氧化氢裂解酶(HPL)和醇脱氢酶(ADH)以及氨基酸途径的醇酰基转移酶(AAT)。脂肪酸途径先是通过氧化或LOX酶生成中间产物,而后转化为醛和醇,最后生成酯类;萜类合成途径是在各种萜类合酶作用下,将前体物质合成为萜类骨架,再通过各种化学修饰获得不同的萜类化合物。而氨基酸途径代谢形成果实香气物质中的支链脂肪族醇、醛、酮和酯类物质,氨基酸由转氨作用形成支链酮酸后就分为2个途径:一条脱羧形成支链醛进而脱氢生成支链醇;另一条与辅酶A生成酰基辅酶A,然后在醇酰基转

移酶(AAT)作用下形成支链酯类物质^[10-11]。酰基转移酶(acyltransferase)是催化酰基转移形成酯或酰胺的酶,常见的酰基供体主要包括酰化作用后的糖苷、酰基载体蛋白、酰基-CoA 硫酯等。其中植物酰基辅酶A依赖性酰基转移酶构成了一个大的特定家族,称为BAHD家族^[12-13]。

关于香气物质的关键性酶,LOX、HPL和ADH家族已有报道^[5,14-15],而作为参与氨基酸途径的重要作用酶,醇酰基转移酶(AAT)的相关机制仍需进一步探索。目前已鉴定出3种不同的AATase,分别为AATase I、与其密切相关的同源Lg-AATase I和AATase II,三者分别命名为*ATF1*、*Lg-ATF1*和*ATF2*。*ATF1*在酯类的合成中起到主要的作用,*Lg-ATF1*和*ATF2*的作用相对次要。*ATF1*只能使用乙酰辅酶A作为酰基转移的供体,但这种酶可以在体外有效地水解各种酰基辅酶A底物,可作为一种有效的硫酯酶,同时*ATF1*和*Lg-ATF1*基因的转录是共同调节的;研究发现,*ATF2*在解毒羟类固醇和某些植物化学物质中发挥着积极作用^[16-19]。

果实中醇酰基转移酶的编码基因可以选择性地释放不同的底物和异源AAT,从而进一步调节挥发性酯的生物合成(图1)^[20-21]。由于其在酯生物合成中的关键作用,AAT酶活性已成为各种水果提取物



图1 醇酰基转移酶催化酯类合成

Fig. 1 Alcohol acyltransferase catalyzes ester synthesis

早期研究的主题。近年来已从草莓和甜瓜中分离并表征了具有AAT活性的酶基因,同时进行AAT的活性分析时发现其对果实成熟具有诱导作用,对醇和酰基CoAs的底物特异性相对广泛^[22-23]。在成熟期的草莓果实中发现了*AAT*基因的高表达与AAT的高活性,AAT酶活性在果实的成熟过程中呈逐渐增加的趋势,相对应酯类化合物的相对含量也逐渐增高^[24-26]。乌云塔娜等^[27]在6个中国梨品种中成功克隆出*AAT*基因,并通过聚类分析证明梨*AAT*基因以家族形式存在。对苹果果实中的AAT酶活性的检测后发现,随着AAT酶活性的增强,果实中酯类香气物质的含量呈上升趋势,且在不同器官中AAT的表达量存在差异^[28-29]。王贵章等^[30]将克隆的桃*AAT*

基因氨基酸序列与不同种属的*AAT*基因氨基酸序列进行聚类,发现桃中1个*AAT*序列与草莓等果实的*AAT*基因编码的序列为直系同源基因,同时桃中的AAT能将乙酰CoA与醇特异性结合,形成乙酸酯类物质,通过将桃果实中的*AAT*基因进行定位,发现其表达量随着果实成熟迅速上升,产生了大量酯类香气物质^[30-31]。

因此,笔者着眼于系统研究蔷薇科果树的*AAT*基因家族基因,以已经公布的蔷薇科果树全基因组数据为基础,筛选出中国白梨、西洋梨、杜梨、梅、桃、苹果、欧洲甜樱桃、森林草莓、凤梨草莓以及黑树莓共10种蔷薇科物种的*AAT*基因。通过对*AAT*基因家族的系统鉴定、进化分析和表达分析,分析其序列

的基本特性以及家族成员之间的进化关系,为进一步研究蔷薇科果树 *AAT* 基因的功能以及香气物质的合成机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选取中国白梨、西洋梨、杜梨、梅、桃、苹果、欧洲甜樱桃、森林草莓、凤梨草莓以及黑树莓 10 种蔷薇科物种。苹果、西洋梨、杜梨、欧洲甜樱桃、森林草莓、凤梨草莓以及黑树莓的基因序列信息从蔷薇科基因组数据库 (GDR) (<https://www.rosaceae.org/>) 获取。中国白梨、梅和桃分别从梨基因组数据库 (<http://peargenome.njau.edu.cn/>)、梅基因组数据库 (<http://prunusmumegenome.bjfu.edu.cn/>) 和 Phytozome 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 获取。

1.2 蔷薇科果树 *AAT* 基因的筛选与定位

从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 中获取 *AAT* 结构域,使用 Hidden Markov Model,通过 HMMER 3.0 软件 (<http://www.hmmerr.org/>) 进行 10 种蔷薇科物种所有蛋白序列的搜寻,鉴定蔷薇科物种蛋白序列中的所有 *AATs* 家族序列。合并鉴定结果,筛选重复序列,整合数据,确定 46 条 *AAT* 基因并进行命名。

1.3 蔷薇科果树 *AAT* 基因的基因结构及系统进化分析

利用基因结构 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 在线分析软件,对 *AAT* 基因序列进行内含子和外显子结构分析^[32]。使用 MEGAX (<http://megasoftware.net>),通过邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 生成蔷薇科物种 *AAT* 基因的系统进化树^[33]。参数设置:使用 Bootstrap 方法进行系统发育测试,将 Bootstrap 值设置为 1000,模型采用泊松分布,数据处理为成对删除。

1.4 蔷薇科果树 *AAT* 基因家族蛋白基序分析

使用在线工具 ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 对鉴定出的序列进行理化性质分析,包括 *AAT* 蛋白的氨基酸数、分子量、等电点、平均亲水系数、不稳定指数、脂肪族指数等^[34]。亚细胞定位利用 CELLO 网站 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 进行预测^[35]。通过 MEME 数据库 (<http://alternate.meme-suite.org/tools/meme>) 分析蛋白基序 Mo-

tif。参数设定:模式采用经典模式;每个序列 0 或 1 次出现;Motif 搜索数为 20;Motif 最小宽度为 6,最大宽度为 50^[36]。

1.5 蔷薇科果树 *AAT* 基因家族的进化模式分析

利用 Mapdraw 软件制作 *AAT* 基因的染色体定位图,分析各 *AAT* 基因在染色体上的分布情况^[37]。使用 MCSanX (<http://chibba.pgml.uga.edu/mcsan2>) 对鉴定序列进行共线性分析^[38]。利用 Muscle、ParAT 与 KaKs_Calculator2.0 软件计算基因对之间的 K_a 和 K_d/K_s 值,参数设置:参数指定方法为 NG 法,遗传密码为 1-Standard Code^[39-41]。

2 结果与分析

2.1 蔷薇科果树 *AAT* 基因的筛选与定位

利用 Pfam 的“Alcohol acetyltransferase”结构域 (<http://pfam.xfam.org/family/PF07247>),在 10 个已完成测序的蔷薇科物种基因组中鉴定 *AAT* 同源基因,如表 1 所示。

通过 MSV 算法,由 HMMER3.0 鉴定出 46 个 *AAT* 蛋白序列。其中,梨中鉴定出 4 个、西洋梨鉴定出 4 个、杜梨鉴定出 6 个、苹果鉴定出 7 个、桃鉴定出 8 个、梅鉴定出 4 个、欧洲甜樱桃鉴定出 2 个、凤梨草莓鉴定出 7 个、森林草莓鉴定出 1 个以及黑树莓鉴定出 3 个(表 1)。分析鉴定结果,发现单个物种鉴定出的序列均为个位数,对比起 LOX 的蔷薇科物种鉴定数均高于 10 个^[5],*AAT* 基因在蔷薇科物种中相对较少。同时根据物种拉丁名首字母+AAT+列表顺序,对鉴定出的 46 个蔷薇科植物 *AAT* 蛋白进行了命名

表 1 10 种蔷薇科果树中鉴定出的 *AAT* 同源基因

Table 1 *AAT* homologous genes identified from 10

Rosaceae species

物种名称 Species name	染色体数 Chromosome number	版本 Release version	鉴定结果 Identified genes
中国白梨 <i>Pyrus bretschneideri</i>	34	NJAU, v1.0	4
西洋梨 <i>Pyrus communis</i>	34	GDR, v1.0	4
杜梨 <i>Pyrus betulifolia</i>	34	GDR, v1.0	6
苹果 <i>Malus domestica</i>	34	GDR, v3.0	7
桃 <i>Prunus persica</i>	16	JGI, v2.1	8
梅 <i>Prunus mume</i>	16	BJFU, v1.0	4
欧洲甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	16	GDR, v1.0	2
森林草莓 <i>Fragaria vesca</i>	14	GDR, v4.0	1
凤梨草莓 <i>Fragaria × ananassa</i>	56	GDR, v1.2	7
黑树莓 <i>Rubus occidentalis</i>	14	GDR, v3.0	3

(表2)。

2.2 蔷薇科果树 *AAT* 基因结构及系统进化分析

从系统进化树(图2)可以发现,位于进化树同一组的不同分支的序列存在基因结构相似度较高的情况,说明这10个物种的 *AAT* 序列有着较高的同源性和保守性。通过聚类分析,可将这46个基因序列分类为4个区组(I组、II组、III组与IV组),其中I

组含有23个 *AAT* 基因,II组含有1个 *AAT* 基因,III组含有9个 *AAT* 基因,IV组包含13个 *AAT* 基因。

结合系统进化分析,通过GSDS进行外显子内含子作图(图3),发现苹果 *MdAAT7* 基因序列最短,其中凤梨草莓 *FaAAT7* 基因序列最长,除 *MdAAT7*、*PcAAT4*、*PdAAT6*、*PmAAT3*、*MdAAT7* 5个序列无内含子外,其余41个序列均有内含子。各个序列的结

表2 10种蔷薇科果树 *AAT* 蛋白序列基本信息

Table 2 Basic information of *AAT* protein sequence in 10 Rosaceae species

物种 Species	登录号 Accession number	染色体定位 Chromosome location	基因名称 Gene name
中国白梨 <i>P. bretschneideri</i>	Pbr035338.1	scaffold681	<i>PbrAAT1</i>
	Pbr035339.1	scaffold681	<i>PbrAAT2</i>
	Pbr040473.1	scaffold89	<i>PbrAAT3</i>
	Pbr040474.1	scaffold89	<i>PbrAAT4</i>
西洋梨 <i>P. communis</i>	PCP029711.1	scaffold01079	<i>PcAAT1</i>
	PCP029710.1	scaffold01079	<i>PcAAT2</i>
	PCP039261.1	scaffold00585	<i>PcAAT3</i>
杜梨 <i>P. betulifolia</i>	PCP043782.1	scaffold00840	<i>PcAAT4</i>
	GWHPAAYT010120	Chr12	<i>PbAAT1</i>
	GWHPAAYT010117	Chr12	<i>PbAAT2</i>
	GWHPAAYT030511	Chr17	<i>PbAAT3</i>
	GWHPAAYT040759	Chr5	<i>PbAAT4</i>
苹果 <i>M. domestica</i>	GWHPAAYT058518	Scaffold20	<i>PbAAT5</i>
	GWHPAAYT028415	Chr17	<i>PbAAT6</i>
	MDP0000131461	Chr12	<i>MdAAT1</i>
	MDP0000729521	Chr8	<i>MdAAT2</i>
	MDP0000143130	Chr5	<i>MdAAT3</i>
	MDP0000464528	Chr12	<i>MdAAT4</i>
	MDP0000294614	Chr8	<i>MdAAT5</i>
桃 <i>P. persica</i>	MDP0000256715	Chr9	<i>MdAAT6</i>
	MDP0000137375	Chr3	<i>MdAAT7</i>
	Prupe.3G095000.1	Chr3	<i>PpAAT1</i>
	Prupe.7G103900.1	Chr7	<i>PpAAT2</i>
	Prupe.7G103800.1	Chr7	<i>PpAAT3</i>
	Prupe.7G103700.1	Chr7	<i>PpAAT4</i>
	Prupe.3G140600.1	Chr3	<i>PpAAT5</i>
	Prupe.3G141300.1	Chr3	<i>PpAAT6</i>
梅 <i>P. mume</i>	Prupe.1G432500.1	Chr1	<i>PpAAT7</i>
	Prupe.3G315700.1	Chr3	<i>PpAAT8</i>
	Pm028074	scaffold103	<i>PmAAT1</i>
	Pm005307	Chr2	<i>PmAAT2</i>
	Pm026396	Chr8	<i>PmAAT3</i>
欧洲甜樱桃 <i>P. avium</i>	Pm013737	Chr4	<i>PmAAT4</i>
	Pav_sc0001335.1_g230.1.mk	Chr2	<i>PaAAT1</i>
森林草莓 <i>F. vesca</i>	Pav_sc0000591.1_g450.1.mk	Chr2	<i>PaAAT2</i>
	FvH4_6g19190.1	Chr6	<i>FvAAT1</i>
凤梨草莓 <i>Fragaria × ananassa</i>	maker-Fvb6-4-augustus-gene-134.51	Chr6	<i>FaAAT1</i>
	maker-Fvb6-3-augustus-gene-266.28	Chr6	<i>FaAAT2</i>
	maker-Fvb6-2-augustus-gene-149.41	Chr6	<i>FaAAT3</i>
	maker-Fvb6-2-snap-gene-149.48	Chr6	<i>FaAAT4</i>
	maker-Fvb6-1-augustus-gene-233.38	Chr6	<i>FaAAT5</i>
	maker-Fvb2-2-snap-gene-2.59	Chr2	<i>FaAAT6</i>
	maker-Fvb2-3-snap-gene-59.61	Chr2	<i>FaAAT7</i>
黑树莓 <i>R. occidentalis</i>	Ro06_G14178	Chr6	<i>RoAAT1</i>
	Ro05_G30612	Chr5	<i>RoAAT2</i>
	Ro02_G22954	Chr2	<i>RoAAT3</i>

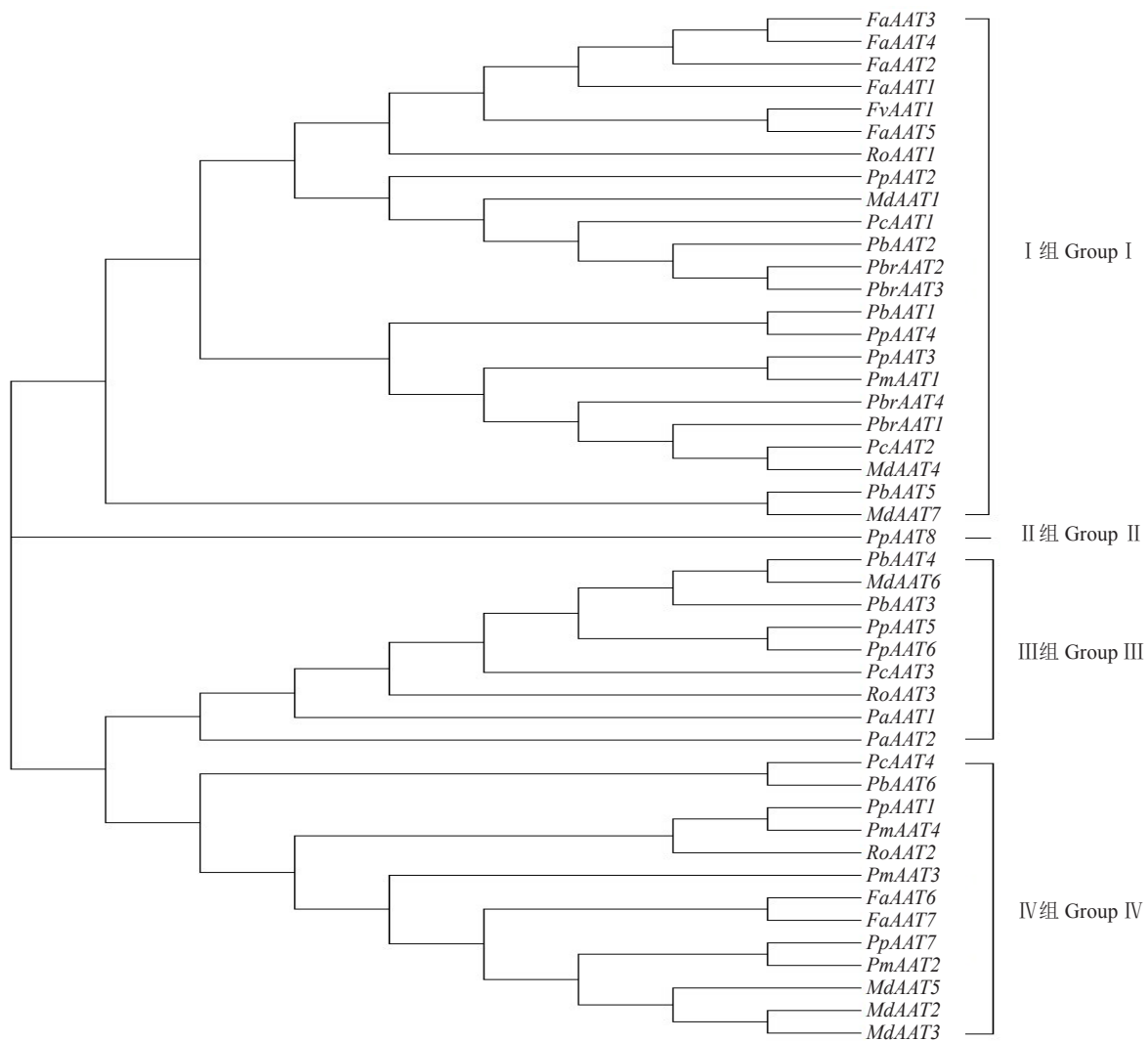


图 2 10 种蔷薇科果树 *AAT* 基因家族的系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic Tree of *AAT* gene family in 10 Rosaceae species

构组成都相对复杂,但是按照所分的4个区组来看,区组内的序列有更为相似的结构组成。同时发现不同序列的外显子数目与分布都存在差异,证明蔷薇科果树 *AAT* 基因家族结构发生了不同程度的分化。

2.3 蔷薇科果树 *AAT* 基因家族蛋白序列特性

使用在线工具 ExPASy 对鉴定出的序列进行理化性质的分析,发现 *AAT* 蛋白在氨基酸数、分子量、等电点、平均亲水系数、不稳定指数、脂肪族指数等指标均存在差异(表3)。

氨基酸数目相差较大,苹果 *MdAAT7* 氨基酸数目最少,有 160 个,凤梨草莓 *FaAAT7* 氨基酸数目最多,有 1408 个。相对分子质量为 18~157 kDa,相对分子质量最大的是凤梨草莓的 *FaAAT7*,为 157.37 kDa;相对分子质量最小的是苹果的 *MdAAT7*,为 18.24 kDa。等电点范围为 5.21~8.74,小于 7 的有 29

个,超过半数,梅 *PmAAT1* 等电点最大,而等电点最小的为中国白梨 *PbrAAT2*、*PbrAAT3*,说明蔷薇科 *AAT* 蛋白整体偏酸,但也有偏弱碱的蛋白序列。脂肪族指数是脂肪族侧链(丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸)所占据的相对体积,可以认为是增加球状蛋白热稳定性的积极因素,其范围为 77.52~99.60,最低的是 *MdAAT5*,最高的是 *PmAAT3*。亲水系数为 -0.379~0.064,只有桃 *PpAAT8* 为正值(0.064),其他均为负值,其负值越大越亲水,正值越大越疏水,故蔷薇科 *AAT* 蛋白主要为亲水性蛋白。蛋白质不稳定性指数可以估算蛋白质的稳定性,其范围为 26.24~54.62,中国白梨 *PbAAT4* 不稳定指数最低,黑树莓 *RoAAT3* 的不稳定指数最高;指数小于 40 的为稳定,大于 40 为不稳定,在 *AAT* 蛋白序列的稳定性分析结果中,有 2/3 序列呈不稳定的状态。亚细胞定

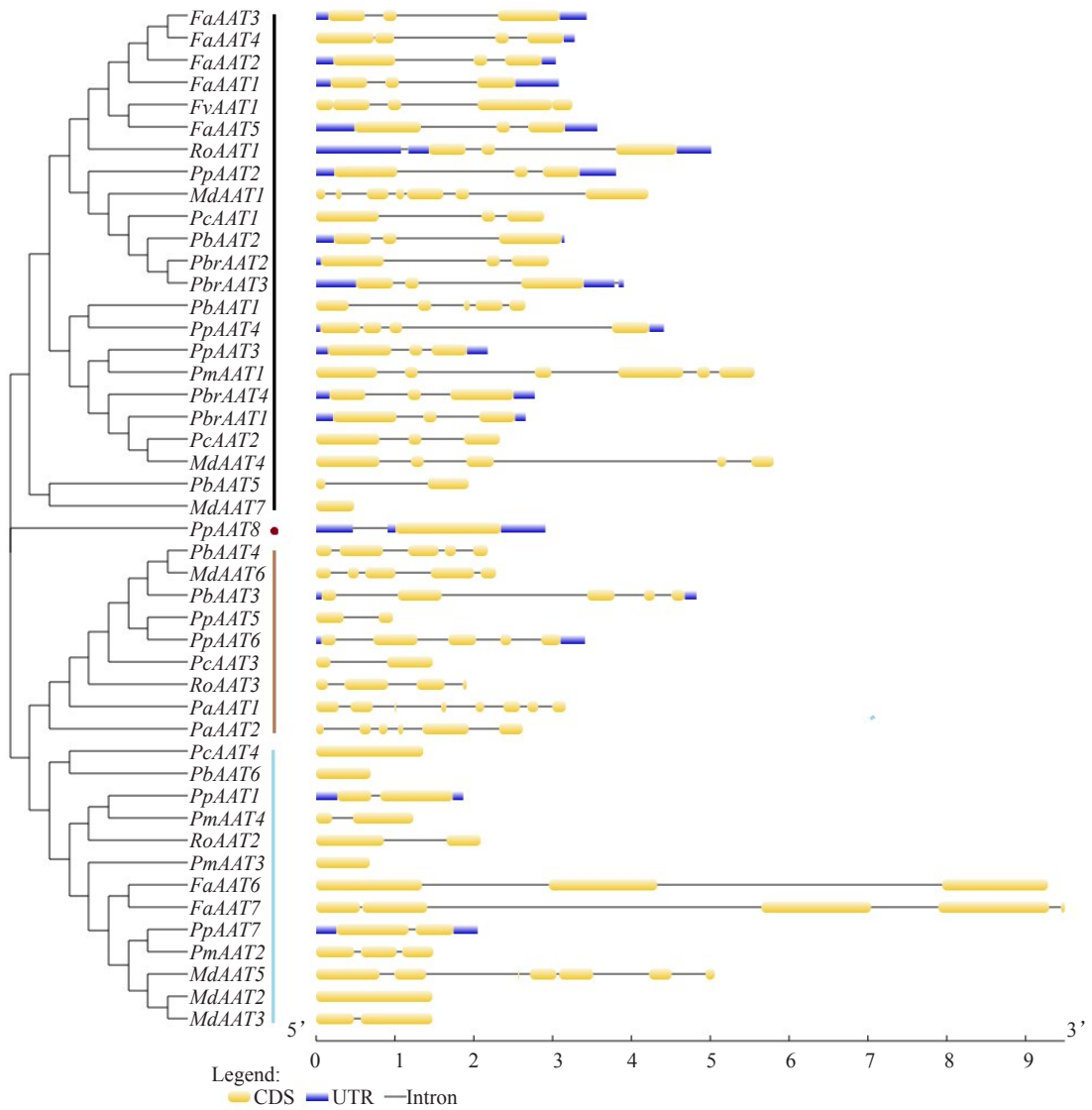


图3 10种蔷薇科果树 *AAT* 基因家族内含子和外显子结构
 Fig. 3 Exon/intron structure of *AAT* gene family in 10 Rosaceae species

位预测存在4种情况,分别为细胞外(extracellular)、周质(periplasmic)、细胞质(cytoplasmic)和外膜(outermembrane),*AAT*蛋白序列主要定位在细胞质上,可证明其在细胞内外均有存在。

将蔷薇科*AAT*蛋白序列提交到MEME网站,进行蔷薇科*AAT*序列的基序结构的分析,获得单个基序的组成结构以及各个蔷薇科*AAT*蛋白序列的基序组成。Motif基序在生物学中是一个基于数据的数学统计模型,是一段序列也可以是一个结构,有时和特定的功能联系在一起。经由分析获得单个基序的结构以及各个蔷薇科*AAT*蛋白序列的基序组成,从而分析各个结构的相同点、不同点以及总体特点,结合进化树作图,得出不同区组的结构相似性。

由于初期选择6个与10个基序时,分析所得结果对于保守性的证明不够充分,所以扩大分析范围,最终选择了20个基序进行分析。在通过MEME分析所得到关键基序的结构图中,每个固定宽度的图案都描述了一个基序, Motif12、Motif17宽度最小, Motif6、Motif7、Motif11、Motif13、Motif14、Motif15、Motif16、Motif19宽度最大。

从基因家族蛋白基序分析图(图4)可看出,区组I的motif结构相似;且*PmAAT1*的结构组成还出现整体重复结构,区组II的序列未发现motif结构,区组III中的结构相似,均为Motif18与Motif19,区组IV中组成结构相似。区组I中的*PbAAT5*与*MdAAT7*序列较短,存在结构本身较少、导致缺少或

表3 10种蔷薇科果树 *AAT* 基因家族蛋白序列理化性质分析
 Table 3 Basic characteristics of the *AAT* gene families in 10 Rosaceae species

基因名 Gene name	氨基酸数 No. amino acids	分子质量 Molecular weight/kDa	等电点 pI	平均亲水系数 Grand average of hydropathicity	不稳定指数 Instability index	脂肪族指数 Aliphatic index
<i>PbrAAT1</i>	473	52.20	7.20	-0.259	27.58	82.05
<i>PbrAAT2</i>	477	52.17	5.21	-0.266	48.09	85.72
<i>PbrAAT3</i>	477	52.16	5.21	-0.269	48.40	85.32
<i>PbrAAT4</i>	473	52.20	7.20	-0.244	26.24	83.09
<i>PcAAT1</i>	477	52.20	5.38	-0.271	46.88	86.94
<i>PcAAT2</i>	473	52.20	7.20	-0.259	27.58	82.05
<i>PcAAT3</i>	253	28.63	5.98	-0.243	51.85	86.25
<i>PcAAT4</i>	453	51.11	5.98	-0.122	44.88	89.98
<i>PbAAT1</i>	400	44.11	8.20	-0.275	39.12	81.92
<i>PbAAT2</i>	477	52.23	5.44	-0.258	48.12	86.92
<i>PbAAT3</i>	463	52.18	7.75	-0.181	41.30	92.61
<i>PbAAT4</i>	483	54.53	8.17	-0.165	50.71	90.81
<i>PbAAT5</i>	212	24.34	6.32	-0.294	32.85	89.20
<i>PbAAT6</i>	230	23.76	5.38	-0.176	42.22	90.30
<i>MdAAT1</i>	661	73.55	5.90	-0.272	47.01	84.87
<i>MdAAT2</i>	491	55.39	6.26	-0.163	46.96	82.65
<i>MdAAT3</i>	463	51.92	6.06	-0.187	48.47	82.81
<i>MdAAT4</i>	570	62.97	8.01	-0.177	29.90	87.26
<i>MdAAT5</i>	795	89.66	8.08	-0.346	48.48	77.52
<i>MdAAT6</i>	483	54.46	7.71	-0.158	48.24	90.60
<i>MdAAT7</i>	160	18.24	5.69	-0.081	54.48	90.25
<i>PpAAT1</i>	449	50.27	6.91	-0.153	42.94	85.99
<i>PpAAT2</i>	477	52.40	5.90	-0.238	48.31	87.57
<i>PpAAT3</i>	470	51.96	7.25	-0.247	29.48	82.38
<i>PpAAT4</i>	468	51.47	7.20	-0.194	33.39	87.05
<i>PpAAT5</i>	238	26.68	6.78	-0.095	49.44	91.36
<i>PpAAT6</i>	480	54.09	8.61	-0.174	51.21	86.13
<i>PpAAT7</i>	465	52.09	6.31	-0.212	46.36	82.49
<i>PpAAT8</i>	444	50.35	8.62	0.064	39.79	90.05
<i>PmAAT1</i>	857	94.64	8.74	-0.224	29.21	82.95
<i>PmAAT2</i>	446	49.83	6.44	-0.208	49.00	82.79
<i>PmAAT3</i>	226	25.49	6.54	-0.031	36.78	99.60
<i>PmAAT4</i>	323	36.12	5.81	-0.193	44.77	86.38
<i>PaAAT1</i>	428	48.09	8.63	-0.214	40.01	95.23
<i>PaAAT2</i>	434	49.52	8.55	-0.379	38.22	92.33
<i>FvAAT1</i>	525	57.45	5.98	-0.112	46.53	88.92
<i>FaAAT1</i>	372	40.79	5.36	-0.125	34.61	88.92
<i>FaAAT2</i>	471	51.26	5.58	-0.112	42.14	90.32
<i>FaAAT3</i>	471	51.30	5.49	-0.127	42.13	90.51
<i>FaAAT4</i>	536	58.95	8.17	-0.234	53.60	87.15
<i>FaAAT5</i>	491	53.40	5.57	-0.110	43.70	89.61
<i>FaAAT6</i>	1351	150.97	6.41	-0.186	43.12	81.98
<i>FaAAT7</i>	1408	157.37	6.17	-0.191	44.04	82.67
<i>RoAAT1</i>	468	51.43	5.42	-0.252	36.73	86.32
<i>RoAAT2</i>	431	48.08	5.74	-0.098	37.78	86.87
<i>RoAAT3</i>	367	41.14	5.87	-0.154	54.62	90.30

无 motif 序列的情况。区组IV中有6条序列存在缺少 motif 的情况,分别为 *PcAAT4*、*PbAAT6*、*PpAAT1*、*PmAAT4*、*RoAAT2*、*PmAAT3*。序列 *FaAAT6* 与 *FaAAT7* 有其余序列的两倍重复结构,属于串联重复现象。通过分析保守结构,发现同一区组的蛋白结

构由相似的基序结构组成,证明 *AAT* 基因家族蛋白序列存在保守性和同源性。

2.4 蔷薇科果树 *AAT* 基因家族的进化模式分析

为了研究这10种蔷薇科植物的系统发育关系以及序列的分子进化历史,首先通过 TREE TIME



A. 蔷薇科果树 AAT 蛋白序列; B. AAT 蛋白关键基序。纵坐标表示该氨基酸的保守性,字母的高度表示该氨基酸出现频率,横坐标表示该氨基酸在序列中的位置。

A. AAT proteins in fruit tree of Rosaceae; B. The key motif of AAT genes. The ordinate indicates the conservation of the amino acid, the height of the letter indicates the frequency of the amino acid, and the abscissa indicates the position of the amino acid in the sequence.

图 4 AAT 基因编码的蛋白基序分析
Fig. 4 The motif analysis of AAT proteins

(<http://www.timetree.org/>)建立了10种蔷薇科果树的物种进化树(图5)。总体来看,黑树莓、森林草莓与凤梨草莓的物种分化要早于李亚科与苹果亚科,分化的时间相对较短^[4]。

利用Mapdraw软件进行染色体定位作图,得到筛选出的各AAT基因在染色体上的分布情况(图6)。同一物种中,存在于同一染色体上的序列,可能有着串联重复的关系,通过染色体定位图可以进行初步分析。

桃、梅、欧洲甜樱桃、森林草莓以及黑树莓的染色体数目较少,其中桃8个序列定位于Chr1、Chr3与Chr7, *PpAAT5/6*以及 *PpAAT4/3/2*可能具有串联重复关系;梅4个序列分别定位于 scaffold103、Chr2、Chr8与Chr4上;欧洲甜樱桃2个均在Chr2上,可能具有串联重复关系;森林草莓1个序列定位于Chr6;黑树莓3个序列分别定位于Chr6、Chr5与Chr2上。

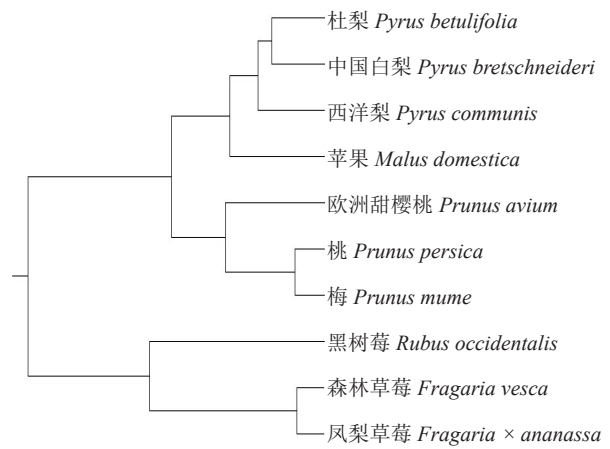


图5 10种蔷薇科果树的进化树

Fig. 5 The evolutionary tree of 10 Rosaceae species

其他几个染色体数目较多的物种,单染色体上有多条序列的情况较多。中国白梨AAT的4条序列分别定位于 scaffold681与 scaffold89;西洋梨的4条

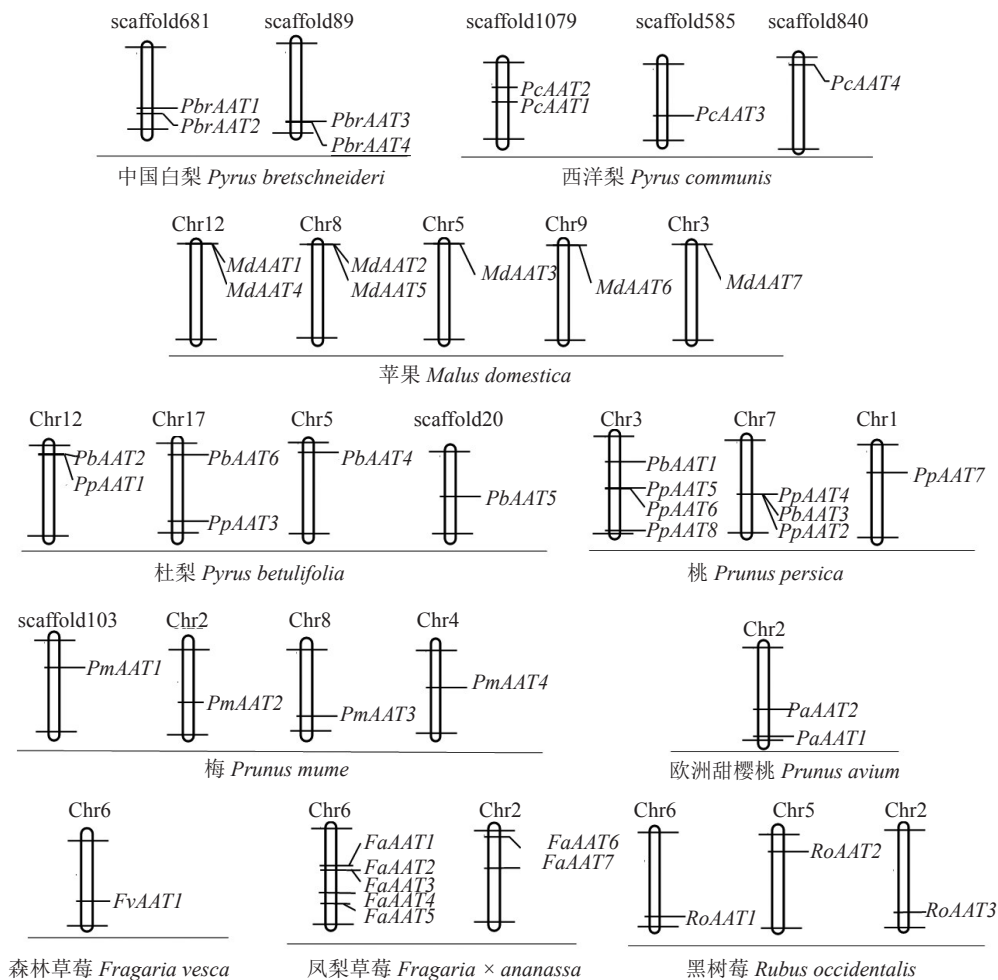


图6 10种蔷薇科果树AAT基因染色体定位分布

Fig. 6 Chromosomal location of AAT genes in fruit tree of 10 Rosaceae species

序列则分别位于 scaffold1079、scaffold585 与 scaffold840; 苹果 7 个序列分别定位于 Chr12、Chr8、Chr5、Chr9 和 Chr3; 杜梨 6 个序列定位在 Chr12、Chr17、Chr5 与 scaffold20; 凤梨草莓 7 个序列定位于 Chr6 与 Chr2 上,可能多条序列有着串联重复的关系。AAT 序列串联重复与片段重复的具体结论需要通过共线性分析进行论证。

利用 MCSanX 的 MCSan 算法分析物种间的共线性区块,通过 ColinearScan 和 E 值 $<1E-10$ 作为标准对结果进行评价,扫描多个基因组或亚基因组,以识别特定的同源染色体区域,然后使用基因作为锚点来对齐这些区域,从而分析存在于基因组内或者基因组间的共线性区块。

在 46 个蛋白序列中共发现 37 对共线关系。其中物种内发现 8 对共线关系,梨有 1 对,梅有 1 对,欧洲甜樱桃 1 对,凤梨草莓较多,为 5 对,且 *FaAAT1* 的物种内共线序列最多。物种间发现 29 对共线关系,中国白梨、桃与 5 个物种存在共线关系,西洋梨、苹果、梅、凤梨草莓与 4 个物种存在共线关系。可以发现 AAT 基因家族的扩张存在串联重复和多倍化过程中片段重复现象。

其中存在共线关系较多的序列有梨基因 *PbrAAT3*、西洋梨基因 *PcAAT2*、苹果基因 *MdAAT1*、桃基因 *PpAAT5* 以及梅基因 *PmAAT1*。同时发现凤梨草莓的 *FaAAT1*、*FaAAT2*、*FaAAT3*、*FaAAT5* 与中国白梨、桃、梅均存在共线关系,西洋梨与凤梨草莓 *FaAAT1* 存在共线关系,梅还与凤梨草莓 *FaAAT6*、*FaAAT7* 存在共线关系,是与凤梨草莓存在共线序列最多的物种。

K_a 和 K_s/K_a 在探究物种起源方面有重要意义,反映了物种的进化驱动力。通过改变蛋白质的组成、构象和功能,异义替换(K_a)会导致氨基酸的变化,从根本上造成生物改变对环境的适应性,最终影响到自然选择的结果是优势还是劣势。而同义替换(K_s)没有进行类似的变化,自然选择的影响也就微乎其微,所以异义替换与同义替换的比值就能够说明这个基因是受到了何种选择: $K_a \gg K_s$ 或者 $K_a/K_s \gg 1$,基因受正选择(positive selection); $K_a = K_s$ 或者 $K_a/K_s = 1$,基因中性进化(neutral evolution); $K_a \ll K_s$ 或者 $K_a/K_s \ll 1$,基因受纯化选择(purify selection)。

利用 $K_a/K_s_calculator2.0$ 软件计算蔷薇科果树物种 AAT 同源基因 K_a 、 K_s 以及 K_a/K_s 值。如表 5 所示,蔷

表 4 10 种蔷薇科果树 AAT 蛋白序列共线性关系
Table 4 Collinear relationship of AAT protein sequence in 10 Rosaceae species

	共线性序列 1 Synteny sequence 1	染色体 Chromosome	共线性序列 2 Synteny sequence 2	染色体 Chromosome	
物种内 Intraspecies	<i>PbrAAT1</i>	scaffold681	<i>PbrAAT2</i>	scaffold681	
	<i>PmAAT2</i>	Chr2	<i>PmAAT3</i>	Chr8	
	<i>FaAAT1</i>	Chr6	<i>FaAAT5</i>	Chr6	
	<i>FaAAT1</i>	Chr6	<i>FaAAT2</i>	Chr6	
	<i>FaAAT1</i>	Chr6	<i>FaAAT3</i>	Chr6	
	<i>FaAAT2</i>	Chr6	<i>FaAAT5</i>	Chr6	
	<i>FaAAT6</i>	Chr2	<i>FaAAT7</i>	Chr2	
	<i>PaAAT1</i>	Chr2	<i>PaAAT2</i>	Chr2	
	物种间 Interspecies	<i>PbrAAT3</i>	scaffold681	<i>MdAAT1</i>	Chr12
		<i>PbrAAT3</i>	scaffold681	<i>PmAAT1</i>	scaffold103
<i>PbrAAT3</i>		scaffold681	<i>PcAAT2</i>	scaffold01079	
<i>PbrAAT3</i>		scaffold681	<i>PpAAT4</i>	Chr7	
<i>PbrAAT3</i>		scaffold681	<i>FaAAT1</i>	Chr6	
<i>PbrAAT3</i>		scaffold681	<i>FaAAT2</i>	Chr6	
<i>PbrAAT3</i>		scaffold681	<i>FaAAT3</i>	Chr6	
<i>PbrAAT3</i>		scaffold681	<i>FaAAT5</i>	Chr6	
<i>PcAAT2</i>		scaffold01079	<i>MdAAT1</i>	Chr12	
<i>PcAAT2</i>		scaffold01079	<i>PpAAT4</i>	Chr7	
<i>PcAAT2</i>		scaffold01079	<i>FaAAT1</i>	Chr6	
<i>MdAAT1</i>		Chr12	<i>PpAAT4</i>	Chr7	
<i>MdAAT4</i>		Chr12	<i>PpAAT4</i>	Chr7	
<i>MdAAT1</i>		Chr12	<i>PmAAT1</i>	scaffold103	
<i>MdAAT2</i>		Chr8	<i>PmAAT3</i>	Chr8	
<i>MdAAT3</i>		Chr5	<i>PmAAT4</i>	Chr4	
<i>MdAAT4</i>		Chr12	<i>PmAAT1</i>	scaffold103	
<i>PpAAT4</i>		Chr7	<i>PmAAT1</i>	scaffold103	
<i>PpAAT1</i>		Chr3	<i>PmAAT4</i>	Chr4	
<i>PpAAT4</i>		Chr7	<i>FaAAT1</i>	Chr6	
<i>PpAAT4</i>	Chr7	<i>FaAAT2</i>	Chr6		
<i>PpAAT4</i>	Chr7	<i>FaAAT3</i>	Chr6		
<i>PpAAT4</i>	Chr7	<i>FaAAT5</i>	Chr6		
<i>PmAAT1</i>	scaffold103	<i>FaAAT1</i>	Chr6		
<i>PmAAT1</i>	scaffold103	<i>FaAAT2</i>	Chr6		

薇科物种 AAT 家族同源基因的 K_a 范围为 0.011 8 (*FaAAT1-FaAAT2*)~0.949 4 (*MdAAT3-PmAAT4*); K_s 的范围为 0.023 4 (*FaAAT1-FaAAT2*)~2.355 4 (*PaAAT1-PaAAT2*); K_a/K_s 的范围为 0.113 2 (*PmAAT2-FaAAT6*)~0.643 6 (*FaAAT1-FaAAT5*)。其中有 3 对同源基因 (*PmAAT2-PmAAT3*、*MdAAT2-PmAAT3*、*MdAAT3-PmAAT4*) 无 K_s 值,从而无 K_a/K_s 值。蔷薇科果树 AAT 基因家族同源基因的 K_a/K_s 值均小于 1,说明其在进化过程中主要受纯化选择作

表5 10种蔷薇科果树AAT基因家族同源基因 K_a/K_s 值
Table 5 The K_a/K_s analysis of AAT homologous gene pair in fruit tree of 10 Rosaceae species

同源基因对 Homologous gene pair	K_a	K_s	K_a/K_s
<i>PbrAAT1-PbrAAT2</i>	0.336 3	1.341 6	0.250 6
<i>PmAAT2-PmAAT3</i>	0.577 3	-	-
<i>FaAAT1-FaAAT5</i>	0.020 1	0.031 3	0.643 6
<i>FaAAT1-FaAAT2</i>	0.011 8	0.023 4	0.502 4
<i>FaAAT1-FaAAT3</i>	0.018 9	0.039 6	0.477 0
<i>FaAAT2-FaAAT5</i>	0.012 2	0.027 0	0.452 0
<i>FaAAT6-FaAAT7</i>	0.020 2	0.085 4	0.236 7
<i>PaAAT1-PaAAT2</i>	0.370 5	2.355 4	0.157 3
<i>PbrAAT3-MdAAT1</i>	0.134 7	0.645 5	0.208 6
<i>PbrAAT3-PmAAT1</i>	0.320 2	1.397 1	0.229 2
<i>PbrAAT3-PcAAT2</i>	0.336 3	1.339 6	0.251 1
<i>PbrAAT3-PpAAT5</i>	0.311 4	1.192 1	0.261 3
<i>PbrAAT3-FaAAT1</i>	0.134 7	0.645 5	0.208 6
<i>PbrAAT3-FaAAT2</i>	0.146 7	0.559 1	0.262 3
<i>PbrAAT3-FaAAT3</i>	0.153 6	0.579 4	0.265 1
<i>PbrAAT3-FaAAT5</i>	0.148 6	0.572 1	0.259 8
<i>PcAAT2-MdAAT1</i>	0.337 6	1.519 8	0.222 1
<i>PcAAT2-PpAAT5</i>	0.199 8	0.624 4	0.320 1
<i>PcAAT2-FaAAT1</i>	0.349 3	1.455 7	0.239 9
<i>MdAAT1-PpAAT5</i>	0.310 3	1.258 5	0.246 6
<i>MdAAT4-PpAAT5</i>	0.247 0	0.722 3	0.342 0
<i>MdAAT1-PmAAT1</i>	0.576 0	1.979 0	0.291 0
<i>MdAAT2-PmAAT3</i>	0.516 3	-	-
<i>MdAAT3-PmAAT4</i>	0.949 4	-	-
<i>MdAAT4-PmAAT1</i>	0.112 2	0.519 7	0.215 8
<i>PpAAT5-PmAAT1</i>	0.043 6	0.158 6	0.274 6
<i>PpAAT1-PmAAT4</i>	0.049 4	0.091 3	0.541 4
<i>PpAAT5-FaAAT1</i>	0.297 9	1.341 1	0.222 1
<i>PpAAT5-FaAAT2</i>	0.294 5	1.188 4	0.247 8
<i>PpAAT5-FaAAT3</i>	0.297 5	1.163 0	0.255 8
<i>PpAAT5-FaAAT5</i>	0.298 3	1.236 3	0.241 3
<i>PmAAT1-FaAAT1</i>	0.315 1	1.358 2	0.232 0
<i>PmAAT1-FaAAT2</i>	0.319 5	1.314 5	0.243 0
<i>PmAAT1-FaAAT3</i>	0.320 8	1.287 8	0.249 1
<i>PmAAT1-FaAAT5</i>	0.345 5	1.473 3	0.234 5
<i>PmAAT2-FaAAT6</i>	0.142 7	1.260 9	0.113 2
<i>PmAAT2-FaAAT7</i>	0.148 4	1.282 9	0.115 6

注: K_a , 异义替换; K_s , 同义替换。-。未运行出结果。

Note: K_a . Non-synonymous substitution; K_s . Synonymous substitution. -. Data is not run out.

用的影响。

3 讨 论

醇酰基转移酶(alcohol acetyltransferase, AAT)

作为香气物质合成的重要作用酶之一,对于酯类物质的合成有着关键催化作用,逐渐受到果实品质研究方向学者们的关注。同时随着分子研究水平的不断提高,蔷薇科各类物种的基因组信息逐渐完善。目前已在部分蔷薇科物种中研究分析了AAT基因的表达水平以及对香气物质产生的作用关系,但有关AAT基因物种中的鉴定和功能研究仍有不足,有待进一步的探究。

笔者基于10种蔷薇科果树的基因组数据,从中共鉴定到46个AAT基因序列,其中以桃的数目最多,森林草莓最少;整体来看,所获得的序列少于同类脂氧化酶(LOX)^[6]的数目,可能是由于AAT在植物组织中的量较少。通过系统进化树进行聚类分析,将46个基因分为4个区组,其中区组II只有1个,为*PpAAT8*,其结构分析、共线性与基因家族同源性较低,可能为无关序列。对各类理化性质的鉴定结果表明,各AAT序列整体上偏酸性(占2/3),脂肪族系数较高,不稳定指数中有2/3的序列呈不稳定的状态。同时为亲水性蛋白,在细胞膜内外均有存在,主要定位于细胞质中,与洋水仙^[42]、苹果^[29]AAT序列的理化性质分析结果相符合。

结合对基因结构与蛋白基序的分析,发现AAT蔷薇科物种基因家族有分化,基因结构未呈现高度相似,但是蛋白基序上呈现出了区组性的序列同源性和保守性,其中凤梨草莓的*FaAAT6/7*可能是重复所导致的序列。在进化模式分析方面,通过染色体定位与共线性分析,发现AAT基因家族的扩张存在串联重复和片段重复的情况,同时发现由于优质果树品种的长期驯化栽培,导致AAT基因家族的进化主要受到纯化选择的影响。

根据秦改花^[43]对梨不同品种的相关研究数据,发现在不同品种的梨果实发育过程中,挥发性芳香物质总量均呈现逐渐增长的趋势。其中砀山酥梨在盛花后60 d芳香物质含量开始增加,盛花后125~135 d有着大幅度的上升,在135 d位于芳香物质含量的最高值;同时南果梨盛花后90 d开始大幅上升,盛花后135~140 d幅度最大(由于南果梨为呼吸跃变型果实,会在后熟阶段大量增加芳香物质),最后于140 d达到峰值。砀山酥梨果实挥发性芳香物质总量要明显少于南果梨,总量增长幅度也明显小于南果梨,因此砀山酥梨果实香气明显淡于南果梨。

其次对挥发性芳香物质总量与果实生长发育过

程中AAT活性的变化进行综合分析,可发现AAT活性较低的品种挥发性香气物质含量也较低,同时挥发性香气物质总量和AAT活性增长均呈逐步上升趋势。其中砀山酥梨中AAT活性从40 d开始变高,在105~135 d呈较大幅度的上升,最高值位于135 d。对比活性数值,南果梨的AAT活性水平要明显高于砀山酥梨,其AAT活性变化相对于挥发性芳香物质总量的变化有所出入,在115~125 d有着大幅度的提升,在135 d达到活性水平的峰值,可能是由于南果梨挥发性芳香物质的种类较多^[43],促进总量上升的因素可能不止AAT一个作用酶,是各种因素综合作用的结果。如吴霏霏等^[44]发现枇杷果肉中AAT酶活性与表达量、酯类物质含量无正相关性,AAT蛋白可能存在着翻译后修饰的情况。

同时根据秦改花^[43]的研究,AAT活性的上升促进了果实内酯类物质的产生,其基因表达与酯类物质关系为正相关,与其他蔷薇科物种如桃^[45-46]、洋水仙^[42]等相关研究结果一致。但是在南果梨成熟后期(135~145 d),出现了果实中挥发性香气物质总量减少和AAT活性下降的情况,可能是由于前体物质的过量消耗使得酶无法进一步催化产生酯类,活性下降,从而降低了挥发性芳香物质的总量,说明了AAT的活性与表达受到了底物的限制。Beekwilder等^[22]没有成功将草莓AAT基因转化到矮牵牛,未在矮牵牛中发现酯类物质的产生,通过补充外缘醇类物质后发现,可能是由于矮牵牛体内不存在AAT可利用的醇类底物或底物含量少,导致AAT不能进行酯类物质的催化作用。有学者在对AAT的底物专一性测定时发现,限制AAT作用的是醇类化合物而不是酰基辅酶A^[42,47]。同时有研究发现,在桃果实采后成熟过程中,由于与醇合成密切相关的乙醇脱氢酶(ADH)表达水平降低,使得醇类减少,从而影响到了AAT的酯类合成^[30]。

笔者基于蔷薇科AAT序列以及分子层面的分析,对蔷薇科AAT基因家族有了更深入的了解,明确了AAT基因家族的进化与自然的选择作用,以及时空上的差异性表达,其催化酯类物质产生的影响因素如底物的限制、是否为多个基因的共同作用等,值得进一步研究。

4 结 论

在10种蔷薇科果树(中国白梨、西洋梨、杜梨、

梅、桃、苹果、欧洲甜樱桃、森林草莓、凤梨草莓以及黑树莓)中共鉴定出46个AAT基因家族成员;通过系统进化分析,将46个基因分为4个区组,其在结构上有着同源性和保守性,最长的凤梨草莓的*FaAAT6/7*可能由重复产生;AAT基因家族的扩张存在串联重复和片段重复的情况,进化主要受到纯化选择的影响。不同品种的AAT活性有所差异,同时AAT活性与果实内酯类物质的产生呈正相关。

参考文献 References:

- [1] 黄苏婷,杭方学,陆海勤,李凯,谢彩锋. 水果挥发性香气成分研究进展[J]. 轻工科技,2019,35(2):1-4.
HUANG Suting, HANG Fangxue, LU Haiqin, LI Kai, XIE Caifeng. Research progress of volatile aroma components in fruits[J]. Light Industry Science and Technology, 2019, 35(2): 1-4.
- [2] 程焕,陈健乐,周晓舟,陈荣荣,刘东红,叶兴乾. 水果香气物质分析及合成途径研究进展[J]. 中国食品学报,2016,16(1): 211-218.
CHENG Huan, CHEN Jianle, ZHOU Xiaozhou, CHEN Rongrong, LIU Donghong, YE Xingqian. Advances in identification and biosynthetic pathway of key aroma in fruits[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 211-218.
- [3] 陈杉艳. 脐橙果实成熟过程中主要香气物质含量的变化及其关键基因的表达[D]. 武汉:华中农业大学,2011.
CHEN Shanyan. The content change of major aroma compounds and the expression of key biosynthetic genes during navel orange fruits ripening[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [4] 刘鑫泉. 菠萝蜜果实香味物质形成相关酶活性及基因表达分析[D]. 湛江:广东海洋大学,2016.
LIU Xinquan. Changes in enzyme activities and gene expressions of enzymes involved in aroma formation during fruit ripening of Jackfruit[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016.
- [5] MENG L, LEITING L, JIM M D, XIN Q, XING L, SHAOLING Z. Characterization of the lipoxygenase (LOX) gene family in the Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and comparison with other members of the Rosaceae[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 444.
- [6] RAM S K, HEMANGI G C, KESHAV H P, ASHOK P G, VIDYA S G. Geographic variation in the flavor volatiles of Alphonso mango[J]. Food Chemistry, 2012, 130(1): 58-66.
- [7] CATRIN S G, ADAM J M, KEN B M, LAURA N. (Methylsulfonyl) alkanolate ester biosynthesis in *Actinidia chinensis* kiwifruit and changes during cold storage[J]. Phytochemistry, 2010, 71(7): 742-750.
- [8] 沈尧绅,冯谦. 果酒中芳香成分的分析[J]. 食品与发酵工业, 1990(4): 35-43.
SHEN Yaoshen, FENG Qian. Identification of aroma composition

- tion in fruit wines[J]. Food and Fermentation Industries, 1990 (4): 35-43.
- [9] TANDON K S, BALDWIN E A, SHEWFELT R L. Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by the medium of evaluation[J]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 20(3): 261-268.
- [10] 张上隆,陈昆松.果实品质形成与调控的分子生理[M].北京:中国农业出版社,2007.
ZHANG Shanglong, CHEN Kunsong. Molecular physiology of fruit quality development and regulation[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.
- [11] WENDAKOON S K, UEDA Y, IMAHORI Y, ISHIMARU M. Inhibition of acetate ester biosynthesis in banana (*Musa sapientum* L.) fruit pulp under anaerobic conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(6): 1615-1620.
- [12] 刘雨雨,莫婷,王晓晖,史社坡,刘晓,屠鹏飞.植物来源BAHD酰基转移酶家族研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(12): 2175-2182.
LIU Yuyu, MO Ting, WANG Xiaohui, SHI Shepo, LIU Xiao, TU Pengfei. Research progress of plant BAHD acyltransferase family[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(12): 2175-2182.
- [13] XIAOHONG Y, JINYING G, CHANGJUN L. BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70(4): 421-442.
- [14] 徐博文,李乐跃,李梦.7个蔷薇科物种HPL基因家族的鉴定和特性分析[J].果树学报,2020,37(4): 459-471.
XU Bowen, LI Leli, LI Meng. Identification and characterization of hydroperoxide lyase (HPL) gene family in seven species of Rosaceae[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(4): 459-471.
- [15] 刘威,陈昊,靳亚忠,齐红岩.高等植物醇脱氢酶及其基因家族研究进展[J].植物生理学报,2014,50(10): 1479-1493.
LIU Wei, CHEN Hao, JIN Yazhong, QI Hongyan. Advances in alcohol dehydrogenase enzymes and their gene families in higher plants[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(10): 1479-1493.
- [16] VERSTREPEN K J, VAN L, STIJN D M, VANDERHAEGEN B M P, DERDELINCKX G, DUFOUR J P, PRETORIUS I S, WINDERICKX J, THEVELEIN J M, DELVAUX F R. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5228-5237.
- [17] BETHANY N, IAN D B, RICHARD S, VIRGINIE D, PAUL C. *Saccharomyces cerevisiae* Atf1p is an alcohol acetyltransferase and a thioesterase *in vitro*[J]. Yeast, 2017, 34(6):239-251.
- [18] HIROYUKI Y, DAISUKE F, TAKAYUKI M, CHIORI I, HIDE-TAKA S, YOSHINOBU K, YUKIO T. Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(1):15-20.
- [19] CAUET G, DEGRYSE E, LEDOUX C, SPAGNOLI R, ACH-STETTER T. Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*: A potential detoxification mechanism[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 261(1): 317-324.
- [20] 刘静轩,许海峰,王得云,张宗营,王意程,左卫芳,王楠,姜生辉,毛志泉,陈学森.两个耐贮性不同的红肉苹果株系果实硬度与香气成分及相关酶活性与基因表达差异分析[J].园艺学报,2017,44(2): 330-342.
LIU Jingxuan, XU Haifeng, WANG Deyun, ZHANG Zongying, WANG Yicheng, ZUO Weifang, WANG Nan, JIANG Shenghui, MAO Zhiquan, CHEN Xuesen. Changes of firmness, aroma, cell wall-modifying enzyme activities and analysis of related-gene expression in 2 red flesh apple strains during fruit storage[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(2):330-342.
- [21] XU Q, YARAN L, GUO JUN Z, AILING Y, HUILING W, XIAOYUE W, QIUHONG P, HAIYING X, LEI S, BAOQING Z. Alcohol acyltransferase gene and ester precursors differentiate composition of volatile esters in three interspecific hybrids of *Vitis labrusca* × *V. vinifera* during berry development period[J]. Food Chemistry, 2019, 295:234-246.
- [22] BEEKWILDER J, ALVAREZ H M, NEEF E, VERSTAPPEN F W A, BOUWMEESTER H J, AHARONI A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana[J]. Plant Physiology, 2004, 135(4):1865-1878.
- [23] AHARONI A, KEIZER L C, BOUWMEESTER H J, SUN Z, ALVAREZ H M, VERHOEVEN H A, BLAAS J, VAN HOUWELINGEN A M, DE V R C, VAN D V H, JANSEN R C, GUIJ M, MOL J, DAVIS R W, SCHENA M, VAN T A J, O'CONNELL A P. 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] ANA G P, RAQUEL O, CARLOS S, JOSÉ M O. Furanones in strawberries: evolution during ripening and postharvest shelf life[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1996, 44(11): 3620-3624.
- [25] CAROLINA P P, CRISTINA Ú, MARIONA G, PATRICIO R, RICARDO I C, LUIS M Q. Comparative study of the volatile organic compounds of four strawberry cultivars and its relation to alcohol acyltransferase enzymatic activity[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 251:65-72.
- [26] 隋静,姜远茂,彭福田,国颖,刘丙花,赵凤霞,王海云.草莓果实发育过程中芳香物质含量和醇酰基转移酶活性的变化[J].园艺学报,2007,34(6):1411-1417.
SUI Jing, JIANG Yuanmao, PENG Futian, GUO Ying, LIU Binghua, ZHAO Fengxia, WANG Haiyun. Development of aroma components and alcohol acyltransferase activity in strawberry fruit during ripening[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(6): 1411-1417.
- [27] 乌云塔娜,康秀,胡尚力,马腾.中国梨醇-酰基转移酶基因的克隆及遗传多态性[J].中南林业科技大学学报,2010,30(4): 39-44.
WUYUN Tana, KANG Xiu, HU Shangli, MA Teng. Alcohol-ac-

- yltransferase (AAT) gene cloning and genetics polymorphism of six Chinese pear cultivars[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2010, 30(4): 39-44.
- [28] SHALIT M, KATZIR N, TADMOR Y, LARKOV O, BURGER Y, SHALEKHET F, LASTOCHKIN E, RAVID U, AMAR O, EDELSTEIN M, KARCHI Z, LEWINSOHN E. Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(2):794-799.
- [29] 李大鹏. 苹果醇酰基转移酶基因 MdAAT2 参与酯类香气合成调控机理的研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2005.
LI Dapeng. Expression characterization of the MdAAT2 gene and its regulation mechanism of volatile ester biosynthesis in apple[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2005.
- [30] 王贵章, 陈新, 赵天田, 梁丽松, 马庆华, 王贵禧. 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[J]. 林业科学研究, 2014, 27(2):158-167.
WANG Guizhang, CHEN Xin, ZHAO Tiantian, LIANG Lisong, MA Qinghua, WANG Guixi. Cloning, characterization and expression of alcohol acyltransferase gene which responds to exogenous ethylene in peach fruit[J]. Forest Research, 2014, 27(2): 158-167.
- [31] PIRONA R, VECCHIETTI A, LAZZARI B, CAPRERA A, MALINVERNI R, CONSOLANDI C, SEVERGNINI M, DE BELLIS G, CHIETERA G, ROSSINI L, POZZI C. Expression profiling of genes involved in the formation of aroma in two peach genotypes[J]. Plant Biology, 2013, 15(3):443-451.
- [32] BO H, JINPU J, ANYUAN G, HE Z, JINGCHU L, GE G. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8):1296-1297.
- [33] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6):1547-1549.
- [34] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, SANCHEZ J C, WILLIAMS K L, APPEL R D, HOCHSTRASSER D F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112:531-552.
- [35] YU C S, LIN C J, HWANG J K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram - negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions[J]. Protein Science, 2004, 13(5):1402-1406.
- [36] BAILEY T L, WILLIAMS N, MISLEH C, LI W W. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Web Server issue): 369-373.
- [37] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J]. 遗传, 2003, 25(3): 317-321.
LIU Renhu, MENG Jinling. MapDraw: A microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data[J]. Hereditas, 2003, 25(3):317-321.
- [38] YUPENG W, HAIBAO T, DEBARRY J D, XU T, JINGPING L, XIYIN W, TAEHO L, HUIZHE J, MARLER B, HUI G, KISSINGER J C, PATERSON A H. MCSanX: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [39] EDGAR R C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(5):1792-1797.
- [40] ZHANG Z, JINGFA X, JIAYAN W, HAIYAN Z, GUIMING L, XUMIN W, LIN D. ParaAT: A parallel tool for constructing multiple protein-coding DNA alignments[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 419(4):779-781.
- [41] DAPENG W, YUBIN Z, ZHANG Z, JIANG Z, JUN Y. KaKs_Calculator 2.0: A toolkit incorporating Gamma- Series methods and sliding window strategies[J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2010, 8(1):77-80.
- [42] 秦军. 洋水仙香气成分的鉴定与香气形成机制研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
QIN Jun. Identification of aromatic components and mechanism of aroma formation of *Narcissus* spp.[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017.
- [43] 秦改花. 梨果实挥发性芳香物质组成及其形成特性分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
QIN Gaihua. Analysis on volatile aroma constituent and its formation characteristics of pears[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [44] 吴霏霏. 枇杷果实香气检测及 AAT1 基因克隆表达与酶活性分析研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
WU Feifei. Aroma analysis and AAT1 gene cloning and expression and enzyme activity detection of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) fruit[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015.
- [45] 曹香梅. 桃果实酯类芳香物质的代谢与调控研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
CAO Xiangmei. Metabolism and regulation of volatile esters in peach fruit[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [46] 冯立国, 巴金磊, 韦军, 孟祥毅, 生利霞. 两种砂梨果实香气成分分析及其相关基因 PpAAT 的克隆与表达分析[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2015, 46(4):491-496.
FENG Ligu, BA Jinlei, WEI Jun, MENG Xiangyi, SHENG Lixia. Analysis on aromatic constituents from two *P. pyrifolia* cultivars and the cloning and expression of the relevant PpAAT gene[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2015, 46(4):491-496.
- [47] YOSHIOKA K, HASHIMOTO N. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast[J]. Agricultural & Biological Chemistry, 2014, 45(10):2183-2190.