

• 农业生物技术 •

桃漆酶基因家族鉴定及其与冷害褐变的关系

王康, 杨民杰, 吴思宜, 刘庆丽, 曹士锋, 陈伟, 施丽愉

浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

王康, 杨民杰, 吴思宜, 刘庆丽, 曹士锋, 陈伟, 施丽愉. 桃漆酶基因家族鉴定及其与冷害褐变的关系. 生物工程学报, 2022, 38(1): 264-274.

WANG K, YANG MJ, WU SY, LIU QL, CAO SF, CHEN W, SHI LY. Identification of laccase gene family members in peach and its relationship with chilling induced browning. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 264-274.

摘要: 为研究桃果实漆酶 (*PpLAC*) 基因家族成员的功能, 利用生物信息分析方法对桃果实 *LAC* 基因成员进行鉴定, 分析不同品种桃果实低温贮藏和外源 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 处理下的表达模式及其与冷害褐变的关系, 为桃果实抗冷害褐变机制提供理论依据。研究从桃果实基因组筛选了 26 个漆酶基因, 这些漆酶基因分布于 6 条染色体上, 含有 5–7 个外显子, 基因结构和保守基序较为相似。根据聚类分析结果将桃果实 *PpLAC* 基因家族成员分为 7 个亚族。通过良方水蜜桃、湖景水蜜桃以及外源 GABA 处理组的转录组测序结果分析, 发现 *PpLAC7*、*PpLAC9* 在低温贮藏下表达量呈上升模式, 且与褐变指数呈现相同的趋势。GABA 处理组减轻桃果实褐变程度, 且 *PpLAC7*、*PpLAC9* 的表达也被抑制, 推测 *PpLAC7*、*PpLAC9* 可能与桃果实冷害褐变有关。

关键词: 桃; 漆酶家族; 生物信息分析; 冷害; 褐变

Identification of laccase gene family members in peach and its relationship with chilling induced browning

WANG Kang, YANG Minjie, WU Siyi, LIU Qingli, CAO Shifeng, CHEN Wei, SHI Liyu

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: The laccase (*PpLAC*) gene family members in peach fruit were identified and the relationship between their expression pattern and chilling induced browning were investigated. The study was performed using two varieties of peaches with different chilling tolerance, treated with or without

Received: May 24, 2021; **Accepted:** July 9, 2021; **Published online:** July 16, 2021

Supported by: Key Research and Development Project in Zhejiang Province, China (2019C02079); “Bioengineering” First Class Student Innovation Project in Zhejiang Province, China (CX2020023)

Corresponding author: SHI Liyu. E-mail: shiliyu@zwwu.edu.cn

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2019C02079); 浙江省“生物工程”一流学科学生创新计划项目 (CX2020023)

exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) during cold storage. Twenty-six genes were screened from the peach fruit genome. These genes were distributed on 6 chromosomes and each contained 5–7 exons. The *PpLAC* gene family members shared relatively similar gene structure and conserved motifs, and they were classified into 7 subgroups based on the cluster analysis. Transcriptome sequencing revealed that the expression levels of *PpLAC7* and *PpLAC9* exhibited an increasing pattern under low temperature storage, and displayed a similar trend with the browning index of peach fruit. Notably, GABA treatment reduced the degree of browning and inhibited the expression of *PpLAC7* and *PpLAC9*. These results suggested that *PpLAC7* and *PpLAC9* might be involved in the browning of peach fruit during cold storage.

Keywords: peach; laccase family; bioinformatic analysis; chilling injury; browning

漆酶是一种含有铜的氧化酶,属于铜蓝蛋白氧化酶家族^[1],多数漆酶由铜离子活性中心、单一肽链以及糖基所构成,能氧化催化多种底物,包括酚类化合物、芳香胺、多环芳烃以及其他具有高氧化还原电位的化合物^[2],已被应用在生物降解、食品工业、染料降解、生物燃料等诸多领域。漆酶首先从日本漆树的汁液中分离出来,研究发现这种具有许多独特催化特性的含铜蛋白质广泛分布于自然界生物中,如植物、真菌、细菌和昆虫等^[3]。

漆酶在植物生长过程中发挥着重要作用:拟南芥中 *AtLAC15* 参与种皮的着色和根系的伸长, *AtLAC4*、*AtLAC11*、*AtLAC17* 与木质素聚合相关^[4-5];水稻 *OsLAC13* 通过调节糖的转运和过氧化氢 (H_2O_2) 的产生,对结实率起到重要作用^[6];梨果实 *PbLAC1* 参与了木质素的生物合成和细胞壁的发育^[7]。此外,漆酶在植物抗逆环境中也起到重要作用,在经非生物胁迫(如盐、干旱和重金属)处理后,水稻 *OsLAC10* 可催化单木酚氧化产生木质素,而且 *OsLAC10* 的过表达增强了其对铜的耐受性,抑制了植物根中铜的积累^[8]。水稻 *LACOsGh11* (*Os01g61160*) 在拟南芥中异位表达时,可增强拟南芥对盐和干旱的耐受性^[9];漆树 *RvLAC2*^[10]和玉米 *ZmLAC1*^[11] 参与伤口修复和盐度反应。目前已在多个物种

中克隆和鉴定出漆酶基因家族,其生物学功能已成为研究热点。

桃果实是一种典型的呼吸跃变型果实,在呼吸跃变前后会发生复杂的生理生化反应和代谢变化,品质迅速下降,不易贮藏^[12]。低温是桃果实常见的贮藏方式。但低温贮藏下的桃果实易发生冷害,表现为果肉絮败、干化、粉质化、褐变等。其中褐变是较严重的一个问题,直接降低桃果实品质,影响消费者可接受程度。现有研究表明,漆酶可以催化表儿茶素之间的反应使苹果皮中呈现棕褐色,表明它可能是造成组织褐色的原因之一^[13]。Fang 等对采后荔枝褐变进行研究,发现荔枝漆酶在果皮褐变中起着降解花色苷的作用^[14]。在鸭梨果实中,漆酶与其果心褐变也有密切的关系^[15]。

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 作为非蛋白质氨基酸,它能够调节植物生长发育和响应胁迫反应的信号,在植物生理的信号转导中具有重要的调控功能^[16]。因此许多研究已将 GABA 作为外源物质施用于植物,以抵抗生长发育过程中受到的逆境损害^[17]。其中有研究表明,施用外源 GABA 可以提高西葫芦^[18]、南果梨^[19]、桃果实^[20]、鲜切红掌花^[21]的抗冷性,进而抑制其冷害褐变的产生。

本研究对桃果实漆酶基因家族成员进行鉴

定和分析,并将其转录组结果和褐变指数关系进行分析,为后期在桃果实中展开对漆酶基因研究提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 桃 *PpLAC* 基因家族成员信息获得及蛋白质性质鉴定

利用桃基因库 (<http://www.plantgdb.org/PeGDB/>) 以及本实验室桃果实发育时期转录组数据库筛选获得 *LAC* 基因家族候选基因,将获得的基因序列信息在 NCBI 进行 BLAST 比对 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 获得其基本信息,并对基因家族成员进行命名。利用在线软件 Protparam (<https://web.expasy.org/protparam>) 分析漆酶基因家族成员的氨基酸数量、理论等电点和分子量大小等理化性质。利用在线软件 SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测。利用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 进行亚细胞定位预测分析。通过 NCBI 搜集桃 *LAC* 基因在染色体上的位置及所在染色体的长度,使用 MapInspect 软件绘制染色体定位图。

1.2 桃基因结构、基因保守基序和进化树分析

利用 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件绘制基因结构图。利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线网站进行蛋白保守基序预测,用 Tootools 绘制蛋白保守基序图。利用 MAGE7.0 中的 Clustal W 对桃 *LAC* 成员以及拟南芥 *LAC* 成员进行序列比对,采用相邻连接法 (neighbor-joining, NJ) 执行参数 maximum composite likelihood, complete deletion 和 bootstrap 1 000 次重复,构建系统进化树,用 iTOL 进行系统进化树图像绘制。

1.3 不同品种桃果实 *PpLAC* 家族基因在低温下与褐变的关系

以浙江省宁波市奉化县具有代表性的湖景和良方水蜜桃为试验材料,于硬熟期 (盛花后 105–120 d) 采收,选择大小均匀、成熟度一致、无病虫害、无机械伤的果实,当日尽快运回实验室。将湖景水蜜桃、良方水蜜桃用蒸馏水简单清洗,去除杂质,晾干后置于 4 °C 下贮藏,在第 14 天和 28 天进行取样,取样后将部分桃果实转移至 20 °C,3 d 后进行褐变指数的统计,4 °C 样品用液氮冷冻,作为不同品种实验样品,–80 °C 贮藏备用。再将剩余的湖景水蜜桃随机分为两组,对照组 (CK): 在蒸馏水中浸泡 20 min; GABA 处理组: 在 5 mmol/L GABA 溶液中浸泡 20 min。处理完的果实晾干后置于 4 °C 下贮藏,在第 14 天和 28 天进行取样,取样后将部分桃果实转移至 20 °C,3 d 后进行褐变指数的统计,4 °C 样品用液氮冷冻,作为 GABA 处理实验样品,–80 °C 贮藏备用。将贮藏的样品磨成粉末,用干冰保存,送至广州基迪奥生物科技有限公司进行转录组测序,用 Tootools 将测序结果进行绘制。

桃果实褐变指数以直接评价果肉内部褐变程度进行测定,并记录计算^[22]。随机取 30 个果实,分为 3 组,沿着果实缝合线纵切,褐变程度采用 5 级评分法,0=无 (无褐变); 1=褐变面积 < 15%; 2=褐变面积介于 15%–45% 之间; 3=褐变面积介于 45%–70% 之间; 4=褐变面积 > 70%。计算公式如下:

$$\text{褐变指数} = \frac{\sum((\text{褐变级别} \times \text{该级别果实个数}) / (4 \times \text{测定果实个数})) \times 100\%}{}$$

2 结果与分析

2.1 *PpLAC* 基因家族鉴定

如表 1 所示,以水蜜桃拉丁名 *Prunus persica* 简称为前缀,基因注释简称为后缀对基

表 1 桃 (*Prunus persica*) *PpLAC* 漆酶基因家族成员基本信息Table 1 *PpLAC* gene family members identified from the genome of peach (*Prunus persica*)

Gene ID	Annotation	Accession number	Chr	Molecular weight/KD	Formula	Names
ppa02720m	laccase-4	XM_007220767.2	Chr2	61.24	C ₂₇₉₄ H ₄₂₉₀ N ₇₄₀ O ₇₈₂ S ₁₅	<i>PpLAC4</i>
ppa01742m	laccase-17	XM_007207484.2	Chr6	64.28	C ₂₉₅₆ H ₄₅₂₃ N ₇₇₃ O ₈₀₃ S ₁₇	<i>PpLAC17</i>
ppa00364m	laccase-4	XM_007204948.2	Chr6	60.77	C ₂₇₆₂ H ₄₂₈₃ N ₇₄₅ O ₇₇₇ S ₁₃	<i>PpLAC4-1</i>
ppa00357m	laccase-11	XM_007204942.2	Chr6	62.27	C ₂₈₄₀ H ₄₃₁₂ N ₇₅₄ O ₇₉₄ S ₁₇	<i>PpLAC11</i>
ppa00329m	laccase-2	XM_007207954.2	Chr6	64.56	C ₂₉₆₂ H ₄₅₄₀ N ₇₉₂ O ₈₀₈ S ₁₂	<i>PpLAC2</i>
ppa00330m	laccase-17	XM_007208232.2	Chr6	64.99	C ₂₉₇₀ H ₄₆₀₅ N ₈₀₃ O ₈₀₉ S ₁₅	<i>PpLAC17-1</i>
ppa02244m	laccase-4	XM_007207034.2	Chr6	61.63	C ₂₇₉₄ H ₄₃₅₁ N ₇₆₁ O ₇₇₄ S ₂₀	<i>PpLAC4-2</i>
ppa00359m	laccase-11	XM_007198928.2	Chr8	62.16	C ₂₈₄₂ H ₄₃₄₁ N ₇₄₇ O ₇₉₀ S ₁₇	<i>PpLAC11-1</i>
ppa01554m	laccase-11	XM_007200154.2	Chr8	62.20	C ₂₈₄₆ H ₄₃₄₉ N ₇₄₇ O ₇₈₉ S ₁₇	<i>PpLAC11-2</i>
ppa00371m	laccase-17	XM_020566762.1	Chr6	64.49	C ₂₉₆₄ H ₄₅₃₉ N ₇₇₅ O ₈₀₇ S ₁₇	<i>PpLAC17-2</i>
ppa00357m	laccase-11	XM_007204136.2	Chr7	65.07	C ₂₉₆₈ H ₄₅₂₆ N ₇₈₈ O ₈₂₆ S ₁₉	<i>PpLAC11-3</i>
ppa01686m	laccase-14	XM_007227239.1	Chr1	64.12	C ₂₉₃₈ H ₄₄₂₂ N ₇₇₄ O ₈₀₄ S ₂₁	<i>PpLAC14</i>
ppa00334m	laccase-12	XM_007218870.2	Chr2	64.07	C ₂₈₈₃ H ₄₄₃₀ N ₇₈₆ O ₈₃₃ S ₂₀	<i>PpLAC12</i>
ppa02133m	laccase-6	XM_007220647.2	Chr2	63.60	C ₂₈₉₀ H ₄₃₈₈ N ₇₅₂ O ₈₂₁ S ₂₅	<i>PpLAC6</i>
ppa00352m	laccase-15	XM_007220587.2	Chr2	62.94	C ₂₈₇₅ H ₄₃₅₆ N ₇₄₄ O ₈₁₄ S ₁₈	<i>PpLAC15</i>
ppa01988m	laccase-1	XM_007210710.2	Chr5	65.50	C ₂₉₈₄ H ₄₅₀₉ N ₇₈₃ O ₈₄₄ S ₂₀	<i>PpLAC1</i>
ppa00354m	laccase-15	XM_007204938.2	Chr6	63.05	C ₂₈₈₁ H ₄₃₄₂ N ₇₄₂ O ₈₁₇ S ₁₉	<i>PpLAC15-1</i>
ppa00331m	laccase-17	XM_007207949.2	Chr6	64.45	C ₂₉₅₂ H ₄₄₉₆ N ₇₇₈ O ₈₂₀ S ₁₄	<i>PpLAC17-3</i>
ppa00358m	laccase-7	XM_007204944.2	Chr6	61.87	C ₂₈₀₅ H ₄₂₅₁ N ₇₃₇ O ₈₀₈ S ₂₀	<i>PpLAC7</i>
ppa00358m	laccase-9	XM_007199683.2	Chr8	62.27	C ₂₈₁₇ H ₄₂₄₈ N ₇₃₂ O ₈₂₅ S ₂₂	<i>PpLAC9</i>
ppa02508m	laccase-15	XM_020570674.1	Chr8	61.26	C ₂₈₁₆ H ₄₂₄₅ N ₇₄₅ O ₇₆₉ S ₁₃	<i>PpLAC15-2</i>
ppa02532m	laccase-15	XM_007199916.2	Chr8	62.34	C ₂₈₁₀ H ₄₂₁₃ N ₇₂₅ O ₈₄₅ S ₂₁	<i>PpLAC15-3</i>
ppa00366m	laccase-9	XM_007199709.2	Chr8	61.26	C ₂₇₅₇ H ₄₁₅₃ N ₇₂₁ O ₈₂₆ S ₂₀	<i>PpLAC9-1</i>
ppa01480m	laccase-15	XM_007200213.2	Chr8	62.54	C ₂₈₁₉ H ₄₂₂₆ N ₇₂₈ O ₈₄₉ S ₂₀	<i>PpLAC15-4</i>
ppa00358m	laccase-9	XM_007199684.2	Chr8	62.06	C ₂₈₀₅ H ₄₂₂₅ N ₇₂₅ O ₈₂₈ S ₂₂	<i>PpLAC9-2</i>
ppa01612m	laccase-15	XM_007200129.2	Chr8	64.10	C ₂₉₂₀ H ₄₃₉₉ N ₇₇₁ O ₈₂₈ S ₁₇	<i>PpLAC15-5</i>

因家族成员进行命名。这 26 个 *LAC* 基因编码的氨基酸长度在 558–586 个氨基酸之间, 分子量在 61.24–64.99 kDa 之间, 等电点在 5.11–9.85 之间。对其信号肽进行预测, 发现只有 *PpLAC11-1*、*PpLAC15-3* 和 *PpLAC15-5* 无信号肽, 其他家族成员均存在信号肽 (表 2), 且稳定性较好, 多数为亲水蛋白。对 *LAC* 基因进行染色体和亚细胞定位发现, *LAC* 基因在染色体上呈不均匀分布, 其多数分布在 2、6 和 8 号染色体上, 少数分布在 1、5 和 7 号染色体上 (图 1), *PpLAC* 基因家族成员多数定位于叶绿体, 部分定位于液

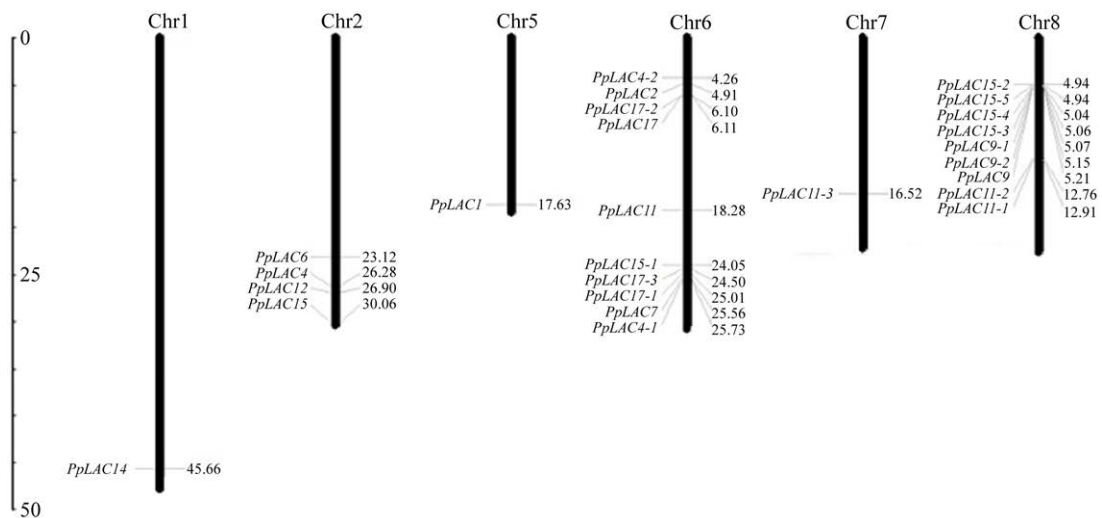
泡、过氧化物酶体及细胞质等。

2.2 *PpLAC* 基因家族成员结构和保守基序分析

为进一步分析桃 *LAC* 的基因结构, 将 26 条基因进行结构分析, *PpLAC* 基因家族成员除了 *PpLAC14* 不含有非翻译区 (untranslated region, UTR) 结构外 (图 2), 其余基因成员均含有内含子、外显子和 UTR 结构。其内含子数量 4–6 个, 外显子数量 5–7 个, 其中含 5 个内含子, 6 个外显子的成员最多。与其他植物中漆酶相类似, 推断漆酶可能在不同的植物中具有保守的功能。

表 2 桃 (*Prunus persica*) *PpLAC* 漆酶基因家族成员蛋白性质分析Table 2 Characteristics of proteins encoded by *PpLAC* gene family members

Gene names	Number of amino acids	pI	Instability index	Aliphatic index	Hydropathy index	Signal peptide	Subcellular localization
<i>PpLAC4</i>	558	9.02	27.92	86.49	-0.045	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC17</i>	581	9.30	29.06	87.57	-0.034	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC4-1</i>	559	9.31	30.38	88.75	-0.060	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC11</i>	564	8.41	30.08	81.26	-0.133	Yes	Vacuole
<i>PpLAC2</i>	587	9.77	31.74	83.88	-0.092	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC17-1</i>	586	9.85	35.68	83.98	-0.156	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC4-2</i>	558	9.43	32.41	88.33	-0.083	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC11-1</i>	563	8.78	33.80	85.72	-0.079	No	Chloroplast
<i>PpLAC11-2</i>	563	8.78	33.36	86.61	-0.074	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC17-2</i>	583	9.33	31.22	87.92	-0.027	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC11-3</i>	587	8.65	34.55	82.35	-0.107	Yes	Cytoplasm
<i>PpLAC14</i>	568	8.98	38.73	76.02	-0.296	Yes	Peroxisome
<i>PpLAC12</i>	583	8.53	35.19	80.81	-0.166	Yes	Cytoplasm
<i>PpLAC6</i>	574	8.38	31.35	79.77	-0.134	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC15</i>	567	6.82	37.04	85.59	-0.118	Yes	Vacuole
<i>PpLAC1</i>	582	7.06	36.01	75.86	-0.272	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC15-1</i>	567	6.64	35.85	82.01	-0.160	Yes	Vacuole
<i>PpLAC17-3</i>	585	9.02	37.36	83.88	-0.072	Yes	Vacuole
<i>PpLAC7</i>	563	5.95	36.48	87.26	-0.028	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC9</i>	564	5.93	30.44	79.34	-0.118	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC15-2</i>	542	8.71	31.24	79.65	-0.280	Yes	Chloroplast
<i>PpLAC15-3</i>	569	5.11	34.58	76.47	-0.115	No	Extracellular
<i>PpLAC9-1</i>	558	5.52	29.85	77.42	-0.140	Yes	Extracellular
<i>PpLAC15-4</i>	569	5.29	34.53	75.59	-0.146	Yes	Peroxisome
<i>PpLAC9-2</i>	564	5.58	31.98	79.54	-0.101	Yes	Cytoplasm
<i>PpLAC15-5</i>	568	6.76	40.08	80.12	-0.271	No	Peroxisome

图 1 *PpLAC* 基因家族成员染色体定位Figure 1 Chromosomal location of the *PpLAC* family members.

保守结构域分析发现 *PpLAC* 编码的蛋白属于铜氧还蛋白超家族。*PpLAC15-2* 有 2 个结构域分别为 Cu-oxidase_2 和 Cu-oxidase, 而其余成员均含有 3 个保守结构域分别为 Cu-oxidase_2、Cu-oxidase 和 Cu-oxidase_3, 保守性较高。通过 MEME 网站以 10 个 motif 为条件进行预测, 结果发现: *PpLAC15-2* 含有 5 个 motif (motif9、motif8、motif4、motif1、motif10) (图 3), 其余 25 条基因家族成员均含有 10 个 motif, 说明该基因家族成员完整性好, 较为保守。

2.3 *PpLAC* 基因家族成员系统进化树构建

将桃果实 *PpLAC* 基因家族成员与模式植物拟南芥漆酶 (*AtLAC*) 基因家族进行系统进化树构建, 根据聚类分析结果, 将其分为 7 个亚族。如图 4 所示: 组 1 中含有 1 个桃漆酶基因和 1 个拟南芥基因 (*AtLAC6*); 组 2 含有 10 个桃漆酶基因和 2 个拟南芥基因 (*AtLAC14*、*AtLAC15*); 组 3 含有 1 个桃漆酶基因和 3 个拟

南芥基因 (*AtLAC7*、*AtLAC8*、*AtLAC9*); 组 4 含有 1 个桃漆酶基因和 4 个拟南芥基因 (*AtLAC3*、*AtLAC13*、*AtLAC5*、*AtLAC12*); 组 5 中含有 1 个桃漆酶基因和 1 个拟南芥基因 (*AtLAC1*); 组 6 含有 5 个桃漆酶基因和 2 个拟南芥基因 (*AtLAC17*、*AtLAC2*); 组 7 含有 7 个桃漆酶基因和 4 个拟南芥基因 (*AtLAC10*、*AtLAC4*、*AtLAC16*、*AtLAC11*)。在不同亚族中的拟南芥漆酶基因有着不同的功能, 根据现有报道: 组 6 和组 7 中的 *AtLAC17*、*AtLAC4* 和 *AtLAC11* 在拟南芥的木质素聚合中起到关键作用; 组 2 的 *AtLAC15* 参与拟南芥种皮中类黄酮的氧化聚合^[23]; 组 3 的 *AtLAC8*、*AtLAC9* 是 2 种假定的高氧化还原电位植物漆酶; 此外组 4 的 *AtLAC13*、*AtLAC5*、*AtLAC12* 对脱落酸 (abscisic acid, ABA) 信号有响应。通过对比分析, 进一步了解了 *PpLCA* 基因家族成员可能存在的功能和信息。

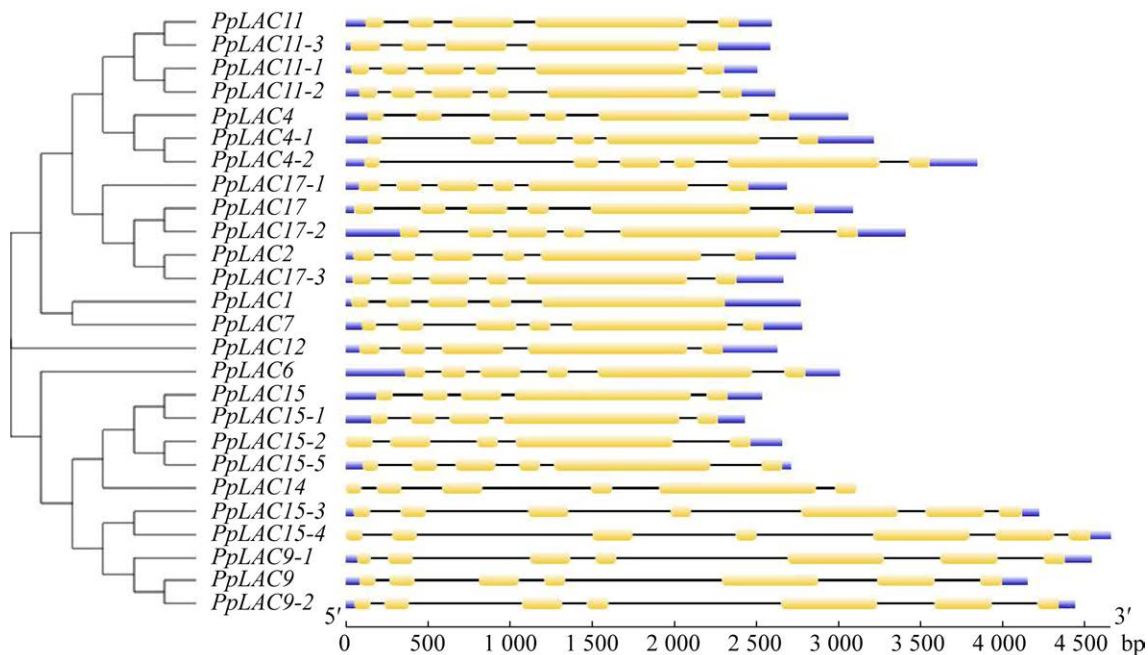


图 2 *PpLAC* 家族基因结构分析图

Figure 2 Analysis of the gene structure of *PpLAC* family gene members. ■: Exon/CDS; ■: non coding sequence/UTR; —: intron/intron.

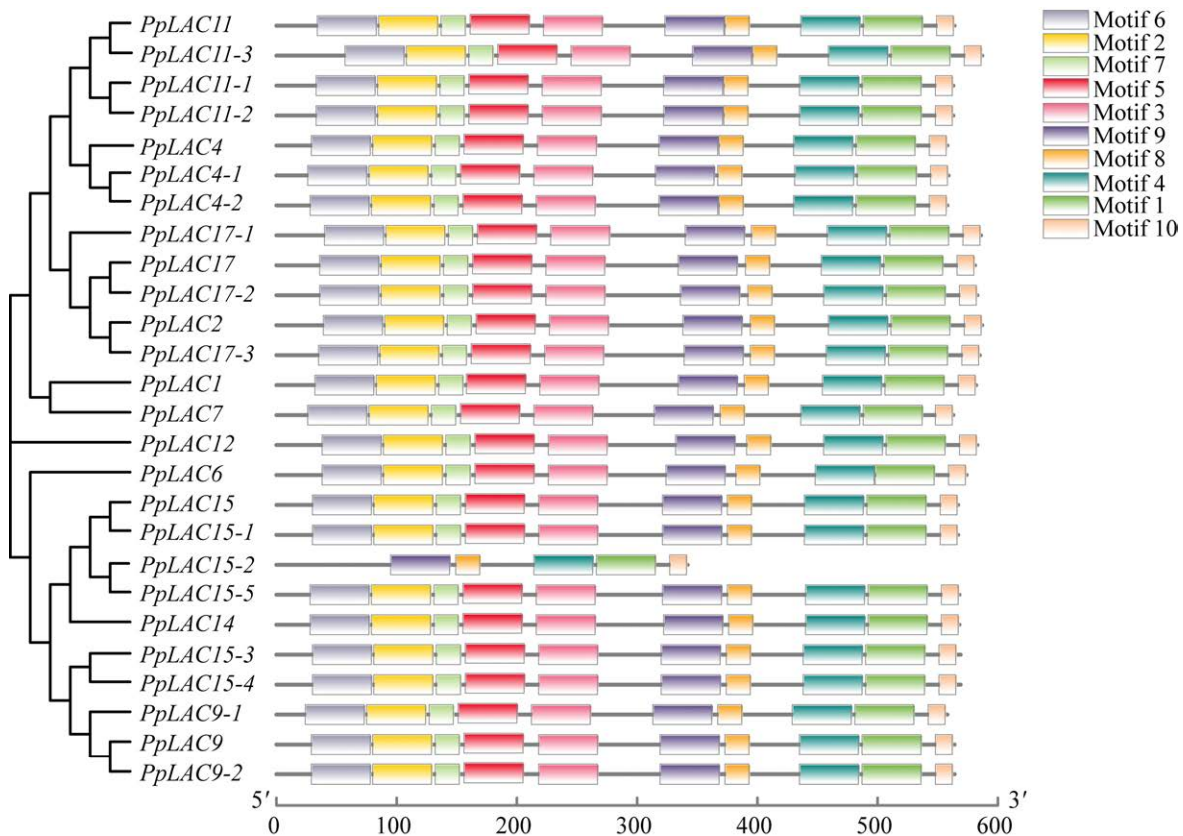


图3 *PpLAC* 家族基因保守基序分析

Figure 3 Analysis of the conserved motifs of *PpLAC* family gene members.

2.4 桃果实 *PpLAC* 家族基因在低温下与褐变的关系

不同品种桃果实良方水蜜桃、湖景水蜜桃在低温贮藏下褐变指数呈上升趋势，且外源 GABA 处理可以减轻桃果实的褐变程度，如图 5A 和 5B 所示。通过图 6A 和 6B 可以发现 *PpLAC7*、*PpLAC9*、*PpLAC9-1* 在低温下贮藏表达量显著高于其他家族成员的基因表达量，且 *PpLAC7*、*PpLAC9* 基因表达量与良方水蜜桃、湖景水蜜桃褐变指数变化趋势一致，都随贮藏时间的增加而呈上升趋势。且外源 GABA 处理组 *PpLAC7*、*PpLAC9* 基因表达量低于对照组，说明 GABA 处理能够减轻桃果实褐变及抑制 *PpLAC7*、*PpLAC9* 基因的表达。由以上结果表

明，*PpLAC7*、*PpLAC9* 基因可能调控桃果实冷害褐变的发生，且通过外源 GABA 的处理可以抑制其调控作用。

3 讨论

目前漆酶家族的基因组鉴定已相继在多个物种中被报道，包括柑橘^[24]、拟南芥^[4]、樱桃^[25]、香蕉^[26]、平菇^[27]、水稻^[8]等，但在桃果实中漆酶基因鉴定还未见报道。桃漆酶基因结构域特征与其他物种结构域特征基本一致，均属于铜蓝蛋白超家族，其基因结构、保守基序也与其他物种表现出相似的结果。通过分子进化树将桃漆酶家族基因分为 7 个不同的亚族，其中拟南芥基因家族成员在 7 个亚族中有不同的功能，包括木质素的

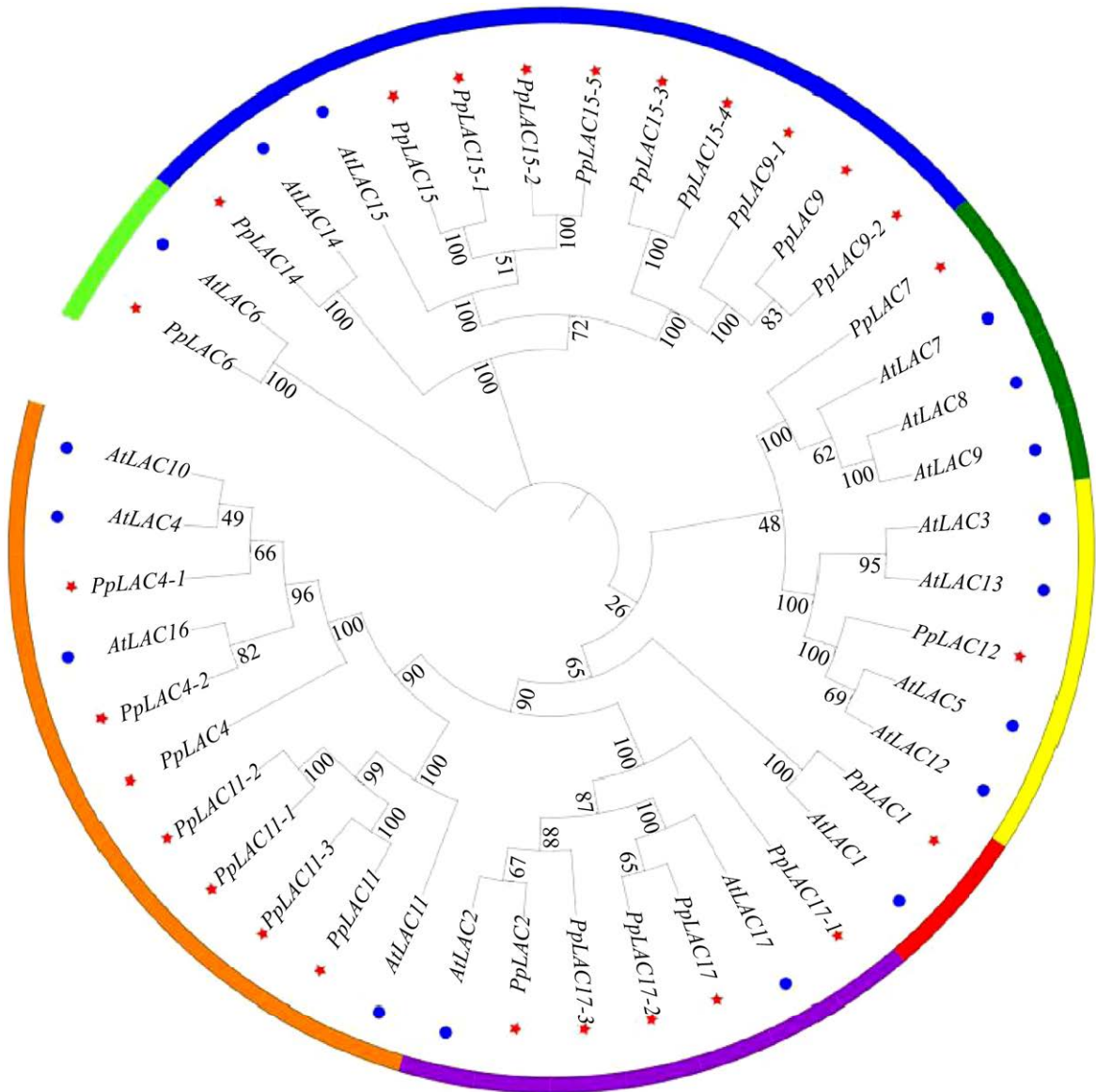


图4 桃、拟南芥漆酶家族基因分子进化树分析

Figure 4 Phylogenetic analysis of laccase family genes in peach and *Arabidopsis*. ●: peach laccase gene family members (*PpLAC*); ★: *Arabidopsis* laccase gene family members (*AtLAC*).

聚合、种皮中类黄酮的氧化聚合以及对 ABA 信号的响应等,在亚族中与其亲缘关系较近的桃漆酶基因可能表现出相似的生物学功能。

桃果实是既属于呼吸跃变型果实也属于冷敏性果实,采后低温贮藏易出现冷害,表现为果肉褐变、絮败、粉质化和木质化等^[28]。果肉褐变表现为果心周围组织产生棕褐色或者黑褐

色,其形成的 3 大条件为酚类物质含量、多酚氧化酶活性和氧气供应。在有氧气的情况下,酚类物质被多酚氧化酶氧化生成醌类物质,醌类物质进一步通过聚合反应生成褐色聚合物^[29-30]。漆酶作为多铜氧化酶属于多酚氧化酶的一种,具有很宽的底物范围^[31],它不仅能够氧化邻二酚,而且还能氧化甲氧基取代的单酚、

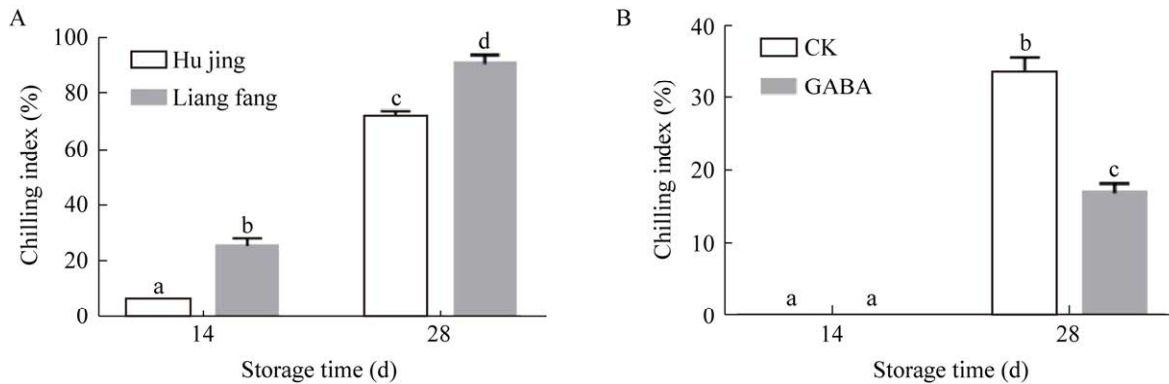


图 5 两品种桃果实 (A) 及外源 GABA 处理 (B) 的桃果实褐变指数

Figure 5 Browning indexes of peach fruits from two cultivars (A) with/without exogenous GABA treatment (B). Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level ($P < 0.05$).

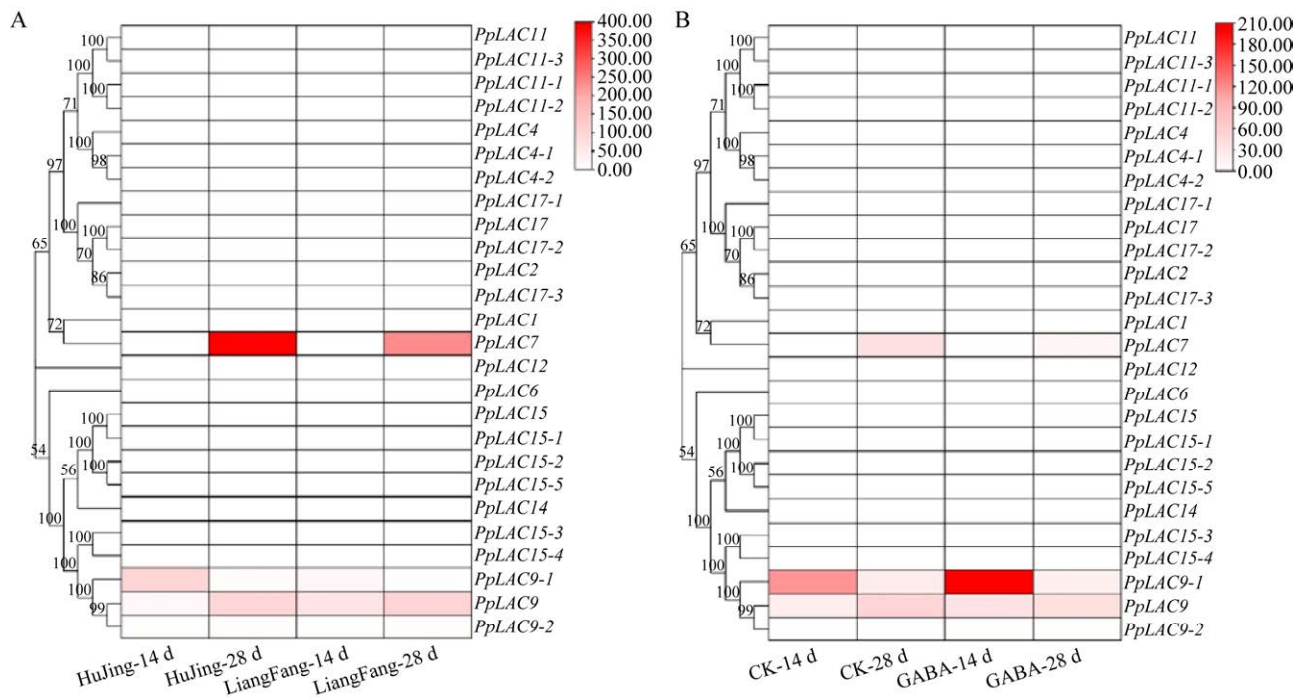


图 6 两品种桃果实及外源 GABA 处理桃果实 (A) *PpLAC* 家族成员基因表达 (B)

Figure 6 Gene expression of *PpLAC* gene family members in peach fruits from two cultivars (A) with/without exogenous GABA treatment (B).

二胺和非芳香族化合物。本研究中, 漆酶基因 *PpLAC7*、*PpLAC9* 在湖景和良方低温贮藏下表达量随时间延长而上升, 且两品种桃果实褐变指数在此期间也呈上升趋势, 二者趋势一致。 γ -氨基丁酸 (GABA) 处理能提高谷氨酸脱羧

酶、 δ 1-吡咯啉-5-羧酸合成酶和鸟氨酸 δ -氨基转移酶的活性, 降低脯氨酸脱氢酶的活性, 显著增加内源性 γ -氨基丁酸和脯氨酸的积累, 从而减轻冷藏桃果实的冷害褐变^[20]。本实验通过外源 GABA 处理减轻了桃果实的褐变程度, 且漆

酶基因 *PpLAC7*、*PpLAC9* 的表达显著低于 CK 组。据此可以推断, 可能在贮藏期间, 桃果实低温环境中组织受损, 使酚类物质与漆酶接触, 并在有氧气存在的情况下反应生成醌类物质, 导致桃果实发生褐变, 且外源 GABA 处理可以减轻褐变和抑制漆酶的活性。这与已有研究证明的漆酶可以使荔枝^[14]、苹果^[13]、龙眼^[32]表皮以及葡萄汁^[33]变为棕褐色的结果一致。因此可以推断漆酶作为多酚氧化酶很可能在桃果实低温贮藏产生褐变的过程中起到相同作用。此外, 对 *PpLAC7*、*PpLAC9* 基因上游启动子序列进行元件预测发现, 发现其具有低温响应元件, 说明 *PpLAC7*、*PpLAC9* 基因会对低温胁迫产生响应。

4 结论

本研究对桃果实漆酶基因家族成员进行鉴定, 分析其基本信息、理化性质、基因结构、染色体定位、亲缘关系以及在低温、GABA 处理下与果实褐变的关系, 为进一步研究桃果实中漆酶基因家族成员的功能提供理论基础。此外, 从漆酶基因表达情况和果实褐变程度推测, *PpLAC7*、*PpLAC9* 可能参与了低温贮藏下桃果实产生冷害褐变的过程, 并可能起到重要作用, 但其具体作用机制仍需进一步探究。

REFERENCES

- [1] Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *Febs J*, 2006, 273(10): 2308-2326.
- [2] Mikolasch A, Schauer F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(4): 605-624.
- [3] Janusz G, Pawlik A, Świdarska-Burek U, et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 966.
- [4] Turlapati PV, Kim KW, Davin LB, et al. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta*, 2011, 233(3): 439-470.
- [5] Zhao Q, Nakashima J, Chen F, et al. Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 3976-3987.
- [6] Yu Y, Li QF, Zhang JP, et al. *Laccase-13* regulates seed setting rate by affecting hydrogen peroxide dynamics and mitochondrial integrity in rice. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1324.
- [7] Cheng X, Li G, Ma C, et al. Comprehensive genome-wide analysis of the pear (*Pyrus bretschneideri*) laccase gene (*PbLAC*) family and functional identification of *PbLAC1* involved in lignin biosynthesis. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0210892.
- [8] Liu QQ, Luo L, Wang XX, et al. Comprehensive analysis of rice laccase gene (*OsLAC*) family and ectopic expression of *OsLAC10* enhances tolerance to copper stress in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): E209.
- [9] Cho HY, Lee C, Hwang SG, et al. Overexpression of the *OsCh11* gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic *Arabidopsis*. *Gene*, 2014, 552(1): 98-105.
- [10] Nitta K, Kataoka K, Sakurai T. Primary structure of a Japanese lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases. *J Inorg Biochem*, 2002, 91(1): 125-131.
- [11] Liang M, Davis E, Gardner D, et al. Involvement of *AtLAC15* in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta*, 2006, 224(5): 1185-1196.
- [12] Lurie S, Crisosto CH. Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biol Technol*, 2005, 37(3): 195-208.
- [13] Yihui G, Song J, Du L, et al. Characterization of laccase from apple fruit during postharvest storage and its response to diphenylamine and L-methylcyclopropene treatments. *Food Chem*, 2018, 253: 314-321.
- [14] Fang F, Zhang XL, Luo HH, et al. An intracellular laccase is responsible for epicatechin-mediated anthocyanin degradation in *Litchi* fruit pericarp. *Plant Physiol*, 2015, 169(4): 2391-2408.
- [15] 王梓宇, 张引引, 李月圆, 等. 漆酶 *LAC* 表达与鸭梨

- 果心褐变的关系. 中国农业科学, 2020, 53(24): 5073-5080.
- Wang ZY, Zhang YY, Li YY, et al. Relationship between *LAC* gene expression and core browning of yali pear. *Sci Agric Sin*, 2020, 53(24): 5073-5080 (in Chinese).
- [16] Ramesh SA, Tyerman SD, Gilliam M, et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(9): 1577-1603.
- [17] Michaeli S, Fromm H. Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 419.
- [18] Palma F, Carvajal F, Jiménez-Muñoz R, et al. Exogenous γ -aminobutyric acid treatment improves the cold tolerance of zucchini fruit during postharvest storage. *Plant Physiol Biochem*, 2019, 136: 188-195.
- [19] Li JX, Zhou X, Wei BD, et al. GABA application improves the mitochondrial antioxidant system and reduces peel browning in 'Nanguo' pears after removal from cold storage. *Food Chem*, 2019, 297: 124903.
- [20] Shang HT, Cao SF, Yang ZF, et al. Effect of exogenous γ -aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(4): 1264-1268.
- [21] Soleimani Aghdam M, Naderi R, Jannatizadeh A, et al. Enhancement of postharvest chilling tolerance of *Anthurium* cut flowers by γ -aminobutyric acid (GABA) treatments. *Sci Hortic*, 2016, 198: 52-60.
- [22] Ali S, Khan AS, Anjum MA, et al. Effect of postharvest oxalic acid application on enzymatic browning and quality of *Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.)* root slices. *Food Chem*, 2020, 312: 126051.
- [23] Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, et al. TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 2966-2980.
- [24] Xu X, Zhou Y, Wang B, et al. Genome-wide identification and characterization of laccase gene family in *Citrus sinensis*. *Gene*, 2019, 689: 114-123.
- [25] Berni R, Piasecki E, Legay S, et al. Identification of the laccase-like multicopper oxidase gene family of sweet cherry (*Prunus avium* L.) and expression analysis in six ancient Tuscan varieties. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3557.
- [26] 刘彦英, 倪珊珊, 项蕾蕾, 等. 香蕉漆酶基因家族鉴定及低温胁迫下的表达分析. *园艺学报*, 2020, 47(5): 837-852.
- Liu YY, Ni SS, Xiang LL, et al. Genome-wide identification of the laccase gene family and its expression analysis under low temperature stress in *Musa accuminata*. *Acta Horti Sin*, 2020, 47(5): 837-852 (in Chinese).
- [27] Jiao XY, Li GQ, Wang Y, et al. Systematic analysis of the *Pleurotus ostreatus* laccase gene (*PoLac*) family and functional characterization of PoLac2 involved in the degradation of cotton-straw lignin. *Molecules*, 2018, 23(4): E880.
- [28] 金鹏. 桃果实采后病害和冷害调控及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- Jin P. Study on regulation and mechanisms of postharvest disease and chilling injury of peach fruit after harvest[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [29] 尚海涛. 桃果实絮败和木质化两种冷害症状形成机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- Shang HT. Mechanism of cold injury symptom formation in peach fruit flocculent abortion and lignification[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [30] 周慧娟. 水蜜桃采后生理及贮藏保鲜技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- Zhou HJ. Studies on postharvest physiology and storage technology of honey peach fruits[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [31] Lonergan G, Baker WL. Comparative study of substrates of fungal laccase. *Lett Appl Microbiol*, 1995, 21(1): 31-33 (in Chinese).
- [32] 帅良, 赵昱清, 廖玲燕, 等. 龙眼漆酶基因(*DILac*)的克隆及表达分析. *食品工业科技*, 2017, 38(13): 95-100.
- Shuai L, Zhao YQ, Liao LY, et al. Cloning and expression analysis of the laccase gene (*DILac*) from *Dimocarpus longan*. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(13): 95-100 (in Chinese).
- [33] Zimdars S, Hitschler J, Schieber A, et al. Oxidation of wine polyphenols by secretomes of wild *Botrytis cinerea* strains from white and red grape varieties and determination of their specific laccase activity. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(48): 10582-10590.

(本文责编 陈宏宇)