

Charakterystyka funkcjonalna czterech syntaz skwalenu oliwnego w odniesieniu do zawartości skwalenu w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia

M. Luisa Hernández, Cristina Muñoz-Ocaña, Pilar Posada, M. Dolores Sicardo, Dámaso Hornero-Méndez, Raquel B. Gómez-Coca, Angelina Belaj, Wenceslao Moreda i José M. Martínez-Rivas*



Cytuj: *J. Agric. Food Chem.* 2023, 71, 15701–15712



Czytaj online

DOSTĘP |



Wskaźniki i nie tylko



Rekomendowane artykuły

Informacje uzupełniające

STRESZCZENIE: Wprowadzenie nowych odmian oliwek o zwiększonej zawartości skwalenu w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia jest uważane za ważny cel programów hodowli oliwek. W niniejszej pracy najpierw zbadano zmienność zawartości skwalenu w podstawowej kolekcji 36 odmian oliwek, ujawniając dwie odmiany oliwek, „Dokkar” i „Klon-14”, o odpowiednio bardzo niskiej i bardzo wysokiej zawartości skwalenu w olejach. Następnie sklonowano cztery sekwencje cDNA kodujące syntazy skwalenu (SQS) z oliwek. Analiza sekwencji i ekspresja funkcjonalna w bakteriach potwierdziły, że kodują one syntazy skwalenu. Analiza transkrypcji w różnych tkankach oliwek i odmianach wykazała, że poziomy ekspresji tych czterech genów SQS są regulowane przestrzennie i czasowo w sposób zależny od odmiany i wskazała OeSQS2 jako gen głównie zaangażowany w biosyntezę skwalenu w mezokarpie oliwki, a zatem w oliwie z oliwek. Ponadto biosynteza skwalenu wydaje się być regulowana transkrypcyjnie w mezokarpie oliwki poddanej stresowi wodnemu.

SŁOWA KLUCZOWE: *Olea europaea*, owoc oliwki, kolekcja podstawowa, SQS, ekspresja genów, stres wodny

I WPROWADZENIE

Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia (VOO) jest uzyskiwana z owoców oliwki wyłącznie w drodze procesów fizycznych, bez użycia konserwantów i dodatków. Światowa produkcja i konsumpcja oliwy z oliwek znacznie wzrosła w ciągu ostatnich kilku lat nie tylko ze względu na jej obiecujące właściwości zdrowotne i niezwykle właściwości odżywcze¹, ale także ze względu na jej wyjątkowe właściwości organoleptyczne. Właściwości te są determinowane przez związki obecne w oliwie VOO. W szczególności VOO składa się z triacylogliceroli, które są głównymi składnikami ($\geq 98\%$), oraz bardzo zróżnicowanej mieszanki związków chemicznych zwanych „związkami mniejszościowymi” ($\leq 2\%$).⁽²⁾

Wśród składników drugorzędnych obecnych w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia skwalen jest wielonienasyconym węglowodorem triterpenowym z sześcioma podwójnymi wiązaniami węglowymi. Ze względu na swoją wysoce nienasyconą strukturę chemiczną cząsteczka skwalenu jest wrażliwa na utlenianie.³ W złożonych mieszaninach, takich jak oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia, jej stabilność ulega poprawie, a skwalen przyczynia się do stabilności oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia pod wpływem światła.⁴ Opisano jednak również degradację skwalenu w VOO po 6 miesiącach przechowywania w ciemności.⁵ Ponadto pojawia się coraz więcej dowodów na to, że skwalen hamuje degradację termiczną/utleniającą olejów do smażenia.⁶

W ostatnich latach szczególną uwagę poświęcono skwalenowi ze względu na potencjalne korzyści zdrowotne wynikające z jego włączenia do diety. Niższe ryzyko zachorowań na nowotwory i choroby układu krążenia wśród ludności regionu Morza Śródziemnego wiąże się ze spożywaniem oliwy z oliwek tłoczonej na zimno, która zawiera znaczne ilości skwalenu.⁽⁷⁾ W tym kontekście liczne badania potwierdziły pewne właściwości bioaktywne skwalenu, takie jak działanie przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i przeciwmiażdżycowe, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*.⁽⁸⁾ Ponadto skwalen jest szeroko stosowany w przemyśle farmaceutycznym

i kosmetycznym jako środek dostarczający leki, środek wspomagający w szczepionkach, środek detoksykacyjny i środek chroniący skórę.⁹

Głównym tradycyjnym źródłem skwalenu jest olej z wątroby rekina, którego stężenie sięga 40–86/100 g.⁽⁷⁾ Jednak wykorzystanie oleju pochodzenia morskiego jako źródła skwalenu jest ograniczone przepisami dotyczącymi ochrony zwierząt oraz obecnością zanieczyszczeń organicznych i metali ciężkich powodujących raka. Z tego powodu w ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się ogólne i rosnące zainteresowanie poszukiwaniem nowych źródeł naturalnego skwalenu, zwłaszcza pochodzenia roślinnego.⁷ Najwyższą zawartość skwalenu obserwuje się w oleju amarantusowym (6/100 g) i oliwie z oliwek (0,5/100 g), chociaż znaczne ilości występują również w innych olejach, w tym w oleju z kielków pszenicy, oleju z otrębów ryżowych, oleju arachidowym, oleju z pestek winogron i oleju z pestek dyni.³ Spośród tych gatunków roślin skwalen pozyskuje się z destylatów przemysłu oliwnego.¹⁰

W roślinach biosynteza izoprenoidów, które są prekursorami skwalenu, może odbywać się poprzez szlak mawalonianowy (MVA) w cytosolu lub poprzez szlak 2C-metylo-D-erytrytol-4-fosforanowy (MEP) zlokalizowany w plastydach.¹¹ Szlak MVA generuje wyłącznie difosforan izopentenylu (IPP), natomiast szlak MEP tworzy IPP i difosforan dimetyloallilu (DMAPP), przy czym wymiana izoprenoidów między cytosolem a plastydami jest dość nieefektywna. Kondensacja dwóch cząsteczek IPP z DMAPP daje

Otrzymano: 31 lipca 2023 r.

Poprawiono: 12 września 2023

Przyjęte: 25 września 2023 r.

Opublikowano: 10 października 2023 r.



spożywczej

Pirofosforan farnesylowy (FPP) jest katalizowany przez syntazę FPP (FPS). FPP jest substratem do biosyntezy fitosteroli, ubichinonów, terpenoidów, fitoaleksyn i kwasu abscysynowego. Następnie skwalen jest syntetyzowany poprzez kondensację dwóch cząsteczek FPP w dwuetapowej reakcji katalizowanej przez syntazę skwalenu (SQS). W pierwszym etapie kondensacja dwóch cząsteczek FPP powoduje powstanie pośredniego difosforanu preskwalenu (PSPF), który następnie w drugim etapie jest redukowany do skwalenu przy użyciu NADPH jako substratu.¹² Następnie skwalen może zostać przekształcony w 2,3-oksydoskwalen w reakcji katalizowanej przez epoksydazę skwalenową (SQE), co stanowi kluczowy etap biosyntezy steroli.¹³ W *Arabidopsis thaliana* wyizolowano i scharakteryzowano dwa geny kodujące SQS, które wykazują duże podobieństwo sekwencji.¹⁴ Obie izoformy znajdują się w retikulum endoplazmatycznym (ER), chociaż tylko SQS1 wykazywał oczekiwaną aktywność enzymatyczną.¹⁵ SQS1 jest wyrażany we wszystkich tkankach roślinnych, głównie w korzeniach, podczas gdy transkrypty SQS2 są szczególnie obfite w liściach, liściach i hipokotylach.

Oprócz swojej roli jako prekursor fitosteroli i brasinosteroidów, kluczowych cząsteczek dla wzrostu roślin i adaptacji do stresów biotycznych i abiotycznych, skwalen może regulować właściwości biofizyczne, dyfuzję i dynamiczną organizację błon komórkowych. Ze względu na swój niepolarny charakter skwalen jest zlokalizowany w hydrofobowym centrum dwuwarstwy lipidowej, odgrywając ważną rolę w elektrochemicznym gradiencie komórkowym.³

Spożycie oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia jest głównym źródłem skwalenu pokrywającym jego zapotrzebowanie w diecie.⁷ Zawartość skwalenu w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia wynosi od 1,5 do 10,1 mg/g, a na ilość tę wpływają czynniki genetyczne i agronomiczne, w tym odmiana, dojrzałość owoców i warunki agroklimatyczne.¹⁶ Skwalen nie ulega żadnym istotnym przemianom chemicznym ani enzymatycznym podczas procesu ekstrakcji oleju, ponieważ jest bezpośrednio przenoszony z owoców oliwki do VOO. Jednak technologia ekstrakcji i proces rafinacji powodują znaczne zmniejszenie ilości skwalenu w oliwach z oliwek.

Ostatnio opracowanie nowych odmian oliwek produkujących oliwę VOO o lepszych właściwościach odżywczych, w tym o zwiększonej zawartości skwalenu, uznano za kluczowy cel programów hodowli oliwek.¹⁷ Aby to osiągnąć, konieczna jest identyfikacja markerów molekularnych związanych z wysoką zawartością skwalenu w oliwie VOO. Jednak nadal niewiele wiadomo na temat genetycznej kontroli zmienności skwalenu wśród odmian oliwek, a badania molekularne dotyczące metabolizmu skwalenu w owocach oliwek są niewystarczające. W szczególności geny SQS oliwek nie zostały dotychczas sklonowane i scharakteryzowane. Dlatego celem naszej pracy była analiza zawartości skwalenu w olejach z odmian wcześniej opracowanej podstawowej kolekcji (Core-36) o dużej różnorodności genetycznej¹⁸ w celu wyszukania odmian o wysokiej i niskiej zawartości skwalenu oraz izolacja i charakterystyka genów SQS w oliwkach w celu określenia głównych kandydatów, które mogą być odpowiedzialne za zawartość skwalenu w mezokarpie oliwki, a tym samym w oliwie z oliwek. W szczególności przeprowadzono identyfikację funkcjonalną i analizę ekspresji podczas rozwoju i dojrzewania owoców oliwek z różnych odmian, nie tylko w celu zbadania ich specyficznej roli w biosyntezie skwalenu w różnych tkankach oliwek, ale także w celu zbadania potencjalnego wpływu genów SQS na reakcję mezokarpium oliwek na stres wodny.

MATERIAŁY I METODY

■ Materiały roślinne. Do analizy oleju wykorzystano owoce oliwki (*Olea europaea* L.) odpowiadające wcześniej ustanowionej podstawowej kolekcji 36

Odmiany (Core-36)¹⁸ zostały zebrane w sezonach 2011/2012 i 2012/2013. Drzewa oliwne z Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (WOGBC) znajdującego się w IFAPA (Alameda del Obispo, Córdoba, Hiszpania) były uprawiane przy użyciu standardowych praktyk uprawowych. Ponieważ WOGBC posiada tylko dwa drzewa do akcesji, zastosowano tę samą metodologię pobierania próbek w poprzednich badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem Core-36¹⁹. W tym celu, aby uzyskać reprezentatywne próbki owoców oliwek ze wszystkich części drzew oliwnych, owoce zbierano ręcznie w fazie dojrzewania o wskaźniku dojrzałości (RI) wynoszącym

2,5, z dwóch drzew na odmianę, zmieszano je i podzielono na trzy różne grupy, które stanowią trzy różne próbki biologiczne.

Do badań tkankowych i rozwojowych wykorzystano drzewa oliwne dwóch głównych odmian uprawianych do produkcji oliwy (odmiany „Picual” i „Arbequina”). Drzewa uprawiano w sadzie doświadczalnym Instituto de la Grasa (Sewilla, Hiszpania), stosując nawadnianie kropłowe i nawożenie (nawadnianie odpowiednimi nawozami w roztworze) od momentu pełnego kwitnienia do dojrzewania owoców. Młode pestkowce, rozwijające się nasiona i tkanka mezokarpium zostały zebrane z co najmniej trzech różnych drzew oliwnych w różnych tygodniach po kwitnieniu (WAF), odpowiadających różnym etapom rozwoju owoców oliwki: zielonym (9, 16 i 19 WAF; RI 0); żółtawym (23 WAF; RI 1); zmieniającym kolor lub dojrzewającym (28 i 31 WAF; odpowiednio RI 2 i 3); oraz dojrzale lub w pełni dojrzale (35 WAF; RI 4).

Do badań nad rozwojem mezokarpium wybranych odmian o zróżnicowanej zawartości skwalenu wykorzystano drzewa oliwne (odmiany „Dokkar” i „Klon-14”) z WOGBC. Tkankę mezokarpium pobrano z dwóch drzew oliwnych każdej odmiany w różnych fazach WAF odpowiadających różnym etapom rozwoju owoców oliwki: zielonym (20 WAF; RI 0), żółtawym (24 WAF; RI 1), zmieniającym kolor lub dojrzewającym (27 WAF; RI 2,5) oraz dojrzale lub w pełni dojrzale (31 WAF; RI 4).

Aby zbadać wpływ różnych metod nawadniania, próbki mezokarpium w różnych fazach WAF pobrano w sadzie Sanabria, komercyjnym sadzie oliwek o bardzo dużej gęstości (odmiana „Arbequina”) w pobliżu Sewilli, zgodnie z opisem Hernández et al.²⁰ Zastosowano pełne nawadnianie (FI) oraz dwie metody regulowanego nawadniania deficytowego (RDI) (60RDI i 30RDI).

We wszystkich przypadkach tkanki oliwek zostały zamrożone w ciekłym azocie bezpośrednio po zbiorach i przechowywane w temperaturze -80°C.

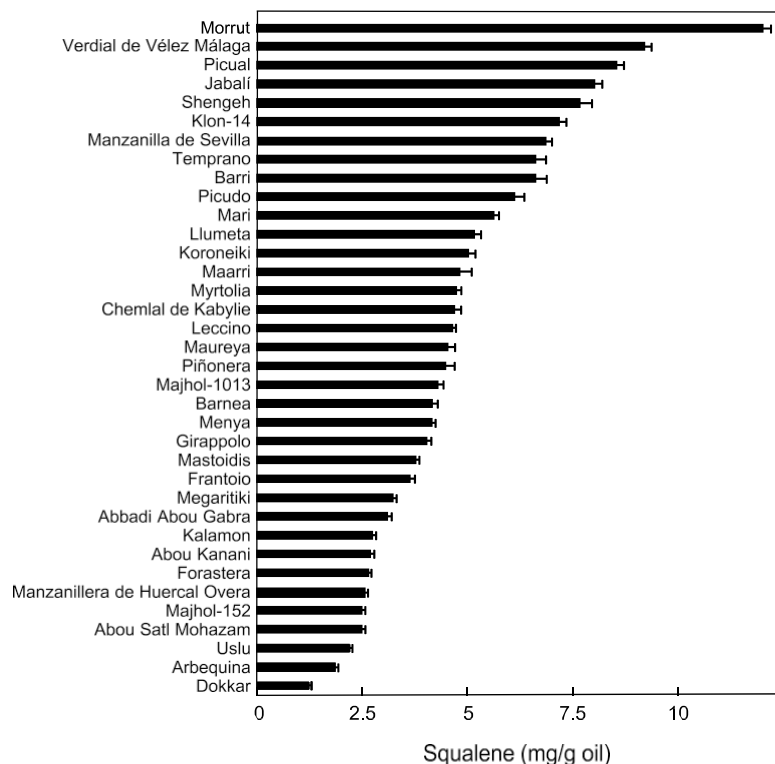
Ekstrakcja oliwy z oliwek. Oliwa została wyekstrahowana z owoców oliwki przy użyciu

laboratoryjnej instalacji do ekstrakcji oleju (Abencor, Comercial Abengoa, SA. Sewilla, Hiszpania), zgodnie z opisem Hernández i wsp.¹⁹

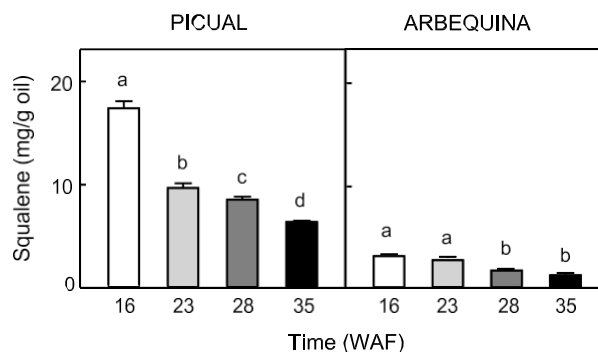
Izolacja pełnej długości klonów cDNA syntazy skwalenu z oliwek i analiza sekwencji. Kandydackie sekwencje SQS oliwek zidentyfikowano w transkryptomie oliwek²¹ i genomie oliwki dzikiej (var. sylvestris)²² przy użyciu algorytmu tblastn, a także sekwencji aminokwasowych genów SQS *Arabidopsis*. Na podstawie tych sekwencji zaprojektowano specyficzne startery do amplifikacji PCR z użyciem polimerazy DNA ACCUZYME (Bioline, Hiszpania), która ma aktywność korekcyjną. Jako matrycę DNA wykorzystano porcję biblioteki cDNA oliwki Uni-ZAP XR skonstruowanej z mRNA izolowanego z 13 owoców oliwki WAF odmiany „Picual” lub cDNA uzyskanego z liści lub mezokarpium w fazie dojrzewania. W każdej reakcji wygenerowano jeden fragment o oczekiwanej wielkości, podklonowano go do wektora pSpark I (Canvax, Hiszpania) i zsekwencjonowano w obu kierunkach metodą Sanger (GATC Biotech, Niemcy).

Dane dotyczące sekwencji DNA zostały zebrane i przeanalizowane za pomocą pakietu oprogramowania LASERGENE (DNAStar, Madison, WI, USA). Wielokrotne wyrównanie sekwencji aminokwasowych oliwki SQS zostało obliczone przy użyciu programu ClustalX i wyświetlone za pomocą GeneDoc. Analiza drzewa filogenetycznego została przeprowadzona przy użyciu metody sąsiedztwa w pakiecie Phylip z zastosowaniem korekty Kimury dla wielokrotnych substytucji i zestawu danych bootstrap 1000. Do wyświetlenia drzewa użyto programu Treeview. Lokalizację subkomórkową przewidziano za pomocą trzech różnych programów: ProtComp (<http://www.softberry.com>), Wolf PSORT (<http://wolfpsort.org/>) i TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), a konserwatywne domeny wywnioskowanych sekwencji aminokwasowych genów SQS wykryto za pomocą narzędzia wyszukiwania Conserved Domain Database (CDD) na serwerze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>). Hydropa-

A



B



Rysunek 1. Zawartość skwalenu w olejach odmian z Core-36 ekstrahowanych z owoców oliwek zebranych w fazie dojrzewania o wskaźniku dojrzałości 2,5 (A) lub z odmian „Picual” i „Arbequina” wyekstrahowanych z owoców oliwki w różnych fazach rozwoju: zielonej (16 WAF), żółtawej (24 WAF), zmieniającej kolor (28 WAF) i dojrzałej (31 WAF) (B). Ekstrakcję oleju i analizę skwalenu przeprowadzono zgodnie z opisem w sekcji Materiały i metody. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych. Różne litery oznaczają istotne różnice ($P < 0,05$) dla odmiany „Picual” lub „Arbequina” według jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu Tukey’a dla wielokrotnych porównań.

Wykresy te generowano metodą Kytę’a i Doolittle’a (<https://web.expasy.org/protscale/>), przeprowadzono również analizę TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

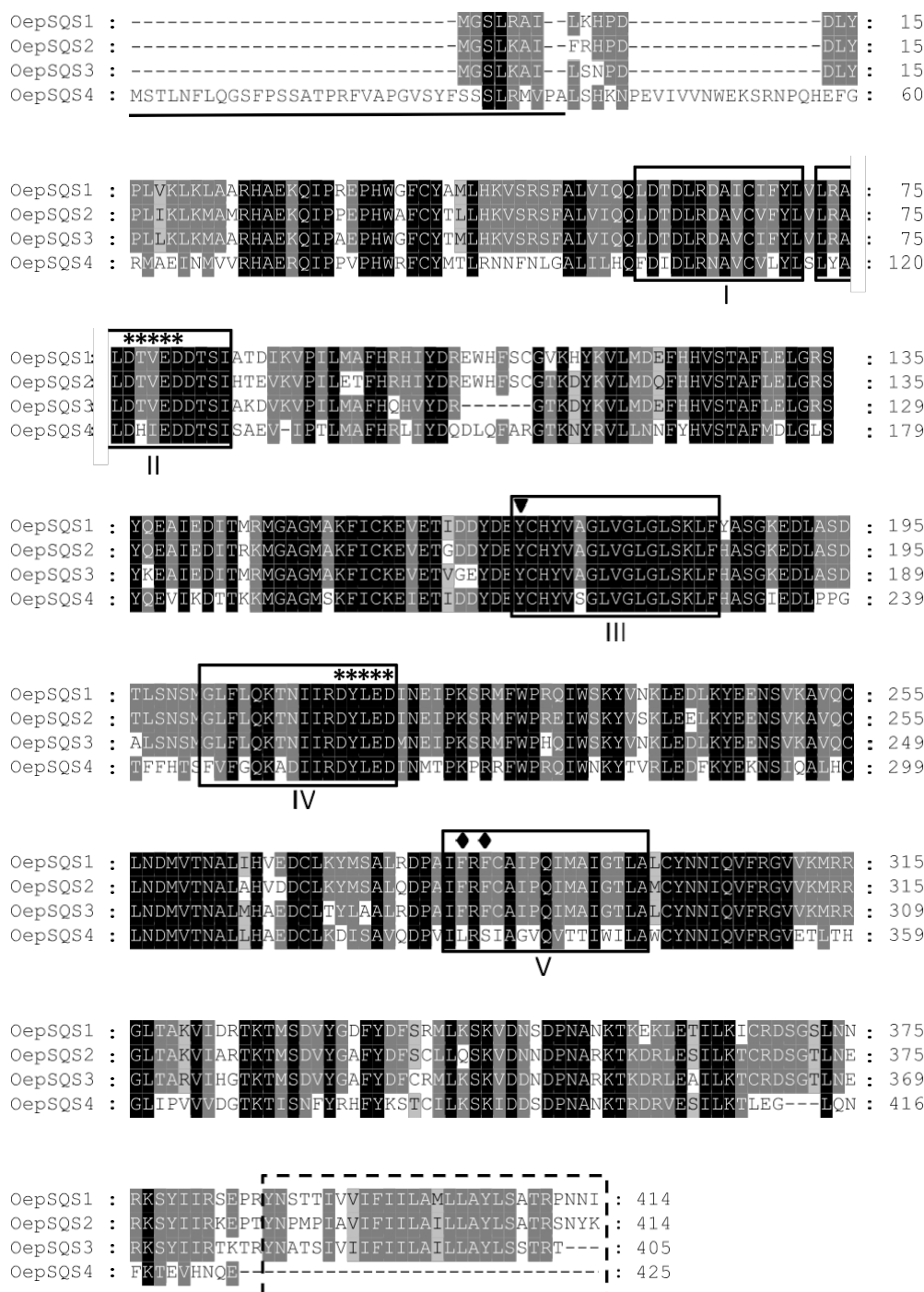
Izolacja całkowitego RNA i synteza cDNA. Izolację całkowitego RNA przeprowadzono zgodnie z opisem Hernández et al.²³ przy użyciu 1,5 g zamrożonej tkanki oliwki. Weryfikację jakości RNA, usunięcie zanieczyszczającego DNA i syntezę cDNA przeprowadzono zgodnie z opisem Hernández et al.²⁴

Analiza ekspresji genów syntazy skwalenu. Analizę ekspresji genów

przeprowadzono za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) przy użyciu systemu CFX connect real-time PCR i iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad, Kalifornia, USA), jak opisano wcześniej²⁵. Primery do amplifikacji specyficznej dla genów zaprojektowano przy użyciu programu Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) i programu Gene Runner (tabela S1). Jako endogenne markery normalizujące wykorzystano gen ubikwityny oliwkowej (OeUBQ2, AF429430).⁽²⁴⁾ W przypadku tkanek i badań rozwojowych

różnych odmian oliwek, względny poziom ekspresji każdego genu obliczono za pomocą równania $2^{-\Delta\Delta C_t}$, gdzie $\Delta C_t = (C_{t_{GOI}} - C_{t_{UBQ2}})$.^{26,27} Metoda ta ma tę zaletę, że umożliwia porównania na poziomie ekspresji genów w różnych stadiach rozwoju, odmianach i genach. W odniesieniu do badań dotyczących nawadniania dane qRT-PCR zostały skalibrowane względem odpowiedniego poziomu ekspresji genów w 13 tygodniu po sadzeniu (WAF) od momentu zastosowania FI jako kalibratora. W tych przypadkach zastosowano metodę $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ do względnej kwantyfikacji.⁽²⁶⁾ Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych, z których każde miało dwa powtórzenia techniczne na płycie 96-dółkowej.

Funkcjonalna ekspresja genów syntazy skwalenu w *Escherichia coli*. Sekwencje kodujące SQS oliwki, z wyjątkiem sygnału retencji C-końcowego do ER w przypadku OepSQS1, OepSQS2 i OepSQS3 (odpowiednio 28, 28 i 25 aminokwasów) lub N-terminalny peptyd sygnałowy chloroplastowy OepSQS4 (50 aminokwasów) został amplifikowany metodą PCR przy użyciu polimerazy DNA ACCUZYME i specyficznych starterów z rozszerzonymi miejscami restrykcyjnymi enzymów restrykcyjnych w celu kierunkowego



Rysunek 2. Porównanie wynioskowanych sekwencji aminokwasowych genów SQS oliwki. Sekwencje zostały wyrównane przy użyciu programu ClustalX i wyświetlone za pomocą GeneDoc. Identyczne i podobne reszty są pokazane odpowiednio na czarnym i szarym tle. Domniemany peptyd transportowy chloroplastów jest zaznaczony linią ciągłą. Konserwatywne domeny charakterystyczne dla genów SQS (I–V) są otoczone linią ciągłą. Dwa motywy bogate w Asp (DXXXD), które biorą udział w wiązaniu FPP, są oznaczone gwiazdkami. Zachowane reszty Tyr i dwie reszty Phe są oznaczone odpowiednio odwróconym trójkątem i dwoma rombami. Hydrofobowy region C-końcowy jest otoczony linią przerywaną. Sekwencje cDNA odpowiadające *OepSQS1*, *OepSQS2*, *OepSQS3* i *OepSQS4* zostały zdeponowane w bazie danych GenBank/EMBL/DDBJ pod numerami dostępu odpowiednio OQ676921, OQ676922, OQ676923 i OQ676924.

ligacja (Tabela S2). Powstałe produkty PCR poddano podwójnej trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi i ligowano pod kontrolą indukowalnego promotora *T7lac* do bakteryjnego wektora ekspresyjnego pET45b(+) (Novagen, Niemcy). Przed rozpoczęciem badań ekspresji sprawdzono połączenia klonowania poprzez sekwencjonowanie. Szczep *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Niemcy) został transformowany uzyskanymi plazmidami i wyselekcjonowany na płytkach LB z ampicyną. Pożywka LB

zawierającą ampicynę (6 ml) zaszczerpiono pojedynczą kolonią i hodowano w temperaturze 37 °C do momentu, gdy A_{600} osiągnęło wartość 0,3–0,5. Następnie 100 ml pożywki LB z ampicyną zaszczerpiono całą hodowlą wstępną i hodowano w temperaturze 37 °C. Gdy hodowla osiągnęła wartość $A_{(600)}$ wynoszącą 0,6, dodano 100 mM izopropyl-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG) w celu indukcji ekspresji genów, a hodowlę inkubowano dalej w temperaturze 22 °C przez 20 godzinę. Komórki bakteryjne zebrano przez wirowanie przy 2500 g przez 10 minut

spożywczej

w temperaturze 4 °C, przemyto 50 mM buforem fosforanowym o pH 7,5, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze –80 °C.

Aby uzyskać surowy ekstrakt, zamrożony osad komórek rozmrożono i ponownie zawieszono w 5 ml buforu ekstrakcyjnego [50 mM bufor fosforanowy o pH 7,5, 1 mM ditiotritol (DTT) i 1 mM fenylometylosulfonylowy fluorek] i rozbito za pomocą sonikacji. Lizat odwirowano przy 13 000 g przez 15 minut w temperaturze 4 °C, a supernatant wykorzystano jako surowy ekstrakt. Zawartość białka określono przy użyciu barwnika białkowego BioRad Bradford z albuminy surowicy bydlęcej jako standardu.

Badanie aktywności SQS *in vitro*. Aktywność SQS została zbadana zgodnie z opisem Ye i wsp.²⁸ z pewnymi modyfikacjami. Aliquot surowego ekstraktu odpowiadający 25 µg białka inkubowano w całkowitej objętości 700 µl z 50 mM buforem fosforanowym o pH 7,5, 2,5 mM NADPH, 10 mM DTT, 5 mM MgCl₂ i 25 µM solą triamonową pirofosforanu farmaceutycznego (FPP). Po 2 godzinach w temperaturze 35 °C mieszaninę reakcyjną ekstrahowano trzykrotnie za pomocą 400 µl heksanu. Jako wewnętrzny standard zastosowano skwalan (10 µg). Próbkę odparowano w strumieniu N₂ i ponownie zawieszono w 50 µl heksanu w celu oznaczenia skwalenu metodą GC.

Oznaczanie skwalenu. Do analizy skwalenu w oliwie z oliwek zastosowano

zastosowano procedurę opisaną przez Lanzón et al.²⁹ z pewnymi modyfikacjami. Próbkę oliwy z oliwek (40 mg) wraz z 20 µl 10 mg/ml skwalenu jako wewnętrznego standardu (współczynnik odpowiedzi równy 1) rozpuszczono w 1 ml heksanu przy użyciu wirówki i zmydlono w temperaturze pokojowej przez 10 minut przy użyciu 200 µl 2N KOH-MeOH. Pojawiają się dwie fazy, a po przemyśleniu górnej części 3 × 400 µl roztworu etanolu i wody w stosunku 1:1 (v/v), 1 µl górnej fazy wykorzystano do GC.

W celu analizy skwalenu w tkankach oliwek zastosowano procedurę opisaną przez Fernández-Cuesta i in.³⁰ z pewnymi modyfikacjami. Liofilizowaną tkankę (200 mg mezosarku, nasion lub liści) wraz z 20 µl 10 mg/ml skwalenu jako wewnętrznym standardem i 2 ml 2% KOH-EtOH ogrzewano w temperaturze 80 °C przez 15 minut w celu przeprowadzenia hydrolizy alkalicznej. Frakcję niezmydlającą wyekstrahowano przez mieszanie w wirówce z 1 ml heksanu i 1,5 ml wody destylowanej. Górną warstwę heksanu przeniesiono do nowej probówki i zatężono w strumieniu N₂ przed analizą GC.

Analizę GC przeprowadzono za pomocą chromatografu gazowego Agilent 7890A wyposażonego w kolumnę HP-5 (długość 30 m; średnica wewnętrzna 0,32 mm; grubość warstwy 0,25 µm; Agilent, Santa Clara, Kalifornia, USA) i detektor jonizacji płomieniowej. Jako gaz nośny zastosowano wodór o liniowej prędkości 4,96 ml/min i współczynniku podziału 1:20. Temperatura wtryskiwacza i detektora wynosiła odpowiednio 300 i 325 °C, a temperatura pieca wynosiła 250 °C przez 3 minuty, a następnie została podwyższona do 290 °C z prędkością 4 °C/min.

Identyfikację skwalenu na podstawie testu aktywności SQS *in vitro* przeprowadzono za pomocą spektrometrii masowej GC (GC-MS) na chromatografie gazowym GC Finnigan Trace-GC 2000 połączonym z spektrometrem masowym z pułapką jonową Polaris-Q (ThermoFinnigan, Austin, Teksas, USA), który działa w trybie pełnego skanowania. Analizę chromatograficzną przeprowadzono przy użyciu kolumny kapilarnej DB-SMS (długość 30 m; średnica wewnętrzna 0,25 mm; grubość warstwy 0,25 µm) (Agilent). Jako gaz nośny zastosowano hel o stałym natężeniu przepływu 1,5 ml/min i współczynniku podziału 1:20. Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 250 °C przez 3 minuty, a następnie podwyższana do 270 °C z prędkością 4 °C/min przez 25 minut. Temperatura wtryskiwacza wynosiła 300 °C, a ogrzewanie pułapki jonowej 200 °C.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Zmienność zawartości skwalenu w podstawowej kolekcji odmian oliwek (Core-36). Zawartość skwalenu w Core-36,¹⁸ która zawiera większość różnorodności genetycznej występującej w WOGBC, została najpierw przeanalizowana w celu zidentyfikowania odmian oliwek o kontrastującej zawartości skwalenu. Średni procent skwalenu wynosił 4,52 mg/g oleju, a przedziały zmienności wynosiły od 1,27 do 11,83 mg/g oleju, przy czym odmiany „Dokkar” i „Morrut” były odmianami o najbardziej zróżnicowanej zawartości skwalenu (ryc. 1A). Wartości te wskazują na wysoki poziom

zmienności i są podobne do tych zgłoszonych dla innego zestawu 28 odmian z tej samej kolekcji materiału genetycznego,¹⁶ potwierdzając wysoki poziom zmienności zawartości skwalenu wśród odmian i stwarzając nowe możliwości hodowli. W odmianach włoskich i tunezyjskich zawartość skwalenu wahała się odpowiednio od 3,5 do 5,8 i od 1,4 do 5,4 mg/g oleju.^{5,31} Co ciekawe, zakres zmienności opisany w niniejszym badaniu był nieco niższy niż zakres zmienności zawartości skwalenu obserwowany w segregującym się potomstwie krzyżówki odmian „Picual” i „Arbequina”, który wynosił od 2,5 do 8,5 mg/g oleju.¹⁷ Wysoki poziom zmienności Core-36 opisano również wcześniej w odniesieniu do profilu kwasów tłuszczowych.⁽¹⁹⁾ Nasze wyniki potwierdzają również dowody, że różnice między odmianami w zawartości skwalenu w oliwach z oliwek wynikają głównie z czynnika genetycznego, jak opisano wcześniej,⁽¹⁶⁾ ponieważ wszystkie odmiany oliwek były uprawiane w tym samym sadzie i w tych samych warunkach, owoce oliwek zbierano w tym samym stadium dojrzałości i stosowano identyczne warunki ekstrakcji o l i w y . Dane te potwierdzają zatem, że genotyp jest głównym źródłem zmienności zawartości skwalenu w oliwie z oliwek.

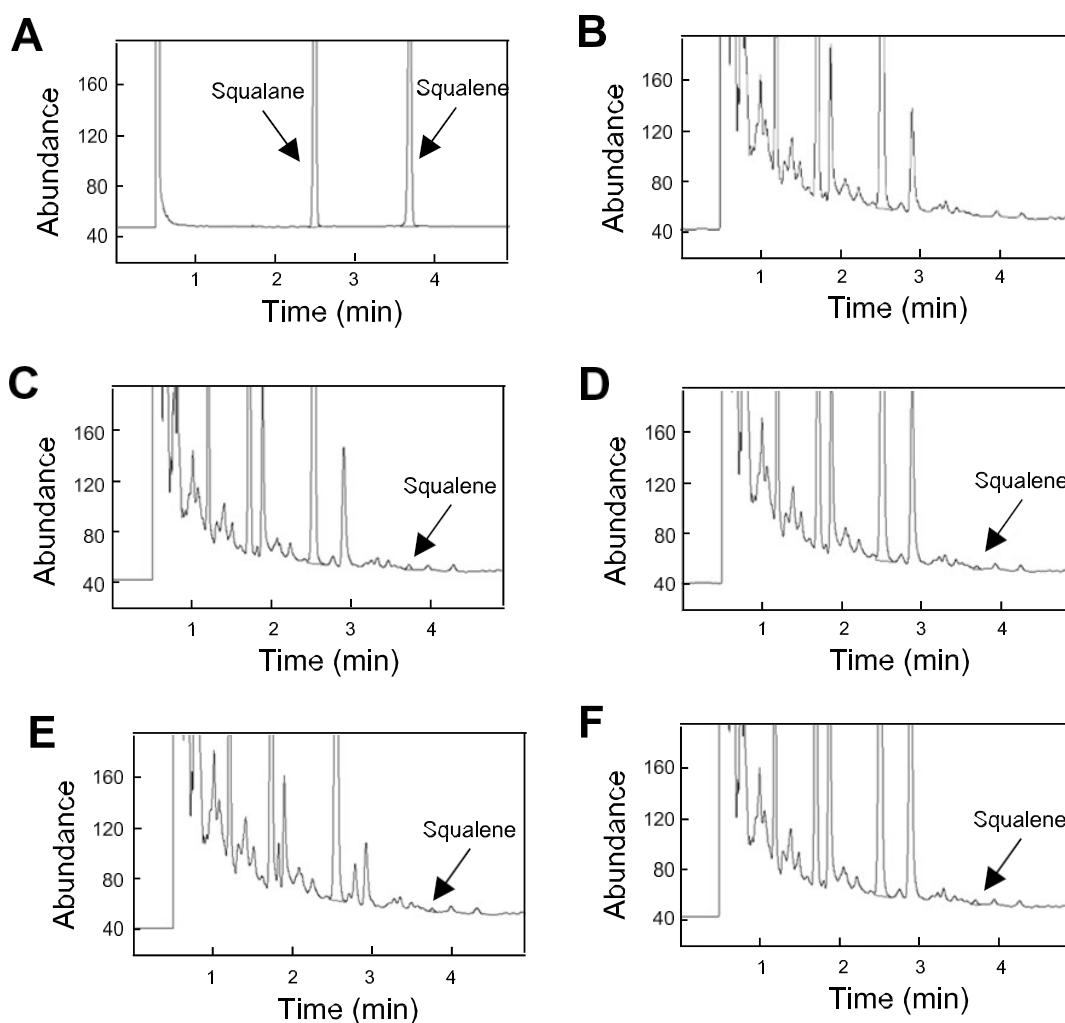
Ponadto wykryto ciągły spadek zawartości skwalenu w oliwach z oliwek ekstrahowanych z owoców odmian „Picual” i „Arbequina” podczas rozwoju i dojrzewania (ryc. 1B). Podobną tendencję odnotowano w przypadku odmian tunezyjskich³¹, chociaż kinetyka tego procesu wydaje się być zależna od odmiany.

Klonowanie cDNA i analiza sekwencji czterech oliwek

Geny syntazy skwalenu. Zidentyfikowano cztery sekwencje z transkryptomu oliwki²¹ i genomu oliwki dzikiej (var. sylvestris)²², które wykazywały wysoki stopień podobieństwa do genu SQS1 Arabidopsis.¹⁴ Na podstawie tych sekwencji zaprojektowano specyficzne pary starterów i wykorzystano je do amplifikacji PCR wraz z porcją biblioteki cDNA owoców oliwki (13 WAF) (cv. „Picual”) lub cDNA uzyskanego z liści lub mezosarku w fazie dojrzewania. Wyizolowano cztery pełnej długości kłony cDNA i nazwano je OepSQS1, OepSQS2, OepSQS3 i OepSQS4, o rozmiarach odpowiednio 1555, 1454, 1562 i 1264 bp. Wykazywały one ORF kodujące przewidywane białka o 414, 414, 405 i 425 reszt aminokwasowych, co odpowiada obliczonym masom cząsteczkowym odpowiednio 47,7, 47,6, 46,2 i 48,9 kDa oraz wartościom pI wynoszącym 8,0 dla OepSQS1, 7,6 dla OepSQS2, 8,0 dla OepSQS3 i 6,9 dla OepSQS4. Porównanie czterech wynioskowanych sekwencji aminokwasowych SQS oliwki (ryc. 2) wykazało, że OepSQS1 wykazuje 86% i 85% identyczności odpowiednio w stosunku do OepSQS2 i OepSQS3, podczas gdy te dwa ostatnie mają 84% identyczności. Natomiast OepSQS4 wykazuje niską identyczność z pozostałymi sekwencjami, wykazując 47, 48 i 46% identyczności odpowiednio z OepSQS1, OepSQS2 i OepSQS3.

Wyszukiwanie w bazie danych NCBI konserwatywnych domen wykazało, że cztery białka należą do nadrodziny klasy 1 biosyntezy izoprenoidów. Analiza Pfam wykazała obecność domeny syntazy skwalenu/fitoenu (Pfam: 00494) między aminokwasami 44-315, 44-315, 44-309 i 92-341 dla OepSQS1, OepSQS2, OepSQS3 i OepSQS4.

W wyrównaniu sekwencji aminokwasowych SQS zidentyfikowano pięć wysoce konserwatywnych domen (ryc. 2). Domeny III, IV i V wykazały sekwencje wysoce konserwatywne w stosunku do innych roślinnych SQS, podczas gdy domeny I i II były mniej konserwatywne⁽³²⁾. Te wysoce konserwatywne domeny są uważane za ważne dla aktywności katalitycznej/funkcjonalnej. Domena I jest miejscem wiązania chemicznego lub kieszeni wiązania substratu. Domeny II i IV zawierają dwa motywy bogate w Asp (DXXXD).



Rysunek 3. Analiza GC autentycznego skwalanu (standard wewnętrzny) i skwalenu (standard zewnętrzny) (A) oraz produktów reakcji testu aktywności SQS zawierającego ekstrakty białkowe z hodowli *E. coli* bez IPTG (B) lub po indukcji ekspresji OepSQS1 (C), OepSQS2 (D), OepSQS3 (E) i OepSQS4 (F). Produkty reakcji zostały wyekstrahowane z mieszaniny reakcyjnej *in vitro* i przeanalizowane metodą GC, jak opisano w sekcji **Materiały i metody**.

pokazane na [rysunku 2](#), które uważane są za koordynujące i ułatwiające wiązanie FPP poprzez wiązanie jonów Mg^{2+33} . Domena III jest miejscem aktywnym, a pierwsza reszta Tyr w tym regionie ([rysunek 2](#)) jest niezbędna dla pierwszego etapu katalizy, ponieważ mutacje w tym aminokwasie powodują całkowitą utratę aktywności SQS.³⁴ Wreszcie domena V jest regionem wiążącym NADPH ([rysunek 2](#)) i zawiera dwa konserwatywne reszty Phe.³⁵ W związku z tym domeny I, II, III i IV biorą udział w pierwszej połowie reakcji, czyli kondensacji dwóch cząsteczek FPP do PSPP, podczas gdy domena V jest niezbędna do przekształcenia PSPP w skwalen, co jest niezbędne dla drugiej połowy reakcji.¹²

Analiza topologii białek transbłonowych przy użyciu oprogramowania Hidden Markov Model (TMHMM) wykazała, że OepSQS4 nie zawiera żadnej domeny transbłonowej (TMD), podczas gdy oliwkowe SQS1, SQS2 i SQS3 posiadają dwie domeny TMD złożone z 22 reszt aminokwasowych każda, obie w regionie C-końcowym białka ([ryc. S1](#)). Topologia ta wyraźnie wskazuje, że oliwkowe SQS1, SQS2 i SQS3 są białkami związanymi z błoną komórkową i jest zgodna z topologią opisaną dla białek SQS roślin, gdzie opisano jedną lub dwie domeny TMD w tym samym miejscu C-końca.⁽³⁵⁾ Druga domena TMD jest wysoce hydrofobowa ([ryc. S2](#)) i charakteryzuje się niskim podobieństwem sekwencji ([ryc. 2](#)) i prawdopodobnie odpowiada za zakotwiczenie SQS.

białko do błony ER.³⁶ Zgodnie z tym poglądem Busquets i wsp.¹⁵ opisali kierowanie wersji GFP AtSQS1 do błony ER w komórkach naskórka cebuli i wykazali, że kierowanie to zależy wyłącznie od obecności drugiego TMD.

Analiza wynioskowanych sekwencji białek SQS oliwki za pomocą oprogramowania do przewidywania lokalizacji subkomórkowej, takiego jak ProtComp lub WoLF PSORT, sugeruje, że OepSQS1, OepSQS2 i OepSQS3 mogą znajdować się w ER, natomiast OepSQS4 może być zlokalizowane w chloroplastach. Ponadto oprogramowanie TargetP wykryło w sekwencji OepSQS4 peptyd tranzytowy N-końcowy o cechach charakterystycznych dla peptydów kierujących do chloroplastów ([ryc. 2](#)), z przewidywanym miejscem rozszczepienia po Glu w reszcie 50. Eksperymentalna lokalizacja białka SQS roślin nie tylko została głównie opisana w ER^{(15) (37) (39)} ale również zlokalizowana w cytoplazmie,^{(39) (40)} jądrze komórkowym⁽³⁹⁾ i błonie komórkowej.⁽³⁵⁾

W celu zbadania relacji filogenetycznych SQS oliwki wygenerowano nieukorzone drzewo filogenetyczne oparte na wynioskowanych sekwencjach aminokwasowych znanych i scharakteryzowanych SQS roślin ([ryc. S3](#)). Zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami⁴¹ analiza filogenetyczna wykazała, że sekwencje SQS składały się z kilku odrębnych klastrow gałęzi, które towarzyszyły rozbieżnościom gatunkowym

spożywczej

, które można było pogrupować w cztery linie: paprocie, rośliny nagonasienne, rośliny jednoliścienne i rośliny dwuliścienne. Związki przedstawione na drzewie filogenetycznym odpowiadały zatem ich klasyfikacji taksonomicznej. Sekwencje SQS oliwki były umiejscowione bardzo blisko siebie, w kładzie wraz z innymi SQS z roślin dwuliściennych. Co ciekawe, OepSQS4 znalazł się w znacznej odległości ewolucyjnej w stosunku do innych SQS roślin.

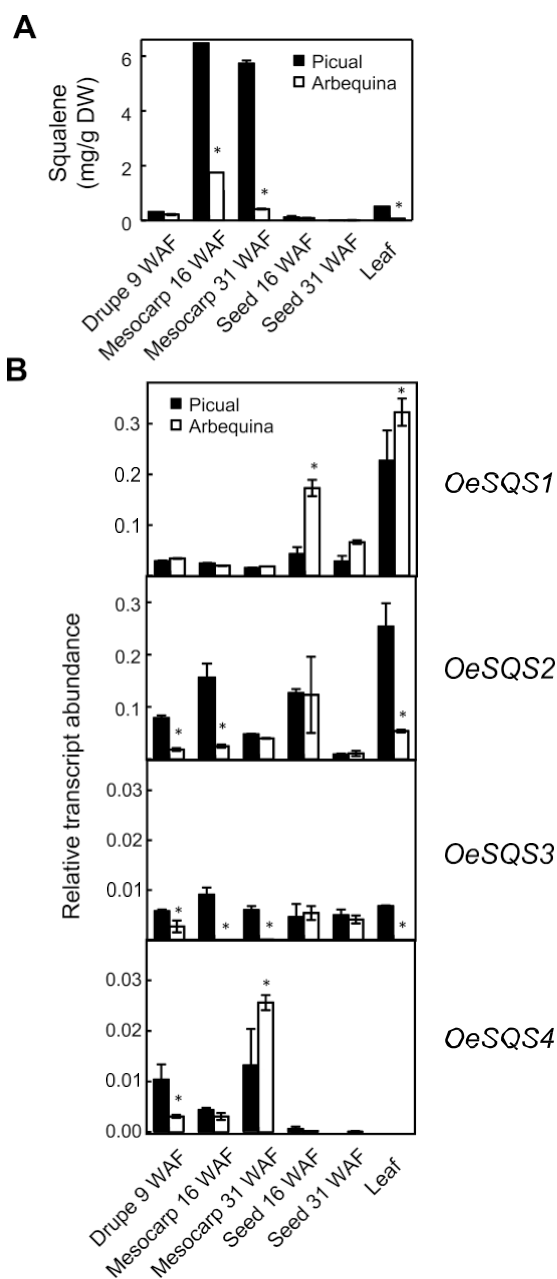
Funkcjonalna ekspresja genów syntazy skwalenu oliwkowego w *E. coli*. Aby potwierdzić funkcjonalną tożsamość czterech genów SQS oliwki, odpowiednie regiony kodujące, z wyłączeniem sekwencji sygnału retencji C-końcowego ER dla OepSQS1, OepSQS2 i OepSQS3 lub peptyd sygnałowy chloroplastu N-końcowego w przypadku OepSQS4 (ryc. 2), umieszczono pod kontrolą promotora indukowanego IPTG wektora ekspresji *E. coli*. Doniesiono, że usunięcie C-końcowego regionu hydrofobowego może zwiększyć rozpuszczalną ekspresję rekombinowanego SQS⁽⁴¹⁾. Komórki bakteryjne zawierające cztery konstrukcje nadekspresji oliwkowego SQS hodowane w temperaturze 22 °C przez 20 godzin wyrażały odpowiednie białka. Aby zweryfikować, czy te cztery polipeptydy były produktami genu SQS, uzyskane surowe ekstrakty bakteryjne wykorzystano do przeprowadzenia testu aktywności SQS *in vitro*. Analiza produktu reakcji przeprowadzona metodą GC wykazała obecność nowego pik o czasie retencji identycznym jak w przypadku skwalenu, który był nieobecny w teście aktywności kontrolnej bez indukcji IPTG (ryc. 3). Analiza GC-MS wykazała, że nowy pik odpowiada skwalenowi (ryc. S4). W związku z tym cztery geny SQS oliwki zostały zidentyfikowane funkcjonalnie, ponieważ kodują one enzym katalizujący syntezę skwalenu z dwóch cząsteczek FPP w obecności NADPH i Mg⁽²⁺⁾.

Specyficzność tkankowa genów syntazy skwalenu oliwki.

Aby zbadać fizjologiczną funkcję czterech genów SQS oliwki, przeanalizowaliśmy zawartość skwalenu i poziomy transkrypcji SQS w różnych organach i tkankach oliwki pochodzących z dwóch głównych odmian uprawianych do produkcji oleju: „Picual” i „Arbequina” (ryc. 4). Bardzo niskie poziomy skwalenu stwierdzono w młodych pestkowcach, rozwijających się nasionach lub liściach (ryc. 4A). Natomiast mezokarp wykazywał najwyższą zawartość skwalenu w porównaniu z pozostałymi tkankami, przy czym zawartość ta była wyższa w odmianie „Picual” niż w odmianie „Arbequina” (ryc. 4A).

Jak pokazano na rysunku 4B, OeSQS1 i OeSQS2 wykazywały znacznie wyższy poziom ekspresji niż OeSQS3 i OeSQS4 we wszystkich analizowanych tkankach. W szczególności OeSQS1 wykazywał najwyższy poziom transkrypcji w młodych nasionach odmiany „Arbequina” i liściach obu odmian, natomiast OeSQS2 był silnie ekspresjonowany w młodych nasionach odmian „Picual” i „Arbequina”, a także w liściach, młodych pestkowcach i mezokarpie odmiany „Picual”. Wysoki poziom ekspresji genów SQS1 i SQS2 oliwki wykryty w liściach może być związany z akumulacją fitosteroli i triterpenów w tej tkance, ponieważ nie stwierdzono korelacji między poziomem transkrypcji SQS a zawartością skwalenu w liściach oliwki (ryc. 4). W przypadku OeSQS3 stwierdzono niski poziom ekspresji we wszystkich badanych tkankach, z wyjątkiem mezokarpu i liści odmiany „Arbequina”, gdzie nie wykryto transkrypcji. Wreszcie, transkrypty OeSQS4 zaobserwowano w młodych pestkowcach i mezokarpie, natomiast były one prawie niewykrywalne w nasionach i liściach. Wszystkie te dane wskazują na przestrzenną regulację genów SQS w oliwkach, biorąc pod uwagę, że były one różnie ekspresjonowane we wszystkich badanych organach i tkankach.

Wzorec ekspresji SQS w tkankach jest bardzo zróżnicowany i zależy od gatunku. Wysokie poziomy transkryptów SQS odnotowano

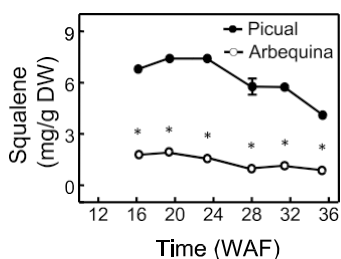


Rysunek 4. Zawartość skwalenu (A) i względna liczebność transkryptów genów SQS oliwki (B) w różnych tkankach odmian „Picual” i „Arbequina”. Ilość skwalenu została określona ilościowo metodą GC, a względną liczebność transkryptów określono metodą qRT-PCR w wskazanych tkankach, zgodnie z opisem w sekcji **Materiały i metody**. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych. Gwiazdka oznacza istotną różnicę ($P < 0,05$) w stosunku do odmiany „Picual” w dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post hoc Bonferroniego w tkankach odmiany „Arbequina”.

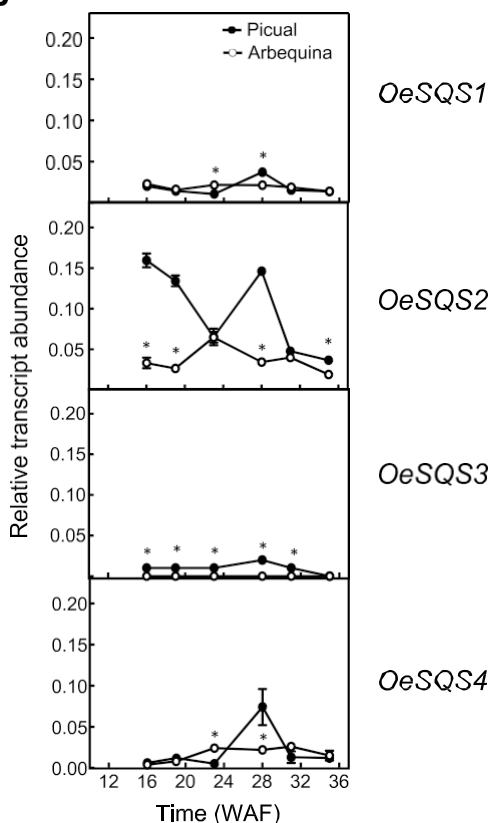
wykryty w młodych tkankach, takich jak liście *Betula platyphylla*,⁴⁰ w organach zawierających dzielące się komórki, takich jak korzenie roślin strączkowych, jak w przypadku *Medicago sativa*,³⁵ oraz w organach bogatych w fitosterole i/lub triterpenoidy, takich jak korzenie roślin leczniczych, w tym żeń-szenia.⁴²

Ekspresja genów syntazy skwalenu w owocach oliwki w odniesieniu do zawartości skwalenu w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia. Zawartość skwalenu w nasionach odmian „Picual” i „Arbequina” (ryc. SSA) była znacznie niższa niż w mezokarpie (ryc. SA). Zgodnie z tym

A



B



Rysunek 5. Zawartość skwalenu (A) i względna liczebność transkryptów genów SQS oliwki (B) w tkance mezokarpu odmian „Picual” i „Arbequina” podczas rozwoju i dojrzewania owoców oliwki. W wskazanych momentach ilość skwalenu została określona ilościowo metodą GC, a względna liczebność transkryptów została określona metodą qRT-PC, jak opisano w sekcji **Materiały i metody**. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych. Gwiazdka oznacza istotną różnicę ($P < 0,05$) w stosunku do odmiany „Picual” w dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post hoc Bonferroniego w odmianie „Arbequina”.

Na podstawie danych uzyskanych przy użyciu oliwy z oliwek (ryc. 1B) stwierdzono, że zawartość skwalenu była wyższa w mezokarpie odmiany „Picual” w porównaniu z odmianą „Arbequina” (ryc. 5A). Było to oczekiwane, ponieważ udział tkanki mezokarpu w ostatecznym składzie oliwy z oliwek jest znacznie wyższy niż udział nasion⁽⁴³⁾.

Stopniowy spadek zawartości skwalenu zaobserwowano również w tkankach nasion i mezokarpu obu odmian podczas rozwoju i dojrzewania owoców (rysunek 5SA i rysunek 5A). Podobne wyniki odnotowano w przypadku innych odmian, takich jak „Chemlali” i „Oueslati”.⁽⁴⁴⁾ Spadek zawartości skwalenu w owocach oliwki można przypisać nie tylko jego przemianie w inne związki, takie jak sterole i triterpeny, ale także jego

działaniu przeciwutleniającym w reakcjach utleniania, które rozpoczęły się w dojrzałych owocach oliwek.³¹

Co ciekawe, spadek wykryty w tkankach odmian „Picual” i „Arbequina” nie był tak silny, jak ten zaobserwowany w odpowiednich oliwach z oliwek (rysunek 1B). Fakt ten można wyjaśnić tym, że stężenie skwalenu w oliwach zależy nie tylko od zmniejszonej zawartości skwalenu w owocach oliwki, ale także od efektu rozcieńczenia spowodowanego zwiększoną akumulacją oliwy w owocach.³⁰

Następnie dokładniej zbadano poziomy ekspresji genów SQS oliwki w owocach oliwki, z których pozyskuje się oliwę z oliwek z pierwszego tłoczenia, aby zidentyfikować, który z nich jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zawartość skwalenu w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia. W szczególności przeanalizowano nasiona i tkanki mezokarpu podczas rozwoju i dojrzewania owoców oliwki z odmian „Picual” i „Arbequina”.

W przypadku rozwijających się nasion (ryc. 5SB) poziomy transkrypcji *OeSQS4* były prawie niewykrywalne w obu odmianach, podczas gdy geny *OeSQS1*, *OeSQS2* i *OeSQS3* wykazywały wyższe poziomy ekspresji. W przypadku odmiany „Picual” te trzy geny SQS osiągnęły szczyt w 23 tygodniu po owocowaniu, natomiast w przypadku odmiany „Arbequina” wykryto spadek transkryptów *OeSQS1* i *OeSQS2* we wczesnych stadiach rozwoju, a także stały i bardzo niski poziom w przypadku *OeSQS3* podczas całego okresu rozwoju i dojrzewania.

Ekspresję genów SQS w nasionach odnotowano również w przypadku innych roślin, takich jak herbata, żeń-szeń i soja.^{38,42,45} W przypadku nasion amarantusa, które gromadzą duże ilości skwalenu, zaobserwowano niskie poziomy transkryptów SQS w początkowych stadiach rozwoju, które gwałtownie wzrosły w środkowej i późnej fazie rozwoju, a następnie spadły w późnych stadiach.⁴⁶

Podobne badania przeprowadzono w przypadku mezokarpu oliwki (ryc. 5B). Analiza ekspresji genów SQS w mezokarpie odmian „Picual” i „Arbequina” wykazała, że najwyższy poziom transkrypcji odnotowano dla genu *OeSQS2*, przy czym poziom ten był wyższy w mezokarpie odmiany „Picual” niż w mezokarpie odmiany „Arbequina”. Ponadto wzorzec ekspresji genu *OeSQS2* podczas rozwoju i dojrzewania mezokarpu był różny w obu odmianach. W odmianie „Picual” gen *OeSQS2* wykazywał wysokie poziomy transkrypcji na początku rozwoju owoców, po czym następowało ich obniżenie, a następnie szczyt w 28 tygodniu po kwitnieniu (faza obrotu) i kolejne obniżenie pod koniec okresu dojrzewania. W przypadku odmiany „Arbequina” zaobserwowano bardziej ciąglej poziom ekspresji w całym okresie rozwoju i dojrzewania. Jeśli chodzi o geny *SQS1*, *SQS3* i *SQS4* oliwki, wszystkie wykazywały niskie i stałe poziomy transkrypcji w obu odmianach, z wyjątkiem *OeSQS4* w odmianie „Picual” w 28 tygodniu po kwitnieniu, gdzie wykryto szczyt. Wszystkie te dane wskazują, że w owocach oliwek ekspresja genów SQS wydaje się być regulowana czasowo w okresie rozwoju i dojrzewania. W przypadku innych owoców opisano spadek poziomu transkrypcji SQS podczas rozwoju i dojrzewania owoców persymony⁽⁴⁷⁾.

W przypadku oliwek wyższy poziom ekspresji wykryty dla *OeSQS2* w mezokarpie odmiany „Picual” jest zgodny z wyższą zawartością skwalenu obserwowaną w tej odmianie w porównaniu z odmianą „Arbequina”. Wynik ten, w połączeniu z faktem, że gen ten wykazał najwyższy poziom transkrypcji spośród genów SQS oliwek w tkance mezokarpu, wskazuje, że *OeSQS2* wydaje się być genem, który w głównym stopniu przyczynia się do biosyntezy skwalenu w mezokarpie oliwki.

Aby potwierdzić tę hipotezę, nasze badania rozszerzono na inne odmiany oliwek charakteryzujące się niską („Dokkar”) i wysoką („Klon-14”) zawartością skwalenu (ryc. 1A) przy użyciu tkanek mezokarpu odpowiadających czterem różnym reprezentatywnym etapom

spożywczej

rozwoju i dojrzewania owoców (ryc. S6). Podobnie jak w przypadku odmian „Picual” i „Arbequina”, geny *SQS1*, *SQS3* i *SQS4* oliwek w odmianach „Dokkar” i „Klon-14” wykazywały bardzo niski poziom transkrypcji w porównaniu z *OeSQS2* (ryc. S6B), co potwierdza, że gen ten jest głównym odpowiedzialnym za biosyntezę skwalenu w mezokarpie oliwek. Nie stwierdzono jednak wyraźnej korelacji między zawartością skwalenu (ryc. S6A) a poziomami transkrypcji *OeSQS2* podczas rozwoju i dojrzewania owoców odmian „Dokkar” i „Klon-14”. Dane te sugerują, że nie tylko *SQS*, ale także inne enzymy, takie jak epoksydaza skwalenowa, która przekształca skwalen w 2,3-oksydoskwalen przed biosyntezą steroli⁽¹³⁾, mogą mieć wpływ na zawartość skwalenu w mezokarpie oliwki, a tym samym w oliwie z oliwek.

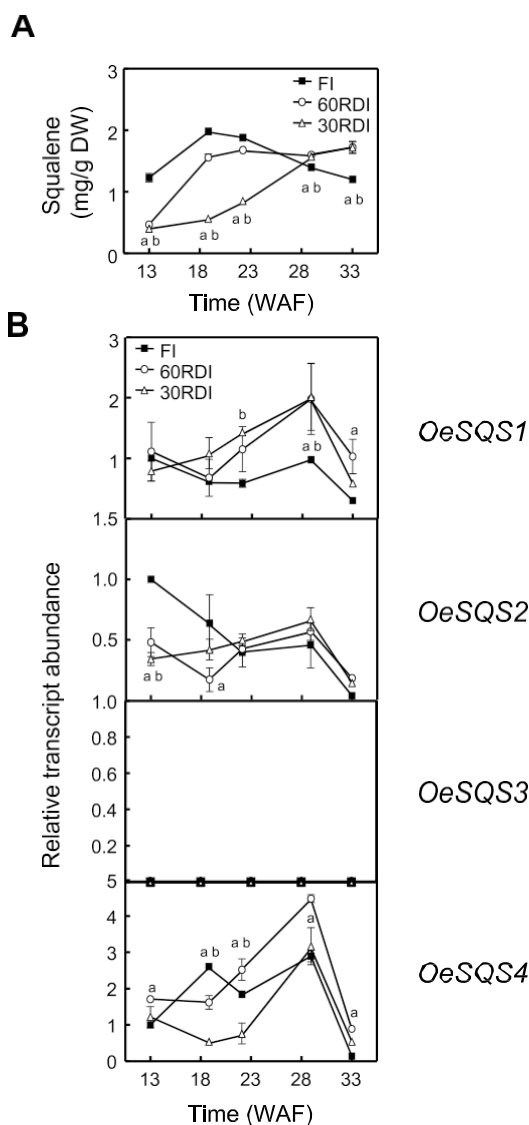
Wpływ regulowanego niedoboru nawadniania na ekspresję genu syntazy skwalenu w mezokarpie owoców oliwki.

Wpływ różnych systemów nawadniania na zawartość skwalenu w oliwie z oliwek był już wcześniej badany, a wyniki różniły się w zależności od odmiany. W przypadku odmiany „Chétoui” odnotowano zwiększoną zawartość skwalenu w oliwach uzyskanych w warunkach nawadniania deszczowego⁽⁴⁸⁾. Natomiast zawartość skwalenu była niższa w oliwach z drzew oliwnych odmian „Barnea” i „Souri”, które były nawadniane w najmniejszym stopniu.⁴⁹ W niniejszym badaniu zawartość skwalenu w tkance mezokarpu była niższa w owocach odmian „Picual” i „Arbequina” uprawianych w warunkach nawadniania deszczowego, zwłaszcza w przypadku odmiany „Picual” (ryc. S7).

W wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez naszą grupę²⁰ zbadano wpływ trzech różnych metod RDI na akumulację oleju, profil kwasów tłuszczowych i poziom ekspresji genów desaturazy kwasów tłuszczowych w mezokarpie owoców odmiany „Arbequina”. Jednak dane dotyczące wpływu stresu wodnego na zawartość skwalenu i poziom ekspresji genów oliwek zaangażowanych w biosyntezę skwalenu nie zostały jeszcze opublikowane. W niniejszym badaniu zaobserwowano zmniejszenie zawartości skwalenu w mezokarpie w fazie zielonej (13–19 WAF) i żółtawej (22 WAF) rozwoju owoców w mezokarpie odmiany „Arbequina” z oliwek poddanych zabiegom 30RDI i 60RDI, które spowodowały znaczny stres wodny, w porównaniu z zabiegiem FI (ryc. 6A). Zgodnie z tymi wynikami, w fazie zielonej owoców poddanych niedoborowi nawadniania wykryto niższe poziomy ekspresji *OeSQS2* (ryc. 6B), co dodatkowo potwierdza główną rolę tego genu w biosyntezie skwalenu w mezokarpie owoców oliwki. Natomiast gen *OeSQS1* wykazywał ciągłą regulację w górę poziomów transkrypcji w mezokarpie odmiany „Arbequina” poddanej stresowi wodnemu, co koreluje z utrzymującym się wzrostem zawartości skwalenu obserwowanym w owocach poddanych tym samym zabiegom podczas rozwoju i dojrzewania. Z drugiej strony, geny *OeSQS3* i *OeSQS4* wykazywały bardzo niskie i stałe poziomy ekspresji lub zmiany w tych poziomach, które nie korelują dobrze z ilością skwalenu w odpowiednich owocach poddanych stresowi wodnemu.

W związku z tym wydaje się, że biosynteza skwalenu jest regulowana transkrypcyjnie w mezokarpie oliwek poddanych stresowi wodnemu, przy czym geny *OeSQS1* i *OeSQS2* zwiększają i zmniejszają swoje poziomy ekspresji odpowiednio pod koniec i na początku rozwoju owoców. W rezultacie ilość skwalenu zmniejszyła się w mezokarpie odmiany „Arbequina” poddanej niedostatecznemu nawadnianiu w fazie zielonej z powodu obniżenia ekspresji genu *OeSQS2*, a następnie powróciła do normy dzięki wzrostowi transkrypcji genu *OeSQS1*, osiągając zawartość skwalenu podobną do tej obserwowanej w mezokarpie poddanej pełnemu nawadnianiu w okresie dojrzewania.

Zgłaszano obniżenie poziomu ekspresji genów *SQS* u roślin soi w warunkach niedoboru wody⁴⁵, co jest zgodne z negatywnym wpływem suszy



Rysunek 6. Wpływ regulowanych zabiegów niedostatecznego nawadniania na zawartość skwalenu (A) i względną liczebność transkryptów genów *SQS* oliwki (B) w tkance mezokarpu odmiany „Arbequina” podczas rozwoju i dojrzewania owoców oliwki. W wskazanych momentach ilość skwalenu została określona ilościowo za pomocą GC, a względną liczebność transkryptów określono za pomocą qRT-PCR, jak opisano w sekcji **Materiały i metody**. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z trzech powtórzeń biologicznych. Indeksy a i b wskazują na istotną różnicę ($P < 0,05$) odpowiednio w 60RDI i 30RDI w stosunku do FI w dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post hoc Bonferroni.

adaptacja odnotowana w przypadku ryżu dla *SQS*, gdy konstytutywne wyciszenie *SQS* ryżu przy użyciu metody RNAi spowodowało poprawę tolerancji na niedobór wody.⁵⁰ Natomiast wzrost poziomu transkrypcji *SQS* opisano w innych roślinach poddanych stresowi suszy, takich jak liście jabłoni.³⁷ Sugeruje się, że w warunkach stresu wodnego ekspresja *SQS* może być indukowana w celu potencjalnej zmiany składu błony komórkowej, ponieważ zawartość fitosteroli i triterpenów wpływa na płynność i stabilność błony komórkowej w zależności od fluktuacji osmotycznej.³⁷

Podsumowując, zawartość skwalenu wykazuje dużą zmienność w oliwach z oliwek pochodzących z kolekcji odmian oliwek Core-36. Ponadto przeprowadzono izolację i charakterystykę czterech genów *SQS* oliwek. Analiza sekwencji tych genów (*OepSQS1*, *OepSQS2*, *OepSQS3* i *OepSQS4*)

spożywczej

pokazuje, że kodują one enzymy SQS. Tożsamość genów SQS została potwierdzona poprzez ekspresję funkcjonalną w bakteriach. Analiza ekspresji genów ujawnia przestrzenną i czasową regulację poziomów transkrypcji SQS w owocach oliwki w trakcie rozwoju i dojrzewania oraz wskazuje, że ekspresja genów SQS oliwki jest zależna od odmiany. Ponadto dane transkrypcyjne z odmian „Picual” i „Arbequina”, wraz z danymi uzyskanymi z dwóch odmian o bardzo zróżnicowanej zawartości skwalenu, takich jak „Dokkar” (niska) i „Klon-14” (wysoka), sugerują, że *OeSQS2* wydaje się być genem, który głównie przyczynia się do biosyntezy skwalenu w mezokarpie oliwki, a zatem w oliwie z oliwek. Ekspresja genów *OeSQS1* i *OeSQS2* w owocach oliwki „Arbequina” jest regulowana przez stan nawodnienia, co pozwala zachować zawartość skwalenu w fazie dojrzewania niezależnie od warunków wodnych. Badanie to stanowi znaczący postęp w wiedzy na temat regulacji biosyntezy skwalenu w owocach oliwki. Ponadto informacje te pozwolą na stworzenie markerów molekularnych do selekcji nowych odmian oliwek o zwiększonej zawartości skwalenu w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia.

POWIĄZANE TREŚCI**Informacje dodatkowe**

Informacje uzupełniające są dostępne bezpłatnie na stronie <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.3c05322>.

Przewidywany TMD dla sekwencji SQS oliwki (rysunek S1), wykres hydropatii przewidywanych sekwencji aminokwasowych SQS oliwki (rysunek S2), analiza drzewa filogenetycznego syntaz skwalenu roślinnego (rysunek S3), widmo masowe pików dla autentycznego skwalenu i skwalenu syntetyzowanego przez SQS oliwki (rysunek S4), zawartość skwalenu i względna liczebność transkryptów genów SQS oliwki w tkance nasion odmian „Picual” i „Arbequina” (rysunek S5), zawartość skwalenu i względna liczebność transkryptów genów SQS oliwki w tkance mezokarpu odmian „Dokkar” i „Klon-14” (rysunek S6), wpływu reżimu wodnego na zawartość skwalenu w tkance mezokarpu (rysunek S7), sekwencji par starterów użytych do analizy ekspresji genów metodą qRT-PCR (tabela S1), sekwencji par starterów użytych do amplifikacji sekwencji kodujących oliwkowe SQS w celu ich funkcjonalnej ekspresji w *E. coli* (tabela S2) oraz numerów dostępu różnych SQS uwzględnionych w analizie drzewa filogenetycznego (tabela S3) (PDF)

INFORMACJE O AUTORZE**Autor korespondencyjny**

José M. Martínez-Rivas – *Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania; orcid.org/0000-0003-4298-1014; Telefon: +34 954611550; E-mail: mrivas@ig.csic.es*

Autorzy

M. Luisa Hernández – *Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania; Aktualny adres: Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular/Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Universidad de Sevilla-CSIC). Avda. Americo Vespucio, 49, 41092 Sevilla, Hiszpania (M.L.H.)*

Cristina Muñoz-Ocaña – *Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania*
Pilar Posada – *Instytut Tłuszczów (IG-CSIC), Kampus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania*
M. Dolores Sicardo – *Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania*
Dámaso Hornero-Méndez – *Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania; orcid.org/0000-0002-1781-5703*
Raquel B. Gómez-Coca – *Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania; orcid.org/0000-0002-6925-8232*
Angelina Belaj – *IFAPA Centro Alameda del Obispo, 14080 Kordoba, Hiszpania*
Wenceslao Moreda – *Instituto de la Grasa (IG-CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, 41013 Sevilla, Hiszpania*

Pełne dane kontaktowe są dostępne pod adresem:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.3c05322>

Wkład autorów

M.L.H. zarządził i przeprowadził zbiór materiału roślinnego, przeprowadził izolację RNA i syntezę cDNA oraz przeanalizował dane. C.M.-O. i P.P. przeprowadzili klonowanie genów i analizę qRT-PCR. C.M.-O. przeprowadził test ekspresji funkcjonalnej i aktywności. M.D.S. przeprowadził zbiór materiału roślinnego, oznaczenie skwalenu i analizę qRT-PCR. D.H.-M., R.B.G.-C. i W.M. przeprowadzili analizę skwalenu. A.B. przyczynił się do wyboru i zebrania materiału roślinnego. J.M.M.-R. opracował koncepcję i projekt badania oraz napisał manuskrypt. Wszyscy autorzy omówili, skomentowali i zatwierdzili ostateczną wersję manuskryptu.

Finansowanie

Praca została sfinansowana przez hiszpańskie Ministerstwo Nauki, Innowacji i Uniwersytetów w ramach grantu badawczego AGL2017-87871-R (AEI/FEDER, UE).

Uwagi

Autorzy oświadczają, że nie mają żadnych konkurencyjnych interesów finansowych.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy A. Pérezowi za analizę GC-MS oraz J.E. Fernándezowi i A. Díaz-Espejo za udostępnienie gaju oliwnego Sanabria w celu zebrania próbek owoców oliwek poddanych różnym zabiegom nawadniania.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Escribá, E.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Sánchez-Rovira, P.; Colomer, R.; Solanas, M.; Gaforio, J. J. Oliwa z oliwek w profilaktyce i progresji nowotworów. *Nutr. Rev.* **2006**, *64*, 40–52.
- (2) Aparicio, R.; Harwood, J. L. (2013). *Podręcznik oliwy z oliwek: analiza i właściwości*; wydanie drugie; Springer: Nowy Jork, USA, 2013.
- (3) Lozano-Grande, M. A.; Gorinstein, S.; Espitia-Rangel, E.; Dávila-Ortiz, G.; Martínez-Ayala, A. L. Źródła roślinne, metody ekstrakcji i zastosowania skwalenu. *Int. J. Agron.* **2018**, nr 1829160, DOI: [10.1155/2018/1829160](https://doi.org/10.1155/2018/1829160).
- (4) Psomiadou, E.; Tsimidou, M. Stabilność oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia. 2. Badania fotoooksydacji. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 722–727.
- (5) Manzi, P.; Panfili, G.; Esti, M.; Pizzoferrato, L. Naturalne przeciwutleniacze w frakcji niezmylejającej się oliwy z oliwek z różnych odmian. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 115–120.

spożywczej

(6) Chiou, A.; Kalogeropoulos, N.; Salta, F. N.; Efstathiou, P.; Andrikopoulos, N. K. Smażenie frytek na trzech różnych olejach jadalnych wzbogaconych ekstraktem z liści oliwnych: stabilność oksydacyjna i losy mikroskładników. *LWT–Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1090–1097.

(7) Naziri, E.; Mantzouridou, F.; Tsimidou, M. Z. Zasoby i zastosowania skwalenu wskazują na potencjał biotechnologii. *Lipid Technol.* **2011**, *23*, 270–273.

(8) Micera, M.; Botto, A.; Geddo, F.; Antoniotti, S.; Berte, C. M.; Levi, R.; Gallo, M. P.; Querio, G. Skwalen: więcej niż krok w kierunku steroli. *Antioxidants* **2020**, *9*, 688.

(9) Kim, S.-K.; Karadeniz, F. Znaczenie biologiczne i zastosowania skwalenu i skwalanów. *Adv. Food Nutr. Res.* **2012**, *65*, 223–233.

(10) Bondioli, P.; Mariani, C.; Lanzani, A.; Dedeli, E.; Muller, A. Odzyskiwanie skwalenu z destylatów dezodoryzujących oliwę z oliwek. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 763–766, DOI: 10.1007/BF02542597.

(11) Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M.; Schwender, J. Dwie niezależne ścieżki biochemiczne biosyntezy difosforanu izopentenylowego i izoprenoidów w roślinach wyższych. *Physiol. Plant.* **1997**, *101*, 643–652, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01049.x.

(12) Pandit, J.; Danley, D. E.; Schulte, G. K.; Mazzalupo, S.; Pauly, T. A.; Hayward, C. M.; Hamanaka, E. S.; Thompson, J. F.; Harwood, H. J. Struktura krystaliczna ludzkiej syntazy skwalenu. Kluczowy enzym w biosyntezie cholesterolu. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30610–30617.

(13) Spanova, M.; Daum, G. Skwalen – biochemia, biologia molekularna, biotechnologia procesowa i zastosowania. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 1299–1320.

(14) Kribbi, R.; Arró, M.; del Arco, A.; González, V.; Balcels, L.; Delourme, D.; Boronat, A. Klonowanie i charakterystyka genu *SQS1 Arabidopsis thaliana* kodującego syntazę skwalenu. Udział regionu C-końcowego enzymu w kierowaniu skwalenu przez szlak sterolowy. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 61–69, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00061.x.

(15) Busquets, A.; Keim, V.; Closa, M.; del Arco, A.; Boronat, A.; Arró, M.; Ferrer, A. *Arabidopsis thaliana* zawiera pojedynczy gen kodujący syntazę skwalenu. *Plant Mol. Biol.* **2008**, *67*, 25–36.

(16) Beltrán, G.; Bucheli, M. E.; Aguilera, M. P.; Belaj, A.; Jiménez, A. Skwalen w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia: badanie zmienności w odmianach oliwek. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, *118*, 1250–1253.

(17) Velasco, L.; Fernandez-Cuesta, A.; de la Rosa, R.; Ruiz-Mendez, M. V.; Leon, L. Selekcja niektórych składników wpływających na jakość oliwy z oliwek poprzez analizę miąższu owoców. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, *91*, 1731–1736, DOI: 10.1007/s11746-014-2523-1.

(18) Belaj, A.; Dominguez-Garcia, M. C.; Atienza, S. G.; Martin-Urdiroz, N.; de la Rosa, R.; Satovic, Z.; Martin, A.; Kilian, A.; Trujillo, I.; Valpuesta, V.; del Rio, C. Opracowanie podstawowej kolekcji oliwek (*Olea europaea* L.) w oparciu o markery molekularne (DArTs, SSRs, SNPs) i cechy agronomiczne. *Tree Genet. Genomes* **2012**, *8*, 365–378.

(19) Hernández, M. L.; Sicardo, M. D.; Belaj, A.; Martínez-Rivas, J. M. Stosunek kwasu oleinowego do linolowego w mezo-karpie owoców oliwki (*Olea europaea* L.) jest kontrolowany głównie przez geny *OeFAD2-2* i *OeFAD2-5* wraz z różną specyfiką enzymów acylotransferazy pozaplastydowej. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, nr 653997.

(20) Hernández, M. L.; Velázquez-Palmero, D.; Sicardo, M. D.; Fernández, J. E.; Díaz-Espejo, A.; Martínez-Rivas, J. M. Wpływ strategii regulowanego nawadniania deficytowego w sadzie oliwnym „Arbequina” na skład kwasów tłuszczowych mezo-karpu i ekspresję genów desaturazy w odniesieniu do jakości oliwy z oliwek. *Agric. Water Manag.* **2018**, *204*, 100–106.

(21) Muñoz-Mérida, A.; González-Plata, J. J.; Cañada, A.; Blanco, A. M.; García-López, M. C.; Rodríguez, J. M.; i in. *De novo* assembly and functional annotation of the olive (*Olea europaea*) transcriptome. *DNA Res.* **2013**, *20*, 93–108, DOI: 10.1093/dnares/dss036.

(22) Unver, T.; Wu, Z.; Sterck, L.; Turkas, M.; Lohaus, R.; Li, Z.; Van de Peer, Y.; i in. Genom dzikiej oliwki i ewolucja biosyntezy oleju. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 9413–9422, DOI: 10.1073/pnas.1708621114.

(23) Hernández, M. L.; Mancha, M.; Martínez-Rivas, J. M. Klonowanie molekularne i charakterystyka genów kodujących dwa

mikrosomalnych desaturaz oleinianowych (*FAD2*) z oliwki. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1417–1426.

(24) Hernández, M. L.; Padilla, M. N.; Mancha, M.; Martínez-Rivas, J. M. Analiza ekspresji identyfikuje *FAD2-2* jako gen desaturazy oleinianowej oliwy, odpowiedzialny głównie za zawartość kwasu linolowego w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6199–6206, DOI: 10.1021/jf900678z.

(25) Hernández, M. L.; Sicardo, M. D.; Alfonso, M.; Martínez-Rivas, J. M. Regulacja transkrypcji genów desaturazy stearylowo-acylowej białka nośnikowego w odpowiedzi na stresy abiotyczne prowadzi do zmian w składzie nienasyconych kwasów tłuszczowych mezo-karpu oliwki. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 251 DOI: 10.3389/fpls.2019.00251.

(26) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analiza danych dotyczących względnej ekspresji genów przy użyciu ilościowego PCR w czasie rzeczywistym i metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.

(27) Pfaffi, M. W. Strategie kwantyfikacji w PCR w czasie rzeczywistym. W: *A-Z of Quantitative PCR*; Bustin, S. A., red.; International University Line: La Jolla, USA, 2004; str. 87–112.

(28) Ye, Y.; Wang, R.; Jin, L.; Shen, J.; Li, X.; Yang, T.; Chen, Y. Klonowanie molekularne i analiza różnicowej ekspresji genu syntazy skwalenu z *Dioscorea zingiberensis*, ważnej rośliny farmaceutycznej. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41*, 6097–6104, DOI: 10.1007/s11033-014-3487-9.

(29) Lanzón, A.; Guinda, A.; Albi, T.; de la Osa, C. Szybka metoda oznaczania skwalenu w olejach roślinnych. *Grasas Aceites* **1995**, *46*, 276–278.

(30) Fernandez-Cuesta, A.; Leon, L.; Velasco, L.; de la Rosa, R. Zmiany zawartości skwalenu i steroli związane z dojrzewaniem oliwek. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 1885–1889.

(31) Laroussi-Mezghani, S.; Le Dréau, Y.; Molinet, J.; Hammami, M.; Grati-Kamoun, N.; Artaud, J. Różnorodność biologiczna tunezyjskich oliw z oliwek z pierwszego tłoczenia: klasyfikacja pochodzenia odmianowego według ich składników ubocznych. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1087–1099.

(32) Vishwakarma, R. K.; Patel, K.; Sonawane, P.; Kumari, U.; Singh, S.; Ruby; Abbassi, S.; Agrawal, D. C.; Tsay, H.-S.; Khan, B. M. Gen syntazy skwalenu z ziela leczniczego *Bacopa monniera*: charakterystyka molekularna, ekspresja różnicowa, modelowanie porównawcze i badania dokowania. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2015**, *33*, 1675–1685.

(33) Huang, Z.; Jiang, K.; Pi, Y.; Hou, R.; Liao, Z.; Cao, Y.; Han, X.; Wang, Q.; Sun, X.; Tang, K. Klonowanie molekularne i charakterystyka genu cisowego kodującego syntazę skwalenu z *Taxus cuspidata*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 625–635.

(34) Gu, P.; Ishii, Y.; Spencer, T. A.; Shechter, I. Badania funkcji i struktury i identyfikacja trzech domen enzymatycznych zaangażowanych w aktywność katalityczną syntazy skwalenu w wątrobie szczura. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12515–12525.

(35) Kang, J.; Zhang, Q.; Jiang, X.; Zhang, T.; Long, R.; Yang, Q.; Wang, Z. Klonowanie molekularne i identyfikacja funkcjonalna genu kodującego syntazę skwalenu z lucerny (*Medicago sativa* L.). *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4499.

(36) Robinson, G. W.; Tsay, Y. H.; Kienle, B. K.; Smith-Monroy, C. A.; Bishop, R. W. Konserwatyzm między syntazami skwalenu u ludzi i grzybów: podobieństwa w budowie, funkcji i regulacji. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 2706–2717, DOI: 10.1128/mcb.13.5.2706-2717.1993.

(37) Navarro Gallón, S. M.; Elejalde-Palmett, C.; Daudu, D.; Liesecke, F.; Jullien, F.; Papon, N.; i in. Wywołane przez wirusa wyciszenie genów dwóch izoform syntazy skwalenu jabłoni (*Malus x domestica* L.) ma negatywny wpływ na biosyntezę fitosteroli, pigmentację plastydów i wzrost liści. *Planta* **2017**, *246*, 45–60.

(38) Fu, J. Y.; Liu, G. H.; Yang, M.; Wang, X. C.; Chen, X. L.; Chen, F.; Yang, Y. J. Izolacja i analiza funkcjonalna genu syntazy skwalenu w roślinie herbacianej *Camellia sinensis*. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *142*, 53–58.

(39) Wu, J.; Xu, R.; Lu, J.; Liu, W.; Yu, H.; Liu, M.; Li, J.; Yin, M.; Peng, H.; Zha, L. Klonowanie molekularne i charakterystyka funkcjonalna dwóch genów syntazy skwalenu w *Arctostaphylos lancea*. *Planta* **2022**, *255*, 8 DOI: 10.1007/s00425-021-03797-9.

spożywczej

- (40) Zhang, M.; Wang, S.; Yin, J.; Li, C.; Zhan, Y.; Xiao, J.; Liang, T.; Li, X. Klonowanie molekularne i analiza promotora genów syntazy skwalenu i epoksydazy skwalenu z *Betula platyphylla*. *Protoplasma* **2016**, *253*, 1347–1363.
- (41) Zha, L. P.; Liu, S.; Su, P.; Yuan, Y.; Huang, L. Q. Klonowanie, ekspresja prokariotyczna i analiza funkcjonalna syntazy skwalenu (SQS) w *Magnolia officinalis*. *Protein Expression Purif.* **2016**, *120*, 28–34.
- (42) Lee, M. H.; Jeong, J. H.; Seo, J. W.; Shin, C. G.; Kim, Y. S.; In, J. G.; Choi, Y. E. Zwiększona biosynteza triterpenów i fitosteroli w *Panax ginseng* nadekspresjonującym gen syntazy skwalenu. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 976–984, DOI: [10.1093/pcp/pch126](https://doi.org/10.1093/pcp/pch126).
- (43) Hernández, M. L.; Sicardo, M. D.; Martínez-Rivas, J. M. Różnicowy wpływ genów desaturazy kwasów tłuszczowych omega-3 w retikulum endoplazmatycznym i chloroplastach na zawartość kwasu linolenowego w owocach oliwki (*Olea europaea*). *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 138–151.
- (44) Ben Mansour, A.; Flamini, G.; Ben Selma, Z.; Le Dreau, Y.; Artaud, J.; Abdelhedi, R.; Bouaziz, M. Na jakość oliwy z oliwek duży wpływ mają odmiana, wskaźnik dojrzałości i część owocu: analiza chemometryczna substancji lotnych, kwasów tłuszczowych, skwalenu i parametrów jakościowych całych owoców, miąższu i olejów z nasion dwóch tunezyjskich odmian oliwek. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, *117*, 976–987.
- (45) Nguyen, H. T. M.; Neelakadan, A. K.; Quach, T. N.; Valliyodan, B.; Kuma, R.; Zhang, Z.; Nguyen, H. T. Charakterystyka molekularna genów syntazy skwalenu *Glycine max* w biosyntezie fitosteroli nasion. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *73*, 23–32, DOI: [10.1016/j.plaphy.2013.07.018](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.07.018).
- (46) Park, Y.-J.; Nemoto, K.; Minami, M.; Matsushima, K. Klonowanie molekularne, ekspresja i charakterystyka genu syntazy skwalenu z amarantusa zbożowego (*Amaranthus cruentus* L.). *Jpn. Agric. Res. Q.* **2016**, *50*, 307–317, DOI: [10.6090/jarq.50.307](https://doi.org/10.6090/jarq.50.307).
- (47) Zhou, C.; Zhao, D.; Sheng, Y.; Liang, G.; Tao, J. Klonowanie molekularne i ekspresja genów syntazy skwalenu i cyklazy 2,3-oksydaskwalenu w owocach persymony (*Diospyros kaki* L.). *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 1125–1132.
- (48) Baccouri, O.; Guerfel, M.; Baccouri, B.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Lercker, G.; Zarrouk, M.; Ben Miled, D. D. Skład chemiczny i stabilność oksydacyjna tunezyjskich jednoszczepowych oliw z oliwek z pierwszego tłoczenia w odniesieniu do dojrzewania owoców. *Food Chem.* **2008**, *109*, 743–754, DOI: [10.1016/j.foodchem.2008.01.034](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.034).
- (49) Ben-Gal, A.; Dag, A.; Basheer, L.; Yermiyahu, U.; Zipori, I.; Kerem, Z. Wpływ cykli owocowania na reakcję jakości oliwy z oliwek na nawadnianie. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11667–11675.
- (50) Manavalan, L. P.; Chen, X.; Clarke, J.; Salmeron, J.; Nguyen, H. T. Zakłócenie syntezy skwalenu za pośrednictwem RNAi poprawia tolerancję na suszę i plony ryżu. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 163–175.