

黄秋葵番茄红素 β -环化酶 *LCYB* 基因的克隆与分析

李永平, 陈敏氢, 朱海生, 温庆放, 刘建汀

(福建省农业科学院作物研究所/福建省农业科学院蔬菜研究中心/福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要:应用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆得到 cDNA 全长 1797 bp 的黄秋葵 (*Hibiscus esculentus* L.) 番茄红素 β -环化酶基因 *LCYB*, 开放阅读框 (ORF) 包含 1509 个碱基; 预测编码 503 个氨基酸, 理论分子量 (Mw) 为 56.288 kD, 等电点 (pI) 为 4.577; 编码的蛋白与陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.)、黄麻 (*Corchorus capsularis* L.) 和可可 (*Theobroma cacao* L.) 同源蛋白的相似性均在 88% 以上, 显示其高度的保守性, 将基因命名为 *HeLCYB*, GenBank 登录号为: KX257998。Motif Scan 分析显示, 蛋白氨基酸序列 88~481 位为 *HeLCYB* 保守结构域, 并在 88~113 位含有 1 个 FAD 结合域。通过荧光定量 PCR 分析表明, *HeLCYB* 基因在黄秋葵根、茎、叶、花和果实中均有表达; 叶片生长中以成熟叶中表达最高, 果实发育中以花后 7d 高表达。建立与优化了黄秋葵类胡萝卜素超高效液相检测体系, 结果显示黄秋葵中主要含有 β -胡萝卜素和叶黄素。 β -胡萝卜素在成熟叶中含量最高, 果实以花后 7 d 含量最高, 与 *HeLCYB* 基因的表达呈正相关。本研究揭示了 *HeLCYB* 基因表达和类胡萝卜素积累的特性, 为开展黄秋葵类胡萝卜素分子调控机制研究奠定了基础。

关键词:黄秋葵; 番茄红素 β -环化酶 *LCYB* 基因; 类胡萝卜素; UPLC

Cloning and Expression Analysis of a Lycopene Beta-cyclase Gene in *Hibiscus esculentus* L.

LI Yong-ping, CHEN Min-dong, ZHU Hai-sheng, WEN Qing-fang, LIU Jian-ting

(Crops Research Institute, Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013)

Abstract: In this study, a *LCYB* gene was cloned from *Hibiscus esculentus* L. by RT-PCR and RACE technique. The full-length cDNA sequence of *LCYB* was 1797 bp, which contained a 1509 bp open reading frame (ORF) that encoded 503 amino acids, with a predicted molecular weight (mol. wt) of 56.288 kD and a hypothetical isoelectric point (pI) of 4.577. It shared over 88% identity with the homologous proteins from *Gossypium hirsutum*, *Corchorus capsularis*, and *Theobroma cacao*, showing that it was highly conservative. This gene was named *HeLCYB* and the GenBank accession number was KX257998. Motif Scan analysis showed that *HeLCYB* protein had a conservative structure domain and a FAD binding domain in the position of 88-481 and 88-113 sites, respectively. Real-time PCR analysis revealed that *HeLCYB* expressed in different tissues of *Hibiscus esculentus* L., including roots, stems, leaves, flowers and fruits, and the level was the highest in mature leaves and 7 days after flowering during the process of leaf and fruit development, respectively. What's more, an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) method for the determination of *Hibiscus esculentus* L. carotenoid contents was explored. *Hibiscus esculentus* L. mainly contained lutein and β -carotene, and β -carotene contents was also the highest in mature leaves and 7 days

收稿日期: 2017-04-12 修回日期: 2017-06-23 网络出版日期: 2017-12-26

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171226.1515.028.html>

基金项目:福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2015R1026-9); 福建省农业科学院蔬菜科技创新团队 (STIT2017-1-2); 福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”项目 (YC2017-5); 国家大宗蔬菜产业技术体系 (CARS-23-G-53); 国家特色蔬菜产业技术体系 (CARS-24-G-07)

第一作者研究方向为蔬菜生物技术与育种研究。E-mail: 248937256@qq.com

通信作者: 朱海生, 研究方向为园艺植物生物技术与育种研究。E-mail: zhs0246@163.com

温庆放, 研究方向为蔬菜育种与栽培研究。E-mail: fjvrc@163.com

after flowering during the process of leaf and fruit development respectively, which probably related to the changes in *HeLCYB* genes expression. These results revealed the expression of *HeLCYB* gene and the accumulation characteristics of carotenoid contents, and provided a base for the study of carotenoid molecular regulation mechanism in *Hibiscus esculentus* L.

Key words: *Hibiscus esculentus* L.; Lycopene β -cyclase *LCYB* gene; carotenoid; UPLC

类胡萝卜素在叶绿体、有色体中合成,行使着植物的各种基本功能。在叶绿体中,类胡萝卜素起着光捕捉、光保护、光修复等作用^[1]。在有色体中,类胡萝卜素负责水果和鲜花的着色,艳丽的色彩可以引诱昆虫从而协助传播后代^[2]。类胡萝卜素能够改善人类健康,一些 β -环基团类胡萝卜素是维生素 A 的前体,服用维生素 A 补充剂能够使低龄儿童的全因死亡率大幅下降^[3-5]。另外,摄入富含类胡萝卜素的食物可以作为治疗心血管疾病、骨质疏松和前列腺癌等的潜在手段^[6-8]。因此,目前诸多研究都关注于类胡萝卜素的调控机制方面。

番茄红素 β -环化酶(*LCYB*, lycopene beta-cyclase)调控 β -胡萝卜素与含 β -环的胡萝卜素的生物合成,*LCYB* 编码的基因是基因工程改良植物类胡萝卜素含量的重要靶点^[9-10]。在白肉番茄 Beta 变种中,因为 *LCYB* 表达上调导致其 β -胡萝卜素含量远远超过野生种^[11];在红瓢西瓜中,*LCYB* 突变致使 β -环化酶的活性降低,引起番茄红素积累^[12];在黄肉番木瓜中,番茄红素全数被高水平的 *LCYB* 基因合成为 β -胡萝卜素^[13];萝卜中 *LCYB* 基因的沉默表达及过量表达分别能使 β -胡萝卜素的含量降低和升高^[14];在成熟的猕猴桃果实中,*LCYB* 的表达可调控 β -胡萝卜素含量^[15]。

黄秋葵(*Hibiscus esculentus* L.),秋葵属,原产于非洲东北部,世界栽培广泛,近年来,国内引进推广较快,栽培面积逐年增长。黄秋葵以食嫩果为主,含丰富蛋白质、维生素及矿物盐、糖聚合体等营养成分,是一种具有较高营养价值、保健功能的健康蔬菜^[16-17]。此外,黄秋葵植株生长量大,产量高,可达 90 t/hm²,叶片、茎秆中富含叶黄素、 β -胡萝卜素、粗纤维和粗蛋白,是良好的天然着色剂原料和植物蛋白饲料^[18]。本研究首次成功获得黄秋葵 *HeLCYB* 基因全长,分析了 *HeLCYB* 基因表达和类胡萝卜素积累特性,对揭示 *HeLCYB* 基因在黄秋葵类胡萝卜素合成中的作用具有重要理论意义,为开展黄秋葵类胡萝卜素分子调控机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料为红色黄秋葵品种、白色黄秋葵品种、绿色黄秋葵品种,由福建省农业科学院蔬菜研究中心提供。取 3 个品种的根、茎、叶(幼叶:叶龄 10 d,嫩叶:叶龄 20 d,成熟叶:叶龄 30 d,老叶:叶龄 50 d)、花、果(花后 1 d、花后 3 d、花后 5 d、花后 7 d、花后 10 d 的果实)存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

植物材料的总 RNA 采用通用植物总 RNA 提取试剂盒(百泰克生物技术有限公司)提取;RNA 的质量用凝胶电泳与紫外分光光度计检测;总 RNA 逆转录应用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa 公司)。

1.3 *HeLCYB* 基因序列的克隆

根据 GenBank 上陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、黄蜀葵(*Abelmoschus manihot* (L.) Medicus)^[19]、柿子(*Diospyros kaki*)、茄子(*Solanum lycopersicum*)的 *LCYB* 保守序列,设计一对简并引物 HB1-F(上游)、HB1-R(下游)(表 1),PCR 扩增黄秋葵嫩叶 cDNA。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,40 个循环;72 °C 延伸 10 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,目的片段经回收(美国 Omega 公司)、连接(载体 pMD18-T,宝生物工程有限公司)、转化(大肠杆菌 DH5 α ,宝生物工程有限公司)、蓝白斑筛选、PCR 鉴定、测序(上海生工生物工程有限公司),最后获得 *LCYB* 保守片段。

根据 *LCYB* 基因保守区克隆测序结果,设计 3' 端上游引物 HB-3'(表 1),与通用引物 AUAP(表 1)配对进行 PCR 扩增。

根据已获得的序列,设计了两个 5' 端下游引物 HB-5'-1 和 HB-5'-2(表 1)。以 HB-5'-1 为引物应用 Prime ScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(宝生物有限公司),合成 cDNA 第 1 链,随后加同聚物尾,合成 cDNA 第 2 链,产物作为扩增模板以 HB-5'-2 与 AUAP 配对进行 PCR 扩增。将扩增得到的 3' 和 5' Race 产物对比拼接。

表 1 黄秋葵 *HeLCYB* 基因克隆与表达的引物
Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of *HeLCYB* gene in *Hibiscus esculenta* L. Banks

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence | 作用 Function |
|---------------------|---------------------------------|--|
| AP | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)17-3' | 反转录引物 Reverse transcription primer |
| AAP | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(G)8-3' | 通用引物 Anchored primer |
| AUAP | 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' | |
| HB1-F | 5'-CCCCTTCCAGTGCTACCCCAA-3' | 保守区引物 For the conserved fragment |
| HB1-R | 5'-TCGTCCGAGATGCCATAGTTC-3' | |
| HB-3' | 5'-TCGTCCGAGATGCCATAGTTC-3' | 3'RACE 引物 3'RACE |
| HB-5'-1 | 5'-GCAAGAGTTCTTGCAACCATGTA-3' | 5'RACE 引物 5'RACE |
| HB-5'-2 | 5'-AGGGACCCACCCATCGGAATA-3' | 反转录引物 Reverse transcription primer |
| HeLCYB-F | 5'-CCATGGATACTTTACTTAGAAC-3' | 扩增开放阅读框引物 For the cDNA of ORF |
| HeLCYB-R | 5'-CTTATTCTCTATCCTGCACT-3' | |
| B2S | 5'-GAACTCTTCCTTTAGCCAACA-3' | 表达引物 For the expression of <i>HeLCYB</i> |
| B2X | 5'-AATGAAACCCAGCCACAA-3' | |
| NE-F | 5'-CTGAGAAACGGCTACCACAT-3' | 内参基因引物 For the internal control |
| NE-R | 5'-ACCCAAGGTCCAACCTACGAG-3' | |

在黄秋葵 *HeLCYB* 基因 cDNA 全长的基础上,设计一对其 ORF 扩增引物 HeLCYB-F、HeLCYB-R,用以验证已得序列。

1.4 *HeLCYB* 基因的生物信息学分析

应用 DNAMAN 6.0 用于引物设计、多序列比对;使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/0>) 在线软件分析蛋白一级结构;翻译后蛋白修饰运用 Motif Scan(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 在线分析;保守结构域运用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 软件分析;应用 bioxm 预测分子量、蛋白质的等电点;应用 SOMPA 软件分析蛋白二级结构;利用 SWISS-MODEL 在线软件进行蛋白 3D 结构建模;采用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) ClustalX 1.81 软件和 MEGA 4.0 软件构建进化树。

1.5 *HeLCYB* 基因的实时荧光定量分析

依据黄秋葵 *HeLCYB* 基因全长序列,应用 Primer Express 3.0 软件,遵照定量 PCR 引物设计的原则设计一对荧光定量特异引物 B2S 和 B2X(表 1),以黄秋葵 18s rRNA (GenBank: AF069229.1) 作为内参,设计内参引物 NE-F 和 NE-R(表 1)。应用 Power SYBR Green PCR Master Mix(美国,ABI)试剂盒进行实时定量 PCR 扩增(ABI7500)。25 μL 反应体系:12.5 μL Power SYBR Green PCR Master Mix,

1 μL cDNA,上、下引物各 0.5 μL(10 μmol/L),用双蒸水补充至 25 μL。反应程序:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s,56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,40 个循环。每个反应设 3 次重复,试验结果应用 ABI 7500 分析软件中 Comparative CT (ΔΔCT) 法分析。基因表达差异显著性分析使用 SPSS 软件。

1.6 类胡萝卜素提取和超高效液相色谱测定

液氮研磨样品,称取 2 g 粉末,用 50 mL 浸提剂(丙酮:石油醚=2:3)(含 0.1% BHT)混匀于 50 ℃ 下黑暗浸提,过滤采集上清液,重复上述操作直到渣变白,集中提取液,用旋转蒸发仪 40 ℃ 下蒸干,复溶于 20 mL 的石油醚(含 0.1% BHT)中,加 20 mL 皂化液 10% KOH-甲醇,放置过夜,样品经过洗涤,过滤并蒸干,最后用丙酮定容至 5 mL,氮储于 -70 ℃,超高效液相色谱(UPLC,ultra performance liquid chromatography)分析之前用 0.22 μm 的尼龙膜过滤。用 ACQUITY UPLC BEH C18 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm)(Waters, USA)分离、鉴别类胡萝卜素种类,流动相为乙腈甲醇(90:10 v/v),在 450 nm 下检测类胡萝卜素成分(叶黄素、番茄红素、β-胡萝卜素和 β-隐黄质)并用它们相应的标准曲线进行定量。类胡萝卜素总量为各个类胡萝卜素成分的总和,全部数据至少经过 3 次独立试验并用平均值 ± 标准差。

2 结果与分析

2.1 *HeLCYB* 基因克隆

应用简并引物 LCYB-F 和 LCYB-R, 以黄秋葵嫩叶总 RNA 逆转录的 cDNA 第 1 链作为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增得到一条与预期大小吻合的近 300 bp 的条带 (图 1A)。经回收、连接、转化、PCR 鉴定、测序, 测得该片段实际为 287 bp, 经 BLASTn 分析, 确认是黄秋葵 *HeLCYB* 基因的保守序列。

通过 3'RACE, 扩增得到 577 bp 的片段 (图

1B), 除去与保守区重叠区段与引物, 实际大小为 406 bp。经 NCBI 网站 BLAST 检索确认其为黄秋葵 *HeLCYB* 基因的 3'端序列。

根据 5'RACE 的原理, 扩增出了 5'端 1139 bp 的片段 (图 1C), 除保守区重叠区段实际为 1104 bp, 经 NCBI 网站 BLAST 核实其是黄秋葵 *HeLCYB* 基因的 5'端序列。

所得的 3'RACE、保守区和 5'RACE 的序列经比对拼接得一大小为 1797 bp 的全长序列, 含 1509 个碱基 (图 1D) 的完整开放阅读框 (ORF), 编码了 503 个氨基酸。

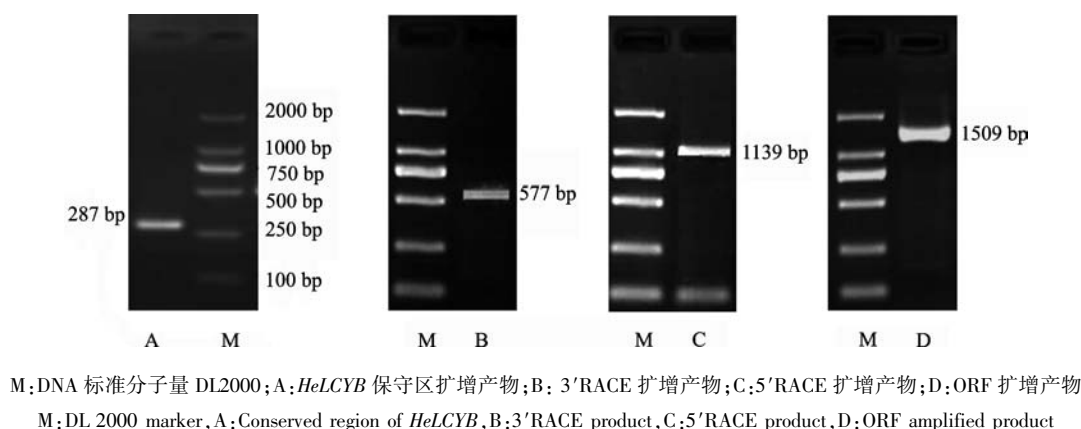


图 1 黄秋葵 *HeLCYB* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *HeLCYB* gene in *Hibiscus esculenta* L.

2.2 *HeLCYB* 基因序列的生物信息分析

序列分析显示, *HeLCYB* 具有一个 1509 bp 的完整 ORF, 编码区的 GC 含量占 41%, 预测编码 503 个氨基酸, 理论分子量 (M_w) 为 56.288 kD, 等电点 (pI) 为 4.577, pH = 7.0 时的带点荷数 (ch) 为 -8.306; 在构成该蛋白的 20 种氨基酸中, 亮氨酸 (Lue) 含量最高 (11.7%), 缬氨酸 (Val) 次之 (8.0%), 色氨酸 (Trp) 含量最低 (1.4%); 就氨基酸的特性而言, 该蛋白不包含强碱性氨基酸、强酸性氨基酸 (D、E), 含有 405 个疏水氨基酸 (A、I、L、F、W、V) 和 719 个极性氨基酸 (N、C、Q、S、T、Y), 脂肪族指数 (AI) 是 92.62, 不稳定系数 (Π) 是 36.00; 其蛋白的总体平均疏水性 (GRAVY) 是 -0.133, 因此预测为亲水性蛋白。

Motif Scan 分析表明, 88~481 位为保守区蛋白结构域, 88~113 位为 FAD 蛋白结合域。SOMPA 分析 *HeLCYB* 蛋白的二级结构表明, 该蛋白有 α 螺旋 38.970%、不规则卷曲 44.33% 和延伸链结构 16.70%, 未发现 β 转角的存在。利用 SWISS-MOD-

EL 在线构建蛋白 3D 模型, *HeLCYB* 蛋白的保守结构域三维结构模型如图 2 所示。



图 2 *HeLCYB* 蛋白三级结构

Fig. 2 Tertiary structure of *HeLCYB* protein

比对 *HeLCYB* 编码的氨基酸序列和 GenBank 其他植物 LCYB 蛋白序列, 显示 *HeLCYB* 与多种植物 LCYB 氨基酸序列均具有较高同源性, 并有多处保守区域。其中与陆地棉 (XP_012464129.1) 有 91% 的同源性, 与黄麻 (OMO60094.1)、可可 (XP_

007028557.2)、毛果杨(XP_002308903.1)等序列也分别有88%、88%、83%的同源性。HeLCYB氨基酸序列具有“FLYAIVIP”序列及FAD/NAD(P)结合区

(图3),因此确认所得序列为黄秋葵 *HeLCYB* 基因全长cDNA序列,将其命名为 *HeLCYB*, GenBank 登录号为 KX257998。

| | | |
|------------------|--|-----|
| XP_012464129.1_F | MDTLIRTHSKLEFS.VLILHGFSEKACKTH.....EVKFGPKK.....RFPNGCVKVK | 48 |
| OMO60094.1_Lycop | MDTLIRTHNKLEEL.PQLHGFSEKACNLSSARVQTEELKFGPKKSYWRRGRDN.GCVCVK | 58 |
| XP_007028557.2_F | MDTLIRTHNKLELL.PQLHGFSEKACNLSSVRVQNEPKFGPKKSYFKRGR...GNTCVK | 56 |
| ABD91578.1_lycop | MDTLIRTHNKLEEL.PQLHGFSEKSSS.SSSRLQNEELRFPGPKKYPWKGRGR....DGCLK | 54 |
| AAM21152.1_lycop | MDTLIRTHNKLEEL.PQVHGALEKSSSSSLKIQNEELKFGPKKSRQKRN....SCFIK | 55 |
| AAR89632.1_lycop | MDTVIRTHNKLEEL.PQVHGALEKSSSSSLKIQNEELRFGPKKSRQKRN....SCFIK | 55 |
| AP014285.1_lycop | MDTLIRTHSKLEFSRLLHGFSEKAFNKT.....EVKFGPKKSYLGRGRDDNGCVKIK | 54 |
| Consensus | mdt l th kle hg ek e fg k k | |
| XP_012464129.1_P | ASSSALLEVPETKKEILELPMFDPKSGAVVDLAVVGGGPAGLAVACVSAAGLSVCS | 108 |
| OMO60094.1_Lycop | ASSSALLEVPETKKEILELFIYDPSKGTVDLAVVGGGPAGLAVACVSAAGLSVCS | 118 |
| XP_007028557.2_P | ASSTALLEVPETKKEILELFIYDPSKGTVDLAVVGGGPAGLAVACVSAAGLSVCS | 116 |
| ABD91578.1_lycop | ASNSALLEVPETKKEILELPMYDPSKGLVDLAVVGGGPAGLAVACVSAAGLSVCS | 114 |
| AAM21152.1_lycop | ASSSALLEVPETKKEILELPMYDPSKGLVDLAVVGGGPAGLAVACVSAAGLSVCS | 115 |
| AAR89632.1_lycop | ASSSALLEVPETKKEILELPMYDPSKGLVDLAVVGGGPAGLAVACVSAAGLSVCS | 115 |
| AP014285.1_lycop | ASRSALLEVPETKKEILELFIYDPSKGTVDLAVVGGGPAGLAVACVSAAGLSVCS | 114 |
| Consensus | as alle vpetkke l elp dpskg vvdlavvgggpaglavac vs aglsvcs | |
| XP_012464129.1_P | IDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTTWSGAVVYIDDKKKKILRPYGRVNRKQL | 168 |
| OMO60094.1_Lycop | IDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTTWSGAVVYIDDKKKKILRPYGRVNRKQL | 178 |
| XP_007028557.2_P | IDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTTWSGAVVYIDDKKKKILRPYGRVNRKQL | 176 |
| ABD91578.1_lycop | IDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTTWSGAVVYIDDKKKKILRPYGRVNRKQL | 174 |
| AAM21152.1_lycop | IDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTTWSGAVVYIDDKKKKILRPYGRVNRKQL | 175 |
| AAR89632.1_lycop | IDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTTWSGAVVYIDDKKKKILRPYGRVNRKQL | 175 |
| AP014285.1_lycop | IDPSPKLIWPNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTTWSGAVVYIDDKKKKILRPYGRVNRKQL | 174 |
| Consensus | idpspkl wpnnygvwvdefeamdlldcldttwsgavv idd kk l rpygrvnrk l | |
| XP_012464129.1_P | KSKMLIKCISNGVKFHOAKVIKVIHEESKSLICNDGVTIOATVVDATGFSRCLVQYDK | 228 |
| OMO60094.1_Lycop | KSKMLIKCISNGVKFHOAKVIKVIHEESKSLICNDGVTIOATVVDATGFSRCLVQYDK | 238 |
| XP_007028557.2_P | KSKMLIKCISNGVKFHOAKVIKVIHEESKSLICNDGVTIOATVVDATGFSRCLVQYDK | 236 |
| ABD91578.1_lycop | KSKMLIKCISNGVKFHOAKVIKVIHEESKSLICNDGVTIOATVVDATGFSRCLVQYDK | 234 |
| AAM21152.1_lycop | KSKMLIKCISNGVKFHOAKVIKVIHEESKSLICNDGVTIOATVVDATGFSRCLVQYDK | 235 |
| AAR89632.1_lycop | KSKMLIKCISNGVKFHOAKVIKVIHEESKSLICNDGVTIOATVVDATGFSRCLVQYDK | 235 |
| AP014285.1_lycop | KSKMLIKCISNGVKFHOAKVIKVIHEESKSLICNDGVTIOATVVDATGFSRCLVQYDK | 234 |
| Consensus | kskml kc ngvkfhqakvi ih ee ksllicndg t qa vv datgfsrclvqyd | |
| XP_012464129.1_P | PYNPGYQAYGILAEVEHPFDVKMVMFMDWRDShlSDSKELKERNRSRIITFLYAMPSS | 288 |
| OMO60094.1_Lycop | PYNPGYQAYGILAEVEHPFDVKMVMFMDWRDShlINNKELREKNSKIITFLYAMPSS | 298 |
| XP_007028557.2_P | PYNPGYQAYGILAEVEHPFDVKMVMFMDWRDShlINNKELREKNSKIITFLYAMPSS | 296 |
| ABD91578.1_lycop | PYNPGYQAYGILAEVEHPFDVKMVMFMDWRDShlNSNTELKERNRSRIITFLYAMPSS | 294 |
| AAM21152.1_lycop | PYNPGYQAYGILAEVEHPFDVKMVMFMDWRDShlNNNSSELKEANSKIITFLYAMPSS | 295 |
| AAR89632.1_lycop | PYNPGYQAYGILAEVEHPFDVKMVMFMDWRDShlNNNSSELKEANSKIITFLYAMPSS | 295 |
| AP014285.1_lycop | PYNPGYQAYGILAEVEHPFDVKMVMFMDWRDShlANSMEIRERNRSKIITFLYAMPSS | 294 |
| Consensus | pynpgyq aygilaeve hpf dvmvmfmdwrds hl el e ns itflyampf s | |
| XP_012464129.1_P | NRIFLEETSLVARPGVEMDIERMVARIRHLGKVKIEEDEHCVIPMGGLPVLPRV | 348 |
| OMO60094.1_Lycop | NRIFLEETSLVARPGVEMDIERMVARIRHLGKVKIEEDEHCVIPMGGLPVLPRV | 358 |
| XP_007028557.2_P | NRIFLEETSLVARPGVEMDIERMVARIRHLGKVKIEEDEHCVIPMGGLPVLPRV | 356 |
| ABD91578.1_lycop | NRIFLEETSLVARPGVEMDIERMVARIRHLGKVKIEEDEHCVIPMGGLPVLPRV | 354 |
| AAM21152.1_lycop | NRIFLEETSLVARPGVEMDIERMVARIRHLGKVKIEEDEHCVIPMGGLPVLPRV | 355 |
| AAR89632.1_lycop | NRIFLEETSLVARPGVEMDIERMVARIRHLGKVKIEEDEHCVIPMGGLPVLPRV | 355 |
| AP014285.1_lycop | NRIFLEETSLVARPGVEMDIERMVARIRHLGKVKIEEDEHCVIPMGGLPVLPRV | 354 |
| Consensus | rifleetslvarpg m di ermvarl hlg kv ieede hcvipmgg lpvlprv | |
| XP_012464129.1_P | VGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLAAAPVADAIVRCLDPGKNLMGDKLSAEVWDLWPIER | 408 |
| OMO60094.1_Lycop | VGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLAAAPVADSIVRCLDPGQSFVGNKLSAEVWDLWPIER | 418 |
| XP_007028557.2_P | VGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLAAAPVADSIVRCLDPGKSFVGNKLSAEVWDLWPIER | 416 |
| ABD91578.1_lycop | VGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLAAAPVADSIVRCLDPGKSFVGNKLSAEVWDLWPIER | 414 |
| AAM21152.1_lycop | VGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLAAAPVANAIVRSLSSDRSISCHLSAEVWDLWPIER | 415 |
| AAR89632.1_lycop | VGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLAAAPVANAIVRSLSSDRSISCHLSAEVWDLWPIER | 415 |
| AP014285.1_lycop | VGIGGTAGMVHPSTGYMVARTLAAAPVADAIVRCLDPGKNLSDKLSAEVWDLWPIER | 414 |
| Consensus | giggtagmvhpstgymvartlaaap va ivr l g ls evw dlwpi r | |
| XP_012464129.1_P | RROREFFCFGMDILLKLDLATRRFFFAFFDLEPHYWHGFLSSRLFLPELITFGLSLF | 468 |
| OMO60094.1_Lycop | RROREFFCFGMDILLKLDLATRRFFFAFFDLEPHYWHGFLSSRLFLPELITFGLSLF | 478 |
| XP_007028557.2_P | RROREFFCFGMDILLKLDLATRRFFFAFFDLEPHYWHGFLSSRLFLPELITFGLSLF | 476 |
| ABD91578.1_lycop | RROREFFCFGMDILLKLDLATRRFFFAFFDLEPHYWHGFLSSRLFLPELITFGLSLF | 474 |
| AAM21152.1_lycop | RROREFFCFGMDILLKLDLATRRFFFAFFDLEPHYWHGFLSSRLFLPELITFGLSLF | 475 |
| AAR89632.1_lycop | RROREFFCFGMDILLKLDLATRRFFFAFFDLEPHYWHGFLSSRLFLPELITFGLSLF | 475 |
| AP014285.1_lycop | RROREFFCFGMDILLKLDLATRRFFFAFFDLEPHYWHGFLSSRLFLPELITFGLSLF | 474 |
| Consensus | rrqreffcfgmdillkldl atrrrf affd l p ywhgflssrlflpel itfgslf h | |
| XP_012464129.1_P | ASNTSRLEIMKGTPLVNMNNLVKDR | 496 |
| OMO60094.1_Lycop | ASNTSRLEIMKGTPLVNMNNLVKDR | 506 |
| XP_007028557.2_P | ASNTSRLEIMKGTPLVNMNNLVKDR | 504 |
| ABD91578.1_lycop | ASNTSRLEIMKGTPLVNMNNLVKDR | 502 |
| AAM21152.1_lycop | ASNTSRLEIMKGTPLVNMNNLVKDR | 503 |
| AAR89632.1_lycop | ASNTSRLEIMKGTPLVNMNNLVKDR | 503 |
| AP014285.1_lycop | ASNTSRLEIMKGTPLVNMNNLVKDR | 502 |
| Consensus | as tsr eim kgt pl minnl d | |

陆地棉 *Gossypium hirsutum* L. XP_012464129.1; 黄麻 *Corchorus capsularis* L. OMO60094.1; 可可 *Theobroma cacao* L. XP_007028557.2;

番木瓜 *Chaenomeles sinensis* L. ABD91578.1; 甜橙 *Citrus sinensis* L. AAM21152.1; 柚子 *Citrus maxima* B. AAR89632.1;

黄秋葵 *Hibiscus esculentus* L. AP014285.1; Box I 是“FLYAIVIP”序列; Box II 是 FAD/NAD(P) 结合区

Gossypium hirsutum L. XP_012464129.1, *Corchorus capsularis* L. OMO60094.1, *Theobroma cacao* L. XP_007028557.2,

Chaenomeles sinensis L. ABD91578., *Citrus sinensis* L. AAM21152.1, *Citrus maxima* B. AAR89632.1, *Hibiscus esculentus* L. AP014285.1,

Box I indicates the sequence of “FLYAIVIP”, Box II indicates the FAD/NAD(P)

图3 黄秋葵 *HeLCYB* 氨基酸同源性分析

Fig. 3 Homology analysis of *HeLCYB* in *Hibiscus esculentus* L.

将 HeLCYB 与其他 22 种植物 LCYB 同源蛋白进行多重序列比较,以了解与其他 LCYB 同源蛋白在系统进化的关系,应用 MEGA 4.0 软件构建系统进化树。结果表明,与 HeLCYB 遗传关系最近的是陆地棉,遗传关系较远的是桑树、金丝枣(图 4)。

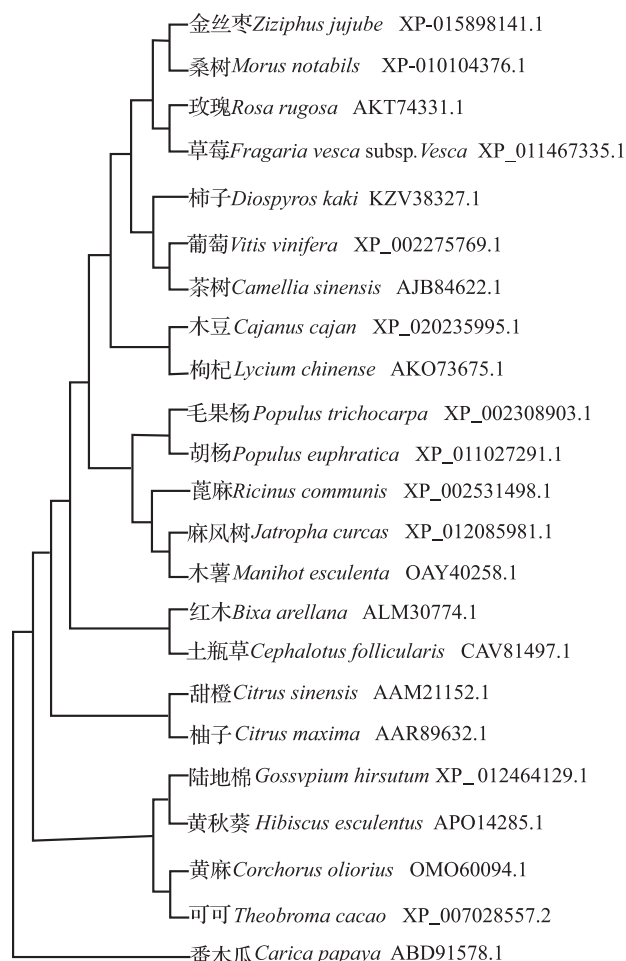


图 4 黄秋葵 HeLCYB 与其他植物
22 个 LCYB 蛋白的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of HeLCYB in *Hibiscus esculentus* L. with 22 other plant LCYBs

2.3 HeLCYB 基因的表达分析

2.3.1 HeLCYB 基因在黄秋葵不同品种和组织中的表达 以黄秋葵 18S rRNA 作为内参,运用荧光定量 PCR 技术检测 HeLCYB 在 3 个不同黄秋葵品种、组织中的表达,结果表明(图 5),HeLCYB 在根、茎、叶、花和果实等各器官中均有表达,花中表达量最高,其次为叶、茎和果实,根的表达量最低,在不同品种间,同一器官以绿色品种的表达更为丰富,红色品种次之,白色品种较低。经软件分析,HeLCYB 基

因表达在花、叶、茎中差异不显著,花、果、根中表达差异显著,在根中表达为白色品种和红色品种无显著差异,而绿色品种与其他两个品种差异显著,在茎、叶、花的表达中,红色品种和绿无品种无显著差异,白色品种与其他两个品种差异显著。

2.3.2 HeLCYB 基因在黄秋葵叶片发育过程中的表达

黄秋葵的叶片可提取天然色素(叶黄素和 β -胡萝卜素),黄秋葵叶粉添加禽类饲料,可提高其产量及品质^[20]。HeLCYB 在黄秋葵叶片不同生长阶段的表达分析表明,在叶片的生长过程中 HeLCYB 表达量逐渐增加,到成熟叶时达到最高,之后逐渐下降,老叶中最低,3 个黄秋葵品种间表达量变化趋势一致。经差异分析得,HeLCYB 在幼叶、嫩叶、成熟叶中表达无显著差异,老叶与其他叶片发育时期的表达差异显著,HeLCYB 在红色品种和绿色品种的幼叶、嫩叶、老叶表达无显著差异,白色品种与其他两个品种差异显著,3 个品种的成熟叶表达无显著差异(图 6)。

2.3.3 HeLCYB 基因在黄秋葵果实发育过程中的表达

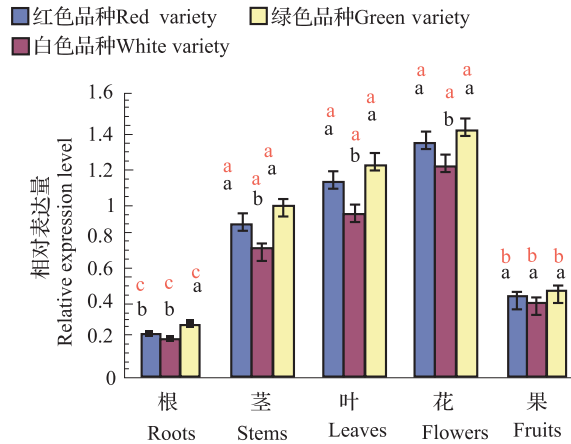
在黄秋葵果实不同发育阶段,HeLCYB 基因表达量伴随着果实发育逐渐增加,花后 7 d 表达量达到峰值,随后表达量迅速下降。HeLCYB 基因表达在红色品种和绿色品种的花后 3 d、5 d、7 d 的果实中表达无显著差异,白色品种与其他两个品种差异显著,3 个品种的花后 1 d、10 d 的果实表达无显著差异(图 7)。

2.4 黄秋葵类胡萝卜素含量 UPLC 方法的建立和测定

通过对黄秋葵类胡萝卜素提取方法筛选、色谱条件优化、重复性、精密度和回收率试验,建立黄秋葵类胡萝卜素超高效液相色谱法标准分析体系。采用 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱,以乙腈:甲醇=9:1 为流动相,流速 0.5 mL/min,检测波长 450 nm,柱温 28 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 50 μL ,检测在 5 min 内完成,平均回收率达到 95.3%,变异系数为 1.38% ~ 1.76%。在黄秋葵的各组织中均检测到叶黄素、 β -胡萝卜素,未检测到番茄红素、 β -隐黄质(图 8)。

2.4.1 不同品种黄秋葵各组织类胡萝卜素含量测定

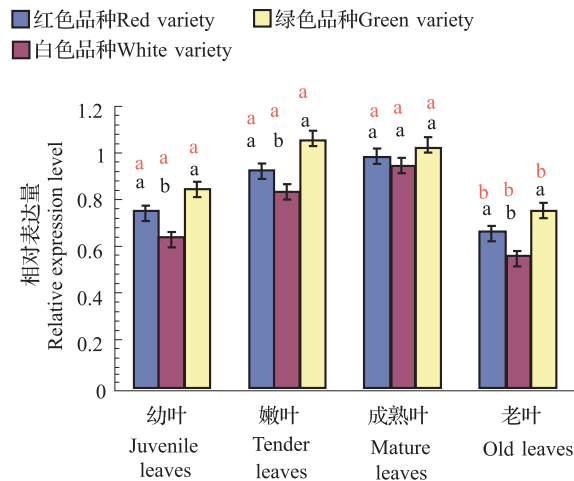
在黄秋葵各组织中,叶的叶黄素含量最高,茎其次,根中含量最低; β -胡萝卜素在花中最丰富,叶其次,根中最低。除红色品种花的叶黄素、 β -胡萝卜素较绿色品种高外,其余各器官均低于绿色品种,白色品种仅在果实中叶黄素含量比红色品种略高(表 2)。



红色字母表示 *HeLCYB* 在黄秋葵各组织表达的差异显著性;
黑色字母表示 *HeLCYB* 在黄秋葵不同品种间的表达差异显著性
Red letters represent significant expression differences of *HeLCYB* gene
between different tissues, Black letters represent expression
differences of *HeLCYB* gene between different varieties

图5 *HeLCYB* 在不同黄秋葵品种、组织中的表达

Fig. 5 Expression of *HeLCYB* in
different varieties and tissues

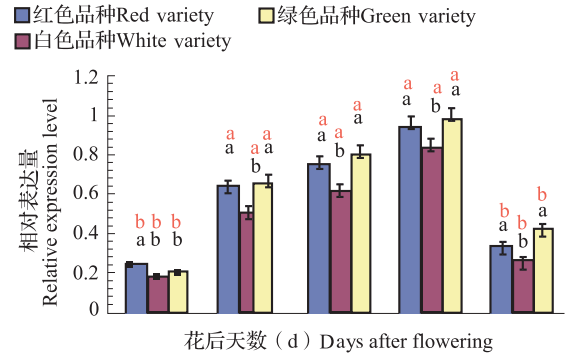


红色字母表示 *HeLCYB* 在黄秋葵叶发育过程表达的差异显著性;
黑色字母表示 *HeLCYB* 在黄秋葵不同品种间的表达差异显著性
Red letters represent significant expression differences of *HeLCYB* gene
between leaf development, Black letters represent expression
differences of *HeLCYB* gene between different varieties

图6 黄秋葵叶片发育过程中 *HeLCYB* 的表达

Fig. 6 Expression of *HeLCYB* in the
process of leaf development

2.4.2 叶片生长发育过程类胡萝卜素含量变化 同一品种中伴随叶片的生长发育叶黄素、 β -胡萝卜素含量逐步升高,成熟叶时达到峰值,叶成熟后到叶片老化其类胡萝卜素含量迅速下降。不同品种叶片发育的叶黄素、 β -胡萝卜素含量变化趋势一致,以绿色黄秋葵品种的成熟叶总含量最高,而白色黄秋葵品



红色字母表示 *HeLCYB* 在黄秋葵果实发育过程表达的差异显著性;
黑色字母表示 *HeLCYB* 在黄秋葵不同品种间的表达差异显著性

Red letters represent significant expression differences of
HeLCYB gene between fruit development,
Black letters represent expression differences of
HeLCYB gene between different varieties

图7 黄秋葵果实发育过程中 *HeLCYB* 的表达

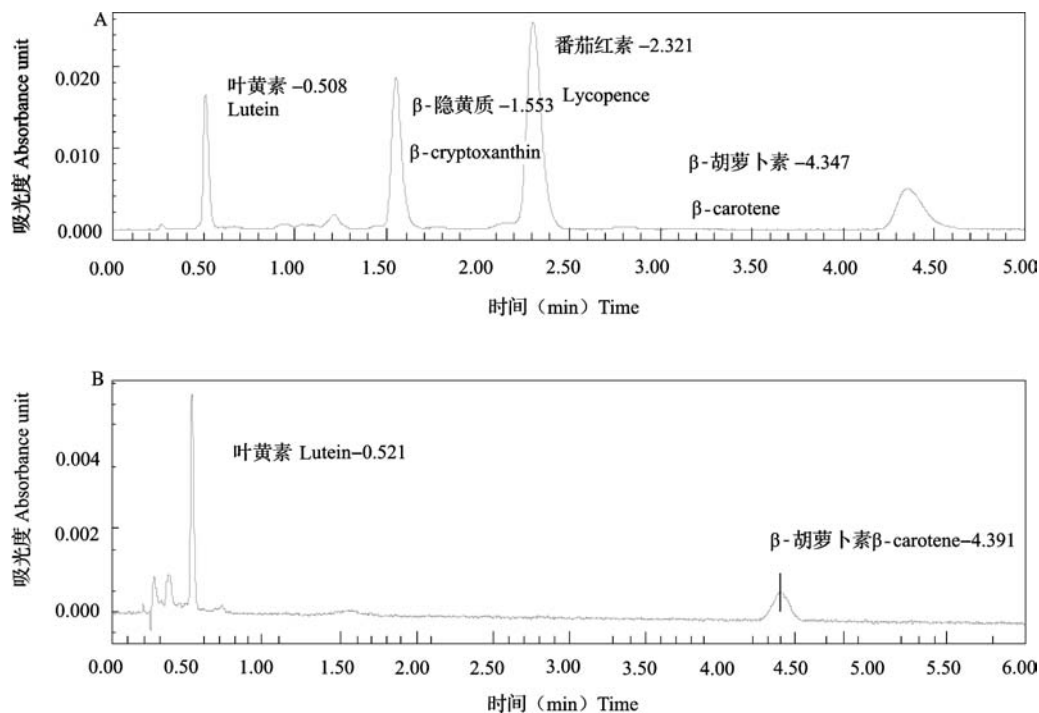
Fig. 7 Expression of *HeLCYB* in the
process of fruit development

种老叶总含量最低,在同一时期3个品种相较以绿色品种含量略高,红色品种含量其次,白色品种含量最低(表3)。

2.4.3 果实发育过程中类胡萝卜素含量变化 在黄秋葵果实发育过程中 β -胡萝卜素含量呈现先上升后下降态势,在花后7 d达到峰值,随后下降。叶黄素在花后3 d含量最高,随后缓慢下降。花后1 d的果实叶黄素、类胡萝卜素总量均最低。不同80种表现同一变化规律,以绿色黄秋葵品种的花后7 d果实类胡萝卜素总含量最高,白色黄秋葵品种花后1 d果实胡萝卜素总含量最低。不同黄秋葵品种同一时期的类胡萝卜素总含量以绿色品种最高,红色品种次之,白色品种总含量最低(表4)。

3 讨论

类胡萝卜素既是影响果实外观品质和花卉观赏价值的重要因素,也是决定水果和蔬菜内在营养品质的重要指标^[21]。不同的蔬菜、水果中类胡萝卜素的组分与含量差异较大。番茄以番茄红素为主,绿叶蔬菜以胡萝卜素为主,而羽衣甘蓝、万寿菊、菠菜主要以叶黄素为主^[22-23]。本研究建立和优化了黄秋葵类胡萝卜素超高效液相色谱分析体系,分析了黄秋葵类胡萝卜素积累特点,黄秋葵主要含有叶黄素和 β -胡萝卜素。 β -胡萝卜素是维护人体健康不可缺少的营养素,在淬灭自由基、抗癌、预防心血管疾病、白内障及抗氧化上有显著的功能^[24-25]。黄秋葵各组织中均含有 β -胡萝卜素。叶片中 β -胡萝卜素含量伴随着叶片



A:类胡萝卜素标准样色谱图;B:黄秋葵成熟果实类胡萝卜素提取物色谱图

A;UPLC chromatogram of carotenoids standards,B;UPLC chromatogram of carotenoids extracted from mature fruit in *Hibiscus esculentus* L.

图 8 黄秋葵类胡萝卜素含量的 UPLC 分析

Fig. 8 UPLC analysis of carotenoid component and content of *Hibiscus esculentus* L.

表 2 不同品种黄秋葵各组织类胡萝卜素含量

Table 2 Total carotenoid and each component content of different tissues in *Hibiscus esculentus* L. ($\mu\text{g}/100 \text{ g} \cdot \text{FW}$)

| 品种 Variety | 类胡萝卜素类型 Carotenoid type | 根 Root | 茎 Stem | 叶 Leaf | 花 Flower | 果实 Fruit |
|---|---------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| 红色黄秋葵 Red <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 1.32 \pm 0.56a | 17.42 \pm 1.28c | 22.63 \pm 0.75d | 14.42 \pm 0.67c | 2.12 \pm 1.31b |
| | β -胡萝卜素 β -carotene | 8.03 \pm 3.26a | 126.32 \pm 8.16c | 138.03 \pm 7.37d | 146.21 \pm 5.61d | 28.57 \pm 2.39b |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 9.35 \pm 2.57a | 143.74 \pm 5.47c | 160.66 \pm 7.43d | 160.63 \pm 4.43d | 30.69 \pm 3.70b |
| 白色黄秋葵 White <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 1.16 \pm 0.43a | 14.86 \pm 1.34d | 17.98 \pm 2.36d | 12.62 \pm 1.44c | 2.14 \pm 0.71b |
| | β -胡萝卜素 β -carotene | 6.39 \pm 1.87a | 119.54 \pm 2.53c | 125.78 \pm 5.83d | 129.14 \pm 4.86d | 17.59 \pm 1.93b |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 7.55 \pm 2.13a | 134.40 \pm 2.33c | 143.76 \pm 6.96d | 141.76 \pm 3.96d | 19.73 \pm 2.41b |
| 绿色黄秋葵 Green <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 1.69 \pm 0.23a | 21.98 \pm 4.86d | 24.02 \pm 4.79d | 11.58 \pm 3.39c | 2.83 \pm 0.17b |
| | β -胡萝卜素 β -carotene | 9.65 \pm 1.79a | 131.16 \pm 9.08c | 140.94 \pm 8.23d | 145.18 \pm 6.06d | 29.65 \pm 0.89b |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 11.43 \pm 1.12a | 153.14 \pm 7.39c | 164.96 \pm 10.80d | 156.76 \pm 5.81c | 32.48 \pm 0.99b |

a,b,c,d 代表横向多重比较 SNK 检验在 $P=0.05$ 水平的差异显著性,下同

a,b,c,d stands for multiple comparison SNK tests with significant differences in $P=0.05$ significant levels,the same as below

表 3 不同品种黄秋葵叶片生长过程的类胡萝卜素含量

Table 3 Total carotenoid and each component content of leaf in *Hibiscus esculentus* L. (μg/100 g · FW)

| 品种 Variety | 类胡萝卜素类型 Carotenoid type | 幼叶 Juvenile leaf | 嫩叶 Tender leaf | 成熟叶 Matured leaf | 老叶 Old leaf |
|---|----------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| 红色黄秋葵 Red <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 10.57 ± 0.264b | 20.42 ± 0.67c | 21.04 ± 0.39c | 8.74 ± 0.09a |
| | β-胡萝卜素 β-carotene | 23.17 ± 1.47b | 52.24 ± 2.23c | 138.03 ± 7.37d | 21.46 ± 0.15a |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 33.74 ± 1.51b | 72.66 ± 2.42c | 159.07 ± 7.43d | 30.20 ± 0.20a |
| 白色黄秋葵 White <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 8.27 ± 0.87b | 16.62 ± 1.44c | 17.89 ± 1.39d | 7.85 ± 0.23a |
| | β-胡萝卜素 β-carotene | 22.69 ± 0.55b | 64.21 ± 4.39c | 125.78 ± 5.83d | 21.13 ± 0.18a |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 30.96 ± 1.25b | 80.83 ± 4.56c | 143.67 ± 6.96d | 28.98 ± 0.33a |
| 绿色黄秋葵 Green <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 12.24 ± 0.42b | 21.58 ± 3.39c | 24.31 ± 1.46d | 11.27 ± 0.27a |
| | β-胡萝卜素 β-carotene | 22.99 ± 0.58b | 84.91 ± 5.74c | 140.94 ± 8.23d | 20.87 ± 2.62a |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 35.23 ± 0.74b | 106.49 ± 6.33c | 165.25 ± 7.82d | 32.14 ± 2.82a |

表 4 不同品种黄秋葵果实过程的类胡萝卜素含量

Table 4 Total carotenoid and each component content of fruit in *Hibiscus esculentus* L. (μg/100 g · FW)

| 品种 Variety | 类胡萝卜素类型 Carotenoid type | 花后 1 d 1 day after flowering | 花后 3 d 3 days after flowering | 花后 5 d 5 days after flowering | 花后 7 d 7 days after flowering | 花后 10 d 10 days after flowering |
|---|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 红色黄秋葵 Red <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 0.42 ± 0.13a | 3.04 ± 0.19d | 2.63 ± 0.57d | 2.12 ± 1.31c | 1.64 ± 0.24b |
| | β-胡萝卜素 β-carotene | 2.47 ± 0.33a | 9.15 ± 1.37b | 16.79 ± 2.78c | 28.57 ± 2.39d | 2.10 ± 0.89a |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 2.89 ± 0.41a | 12.52 ± 1.17b | 19.42 ± 3.25c | 30.69 ± 3.70d | 3.74 ± 0.96a |
| 白色黄秋葵 White <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 0.32 ± 0.16a | 2.85 ± 0.32d | 2.62 ± 0.94d | 2.14 ± 0.71c | 1.59 ± 0.19b |
| | β-胡萝卜素 β-carotene | 2.12 ± 0.08a | 5.97 ± 0.98b | 12.33 ± 2.35c | 17.59 ± 1.93d | 1.96 ± 0.99a |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 2.44 ± 0.18a | 8.82 ± 1.13b | 14.95 ± 3.08c | 19.73 ± 2.41d | 3.55 ± 1.03a |
| 绿色黄秋葵 Green <i>Hibiscus esculentus</i> | 叶黄素 Lutein | 0.62 ± 0.22a | 3.27 ± 0.23d | 3.01 ± 0.69d | 2.83 ± 0.17c | 1.85 ± 0.37b |
| | β-胡萝卜素 β-carotene | 3.36 ± 0.57a | 10.11 ± 1.37b | 18.83 ± 2.28c | 29.65 ± 0.89d | 2.68 ± 2.13a |
| | 类胡萝卜素总量 Carotenoids | 3.98 ± 0.69a | 13.38 ± 1.29b | 21.84 ± 2.69c | 32.48 ± 0.99d | 4.53 ± 1.97a |

的发育逐步升高,成熟叶时达到峰值,叶片老化后迅速下降。黄秋葵茎、叶的类胡萝卜素含量丰富,因其生长期短、产量大,是作为天然着色剂的重要植物源^[26]。果实中 β-胡萝卜素含量伴随着果实的发育呈现先上升后下降态势,在花后 7 d 达到峰值,此时也是黄秋葵果实最适宜采收期^[27-28]。

LCYB 是类胡萝卜素合成过程中的下游基因,促使番茄红素向 β-胡萝卜素转化合成。在番茄、木瓜等作物中,β-胡萝卜素含量与 *LCYB* 基因表达量呈正相关^[29,13]。在小麦中,通过 RNA 干扰使 *LCYB* 基因发生转录后沉默,检测发现转基因植株的 *LCYB* 表达量均有不同程度下调^[30];红肉脐橙的 *LCYB* 基因导入番茄中,发现转基因植株中,外源 *LCYB* 超量表达,番茄红素大量向 β-胡萝卜素转化,β-胡萝卜素的含量极显著的高于对照^[31]。本研究利用 RACE 和 RT-PCR 技术,首次克隆获得黄秋葵 *HeLCYB* 基因,其全长为 1797 bp,含有 1509 个碱基的开

放阅读框(ORF),编码 503 个氨基酸。序列分析表明,*HeLCYB* 存在高度保守区域且包含植物 *LCYB* 的共同特征“FLYAIVIP”序列和 FAD/NAD(P)结合区^[32],这些高度保守的残基与催化功能有关^[33]。黄秋葵 *HeLCYB* 的氨基酸序列与陆地棉有高达 91% 的同源性。系统进化树分析显示,黄秋葵与陆地棉 *LCYB* 有较近的亲缘关系,与桑树、金丝枣亲缘关系较远。实时荧光定量 PCR 分析发现,*HeLCYB* 基因在黄秋葵各组织中均有表达。在黄秋葵叶片中,伴随着叶片的生长,*HeLCYB* 的表达量逐渐增加,在成熟叶中达到最高,之后逐渐下降。在黄秋葵果实发育过程中,*HeLCYB* 基因表达量呈现先上升后下降趋势,在花后 7 d 达到峰值,随后下降。*HeLCYB* 基因的表达趋势与 β-胡萝卜素含量变化规律基本一致,与在番茄、木瓜、小麦、番茄等众多研究结果一致^[13,29-31],暗示 *HeLCYB* 基因在调控黄秋葵 β-胡萝卜素生物合成中起重要作用,*HeLCYB* 基因表

达与 β -胡萝卜素合成存在密切的相关性。本研究为进一步深入了解黄秋葵类胡萝卜素合成调控机制奠定基础,为创制高类胡萝卜素含量新种质资源、开展类胡萝卜素品质育种提供了可能。

参考文献

- [1] Ruiz-Sola M G, Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway[J]. *Arabidopsis Book*, 2012, 10 (e0158): 158-185
- [2] Howitt C A, Pogson B J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues[J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29 (3): 435-445
- [3] West K P, Klemm R D W, Sommer A. Vitamin A saves lives. Sound science, sound policy[J]. *World Nutr*, 2010, 1 (10): 211-229
- [4] Mayo-Wilson E, Imdad A, Herzer K, et al. Vitamin A supplements for preventing mortality, illness and blindness in children aged under 5: systematic review and meta-analysis[J]. *Br Med J*, 2011, 343 (7833): 5094-5112
- [5] Tang G W, Hu Y M, Yin S A, et al. β -Carotene in Golden Rice is as good as β -carotene in oil at providing vitamin A to children[J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 96 (3): 658-664
- [6] Fassett R G, Coombes J S. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease[J]. *Mar Drug*, 2011, 9 (3): 447-465
- [7] Cazzonelli C I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond[J]. *Funct Plant Biol*, 2011, 38 (11): 833-847
- [8] Yamaguchi M. Role of carotenoid β -cryptoxanthin in bone homeostasis[J]. *J Biol Sci*, 2012, 19 (1): 19-36
- [9] 朱长甫, 陈星, 王英典. 植物类胡萝卜素生物合成及其相关基因工程中的应用[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30 (6): 609-618
- [10] 抗艳红, 季静, 胡军, 等. 农杆菌介导类胡萝卜素合成酶基因 *LycB* 转化水稻的研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12 (4): 605-611
- [11] Ronen G, Cohen M, Zimlir D, et al. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development; expression of the gene for lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta[J]. *Plant J*, 1999, 17 (4): 341-351
- [12] Bangh H, Kim S, Leskovaar D, et al. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene beta-cyclase (*LCYB*) gene[J]. *Mol Breed*, 2007, 20 (1): 63-72
- [13] Devitt L C, Fanning K, Dietzgen R G, et al. Isolation and functional characterization of a lycopene β -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.) [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61 (1): 33-39
- [14] Moreno J C, Pizarro L, Fuentes P, et al. Levels of lycopene β -cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): 58144-58156
- [15] Ampomah-Dwamena C, McGhie T, Wibisono R, et al. The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit[J]. *J Exp Bot*, 2009, 60 (13): 3765-3779
- [16] 卢俊杰, 苏浓, 岳森. 菜药花兼用型植物-黄秋葵[J]. *蔬菜*, 2004 (10): 36
- [17] Lawford B, Luther W J. Controlled atmosphere effects on physical changes and ethylene evolution in harvested Okra[J]. *Hortic Sci*, 1990, 25 (1): 92-95
- [18] 张慧, 李涛, 徐公世. 一种前景广阔天然食品着色剂-叶黄素[J]. *中国食品添加剂*, 2004 (5): 45-48.
- [19] 王旭, 韩春乐, 周亚楠, 等. 黄秋葵查尔酮合成酶基因 *AeCHS* 的克隆与表达分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15 (3): 561-567
- [20] 叶花兰, 刘东祥, 刘国道. 黄秋葵作为禽用着色剂的品种比较试验[J]. *中国农学通报*, 2007, 23 (5): 428-431
- [21] 陶俊, 张上隆. 园艺植物类胡萝卜素的代谢及其调节[J]. *浙江大学学报*, 2003, 29 (5): 585-590
- [22] Konings E J, Harry S R. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit[J]. *Food Chem*, 1997, 4 (4): 599-603
- [23] Chen M D, Zhu H S, Wen Q F, et al. Determination of carotenoids in strawberry by UPLC[J]. *J Fruit Sci*, 2013, 30 (4): 706-711
- [24] 陈选阳, 袁照年, 张招娟, 等. 甘薯番茄红素 β -环化酶基因的克隆与转化烟草的研究[J]. *作物学报*, 2007, 33 (10): 1724-1728
- [25] 赵倩, 赖凡, 于静娟, 等. 谷子类胡萝卜素生物合成途径中番茄红素 β -环化酶基因的克隆[J]. *中国农业大学学报*, 2004, 9 (1): 1-6
- [26] 刘东祥, 叶花兰, 刘国道. 14 个黄秋葵品系叶黄素和 β -胡萝卜素产量比较试验[J]. *中国农学通报*, 2006, 22 (6): 425-427
- [27] Singh P, Tripathi R D, Singh H N. Effect of age of picking on the chemical composition of the fruits of Okra[J]. *Ind Agric Sci*, 1974, 44 (1): 22-26
- [28] 许如意, 罗丰, 袁廷庆, 等. 不同采摘期对黄秋葵果实性状和品质的影响[J]. *长江蔬菜*, 2011 (2): 18-20
- [29] Ronen G, Carmel-goren L, Zamir D, et al. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (20): 11102-11107
- [30] 曾坚. 小麦番茄红素环化酶基因 *TaLCYB* 的 RNAi 载体构建及遗传转化研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013
- [31] 周文静. 红肉脐橙 (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) 番茄红素 β -环化酶基因 (*Lcyb*) 功能的初步验证和分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008
- [32] Cunningham F X, Pogson B, Sun Z, et al. Functional analysis of the β and ζ -lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation[J]. *Plant Cell*, 1996, 8 (9): 1613-1626
- [33] Daquiu Z, Yanle S, Guohua L, et al. Molecular cloning and expression of phytoene synthase, lycopene beta-cyclase, and beta-carotene hydroxylase genes in Persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29 (2): 345-351