

黄秋葵八氢番茄红素合成酶 PSY 基因的克隆与分析

李永平^{1,2,3,4} 陈敏氢^{1,2,3,4} 朱海生^{1,2,3,4*} 温庆放^{1,2,3,4*} 刘建汀^{1,2,3,4} 林思锻⁵

(¹福建省蔬菜遗传育种重点实验室, 福州 350013; ²福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013;

³福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福州 350013; ⁴福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013;

⁵泉州市洛江区农业科学研究所, 泉州 362011)

摘要 该研究根据黄秋葵(*Hibiscus esculentus* L.)转录组测序获得的八氢番茄红素合成酶 PSY 基因序列, 设计引物克隆验证得到一条全长为1 399 bp的cDNA, 开放阅读框(ORF)包含1 155个碱基; 预测编码384个氨基酸, 理论分子量为43.45 kDa, 等电点(pI)为8.729; 编码的蛋白与亚洲棉(*Gossypium arboreum*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)、海岛棉(*Gossypium barbadense*)、可可(*Theobroma cacao*)同源蛋白的相似性均在90%以上, 显示黄秋葵 PSY 基因具高度的保守性, 将基因命名为 $HePSY$, GeneBank登录号为: MG372369。通过荧光定量PCR分析表明, $HePSY$ 基因在黄秋葵根、茎、叶、花和果荚中均有表达; 叶片生长中以成熟叶中表达最高, 果实发育中花后4天表达量高。类胡萝卜素含量以成熟叶的最高, 果实以花后4天含量最高, 与 $HePSY$ 基因的表达呈正相关。该研究揭示了 PSY 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; 八氢番茄红素合成酶; 类胡萝卜素

Cloning and Expression Analysis of a Phytoenesynthase Gene in *Hibiscus esculentus* L.

LI Yongping^{1,2,3,4}, CHEN Mindong^{1,2,3,4}, ZHU Haisheng^{1,2,3,4*}, WEN Qingfang^{1,2,3,4*}, LIU Jianting^{1,2,3,4}, LIN Siduan⁵

(¹Fujian Key Laboratory of Vegetable Genetics and Breeding, Fuzhou 350013, China; ²Crops Research Institute, Fujian

Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; ³Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural

Sciences, Fuzhou 350013, China; ⁴Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China;

⁵Institute of Agricultural Science, Luojiang District, Quanzhou 362011, China)

Abstract In this study, a PSY gene was cloned from *Hibiscus esculentus* L. by RT-PCR and RACE technique. The full-length cDNA sequence of PSY was 1 399 bp, which contained a 1 155 bp open reading frame (ORF) that encoded 384 amino acids with a predicted molecular weight of 43.45 kDa and a hypothetical isoelectric point (pI) of 8.729. The encoded protein had more than 90% homology with *Gossypium arboreum*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium raimondii*, *Gossypium barbadense*, and *Theobroma cacao*, which indicated that PSY gene of Okra was highly conserved. The gene was named $HePSY$ and the GeneBank accession number was MG372369. Real-time PCR analysis revealed that $HePSY$ could be expressed in different tissues of *Hibiscus esculentus* L., including roots,

收稿日期: 2019-04-22 接受日期: 2019-07-05

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2019R1031-4)、福建省重大专项专题(批准号: 2018NZ0002-3)、福建省农业科学院蔬菜科技创新团队(批准号: STIT2017-1-2)和国家特色蔬菜产业技术体系项目(批准号: CARS-24-G-07)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; fjvrc@163.com

Received: April 22, 2019

Accepted: July 5, 2019

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2019R1031-4), Major special topics of Fujian (Grant No.2018NZ0002-3), Fujian Academy of Agricultural Sciences Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2), and Technical System for Vegetable Industry with National Characteristics (Grant No.CARS-24-G-07)

*Corresponding authors. Tel: +86-591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; fjvrc@163.com

网络出版时间: 2019-11-12 12:25:58

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1026.006.html>

stems, leaves, flowers and fruits, and the level was the highest in mature leaves and 4 days after flowering during the process of leaf and fruit development, respectively. Carotenoid contents was explored. *Hibiscus esculentus* L. carotenoid was also the highest in mature leaves and 4 days after flowering during the process of leaf and fruit development respectively, which positive correlation with *HePSY* gene expression. These results revealed the expression of *HePSY* gene and the accumulation characteristics of carotenoid contents, and provided a base for the study of carotenoid molecular regulation mechanism in *Hibiscus esculentus* L.

Keywords *Hibiscus esculentus* L.; phytoenesynthase; carotenoid

类胡萝卜素在叶绿体、有色体中合成, 行使植物的各种基本功能。在叶绿体中, 类胡萝卜素起光捕捉、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。

八氢番茄红素合成酶(phytoenesynthase, *PSY*)是类胡萝卜素合成途经的第一个关键限速酶, 对类胡萝卜素合成起着重要的控制作用。它催化两个牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)缩合形成八氢番茄红素, 其编码基因已成为植物类胡萝卜素基因工程的首选目的基因^[9-11]。1987年, Ray等^[12]获得番茄中的 PSY 基因。目前, 已分离出 PSY 基因的植物有水稻^[13]、玉米^[14]、杧果^[15]、枸杞^[16]、向日葵^[17]、烟草^[18]、辣椒^[19]、番茄^[20]、草莓^[21]等。当油菜中转入一种细菌的八氢番茄红素合酶(phytoene synthase, *crtB*)基因后, 转基因种子中总类胡萝卜素含量提高了50倍^[22]。季静等^[23]将龙胆草5个类胡萝卜素合成酶基因导入烟草, 发现 PSY 基因对烟草的叶黄素、 β -胡萝卜素含量影响较大。

黄秋葵(*Hibiscus esculentus* L.), 秋葵属, 原产于非洲东北部及亚洲热带, 世界各地均有栽培, 近年来, 中国南北方各地均有黄秋葵的分布与栽培。黄秋葵以食嫩果为主, 含丰富蛋白质、游离氨基酸、维生素、矿物盐、果胶和多糖等营养成分, 具有保护肝脏、健胃整肠、降血糖等功能的健康蔬菜^[24-25]。此外, 黄秋葵植株生物产量高, 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 PSY 基因全长, 分析了 PSY 基因表达和类胡萝卜素积累特性, 对揭示 PSY 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 实验材料

材料为红色黄秋葵品种(红玉)、白色黄秋葵品种(绿白1号)、绿色黄秋葵品种(台湾五福), 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天; 嫩叶: 叶龄20天; 成熟叶: 叶龄30天; 老叶: 叶龄50天)、花、果(花后2天、花后4天、花后6天、花后8天、花后10天的果实)存于-80℃冰箱中备用。

1.2 转录组数据来源

从福建省农业科学院作物研究所黄秋葵种质资源库中选取绿色黄秋葵资源(全株及嫩果均为绿色, 果实六棱至八棱, 以六棱为主), 2017年4月中旬播种, 5月上旬定植于福建省农业科学院蔬菜中心基地, 6月5日采花后6天的嫩果, 液氮速冻, -80℃保存备用。测序时每个单株构建1个文库, 委托广州基迪奥生物科技有限公司采用Illumina HiSeq™ 2500 PE125系统进行RNA-Seq转录组测序(无参考基因组), 采用Trinity进行序列组装, 经过滤(去除含adaptor、无法确定碱基信息的比例大于10%、质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整个片段的40%以上的片段)获得3.87 GB的有效数据。

1.3 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)完成。

1.4 *HePSY*基因序列的克隆验证

根据黄秋葵转录组测序获得的 PSY 基因序列, 设计一对引物HPSY-F(上游)、HPSY-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), 最后获得黄秋葵PSY基因全长。

1.5 HePSY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; 采用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)ClustalX 1.81软件和MEGA 4.0软件构建进化树。

1.6 HePSY基因的实时荧光定量分析

依据黄秋葵PSY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Y2S和Y2X(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公司)试剂盒进行实时定量PCR扩增(ABI7500)。25 μ L反应体系: 12.5 μ L Power SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ L cDNA, 上、下引物各0.5 μ L(10 μ mol/L), 用双蒸水补充至25 μ L。反应

程序: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 56 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 40个循环。每个反应设3次重复, 实验结果应用ABI 7500分析软件中Comparative CT($\Delta\Delta$ CT)法分析。基因表达差异显著性分析使用SPSS软件。

1.7 类胡萝卜素提取和测定

液氮研磨样品, 称取5 g粉末, 用50 mL浸提剂(丙酮:石油醚=2:3)(含0.1% BHT)混匀于50 °C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, 于旋转蒸发仪(40 °C)蒸干, 复溶于20 mL的石油醚(含0.1% BHT)中, 加20 mL皂化液10%氢氧化钾-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, 液氮处理后, 储于-70 °C超低温冰箱备用, 用0.22 μ m的尼龙膜过滤后用UV1000(上海天美科学仪器有限公司)紫外分光光度计测定。分别在663 nm、646 nm、470 nm下检测色素浓度, 每样品测3次, 将其平均值带入以下公式计算含量。

$$\text{叶绿素a浓度}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}: C_a=12.2D_{663}-2.81D_{646}$$

$$\text{叶绿素b浓度}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}: C_b=20.13D_{646}-5.03D_{663}$$

$$\text{总叶绿素浓度}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}: C_T=C_a+C_b$$

$$\text{类胡萝卜素浓度}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}: C_{x_c}=(1\ 000D_{470}-3.27C_a-104C_b)/229$$

$$\text{色素含量}/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}=\text{色素浓度}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\times\text{提取液体积}/\text{L}\times\text{稀释倍数}/\text{样品重量}/\text{g}$$

2 结果与分析

2.1 HePSY基因克隆与验证

应用引物PSY-F和PSY-R, 以黄秋葵嫩叶总RNA

表1 黄秋葵PSY基因验证与表达的引物

Table 1 Primers used to verify and analyze the expression of PSY gene in *Hibiscus esculentus* L.

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	作用 Function
AP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT T	Reverse transcription primer
AAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGG GGG G	Anchored primer
AUAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	
HPSY-F	AAT GCC ACT GCT TTG CTT AGC TT	The conserved fragment
HPSY-R	TAA GAT GAC AAA TTT CAT ACA AAT	
HePSY-F	TAC TGT TAT CAT CTT TCA CTT ATC T	The cDNA of ORF
HePSY-R	TTT ATA TAT GTG TTA AAG AAA AAG A	
Y2S	ACT GGC ACG GTT TGG ACT ATC A	The expression of PSY
Y2X	TCA GCT CGG AAA CAC CCT TTT	
NE-F	CTG AGA AAC GGC TAC CAC AT	The internal control
NE-R	ACC CAA GGT CCA ACT ACG AG	

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1 500 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1 399 bp, 经BLASTn分析, 确认是黄秋葵PSY基因的全长序列。

根据黄秋葵PSY基因的全长序列, 设计引物HePSY-F、HePSY-R克隆获得黄秋葵PSY基因含1 155个碱基(图1B)的完整开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码了384个氨基酸。

2.2 HePSY基因序列的生物信息分析

实验表明, PSY含一个长达1 155 bp的ORF, 其序列分析显示, HePSY具有一个1 155 bp的完整ORF, 编码区的GC含量占44.85%, 预测编码384个氨基酸, 理论分子量为43.45 kDa, 等电点(pI)为8.729, pH7.0时的带点荷数(ch)为5.954; 在构成该蛋白的20种氨基酸中, 亮氨酸(Leu)含量最高(10.2%), 丙氨酸(Ala)次之(9.6%), 组氨酸(His)含量最低(0.3%); 就构成氨基酸的特性而言, 该蛋白包含56个强碱性氨基酸(K和R), 50个强酸性氨基酸(D和E), 141个疏水氨基酸(A、I、L、F、W、V)和85个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y), 脂脂族指数(AI)为85.86, 不稳定系数(II)为48.08; 该蛋白的总平均疏水性(GRAVY)为-0.305, 预测为亲水性蛋白。

比对HePSY编码的氨基酸序列和GenBank其他植物PSY蛋白序列, 显示HePSY与多种植物PSY氨基酸序列均具有较高同源性。其中与亚洲棉(XP_017608492.1)、陆地棉(XP_016698693.1)有

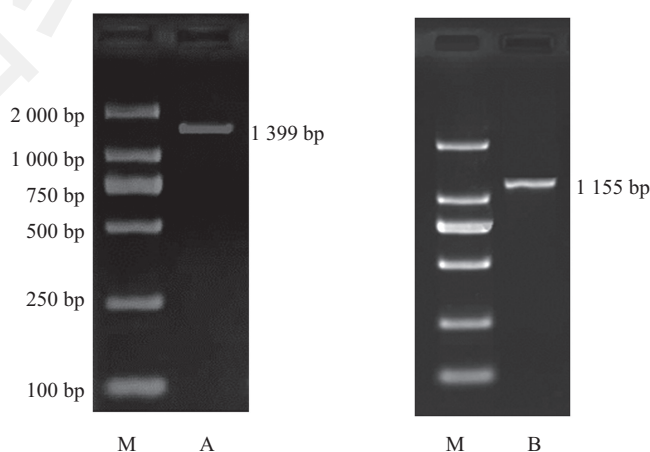
92%的同源性, 与雷蒙德氏棉(XP_012483475.1)、海岛棉(PPR93916.1)、可可(XP_007048944.1)等序列也分别有91%、90%、90%的同源性。因此确认所得序列为黄秋葵PSY基因全长cDNA序列, 将其命名为HePSY, GenBank登录号为MG372369(图2)。

将HePSY与其他19种植物PSY同源蛋白进行多重序列比较, 以了解与其他PSY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HePSY遗传关系最近是亚洲棉(*Gossypium arboreum*)和雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)的PSY, 遗传关系较远的是樱桃(*Prunus avium*)、欧李(*Prunus humilis*)和碧桃(*Prunus persica*)的PSY(图3)。

2.3 HePSY基因的表达分析

2.3.1 HePSY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HePSY在3个不同黄秋葵品种、组织中的表达, 结果表明(图4), HePSY在根、茎、叶、花和果实等各器官中均有表达, 叶中表达量最高, 其次为茎和果实, 花、根的表达量较低, 在不同品种间, 同一器官以红色品种的表达更为丰富, 绿色品种次之, 白色品种较低。经软件分析, HePSY基因表达在红色品种的叶中最高且显著高于绿色品种和白色品种的叶表达, 茎、果中表达除白色品种差异不具统计学意义, 但显著高于在花、根中的表达, 在花、根中的表达无显著差异显著, 在茎、叶、花的表达中, 红色品种和绿无品种无显著差异, 白色品种差异显著。

2.3.2 HePSY基因在黄秋葵叶片发育过程中的表达



M: DNA marker 2000; A: PSY全长; B: ORF扩增产物。

M: DNA marker 2000; A: full-length cDNA sequence of HePSY; B: ORF amplified product.

图1 黄秋葵HePSY基因的克隆

Fig.1 Cloning of PSY gene in *Hibiscus esculentus* L.

ACA6G1C901R	MAGVLLWVCPFGNATALLSLIRSG..NKF....KKKSEN..CVSA..SSAVANPARSSECVVHVVLKQALVKEQGRKPLDIEKRSEKTDGFTDWDI	92
XP_017608492.1	MAGVLLWVCPFGNATALLSLIRSG..XHKRCRVHQKVKFSTCVSA..SSAVANPARSSECVVHVVLKQALVKEQGRKPLDIEKRSEKTDGFTDWDI	97
XP_016698693.1	MAGVLLWVCPFGNATALLSLIRSG..XHKRCRVHQKVKFSTCVSA..SSAVANPARSSECVVHVVLKQALVKEQGRKPLDIEKRSEKTDGFTDWDI	97
XP_012483475.1	MAGVLLWVCPFGNATALLSLIRSG..XHKRCRVHQKVKFSTCVSA..SSAVANPARSSECVVHVVLKQALVKEQGRKPLDIEKRSEKTDGFTDWDI	97
XP_007048944.1	MAGVLLWVCPFGNATALLSLIRSG..KQKRS..RLCPTLTKKATCTVSA..SSAVANPARSSECVVHVVLKQALVKEQGRKPLDIEKRSEKTDGFTDWDI	97
OMP06676.1	MAGVLLWVCPFGNATALLSLIRSGGKQKRSRLCSPRIKSTVSA..SSAVANPARSSECVVHVVLKQALVKEQGRKPLDIEKRSEKTDGFTDWDI	100
Consensus	magvllwv pk nallsl p sg f vsa ssavanparsse cvv hvvlkqaalvkeqr k ldl d tdwd	
ACA6G1C901R	LINEAYDRCGEVCAEYAKTFYLGTLTMTFERRRAVWAIYVWCRTDELVDGNA..HITPRALDRWEKRLDDIFGGRFYDM..DAALSDTVSKYFVDIQPFKD	192
XP_017608492.1	LINEAYDRCGEVCAEYAKTFYLGTLTMTFERRRAVWAIYVWCRTDELVDGNA..HITPRALDRWEKRLDDIFGGRFYDM..DAALSDTVSKYFVDIQPFKD	197
XP_016698693.1	LINEAYDRCGEVCAEYAKTFYLGTLTMTFERRRAVWAIYVWCRTDELVDGNA..HITPRALDRWEKRLDDIFGGRFYDM..DAALSDTVSKYFVDIQPFKD	197
XP_012483475.1	LINEAYDRCGEVCAEYAKTFYLGTLTMTFERRRAVWAIYVWCRTDELVDGNA..HITPRALDRWEKRLDDIFGGRFYDM..DAALSDTVSKYFVDIQPFKD	197
XP_007048944.1	LINEAYDRCGEVCAEYAKTFYLGTLTMTFERRRAVWAIYVWCRTDELVDGNA..HITPRALDRWEKRLDDIFGGRFYDM..DAALSDTVSKYFVDIQPFKD	197
OMP06676.1	LINEAYDRCGEVCAEYAKTFYLGTLTMTFERRRAVWAIYVWCRTDELVDGNA..HITPRALDRWEKRLDDIFGGRFYDM..DAALSDTVSKYFVDIQPFKD	200
Consensus	lineaydrcegevcayektfylygtllmtferrravwaiyvwcrtdelvdgna hitpraldrwekrlddl grpydm daalsdtvskypvdiqpfkd	
ACA6G1C901R	MEGMRDLRKSRYMNFDELYLYCYVAGTVGLMSVFMGIAPESKASVESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELARGLSDIDIER	292
XP_017608492.1	MEGMRDLRKSRYMNFDELYLYCYVAGTVGLMSVFMGIAPESKASVESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELARGLSDIDIER	297
XP_016698693.1	MEGMRDLRKSRYMNFDELYLYCYVAGTVGLMSVFMGIAPESKASVESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELARGLSDIDIER	297
XP_012483475.1	MEGMRDLRKSRYMNFDELYLYCYVAGTVGLMSVFMGIAPESKASVESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELARGLSDIDIER	297
XP_007048944.1	MEGMRDLRKSRYMNFDELYLYCYVAGTVGLMSVFMGIAPESKASVESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELARGLSDIDIER	297
OMP06676.1	MEGMRDLRKSRYMNFDELYLYCYVAGTVGLMSVFMGIAPESKASVESVYNAALALGIANQLTNILRDVGEDARRGRVYLPQDELARGLSDIDIER	300
Consensus	m egmrldlrksry nfdelylycyvagtvgllmsvfmgiapeskatesvynaalalgianqltnilrdvgedarrgr ylpqdela rgld dif	
ACA6G1C901R	GQVTDWRNFMKDQIKRARMFFDEAEKGVSELN..ASRWFVWASLLLYRQILD..IBENDYNNFSKRAYVGKKKASLFVAYGRAIMGSKL	383
XP_017608492.1	GQVTDWRNFMKDQIKRARMFFDEAEKGVSELN..ASRWFVWASLLLYRQILD..IBENDYNNFSKRAYVGKKKASLFVAYGRAIMGSKL	388
XP_016698693.1	GQVTDWRNFMKDQIKRARMFFDEAEKGVSELN..ASRWFVWASLLLYRQILD..IBENDYNNFSKRAYVGKKKASLFVAYGRAIMGSKL	388
XP_012483475.1	GQVTDWRNFMKDQIKRARMFFDEAEKGVSELN..ASRWFVWASLLLYRQILD..IBENDYNNFSKRAYVGKKKASLFVAYGRAIMGSKL	388
XP_007048944.1	GQVTDWRNFMKDQIKRARMFFDEAEKGVSELN..ASRWFVWASLLLYRQILD..IBENDYNNFSKRAYVGKKKASLFVAYGRAIMGSKL	388
OMP06676.1	GQVTDWRNFMKDQIKRARMFFDEAEKGVSELN..ASRWFVWASLLLYRQILD..IBENDYNNFSKRAYVGKKKASLFVAYGRAIMGSKL	391
Consensus	gqvtd wr fmkdqikrarmffdeaekgv eln asrwpvwasllyrqild ie ndynnf krayvgk kk aslpvaygral g sk	

XP_017608492.1: 亚洲棉; XP_016698693.1: 陆地棉; XP_012483475.1: 雷蒙德氏棉; XP_007048944.1: 可可; OMP06676.1: 长蒴黄麻; ACA6G1C901R: 黄秋葵。黑色表示相似度100%, 红色表示相似度75%, 蓝色表示相似度50%。

XP_017608492.1: *Gossypium arboreum*; P_016698693.1: *Gossypium hirsutum* X; XP_012483475.1: *Gossypium raimondii*; XP_007048944.1: *Theobroma cacao*; OMP06676: *Corchorus olitorius*; ACA6G1C901R: *Hibiscus esculentus* L.; black represents 100% similarity, red 75% similarity and blue 50% similarity.

图2 黄秋葵PSY氨基酸同源性分析

Fig.2 Homology analysis of PSY in *Hibiscus esculentus* L.

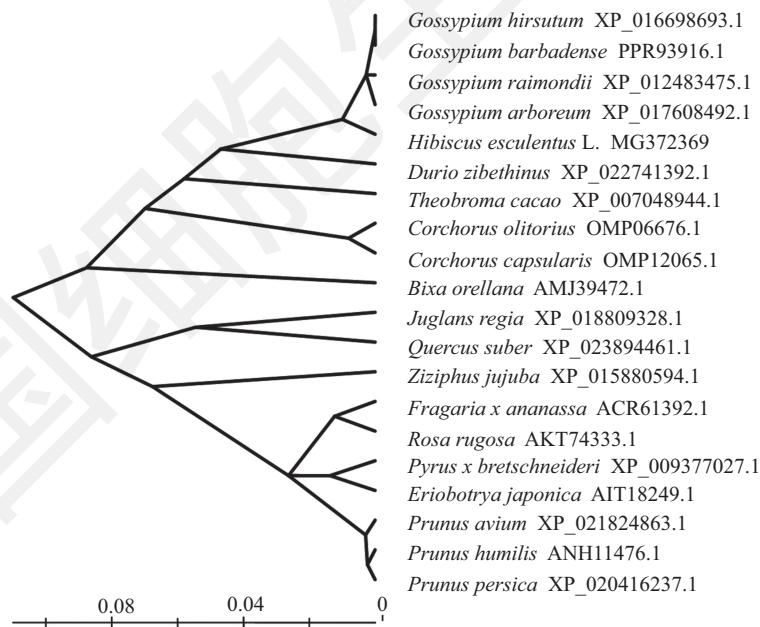


图3 黄秋葵PSY与其他植物19个PSY蛋白的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of PSY in *Hibiscus esculentus* L. with 19 other plant PSYs

*HePSY*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*HePSY*表达量逐渐增加, 到成熟叶时达到最高, 之后逐渐下降, 3个黄秋葵品种间表达量变化趋势一致, 红色品种的成熟叶表达量

最高, 绿色品种的幼叶表达量最低。经差异分析得, *HePSY*除红色品种的成熟叶、绿色品种的嫩叶外, 在嫩叶、成熟叶中表达无显著差异, 老叶与幼叶中除红色品种的老叶外表达差异不显著, *HePSY*在3个

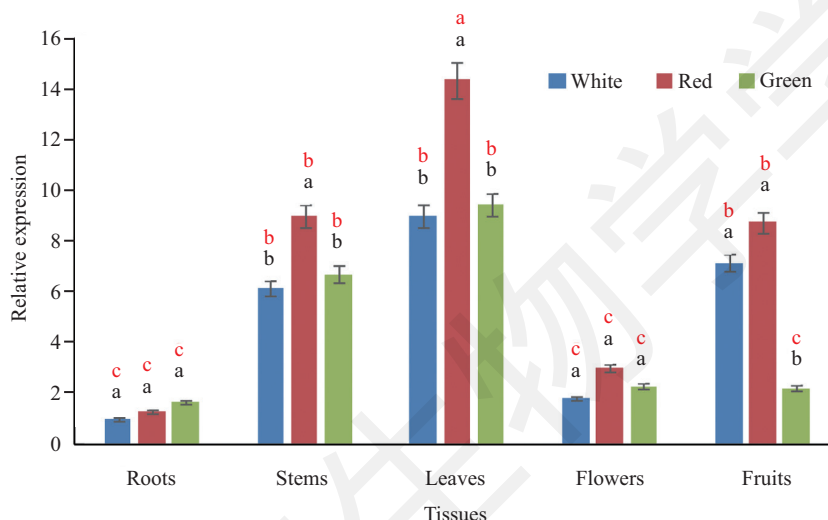
品种的成熟叶和老叶中表达显著差异(图5)。

2.3.3 $HePSY$ 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, $HePSY$ 基因表达量伴随着果实发育逐渐增加, 花后4天表达量达到峰值, 随后表达量迅速下降。 $HePSY$ 基因表达在红色品种和绿色品种的花后6天、8天、10天的果实中表达无显著差异, 白色品种差异显著, 在花后2天、4天的果实中, 绿色品种表达差异显著, 白色、红色品种表达的无显著差异(图6)。

2.4 黄秋葵类胡萝卜素含量测定

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, 叶的叶绿素A、叶绿素B、类胡萝卜素含量均最高, 茎其次, 根中含量最低; 同一器官绿色品种类胡萝卜素较高, 其次是红色品种, 白色品种较低; 同一器官的类胡萝卜素含量红色品种与绿色品种间差异不显著, 而与白色品种有较显著差异(表2)。

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绿素A、叶绿素B、

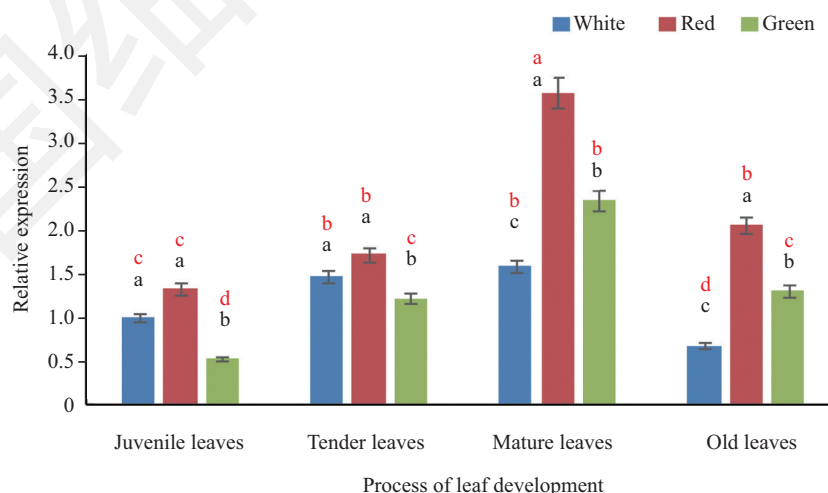


红色字母表示 $HePSY$ 在黄秋葵各组织表达的差异显著性; 黑色字母表示 $HePSY$ 在黄秋葵不同品种间的表达差异显著性。

Red letters represent significant expression differences of $HePSY$ gene between different tissues, Black letters represent expression differences of $HePSY$ gene between different varieties.

图4 $HePSY$ 在不同黄秋葵品种、组织中的表达

Fig.4 Expression of $HePSY$ in different varieties and tissues



红色字母表示 $HePSY$ 在黄秋葵叶发育过程表达的差异显著性; 黑色字母表示 $HePSY$ 在黄秋葵不同品种间的表达差异显著性。

Red letters represent significant expression differences of $HePSY$ gene between leaf development, Black letters represent expression differences of $HePSY$ gene between different varieties.

图5 黄秋葵叶片发育过程中 $HePSY$ 的表达

Fig.5 Expression of $HePSY$ in the process of leaf development

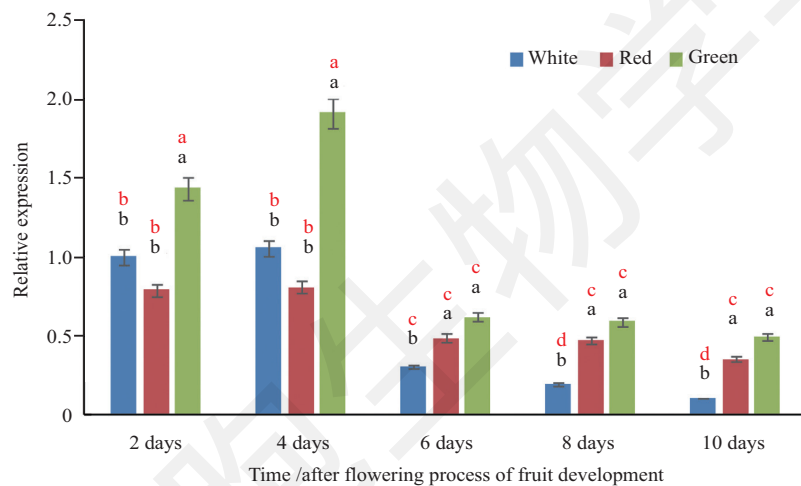
类胡萝卜素含量逐步升高,成熟叶时达到峰值,叶成熟后到叶片老化其类胡萝卜素含量迅速下降。不同品种叶片发育的叶绿素A、叶绿素B、类胡萝卜素含量变化趋势一致,以绿色秋葵品种的成熟叶类胡萝卜素含量最高,而白色秋葵品种老叶类胡萝卜素含量最低,在同一时期3个品种相较以绿色品种含量略高,红色品种含量其次,白色品种含量最低,但无显著差异(表3)。

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叶绿素A、B呈现下降态势,类胡萝卜素含量则呈现先上升后下降趋势,在花后4天达到峰值,随后下降。在花后4天含量最高,随后下

降。不同基因型表现同一变化规律,以绿色秋葵品种的花后4天果实类胡萝卜素总含量最高,白色秋葵品种花后10天果实胡萝卜素总含量最低。不同秋葵品种同一时期的类胡萝卜素以绿色品种最高,红色秋葵品种次之,白色秋葵品种总含量最低(表4)。

2.5 PSY基因的表达式与类胡萝卜素含量的相关性分析

通过相关性分析发现,黄秋葵果实发育过程PSY基因表达量与类胡萝卜素含量相关性较好,相关系数 R^2 均在0.9以上,其中白色秋葵的相关性最好,均呈强正相关。叶发育过程PSY基因表达量与类胡萝卜素含量相关性相对较差,相关系数 R^2 在0.7左右,



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

Red letters represent significant expression differences of HePSY gene between fruit development. Black letters represent expression differences of HePSY gene between different varieties.

图6 黄秋葵果实发育过程中HePSY的表达

Fig.6 Expression of HePSY in the process of fruit development

表2 不同品种黄秋葵各组织类胡萝卜素含量/mg·(100 g)⁻¹

Table 2 Total carotenoid and each component content in *Hibiscus esculentus* L. different tissues /mg·(100 g)⁻¹

品种 Varieties	类胡萝卜素 Carotenoid	根 Roots	茎 Stems	叶 Leaves	花 Flowers	果实 Fruits
Red <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	2.17±0.08 ^c	17.53±0.20 ^b	19.06±0.43 ^a	4.82±0.19 ^d	6.19±0.13 ^c
	Chlorophyll B	0.34±0.03 ^d	5.23±0.07 ^b	6.01±0.31 ^a	1.23±0.06 ^b	1.49±0.06 ^c
	Carotenoids	1.04±0.09 ^d	5.55±0.14 ^a	5.85±0.07 ^a	1.51±0.11 ^c	1.84±0.10 ^b
White <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	1.58±0.14 ^c	12.83±0.64 ^b	15.94±0.62 ^a	2.56±0.03 ^c	3.25±0.02 ^c
	Chlorophyll B	0.24±0.02 ^d	2.81±0.03 ^b	3.88±0.04 ^a	0.59±0.05 ^c	0.69±0.04 ^c
	Carotenoids	0.64±0.05 ^c	4.40±0.13 ^b	5.07±0.09 ^a	0.80±0.02 ^c	1.06±0.12 ^c
Green <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	2.59±0.08 ^c	18.69±0.42 ^b	20.84±0.38 ^a	5.37±0.14 ^d	6.39±0.13 ^c
	Chlorophyll B	0.51±0.02 ^d	5.92±0.09 ^b	7.20±0.25 ^a	2.52±0.06 ^c	2.04±0.29 ^c
	Carotenoids	1.21±0.01 ^b	5.78±0.24 ^a	5.93±0.42 ^a	1.56±0.20 ^b	2.02±0.08 ^b

a、b、c、d、e代表横向SNK检验在 $P<0.05$ 水平下具有显著性差异。

a, b, c, d, e stands for represent horizontal SNK tests with significant differences in $P<0.05$ levels.

表3 不同品种黄秋葵叶片生长过程的类胡萝卜素含量/mg·(100 g)⁻¹

Table 3 Total carotenoid and each component content in *Hibiscus esculentus* L. leaf /mg·(100 g)⁻¹

品种	类胡萝卜素	幼叶	嫩叶	成熟叶	老叶
Varieties	Carotenoid	Juvenile leaf	Tender leaf	Matured leaf	Old leaf
Red <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	6.12±0.15 ^d	14.01±0.09 ^b	19.06±0.16 ^a	12.39±0.12 ^c
	Chlorophyll B	2.19±0.08 ^d	3.74±0.04 ^b	6.01±0.09 ^a	3.65±0.08 ^c
	Carotenoids	2.28±0.10 ^c	4.71±0.15 ^b	5.85±0.08 ^a	4.19±0.26 ^b
While <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	5.78±0.09 ^d	12.50±0.05 ^b	15.94±0.12 ^a	11.47±0.20 ^c
	Chlorophyll B	1.67±0.03 ^c	2.85±0.21 ^b	3.88±0.16 ^a	2.65±0.06 ^b
	Carotenoids	2.07±0.05 ^d	4.20±0.05 ^b	5.07±0.14 ^a	3.84±0.13 ^c
Green <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	6.49±0.18 ^d	16.79±0.31 ^b	20.84±0.61 ^a	14.39±0.26 ^c
	Chlorophyll B	3.19±0.06 ^c	5.11±0.14 ^b	7.20±0.08 ^a	5.07±0.17 ^b
	Carotenoids	2.59±0.08 ^d	5.21±0.08 ^b	5.93±0.12 ^a	4.14±0.14 ^c

a、b、c、d、e代表横向SNK检验在P<0.05水平下的差异显著。
a, b, c, d, e stands for represent horizontal SNK tests with significant differences in P<0.05 levels.

表4 不同品种黄秋葵果实发育过程的类胡萝卜素含量/mg·(100 g)⁻¹

Table 4 Total carotenoid and each component content in *Hibiscus esculentus* L. fruit /mg·(100 g)⁻¹

品种	类胡萝卜素	花后2天	花后4天	花后6天	花后8天	花后10天
Varieties	Carotenoid	2 days after flowering	4 days after flowering	6 days after flowering	8 days after flowering	10 days after flowering
Red <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	8.01±0.04 ^a	7.01±0.18 ^b	6.19±0.09 ^c	4.07±0.09 ^d	3.56±0.13 ^c
	Chlorophyll B	2.99±0.14 ^a	1.77±0.08 ^b	1.49±0.04 ^c	0.95±0.02 ^d	0.66±0.02 ^e
	Carotenoids	2.47±0.12 ^b	2.95±0.05 ^a	1.84±0.10 ^c	1.26±0.08 ^d	1.15±0.05 ^d
While <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	7.62±0.08 ^a	5.39±0.16 ^b	3.25±0.05 ^c	2.51±0.07 ^d	2.28±0.12 ^d
	Chlorophyll B	1.74±0.08 ^a	0.98±0.07 ^b	0.69±0.04 ^c	0.64±0.04 ^c	0.58±0.08 ^c
	Carotenoids	2.28±0.09 ^a	2.48±0.10 ^a	1.06±0.07 ^b	0.71±0.05 ^c	0.60±0.03 ^c
Green <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Chlorophyll A	15.60±0.80 ^a	14.24±0.23 ^b	11.23±0.23 ^c	9.97±0.14 ^d	9.45±0.02 ^d
	Chlorophyll B	5.22±0.10 ^a	3.65±0.10 ^b	2.63±0.10 ^c	1.90±0.04 ^d	1.63±0.09 ^d
	Carotenoids	3.80±0.09 ^a	4.04±0.06 ^a	3.10±0.08 ^b	3.04±0.13 ^b	2.65±0.08 ^c

a、b、c、d、e代表横向SNK检验在P<0.05水平下的差异显著。
a, b, c, d, e stands for represent horizontal SNK tests with significant differences in P<0.05 levels.

表5 黄秋葵叶、果实发育PSY基因表达量与类胡萝卜素含量相关性分析R²值
Table 5 Correlation analysis of gene expression, and carotenoid content in leaves and fruits of *Hibiscus esculentus* L.

项目	红色秋葵	白色秋葵	绿色秋葵
Item	Red <i>Hibiscus esculentus</i> L.	While <i>Hibiscus esculentus</i> L.	Green <i>Hibiscus esculentus</i> L.
Leaf development	0.712 8*	0.753 36*	0.753 2*
Fruit development	0.906 8**	0.995 7**	0.935 3**

*表示中相关, **表示强相关。
* Indicates relevance, ** indicates strong correlation.

中度正相关(表5)。

3 讨论

类胡萝卜素既是类胡萝卜素普遍存在于水果、蔬菜中, 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^[26]。具有抗氧化^[27-28]、预防心血管疾病^[29]、抗衰老^[30]和保护视力^[31]等功效。类胡萝卜素作为被联合国组织认定的A类营养素广泛地应用于食品、医药和饲料等领域。本研究测得黄秋葵各组织中均含有类胡萝卜素, 叶片中类胡萝卜素含量伴随着叶片的发育逐步升高, 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, 具备作为天然着色剂植物源栽培和应用优势条件^[32]。果实中类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4天达到峰值, 此时也是黄秋葵果实最适宜采收期^[33-34]。

八氢番茄红素合成酶是植物类胡萝卜素代谢途径中的第一个关键酶, 对类胡萝卜素物质的合成具有重要作用^[35-36]。柑桔、番茄果实成熟期间 PSY 基因的表达增强20多倍, 表明果实发育期间的类胡萝卜素含量与 PSY 密切相关, 果实转色期 PSY 基因表达增强是类胡萝卜素含量迅速上升的主要原因^[37-38]。杧果 PSY 基因的表达丰度和类胡萝卜素合成密切相关^[15]。 PSY 在胡萝卜根中的表达水平与类胡萝卜素含量呈正相关, 而叶片类胡萝卜素含量与 PSY 的表达水平基本呈现负相关关系^[39]。本研究根据黄秋葵转录组测序获得的 PSY 基因序列, 经克隆验证获得黄秋葵 PSY 基因, 其全长为1 399 bp, 含有1 155个碱基的开放阅读框(ORF), 编码384个氨基酸。黄秋葵 PSY 的氨基酸序列与亚洲棉、陆地棉、可可的相似性均在90%以上, 显示其高度的保守性。系统进化树分析显示, 黄秋葵与亚洲棉(*Gossypium arboreum*)、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)的 PSY 遗传关系较教近, 与樱桃(*Prunus avium*)、欧李(*Prunus humilis*)和碧桃(*Prunus persica*)的遗传关系较远。实时荧光定量PCR分析发现, $HePSY$ 基因在黄秋葵各组织中均有表达, 以在叶中表达量最高。在黄秋葵叶片, 伴随着叶片的生长, $HePSY$ 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, $HePSY$ 基因表达量呈现先上升后下降趋势, 在花后4天达到峰值, 随后下降。 $HePSY$ 基因的表达趋势与类胡萝卜素含量变化规律一致, 在叶和果实中 $HePSY$ 基因表达与类胡萝卜素含量均正相关, 这与王慧^[39]在胡萝卜根中的研究结果相同, 与其在胡萝卜叶中的研究结果不同。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 (References)

- 1 Ruiz-Sola Má, Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *TAB* 2012; 10(1): 158-85.
- 2 Howitt CA, Pogson BJ. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* 2006; 29(3): 435-45.
- 3 West KP, Klemm RDW, Sommer A. Vitamin A saves lives. sound science, sound policy. *World Nutr* 2010; 1(10): 211-29.
- 4 Mayo-Wilson E, Imdad A, Herzer KR, Yakoob M. Vitamin A supplements for preventing mortality, illness and blindness in children aged under 5: systematic review and meta-analysis. *Brit Med J* 2011; 343(8): 5094-112.
- 5 Tang GW, Hu YM, Yin SA, Wang Y, Dallal GE, Grusak MA, et al. β -Carotene in Golden Rice is as good as β -carotene in oil at providing vitamin A to children. *Am J Clin Nutr* 2012; 96(3): 658-64.
- 6 Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar Drugs* 2011; 9(3): 447-65.
- 7 Cazzonelli CI. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct Plant Biol* 2011; 38(11): 833-47.
- 8 Yamaguchi M. Role of carotenoid β -cryptoxanthin in bone homeostasis. *J Biomed 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在基因工程中的应用. *植物生理与分子生物学报*(Zhu Changfu, Chen Xing, Wang Yingdian. Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*) 2004; 30(6): 609-18.
- 10 Fraser PD, Truesdale MR, Bird C, Schuch W, Bramley PM. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Evidence for tissue-specific gene expression. *Plant Physiol* 1994; 105(1): 405-13.
- 11 Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY. Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* 1999; 20(4): 401-12.
- 12 Ray J, Bird C, Maunders M, Grierson D, Schuch W. Sequence of pTOM5 a ripening related cDNA from tomato. *Nucleic acids Res* 1987; 15(24): 1058.
- 13 Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta* 2010; 232(5): 1251-62.
- 14 Wong JC, Lambert RJ, Wurtzel ET, Rocheford TR. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theor Appl Genet* 2004; 108(2): 349-59.
- 15 黄建峰, 高爱平, 赵志常, 党志国, 罗睿雄, 陈业渊. 杧果类胡萝卜素合成酶基因 PSY 的表达特性分析. *中国南方果树*(Huang Jianfeng, Gao Aiping, Zhao Zhichang, Dang Zhiguo, Luo Ruixiong, Chen Yeyuan. The expression analysis of phytoene synthase gene in mango. *South China Fruits*) 2016; 45(5): 18-22.
- 16 陶能国. 枸杞果实 PSY 和 $LCYB$ 基因片段的克隆与序列分析. *湘潭大学自然科学学报*(Tao Nengguo. Cloning and sequence analysis of the partial sequences of PSY and $LCYB$ genes from fruits of wolfberry. *Natural Science Journal of Xiangtan University*) 2011; 33(2): 60-4.
- 17 Salvini M, Bemini A, Fambfimi M, Pugliesi C. cDNA cloning and expression of the phytoene synthase gene in sunflower. *J Plant Physiol* 2005; 162(4): 479-84.
- 18 Busch M, Seuter A, Hain R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 2002; 128(2): 439-53.
- 19 Huh JH, Kang BC, Nahm SH, Kim S, HaK S, Lee MH, et al.

- A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.). *Theor Appl Genet* 2001; 102(4): 524-30.
- 20 Ray J, Moureau P, Bird C, Bird A, Grierson D, Maunders M, *et al.* Cloning and characterization of gene involved in phytoene syn thesis from tomato. *Plant Mol Biol* 1992; 19(3): 401-4.
- 21 朱海生, 李永平, 温庆放. 草莓八氢番茄红素合成酶基因的克隆及其表达特性. *中国农业科学* (Zhu Haisheng, Li Yongping, Wen Qingfang. Cloning and expression analysis of phytoene synthase gene in *Fragaria ananassa* Duch. *Scientia Agricultura Sinica*) 2011; 44(2): 349-57.
- 22 Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* 1999; 20(4): 401-12.
- 23 季静, 王罡. 来自龙胆草 (*Gentiana lutea*) 的5个类胡萝卜素生物合成相关酶基因对类胡萝卜素生物合成量影响的分析. *农业生物技术学报* (Ji Jing, Wang Gang. Analysis of the effects of five carotenoid biosynthesis-related enzyme genes from gentiana lutea on carotenoid biosynthesis. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2002; 10(3): 62-3.
- 24 卢隆杰, 苏浓, 岳森. 菜药花兼用型植物——黄秋葵. *蔬菜* (Lu LongJie, Su Nong, Yue Sen. Cabbage-flowering plant——Okra. *Vegetables*) 2004; 10: 36.
- 25 Lawford B, Luther W J. Controlled atmosphere effects on physical changes and ethylene evolution in harvested okra. *Hortic Sci.* 1990; 25(1): 92-5.
- 26 陶俊, 张上隆. 园艺植物类胡萝卜素的代谢及其调节. *浙江大学学报* (Tao Jun, Zhang Shanglong. Metabolism of carotenoid and its regulation in garden crop. *Journal of Zhejiang University*) 2003; 29(5): 585-90.
- 27 Kim YS, Park SJ, Cho YH, Park J. Effect of combined treatment of high hydrostatic pressure and mild heat on the quality of carrot juice. *J Food Sci* 2011; 66(9): 1355-60.
- 28 Zanfini A, Corbini G, La Rosa C, Dreassi E. Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT-Food Sci Technol* 2010; 43(1): 67-72.
- 29 Aruna G, Baskaran V. Comparative study on the levels of carotenoids lutein, zeaxanthin and β -carotene in Indian spices of nutritional and medicinal importance. *Food Chem* 2010; 23(2): 404-9.
- 30 Semba RD. Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. *P Nutr Soc* 2007; 58(3): 719-27.
- 31 Oliver J, Palou A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J Chromatogr A* 2000; 881(1/2): 543-55.
- 32 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. *中国农学通报* (Liu Dongxiang, Ye Hualan, Liu Guodao. A comparative experiment on lutein and beta-carotene yields of 14 okra strains. *China Agricultural Bulletin*) 2006; 22(6): 425-7.
- 33 Singh D, Tripathi RD, Singh HN. Effect of age of picking on the chemical composition of the fruits of okra. *Indian J Agr Sci* 1974; 44 (1): 22-6.
- 34 许如意, 罗丰, 袁廷庆, 黄仁功, 李劲松. 不同采摘期对黄秋葵果实性状和品质的影响. *长江蔬菜* (Xu Ruyi, Luo Feng, Yuan Tingqing, Huang Rengong, Li Jinsong. Effect of picking time on the fruit characters of okra. *Journal of Changjiang Vegetables*) 2011; (2): 18-20.
- 35 Busch M, Seuter A, Hain R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 2002; 128(2): 439-53.
- 36 Ove L, Kjell GS, Anna SH. Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiol* 2003; 132(2): 779-85.
- 37 Lois LM, Rodriguez-concepcion M, Gallego F, Campos N. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* 2000; 22(6): 503-13.
- 38 Rodrigo MJ, Marcos JF, Alferrez F, Mallent MD. Characterization of Pinalate, a novel citrus sinensis mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* 2003; 54(383): 727-38.
- 39 王慧. 胡萝卜PSY基因的功能研究. 北京: 中国农业科学院, 2014.