

屠凯,文晓鹏,张惠敏,等. 火龙果 $HpGST$ 基因克隆及表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(1): 34-41.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.01.005

火龙果 $HpGST$ 基因克隆及表达分析

屠凯,文晓鹏,张惠敏,申洛男

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院/
山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025

摘要 为探究火龙果(*Hylocereus*)谷胱甘肽S-转移酶基因($HpGST$)的功能,克隆了 $HpGST$ 基因的cDNA序列,并进行生物信息学及表达分析。结果显示: $HpGST$ 序列全长为666 bp,编码221个氨基酸,编码蛋白属于非分泌型不稳定亲水性蛋白,亚细胞定位预测其于细胞质中发挥作用;系统进化树显示其与藜麦亲缘关系较近,属谷胱甘肽转移酶Tau家族;实时荧光定量PCR分析结果显示, $HpGST$ 在火龙果不同色泽类型品种果肉中均有表达,在有色素累积的紫肉和粉肉类型中表达量均显著高于无色素累积的白肉类型,表达趋势均为先上升后下降,其表达量与甜菜素含量呈现正相关,且在不同色泽类型品种中表达趋势与甜菜素累积趋势高度一致,推测 $HpGST$ 基因在火龙果甜菜素合成与分布中发挥重要作用。

关键词 火龙果; 谷胱甘肽S-转移酶基因($HpGST$); 甜菜素; 生物信息学; 基因克隆

中图分类号 S667.903 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)01-0034-08

谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)是一种普遍存在的参与多种细胞功能的蛋白,参与植物花青苷运输与定位。花青素的运输需要与GSH结合才能运输到液泡中,而谷胱甘肽泵能够识别与GSH结合标记的内源底物并将它们定位到合适部位^[1]。在苹果中, $MdGSTF3$ 基因的表达与果实不同组织花青苷的积累和分布密切相关^[2]。在葡萄中,葡萄果皮和果肉花青苷的积累与GST相关^[3],GST参与小泡运输花青苷^[4],并且在葡萄中,葡萄ATP结合蛋白ABCC1运输花青苷依赖于谷胱甘肽的含量^[5]。

火龙果(*Hylocereus*)为仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereusundatus*)果树,因其富含甜菜素而具有很高的经济价值,被贵州省列为重点支持的特色产业^[6]。研究表明,甜菜素是以酪氨酸为起始底物,经众多酶促反应和自发反应合成,其关键酶是酪氨酸羟化酶和4,5-多巴双加氧酶^[7]。虽然甜菜素合成通路日渐清晰,对于甜菜素合成后的运输机制尚不清楚。火龙果的主要色素是甜菜素而不是花青素,鉴于GST在植物中参与花青苷运输与定位的重要作用,火龙果GST是否参与甜菜素的运输与定位?为探究这一科学问题,本研究克隆火龙果 $HpGST$ 基因的

cDNA全长序列,分析 $HpGST$ 在火龙果不同组织和发育时期的表达情况,测定相应时期和组织中甜菜素含量,进而对该基因表达与甜菜素含量间的相关性进行分析,旨在全面认识 $HpGST$ 基因在火龙果甜菜素代谢过程中的分子机制,为通过基因工程手段对果实色泽性状进行定向改良提供新信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取贵州省罗甸县火龙果种植基地紫肉(紫红龙)、粉肉(粉红龙)、白肉(晶红龙)类型适龄植株挂牌标记,每种色泽类型品种选3株,采集开花后10、20、25、26、27、30 d果实,并分别标记为S1(10 DAF)、S2(20 DAF)、S3(25 DAF)、S4(26 DAF)、S5(27 DAF)、S6(30 DAF)。每个采样时期从3株植株各采1果,经清水洗净后液氮速冻,并置于-80℃超低温冰箱备用。

1.2 总RNA提取与cDNA合成

取约0.2 g样品经液氮速冻充分研磨后,采用多糖多酚植物RNA提取试剂盒(张家口赛诺生物科技有限公司),根据说明书操作步骤提取果实总RNA,

收稿日期: 2022-07-28

基金项目:国家自然科学基金项目(32060663);贵州省教育厅普通高等学校科技拔尖人才项目(黔教合KY字[2021]028)

屠凯, E-mail: 2535170385@qq.com

通信作者: 文晓鹏, E-mail: xpwensc@hotmail.com

利用全波长扫描酶标仪(Thermo Fisher)和1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的浓度和质量;利用TaKaRa公司反转录试剂盒(PrimeScript™ TR reagent Kit with gDNA Eraser)进行反转录,合成cDNA第1链。

1.3 基因克隆

根据*HpGST*基因序列,使用Prism 5.0本地软件设计特异性引物(表1)。利用PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa, 大连)高保真酶进行

PCR 扩增,PCR反应条件为:98 ℃变性 10 s,61 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。扩增采用 10 μL 体系,包括 5 μL PrimerSTAR Buffer、3.5 μL ddH₂O、0.5 μL 正向引物、0.5 μL 反向引物、0.5 μL cDNA 模板。产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测后,目的片段胶回收后与Blunt克隆载体连接并转化大肠杆菌感受态中,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 火龙果 *HpGST* 基因克隆的相关引物。

Table 1 Primers used for *HpGST* gene cloning in pitaya fruit

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
<i>HpGST</i> -F	CGGAATCCAGAAACCCGTGTG	<i>HpGST</i> 基因cDNA扩增 Amplification of <i>HpGST</i> gene cDNA
<i>HpGST</i> -R	GCAACACTCAAGGCGTTAGCT	
<i>qHpGST</i> -F	TGCTGATTCAACAACCGTCCG	基因表达分析 Analysis of gene expression
<i>qHpGST</i> -R	TGCCTCCTGCTCTTCACCT	
<i>ACTION</i> -2-F	TCCCGAAGAGCACCCAGTTT	内参基因 Reference gene
<i>ACTION</i> -2-R	ATGGCATGAGGAAGGGCATA	

1.4 基因生物信息学分析

利用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)进行核苷酸和氨基酸序列比对及保守结构域分析;使用MEGA 8.0 软件构建系统发育树;使用ExPASy (<https://www.expasy.org/resources/protparam>)在线分析软件预测蛋白质的理化性质和亲疏水性;TMHMM Server2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)在线软件分析蛋白质的跨膜结构域;使用Cell-PLoc 2(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)预测蛋白质的亚细胞定位,GOR4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl)预测蛋白质二级结构。

1.5 RT-PCR 分析

根据笔者所在课题组前期获得的火龙果转录组数据^[8]中的*HpGST*基因序列,设计荧光定量引物,*qHpGST*-F和*qHpGST*-R(表1),以*ACTION*-2为内参,分别设计其特异性引物*ACTION*-2-F、*ACTION* 2-R(表1),采用2^{-△△Ct}法分析相对表达量。

1.6 甜菜素提取和测定

参考曾灿彬^[9]的方法并进行改进。准确称取不同色泽类型品种及不同发育时期火龙果果肉0.2 g,经液氮研磨,利用80%乙醇提取甜菜素,在紫外分光光度计上分别于波长538、470 nm处测定甜菜红素和甜菜黄素吸光度并计算其含量。

2 结果与分析

2.1 *HpGST*基因克隆与生物信息学分析

将提取的火龙果总RNA反转录获得火龙cDNA,以火龙果cDNA为模板,利用引物*HPGST*-F和*HPGST*-R(表1)扩增得到1条500~900 bp的特异性条带。利用ExPASy-Protparam预测HpGST蛋白分子质量为2.5 ku,理论等电点为7.02。编码氨基酸包含了20种常见氨基酸。其中赖氨酸含量最高,达到10%。分子式为C₁₁₉₃H₁₈₃₄N₃₀₄O₃₂₆S₇。蛋白不稳定系数为44.46,属于不稳定蛋白。利用TMHMM-2.0分析跨膜结构域,发现该蛋白不具有跨膜结构域,推测其在膜外发挥作用。利用在线分析软件Cell-PLoc 2.0分析蛋白的亚细胞定位,发现该基因主要定位于细胞质。利用ExPASy的ProtScale程序分析火龙果*HpGST*编码蛋白疏水性和亲水性,结果显示,该蛋白质属于亲水性蛋白。通过GOR 4在线分析软件对HpGST蛋白进行二级结构预测,其中α-螺旋占该蛋白的比例最高为33.94%,不规则卷曲所占比例为46.15%,延伸链所占比例为19.91%(图1)。

使用NCBI的CDD在线分析软件对*HpGST*进行蛋白质保守结构域预测,结果(图2)显示,该基因编码蛋白含有GST_N_Tau和GST_C_Tau的保守结构域,第1个保守结构域由第6~80个氨基酸之间的74个氨基酸组成,第2个保守结构域由第91~214个氨基酸之间的123个氨基酸组成,并将该编码蛋白

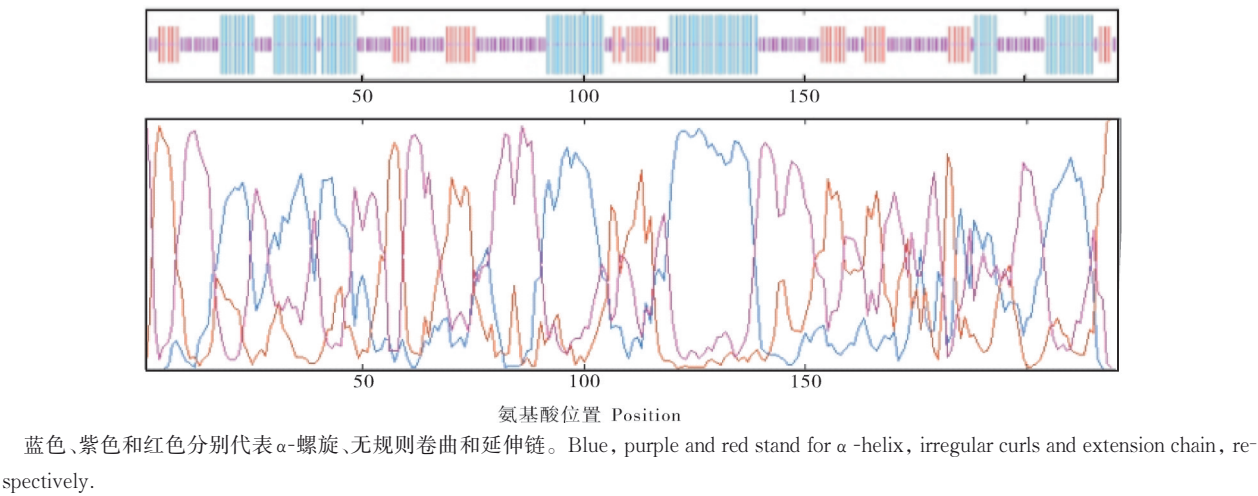


图 1 HpGST 蛋白质二级结构预测分析
Fig. 1 Prediction analysis of secondary structure of HpGST protein

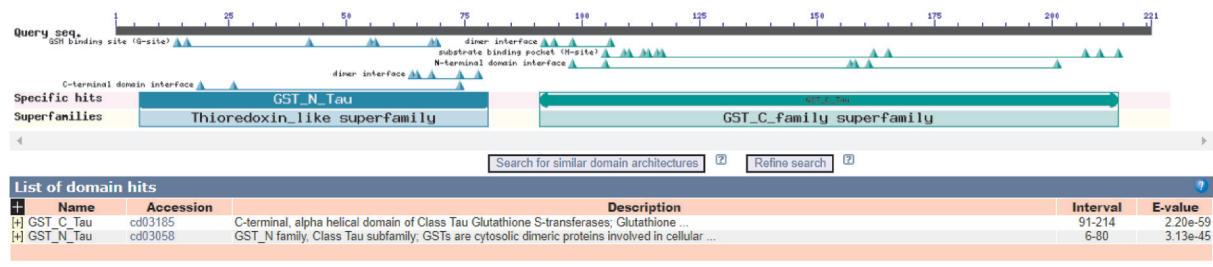


图 2 火龙果 HpGST 保守结构域分析
Fig. 2 Conserved domain analysis of HpGST in pitaya

命名为HpGST。

使用NCBI的BlastP在线分析软件进行在线比对,在蛋白质序列库中对HpGST进行同源性检索和比对分析。获取来自藜麦(*Chenopodium quinoa*)、甜菜亚种(*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、阿尔巴尼亚牧豆(*Prosopis alba*)等8种植物的15个蛋白氨基酸序列。利用MEGA7.0软件将HpGST蛋白与这15个GST蛋白序列进行多重序列比对并构建系统进化树(图3)。结果显示:火龙果HpGST蛋白与藜麦(XP_021720754.1、XP_021715456.1、XP_021746029.1、XP_021715455.1),甜菜亚种(XP_010594823.1),菠菜(XP_021839481.1、XP_021866921.1)亲缘关系最近,与阿尔巴尼亚牧豆(XP_028752413.1、XP_028752382.1、XP_028752391.1、XP_0288045421.1)亲缘关系较远。

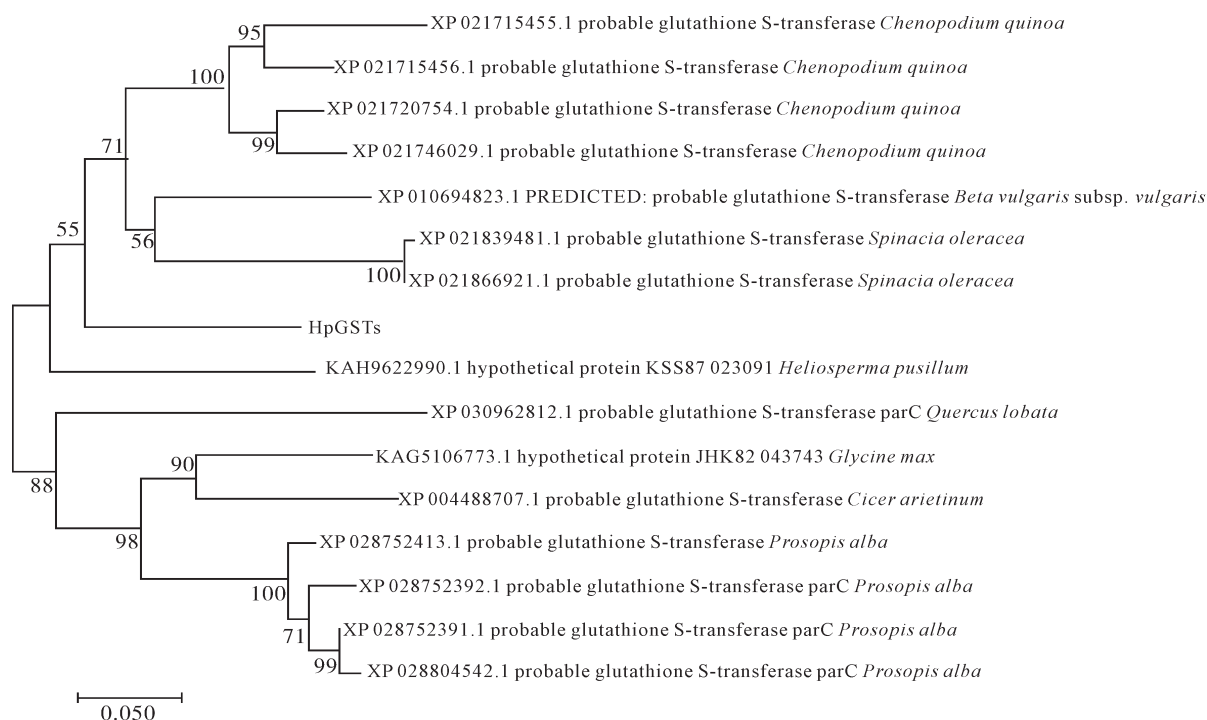
使用DNAMAN8.0将HpGST的氨基酸序列与亲缘性较近的几个物种的GST氨基酸序列进行多重比对(图4),结果显示,HpGST蛋白与其他物种的GST蛋白的氨基酸序列同源性比较高,其中与藜麦(XP_

021720754.1、XP_021715456.1、XP_021746029.1、XP_021715455.1)相似性分别为81%、81.02%、79.64%、76.50%,与甜菜亚种(XP_010594823.1)相似性为77.98%,与菠菜(XP_021839481.1、XP_021866921.1)相似性为71.15%和71.61%。

2.2 HpGST的表达分析

利用qRT-PCR分析HpGST在火龙果不同色泽类型品种、不同发育期果肉中的表达情况,表达结果(图5A)显示,在有色果肉中S3期开始表达量明显上升,紫肉S3期表达量是S2期表达量的9.96倍,粉肉中则是5.54倍。而白肉中直到S4期表达量才显著上升,且表达量整体上较低。此外,紫肉火龙果中基因表达量变化早于粉肉火龙果;紫肉火龙果S4期表达量是S3期表达量的3.32倍且两者差异明显,S5期表达量是S4期表达量的3.80倍且两者差异明显。而粉肉火龙果中S4期表达量是S3期表达量的1.37倍,两者差异不明显,S5期表达量是S4期表达量的12.0倍且2个时期差异显著。而对应时期白肉中表达量则分别是0.99和0.48且表达量较低。

分析HpGST在火龙果不同发育期、不同色泽类

图3 *HpGST*与其他物种GST氨基酸序列系统进化树分析Fig. 3 The phylogenetic tree analysis of GST amino acid sequences of *HpGST* and that of other species

型品种果肉中的表达情况,结果(图5B)显示,在S1-S2期,*HpGST*在3个色泽类型品种果肉表达量无明显差异。而从S3期开始,在有色果肉中表达量明显高于白肉;在紫肉中表达量是白肉的8.12倍,差异显著,而在粉肉中表达量是白肉的4.49倍,差异显著。S4期在紫肉中表达量远高于在粉肉和白肉中的表达且均差异显著,分别是粉肉的4.11倍、白肉的6.82倍。而在该时期*HpGST*在粉肉中的表达量是白肉的1.66倍。此后的S5期和S6期,*HpGST*在有色果肉表达量无显著差异但都远高于白肉中的表达量且差异明显,S5期*HpGST*在紫肉中表达量是白肉中表达量的26.09倍,在粉肉中的表达量是白肉中的17.36倍,而S6期对应的分别为20.02倍和21.45倍。

上述结果表明,*HpGST*基因在不同色泽类型品种果肉中均有表达,但表达特性不同。*HpGST*在有色素累积的果肉中表达量明显远高于无色素累积的白肉火龙果,且整体上呈现紫肉>粉肉>白肉,发育时期上呈现出随时间的延长而先上升后下降的趋势,其中在紫肉和粉肉类型的S5期(27 DAF)相对表达量最高,而白肉类型S4期(26 DAF)表达量最高。

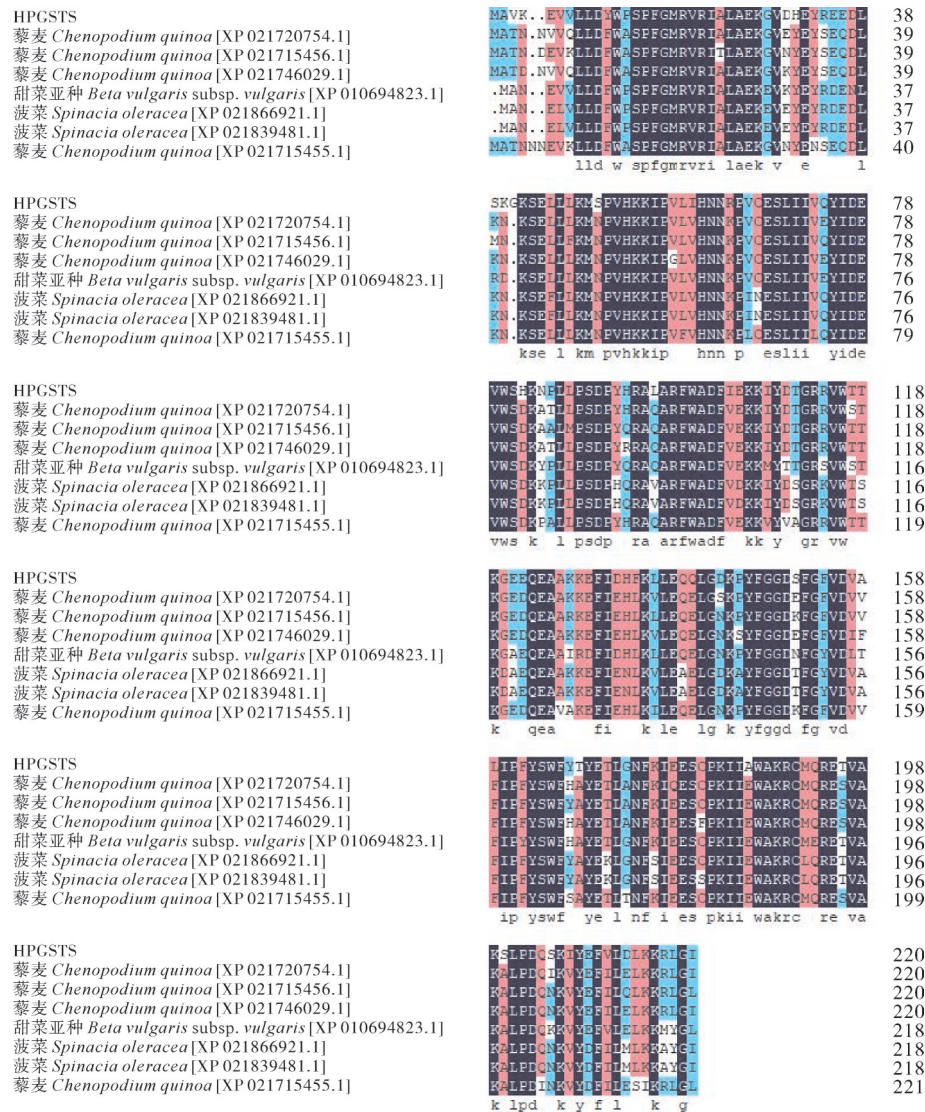
2.3 火龙果发育过程中甜菜素含量的变化

甜菜红素在不同发育时期果肉中的含量变化结果(图6A)显示,紫肉火龙果中甜菜红素含量整体呈

现随发育时期的延长而不断上升的趋势,从S3期开始急速升高,S3-S6期甜菜素含量均与S1、S2期含量有显著差异。而在粉肉火龙果中,S1-S4期甜菜红素含量均无显著差异,S5-S6期差异显著,但整体含量较低。而甜菜红素含量在白肉火龙果中全时期均含量极低且无显著差异。

甜菜红素在不同色泽类型品种火龙果果肉中的含量变化(图6B)显示,S1-S2期在不同色泽类型品种火龙果果肉中虽有差异,但整体含量较低不进行讨论。比较S3-S6期不同色泽类型品种果肉甜菜红素含量差异;S3期紫肉中含量是粉肉的7.50倍,是白肉的9.68倍、而S4期对应的差异分别是16.47倍和20.29倍、S5期对应的差异分别是17.52倍和24.82倍、S6期对应的差异分别是15.04倍和34.00倍。即从S3期开始,不同色泽类型品种火龙果中甜菜红素含量开始出现显著差异,不同色泽类型品种间甜菜红素含量从高到低分别为紫肉>粉肉>白肉。

甜菜黄素在火龙果不同发育时期果肉中的含量变化(图7A)显示,甜菜黄素与甜菜红素具有相同的累积趋势即在不同色泽类型品种火龙果中甜菜黄素含量随发育时期的增加色素含量不断上升但含量都较低。



不同颜色区域显示不同序列的一致性水平:氨基酸序列中深蓝色表示序列同源性为100%,粉色表示序列同源性为80%~90%,淡蓝色表示序列同源性为60%~70%,白色区域表示序列同源性<50%。Different color regions show different levels of identity: dark blue in amino acid sequences indicates 100% sequence homology, pink indicates 80%-90% sequence homology, light blue indicates 60%-70% sequence homology, and white regions indicate <50% sequence homology.

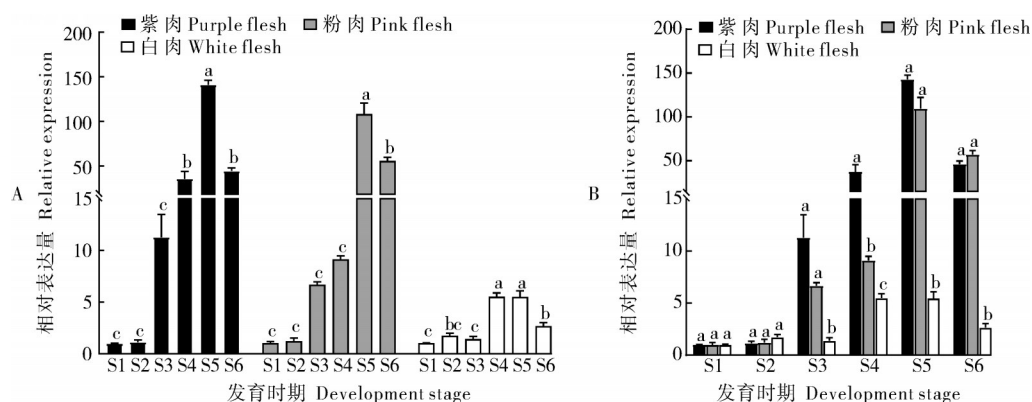
图4 火龙果HpGST和其他植物GSTs蛋白序列比对

Fig. 4 Alignment of HpGST protein sequences of *Hylocereus* and GSTs protein sequences of other plants

甜菜黄素在不同色泽类型品种火龙果果肉中的含量变化结果(图7B)显示,紫肉中甜菜黄素含量变化最大,而粉肉和白肉变化较小。对比紫肉与粉肉、白肉类型的甜菜黄素含量发现,紫肉的含量均比粉肉高,S2-S6期依次高出1.16倍、2.20倍、2.68倍、2.78倍、2.88倍;而紫肉的甜菜黄素含量更显著高于白肉类型,S1-S6期依次高出1.86倍、2.06倍、3.30倍、3.46倍、3.71倍、3.39倍。甜菜黄素含量在不同色泽类型品种间表现为紫肉>粉肉>白肉,虽然与甜菜红素趋势相同但整体含量较低($P<0.05$)。

2.4 甜菜素含量与HpGST基因表达的相关性分析

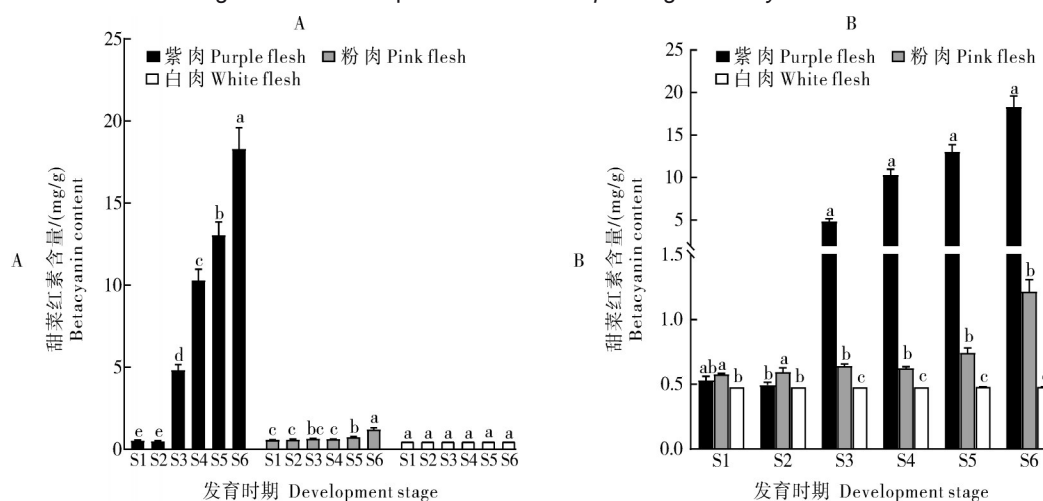
比较HpGST基因在火龙果中的表达与甜菜素的含量变化,发现在火龙果发育时期,HpGST基因的表达与色素累积呈现相同趋势(不同发育时期基因表达量和色素含量趋势相同,且在不同色泽类型品种表达量和甜菜素含量也呈现出显著的同源性),而成熟期甜菜素累积到一定程度会抑制HpGST基因的表达。对比不同色泽类型品种火龙果中HpGST基因的表达与甜菜素的含量变化发现,在S1-S2



A. 不同时期的表达量 Expression levels in different periods; B. 不同色泽类型果肉中的表达量 Expression levels in different color types of flesh. 同一时期不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Different lower-case letters in the same period indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as follows.

图5 火龙果果肉 *HpGST* 基因相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *HpGST* gene in *Hylocereus*



A: 不同时期甜菜红素含量 Betacyanin content at different periods; B: 不同色泽类型果肉甜菜红素含量 Betacyanin content in different color types of flesh.

图6 不同色泽类型品种火龙果不同发育时期甜菜红素含量变化

Fig. 6 Variation of betacyanin content in different *Hylocereus* cultivars at different development stages

期 *HpGST* 基因表达量及甜菜素含量都极低,且都是从 S3 期开始,不同色泽类型品种间基因表达量及甜菜素含量都呈现出紫肉 > 粉肉 > 白肉的趋势。即 *HpGST* 基因表达与甜菜素含量变化具有高度统一的时空性。

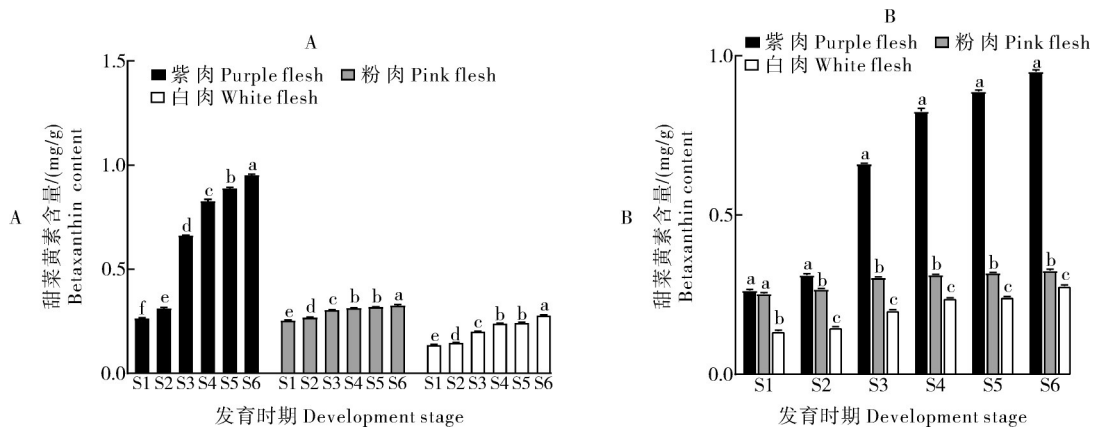
3 讨论

甜菜素作为一种重要的天然色素,应用前景广阔,消费市场潜力巨大,然而有关甜菜素的研究多集中在合成通路上,而对于甜菜素合成后运输与定位的研究却鲜有报道。

谷胱甘肽-S 转移酶 (GSTs) 在植物中具有对花青素的运输标记功能,因 GST 具有特殊的亲和性,能

将花青苷和谷胱甘肽形成偶联连物^[10-11], GST 作为载体标记运输到液泡中从而保护细胞^[11]。现有研究发现,甜菜素在植物中的功能同花青素类似^[12]。然而甜菜素在自然界中仅仅在石竹目植物中发现,尚未发现同一植物中同时存在甜菜素和花青素 2 种色素^[13]。此外,甜菜素起始底物酪氨酸和花青素合成前体物质——对香豆酰 CoA 都来源于苯丙氨酸^[14]。二者都作为一类水溶性色素,同样合成于细胞质中,储存于液泡^[15-16]。此外,二者在植物中的功能相同,合成底物同源,合成部位和最后运输到的细胞器相同,推测 2 种色素在细胞质中合成后运输到液泡的方式存在相同的可能。

本研究对比火龙果中谷胱甘肽 S-转移酶基因



A:不同时期甜菜黄素含量 Betaxanthin content at different periods; B:不同色泽类型果肉甜菜黄素含量 Betaxanthin content in different color types of flesh.

图7 不同色泽类型品种火龙果不同发育时期甜菜黄素含量变化

Fig.7 Variation of betaxanthin content in different varieties of *Hylocereus* at different development stages

(*HpGST*)编码蛋白定位部位和蛋白类型都与花青素来源植物中的GSTs编码蛋白相似,对*HpGST*在火龙果中的表达与甜菜素含量进行相关性分析发现,火龙果中甜菜素(包括甜菜红素和甜菜黄素)含量的变化随发育时期的延长而不断增加,并且与*HpGST*基因表达量具有相同趋势。且甜菜素(包括甜菜红素和甜菜黄素)含量在不同色泽类型品种火龙果中的含量与*HpGST*基因的表达量表现出高度一致的趋势即紫肉>粉肉>白肉。推测*HpGST*基因与火龙果果肉中甜菜素的累积和分布有着紧密联系。

本研究通过对比不同色泽类型品种、不同发育时期火龙果中*HpGST*基因的表达和甜菜素的含量变化,对参与色素运输的谷胱甘肽S-转移酶基因(*GST*)在火龙果中的作用进行了初步研究。鉴于GST在花青苷运输与定位的重要作用,推测*HpGST*基因对火龙果中甜菜素的运输、积累和储存起到重要调控作用,其具体的分子作用机制还需进一步探究,为火龙果果实中甜菜素累积与运输的深入研究提供一个新的视角,进而为解析甜菜素的合成代谢调控提供科学根据。

参考文献

- [1] SANDERMANN H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept [J]. *Pharmacogenetics*, 1994, 4 (5): 225-241.
- [2] 樊连梅, 刘更森, 李思琪, 等. 苹果谷胱甘肽S-转移酶基因*MdGSTF3*的克隆及其表达分析[J]. *植物生理学报*, 2015, 51 (9): 1502-1512. FAN L M, LIU G S, LI S Q, et al. Cloning and expression analysis of apple glutathione S-transferase gene *MdGSTF3* [J]. *Journal of plant physiology*, 2015, 51 (9): 1502-1512 (in Chinese with English abstract).
- [3] 刘海峰, 王军. 山葡萄谷胱甘肽S-转移酶基因(*VAmGST4*)克隆及表达分析[J]. *植物生理学报*, 2011, 47 (12): 1161-1166. LIU H F, WANG J. Cloning and expression analysis of glutathione S-transferase gene (*VmGST4*) in Grape [J]. *Chinese journal of plant physiology*, 2011, 47 (12): 1161-1166 (in Chinese with English abstract).
- [4] CAMILA G, GENEVIÈVE C, LAURENT T, et al. *In vivo* grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST [J]. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 2011, 67 (6): 960-970.
- [5] MARIA F R, ANA R, AGNÈS A, et al. ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides [J]. *The plant cell*, 2013, 25 (5): 1840-1854.
- [6] 杨仕美, 乔光, 文晓鹏. 火龙果EST-SSR分子标记反应体系的建立与优化[J]. *山地农业生物学报*, 2018, 37 (3): 14-20. YANG S M, QIAO G, WEN X P. Establishment and optimization of EST-SSR molecular marker reaction system in pitaya [J]. *Journal of mountain agricultural biology*, 2018, 37 (3): 14-20 (in Chinese with English abstract).
- [7] 于思礼, 刘雪, 张昭宇, 等. 甜菜素的生物合成及其代谢调控进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38 (8): 84-91. YU S L, LIU X, ZHANG Z Y, et al. Biosynthesis and metabolic regulation of beet [J]. *Chinese journal of bioengineering*, 2018, 38 (8): 84-91 (in Chinese with English abstract).
- [8] 吴亚维, 徐娟, 韩秀梅, 等. 红白果肉颜色火龙果果肉转录组分析和基因功能注释[J]. *分子植物育种*, 2019, 17 (2): 400-410. WU Y W, XU J, HAN X M, et al. Transcriptome analysis and gene function annotation of pitaya fruit with red and white flesh [J]. *Molecular plant breeding*, 2019, 17 (2): 400-410 (in Chinese with English abstract).
- [9] 曾灿彬. 红肉与白肉火龙果果实发育的色素比较与差异表达基因研究[D]. 海口: 海南大学, 2017: 11. ZENG C B. Study on pigment comparison and differentially expressed genes between red and white pitaya fruit [D]. Haikou: Hainan University, 2017: 11 (in Chinese with English abstract).
- [10] ALFENITO M R, SOUER E, GOODMAN C D, et al. Func-

- tional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases [J]. The plant cell, 1998, 10(7): 1135-1149.
- [11] HUAIBI Z, LEI W, SIMON D, et al. New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals[J/OL]. BMC plant biology, 2006, 6(1): 29 [2022-07-28]. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-29>.
- [12] DANIELA B, LUISA T, FRANCESCA D G, et al. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50(23): 6895-6901.
- [13] ALFONSO T, TAO F, HESTER S, et al. The evolution of betalain biosynthesis in Caryophyllales [J]. The new phytologist, 2019, 224(1): 71-85.
- [14] 王长泉, 刘涛, 王宝山. 植物甜菜素研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(3): 302-311. WANG C Q, LIU T, WANG B S. Advances in research on plant beets [J]. Chinese journal of botany, 2006, 23(3): 302-311 (in Chinese with English abstract).
- [15] KHAN M I. Stabilization of betalains: a review[J]. Food chemistry, 2016, 197: 1280-1285.
- [16] CHEN N, YU Z H, XIAO X G. Cytosolic and nuclear co-localization of betalain biosynthetic enzymes in tobacco suggests that betalains are synthesized in the cytoplasm and/or nucleus of betalainic plant cells[J/OL]. Frontiers in plant science, 2017, 8: 831 [2022-07-28]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00831>.

Cloning and expression of *HpGST* gene in *Hylocereus*

TU Kai, WEN Xiaopeng, ZHANG Huimin, SHEN Luonan

The Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education) / Institute of Agro-bioengineering / College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract The cDNA sequence of *HpGST* gene was cloned, and bioinformatics analysis and expression analysis of it were carried out to study the function of glutathione S-transferase gene (*HpGST*) in *Hylocereus*. The results showed that the cDNA sequence of *HpGST* was 666 bp in length, encoding 221 amino acids. The encoded protein belonged to non-secretory unstable hydrophilic protein, and its subcellular localization predicted its role in the cytoplasm. The phylogenetic tree shows that it is closely related to *Chenopodium quinoa*, and belongs to the Tau family of glutathione transferases. The results of real-time fluorescent quantitative PCR analysis showed that *HpGST* was expressed in the flesh of different color types of *Hylocereus*. The expression levels of *HpGST* in purple and pink flesh of *Hylocereus* with pigment accumulation were significantly higher than those in white flesh types without pigment accumulation. The expression trend was first increased and then decreased with the development of fruit. Its expression level was positively correlated with content of betaine, and the expression trend in different varieties is highly consistent with the accumulation trend of betaine. It is indicated that *HpGST* gene plays an important role in the synthesis and distribution of betaine in *Hylocereus*.

Keywords *Hylocereus*; *HpGST*; betaine; bioinformatics; gene cloning

(责任编辑: 张志钰)