

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201911024

周丽霞, 吴翼, 杨耀东. 椰子脂肪酸积累及与 *FatB* 基因表达关系研究 [J]. 广西植物, 2021, 41(7): 1165–1172.

ZHOU LX, WU Y, YANG YD. Relationship between fatty acid accumulation and *FatB* gene expression in *Cocos nucifera* [J].

Guihaia, 2021, 41(7): 1165–1172.



椰子脂肪酸积累及与 *FatB* 基因表达关系研究

周丽霞, 吴翼, 杨耀东*

(中国热带农业科学院椰子研究所/海南省热带油料作物生物学重点实验室, 海南文昌 571339)

摘要: 为筛选控制椰子果实中低碳链脂肪酸积累的关键 *FatB* 基因, 本研究以海南本地高种绿椰四个发育时期的果实为试验材料, 参考国家标准 GB/T2906–1982 谷类、油料作物种子粗脂肪测定方法, 用索氏提取法提取果肉脂肪酸, 应用气质联用检测技术测定各发育时期脂肪酸含量及组分, 同时应用 qRT-PCR 对椰子脂肪酸合成相关基因 *FatB1*、*FatB2* 及 *FatB3* 进行相对定量分析, 明确各发育时期椰子果实脂肪酸积累与 *FatB* 基因表达量变化之间的关系。结果表明: (1) 椰子油含 9 种脂肪酸成分, 在椰子果实发育的早期 (第 6 和第 7 个月), 棕榈酸、硬脂酸和油酸的含量较高, 月桂酸和肉豆蔻酸相对含量较低, 通过实时荧光定量 PCR 发现, 此时 *FatB1* 基因的相对表达量较高。(2) 而在椰子果实发育的后期 (第 8 和第 9 个月), 棕榈酸、硬脂酸和油酸的相对含量迅速降低, 月桂酸和肉豆蔻酸相对含量迅速升高, *FatB2* 和 *FatB3* 基因的相对表达量较高, *FatB1* 的表达量略有降低。该研究初步掌握了椰果各发育时期 *FatB* 基因表达量与脂肪酸成分间的变化趋势, 该结果为将来筛选控制椰子果实中低碳链脂肪酸积累的关键 *FatB* 基因奠定基础, 同时为椰子脂肪酸成分的分子改良提供理论依据。

关键词: 椰子, 脂肪酸, *FatB* 基因, 气质联用检测技术, qRT-PCR

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)07-1165-08

Relationship between fatty acid accumulation and *FatB* gene expression in *Cocos nucifera*

ZHOU Lixia, WU Yi, YANG Yaodong*

(Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science/Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Oil Crops Biology, Wenchang, Hainan 571339, China)

Abstract: In order to screen the key genes controlling the accumulation of low-carbon chain fatty acid in coconut fruit, Hainan high-grade green coconut fruits at four growth stages were used as experimental materials, according to GB/T 2906-1982 method for the determination of crude fats in cereals and oil crop seeds, the oil in fresh fruit of Hainan high-grade green coconut was extracted by Soxhler extractor, the contents and components of fatty acids were determined by GC-MS, and quantitative analyses of *FatB1*, *FatB2* and *FatB3* genes were carried out by qRT-PCR. The relationship between fatty acid accumulation and *FatB* gene expression in coconut fruit at each development stage were clarified. The results were as follows: (1) Coconut oil contains nine kinds of fatty acid. In the early growth stage of coconut fruit

收稿日期: 2020-03-25

基金项目: 国家自然科学基金 (31601723, 32071806) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31601723, 32071806)].

作者简介: 周丽霞 (1982-), 硕士, 助理研究员, 主要从事热带油料作物遗传育种研究, (E-mail) glzz_2009@163.com。

*通信作者: 杨耀东, 博士, 研究员, 主要从事热带油料作物分子遗传育种研究, (E-mail) yyang@catas.cn。

development (the 6th and 7th months), the contents of palmitic acid, stearic acid and oleic acid were higher, and the relative contents of lauric acid and myristic acid were lower. The relative expression of *FatB1* gene was higher through real-time fluorescent quantitative PCR. (2) In the later growth stage of coconut fruit (the 8th and 9th month), the relative contents of palmitic acid, stearic acid and oleic acid decreased rapidly, the relative contents of lauric acid and myristic acid increased rapidly, the relative expression of *FatB2* and *FatB3* genes was higher, and the expression of *FatB1* was lower. Through this study, we preliminarily explored the change trend of *FatB* gene expression and fatty acid composition in different growth stages of coconut fruit. The results establish foundation for screening the key *FatB* gene that controls the accumulation of low-carbon chain fatty acids in coconut fruit, and provide theoretical basis for the molecular improvement of fatty acid composition.

Key words: coconut, fatty acid, *FatB* genes, GC-MS, qRT-PCR

椰子(*Cocos nucifera*)为棕榈科(Arecaceae)椰子属(*Cocos* L.)的单子叶植物,原产于东南亚热带雨林地区,目前在全世界 90 多个热带国家和地区广泛种植(Batugal et al., 2005)。椰子作为热带地区的重要木本经济油料作物之一,其开发价值很高,新鲜椰肉中的含油量可达 33.0%,椰子干中的含油量高达 63.0%(段岢君等,2013b)。

椰子油属于典型的月桂酸类油脂,其脂肪酸组成中碳链分布范围较广,囊括了 C6~C18 的馏分(Marina et al., 2009;耿薇,2010),其主要成分的是月桂酸和肉豆蔻酸,相对含量高达 75.0%以上(Krishnamoorthy et al., 2019),其中,高含量的月桂酸是其他大部分油料作物所没有的,且这些脂肪酸极易被人体吸收,其在人体内的消化系数为 99.3%,远高于花生油、菜籽油和芝麻油等食用油(Damayanti et al., 2019)。椰子油还可用来做油脂化工产品、牛奶里的脂肪、制造肥皂的原料、去污剂和个人护理产品等。对椰子油的生理活性研究发现,其具有抗氧化活性、调节血浆血脂、减肥与美容、维持体内代谢平衡和抗微生物、增强免疫力等药用功能(邓福明等,2013;禰小凤等,2013;段岢君等,2013a;李晓煜等,2013;颜巧丽等,2013)。在人体中,月桂酸以月桂酸甘油酯的形式存在,该成分可以破坏脂类包被类型的病毒(如艾滋病、肝炎病毒),具有抗病毒的作用(蒋增良等,2015)。此外,椰子油中的月桂酸等脂肪酸,其皂化值高,可增加产品的泡沫和溶解度,据统计每年都有几百万吨的椰子油用于洗涤剂的加工生产(王钰等,2002)。由此可见,椰子油不仅在食用方面,而且在油脂化工和生物燃料等行业均发挥着重要的作用。掌握控制椰子油中低碳链脂肪酸合成的关键 *FatB* 基因,为其脂肪酸成分的分

良提供理论基础。

脂酰-酰基载体蛋白硫脂酶(Fat)对植物脂肪酸的饱和度及其碳链长度均有重要作用,其中,*FatB* 基因家族倾向于生成饱和碳链(赵彦朋,2014)。目前,已在多种植物中克隆到了 *FatB* 基因,如李晓斐(2011)克隆得到花生 *FatB* 基因序列全长 1 617 bp,构建了植物表达载体 PBI121-AhfatB,实现了遗传转化。赵彦朋(2014)通过克隆和构建 Pbispl-FAD2-FatB 载体,发现转基因烟草种子中的棕榈酸和硬脂酸均有显著降低,油酸含量显著性提高。赵彦朋等(2015)通过构建抑制烟草种子 *FatB* 表达的载体,发现转基因烟草中油酸含量有所提高。刘袞悦等(2019)利用 qRT-PCR 分析文冠果种仁油脂脂肪酸形成相关基因的表达模式,发现 *FatA* 和 *FatB* 基因的低表达和 *KAR* 基因的高表达,为文冠果种仁油脂碳十八以上不饱和脂肪酸的形成积累提供了充足的硬脂酸合成前提。目前,针对椰子油脂脂肪酸成分分析的报道较多(耿薇等,2015;桂青等,2016;周丽霞等,2019),而对调控椰子果实脂肪酸合成的相关基因的研究报道较少。肖勇等(2013)应用椰子转录组数据,挖掘了 11 个脂酰-ACP 硫脂酶基因,通过荧光定量 PCR 检测上述基因的表达变化,发现 *FatB* 基因家族的高表达对中低碳链脂肪酸的积累呈一定的正相关关系。袁怡君(2013)通过克隆椰子胚乳中与中链脂肪酸合成相关的基因 *FatB*,发现转基因烟草种子中肉豆蔻酸(14:0)、棕榈酸(16:0)和硬脂酸(18:0)的相对含量都有不同程度的增加,其他种类脂肪酸含量无明显变化。

目前,关于椰子脂肪酸相关的研究主要集中在生理生化水平,对相关合成基因的表达、功能和合成机制的研究鲜有报道。因此,明确该基因在

椰子果肉发育不同阶段的表达变化情况,可为将来研究椰子脂肪酸合成的分子机理及脂肪酸成分的分子改良奠定基础。本文以海南本地高种绿椰为研究材料,应用 qRT-PCR 和 GC-MS 检测技术,分析椰子果实不同生长时期 *FatB1*、*FatB2* 及 *FatB3* 基因的表达量变化,结合椰子果肉在不同时期各脂肪酸成分的相对含量,明确 *FatB1*、*FatB2* 及 *FatB3* 的表达变化与各脂肪酸含量之间的变化趋势,以期将来深入掌握控制椰子果实中低碳链脂肪酸合成的关键 *FatB* 基因及脂肪酸成分的分子改良提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为中国热带农业科学院椰子研究所椰子大观园内本地高种绿椰。将本地高种绿椰在花授粉后起记为第 1 天,此后的第 180 天(第 6 个月)、第 210 天(第 7 个月)、第 240 天(第 8 个月)和第 270 天(第 9 个月)分别摘取同株的椰果和椰子嫩叶,每次取 3 份重复。椰子嫩叶迅速放于液氮冷却,带到实验室放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,果肉于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

石油醚($60\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$)、氢氧化钾、甲醇、苯及和正己烷均购自海口琼山莱客科技服务中心,罗氏 SYBR Green PCR Master Mix 购自 Sigma 公司。主要仪器设备:Agilent 7890A+5975C 气相色谱-质谱联用仪(Agilent),上海亚荣 RE52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),上海熙扬索氏提取器(上海熙扬仪器有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦 Mx3000P 型)。

1.2 脂肪酸的提取

参考国家标准 GB/T 2906-1982 谷类、油料作物种子粗脂肪测定方法,称取 5 g 椰子果肉,用研钵研磨至粉状后,用滤纸包裹并置于提取器中,向提取瓶内加入 200 mL 石油醚, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴回流提取约 15 h,得无色透明萃取液,应用旋转蒸发仪将其减压浓缩得到样品溶液,用石油醚定容至 10 mL。

1.3 脂肪酸甲酯化处理

吸取上述样品提取液 1 mL,加入 2 mL $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾的甲醇溶液(色谱级)和 8 mL 苯-石油醚(体积比 1:1),充分振荡后静置 15

min,再加入 16 mL 蒸馏水,充分振荡后放置至溶液清晰分层,吸取上清液,旋转蒸发仪将其减压蒸干,得甲酯化脂肪酸,加入 0.5 mL 正己烷使其溶解并转移至 1.5 mL 气相色谱上样瓶中,作 GC-MS 分析。

1.4 GC-MS 条件

GC 条件:色谱柱 Agilent DB-23 ($30\text{ m}\times 250\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$),载气为氮气,柱初温 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率加热至 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$,维持 3 min,平衡时间 1 min,进样量 $1\text{ }\mu\text{L}$,色谱柱流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分流比 1:40。

MS 条件:EI 离子源,电子能量 80 eV,电子倍增器电压 1 kV,质量扫描范围 $25\sim 450\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$,离子源温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$,GC-MS 接口温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$,质谱检测时间 3 min。

1.5 椰子果肉 RNA 提取

分别取第 6、7、8、9 个月的椰子果肉约 1 g,用液氮研磨至粉末状,加入 1 mL 提取液,剧烈震荡并在室温下静置 5 min 后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超高速离心机中 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 氯仿,混匀后在室温下静置 7 min,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超高速离心机中 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,加入等体积异丙醇,混匀并在室温下静置 10 min,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超高速离心机中 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 75%乙醇,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超高速离心机中 $7\text{ }500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液,开盖干燥 3 min,加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ RNase-free H_2O 溶解。

1.6 RNA 逆转录及检测

逆转录分为两个步骤:步骤 1 总体系为 $12\text{ }\mu\text{L}$,其中 nuclease-free Water $6\text{ }\mu\text{L}$,Oligo(dT) 18 Primer $1\text{ }\mu\text{L}$,mRNA $5\text{ }\mu\text{L}$, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 后,迅速置于冰水中冷却;步骤 2 体系为 $8\text{ }\mu\text{L}$,其中, $5\times$ Reaction Buffer $4\text{ }\mu\text{L}$,Ribolock RNase Inhibitor ($20\text{ u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$,10 mM dNTP Mix $2\text{ }\mu\text{L}$,Reverse Transcriptase ($200\text{ u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$,将步骤 2 中的 $8\text{ }\mu\text{L}$ 体系加入步骤 1 的 $12\text{ }\mu\text{L}$ 体系中, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 min 后 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。

采用 UBC10 内参基因(Xia et al., 2013)引物($5'\text{-TCGACGATGACATCAACGAAGT-3}'$, $5'\text{-TCTA TGAATCCACCAACTCAGC-3}'$)进行 PCR 扩增检测,检测体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$:cDNA $1\text{ }\mu\text{L}$,UBC10 F/R 引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,Taq DNA Polymerase $0.2\text{ }\mu\text{L}$,dNTP Mixture $0.2\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ Taq Buffer(plue Mg^{2+}) $1\text{ }\mu\text{L}$,

ddH₂O 6.6 μL。PCR 检测程序:95 °C 5 min,95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s 进行 35 个循环,72 °C 7 min。琼脂糖凝胶电泳,1.0%凝胶,1×TAE 缓冲液,120 V 电压电泳 25 min,置凝胶于凝胶成像分析系统上检测。逆转录成功的 cDNA 母液用灭菌 ddH₂O 稀释 10 倍,分装备用。

1.7 荧光定量 PCR

采用罗氏的 SYBR Green PCR Master Mix 实时荧光定量试剂盒,在 Stratagene Mx3000P 实时荧光定量 PCR 系统上进行实验,每个目的基因进行三

个生物学重复和三个技术重复。反应体系:2×FastStart Universal SYBR Green Master 缓冲液 5 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.5 μL,Rox 0.2 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 2.8 μL,反应总体积 10 μL。反应程序:95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环。引物用 Primer Premier 5.0 进行设计,引物信息见表 1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.8 方法

应用 SHIMADZU GC/MS solution Release 2.10

表 1 相关基因引物
Table 1 Primers of related genes

基因 Gene	命名 Name	引物序列 Primer sequence	基因序列号 GenBank No.
fatty acyl-ACP thioesterase B1	<i>FatB1-F</i> <i>FatB1-R</i>	5'-TGTTCCTCTTGTCTTCCCGT-3' 5'-ATCTGGTCCCTCTATTCTAC-3'	gi 343963206
fatty acyl-ACP thioesterase B2	<i>FatB2-F</i> <i>FatB2-R</i>	5'-CTAGAAGGAAGGCCAGAGAA-3' 5'-GAAAACCCCAACAAACATAAGC-3'	gi 343963208
fatty acyl-ACP thioesterase B3	<i>FatB3-F</i> <i>FatB3-R</i>	5'-CTTGTTCCTCTGCTTTGTCA-3' 5'-CTTCATTTACTCTCAGTTGGGTG-3'	gi 343963210

对 GC-MS 图谱进行鉴定和定量分析,根据 GC-MS 联用测定得到的质谱信息,应用 NIST 11 数据库进行检索,通过与标准谱图进行对照,确定每个成分的化学结构。引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件,应用 Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR,Excel 2010 进行数据分析处理。

2 结果与分析

2.1 各生长时期椰子果肉脂肪酸含量分析

采用索氏提取法提取新鲜椰子果肉四个生长时期的脂肪酸,如图 1 所示,测得第 6 个月的椰子果肉脂肪酸相对含量为 12.5%,第 7 个月的椰子果肉脂肪酸相对含量为 23.6%,第 8 个月的椰子果肉脂肪酸相对含量为 27.0%,第 9 个月的椰子果肉脂肪酸相对含量为 33.5%。随着椰子果实的发育,果肉中脂肪酸的含量不断增加。本研究结果与段岢君等(2013b)调查的结果基本相符。

2.2 椰子果肉脂肪酸的组成及相对含量

应用 GC-MS 技术分别测定四个生长时期椰子果肉的脂肪酸成分及相对含量,结果如图 2-5 所示,由脂肪酸甲酯的总离子流色谱图可知,各生长

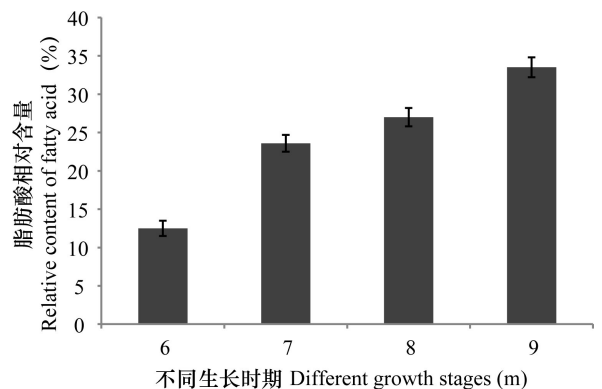
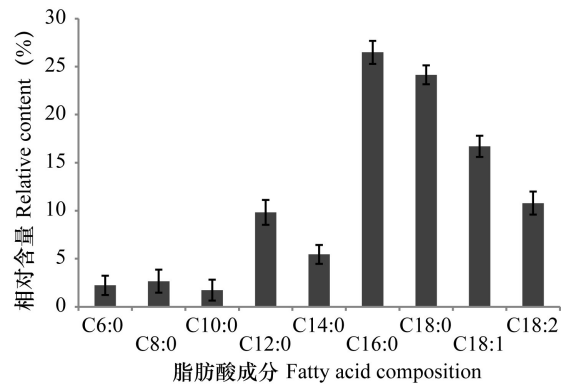
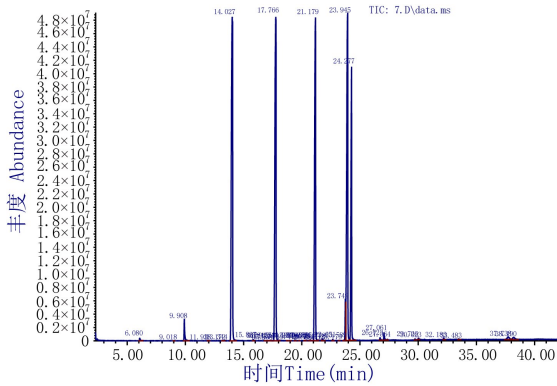


图 1 四个生长时期椰子果肉脂肪酸的相对含量
Fig. 1 Relative contents of fatty acids in coconut in four growth stages

时期椰子果肉中含有的脂肪酸成分完全相同,都含有己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸饱和脂肪酸以及油酸、亚油酸不饱和脂肪酸,保留时间均在 6~28 min 之间。各时期脂肪酸成分的相对含量变化较大,在椰子果实发育早期(第 6 和第 7 个月),棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸的相对含量在 10.0%~30.0% 之间,远大于己酸、辛酸、癸酸、月桂酸和肉豆蔻酸的相对含量。在



C6. 己酸; C8. 辛酸; C10. 癸酸; C12. 月桂酸; C14. 肉豆蔻酸; C16. 棕榈酸; C18. 硬脂酸; C18 : 1. 油酸; C18 : 2. 亚油酸。下同。

C6. Hexanoic acid; C8. Octanoic acid; C10. Decanoic acid; C12. Dodecanoic acid; C14. Myristic acid; C16. Palmitic acid; C18. Stearic acid; C18 : 1. Oleic acid; C18 : 2. Linoleic acid. The same below.

图 2 第 6 个月椰子果肉脂肪酸组分分析结果

Fig. 2 Analysis results of coconut flesh fatty acid composition in the 6th month

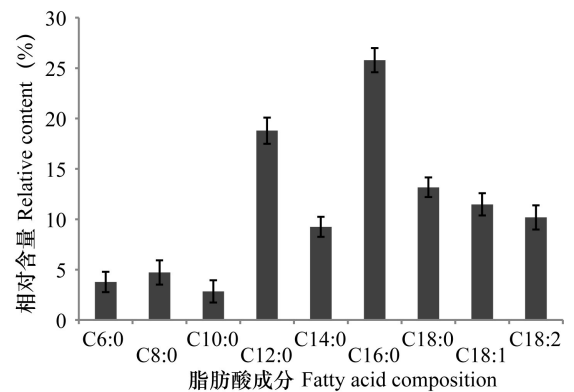
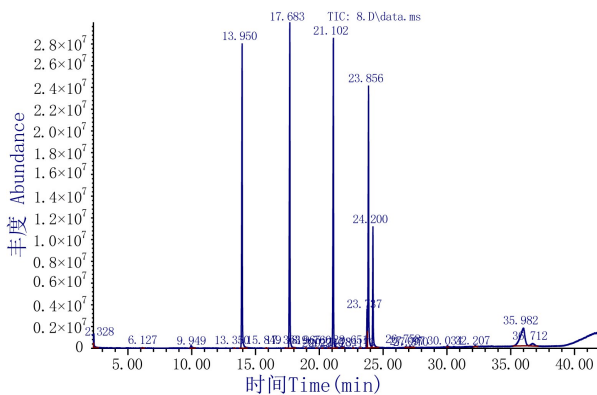


图 3 第 7 个月椰子果肉脂肪酸组分分析结果

Fig. 3 Analysis results of coconut flesh fatty acid composition in the 7th month

椰子果实发育的后期(第 8 和第 9 个月),棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸的相对含量逐渐减少,尤其是在第 9 个月时,其相对含量降到了 10.0% 以下;而月桂酸和肉豆蔻酸的相对含量迅速增加,在第 9 个月时,肉豆蔻酸的相对含量达到了 20.6%,月桂酸的相对含量高达 49.85%。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 *FatB* 基因表达水平

实时荧光定量 PCR 结果采用比较阈值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法) (Livak et al., 2001) 对各功能基因在细胞中的转录水平进行相对定量,对样本中特定 mRNA 的检测是建立在内参样本基础上的,将定量测定结果表示为靶 mRNA/内参样本 mRNA 的比值,确定在椰子果肉生长的四个不同时期脂肪

酸合成相关功能基因表达水平。图 6 展示了椰子脂肪酸合成途径中 *FatB1*、*FatB2* 及 *FatB3* 功能基因在椰子果实生长的第 6、7、8、9 个月转录水平的变化。其中,*FatB1* 在椰子果实发育过程中转录水平相对稳定,表达升高和降低幅度均较小(图 6 : A);*FatB2* 和 *FatB3* 基因在果实发育早期转录水平较低,随着果实的发育,表达水平均逐渐升高,尤其是在第 9 个月,其表达量均达最大(图 6 : B, C)。

3 讨论与结论

椰子作为一种重要的油料作物,与一般的草本油料作物不同。椰子油是国际椰子加工的主要

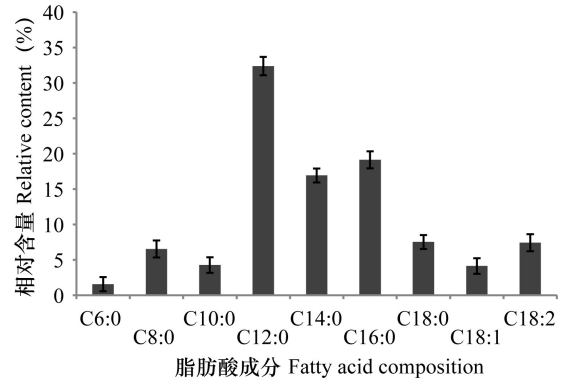
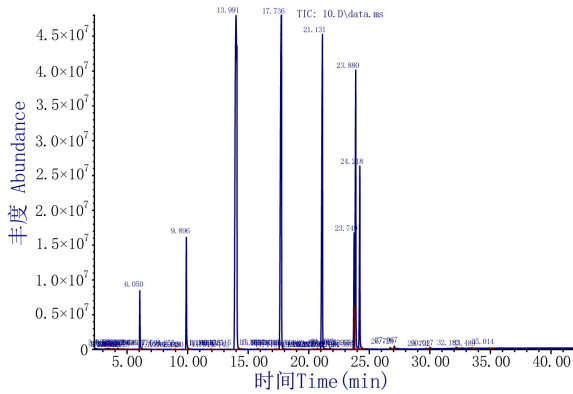


图 4 第 8 个月椰子果肉脂肪酸组成分析结果

Fig. 4 Analysis results of coconut flesh fatty acid composition in the 8th month

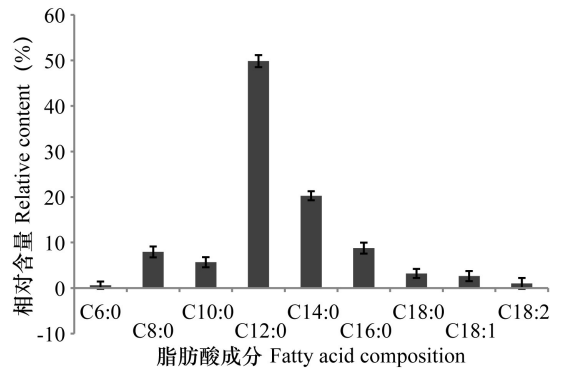
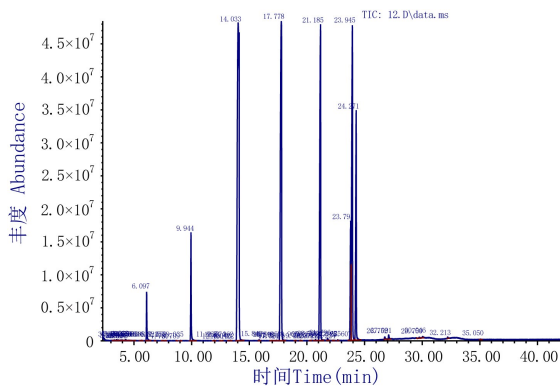


图 5 第 9 个月椰子果肉脂肪酸组成分析结果

Fig. 5 Analysis results of coconut flesh fatty acid composition in the 9th month

产品,其主要成分为月桂酸,作为食用油,较易被人体吸收,除此之外,椰子油在化妆品和洗涤用品等化工行业也有广泛的用途(Guarte et al., 1996; Rindengan et al., 2005)。椰子作为一种月桂酸含量最高的作物,是研究月桂酸等中低碳链脂肪酸合成分子机理的重要材料(肖勇等,2013)。目前,对椰子油脂脂肪酸相关的研究主要集中在其组成成分及含量的测定与分析,对相关基因表达,功能和调控机制的研究鲜有报道。本研究结合 qRT-PCR 和 GC-MS 检测技术,探索椰子果实四个发育时期 *FatB1*、*FatB2* 及 *FatB3* 基因的表达量与脂肪酸成分相对含量之间的变化趋势,为将来深入掌握控制中低碳链脂肪酸合成的关键 *FatB* 基因及为椰子油中低碳链脂肪酸成分的分子改良提供理论依据。

本研究发现新鲜椰子果肉主要含有 9 种脂肪酸成分,这与耿薇(2010)的研究结果相一致。Yandeau-Nelson et al.(2011)研究发现 *FatB1* 主要是针对 C8、C14 和 C16 的脂肪酸合成,*FatB2* 主要针对 C14 和 C16 的脂肪酸合成,而 *FatB3* 负责产生 C12 和 C14 的中碳链脂肪酸。本研究通过分析 *FatB1*、*FatB2* 及 *FatB3* 基因的表达量及相对应各生长时期脂肪酸成分相对含量之间的变化趋势,发现在果实发育的第 6 个月, *FatB1* 表达量达最大,且此时 C16 和 C18 脂肪酸的相对含量最高, C12 和 C14 脂肪酸相对含量较低,在第 7、8、9 个月的 *FatB1* 表达量有小幅下降,但变化相对不大。在果实发育第 8、9 个月, *FatB2* 和 *FatB3* 的表达量逐渐变大,尤其是在第 9 个月, *FatB2* 和 *FatB3* 的表达量均迅速变大,分别为第 6 个月表达量的

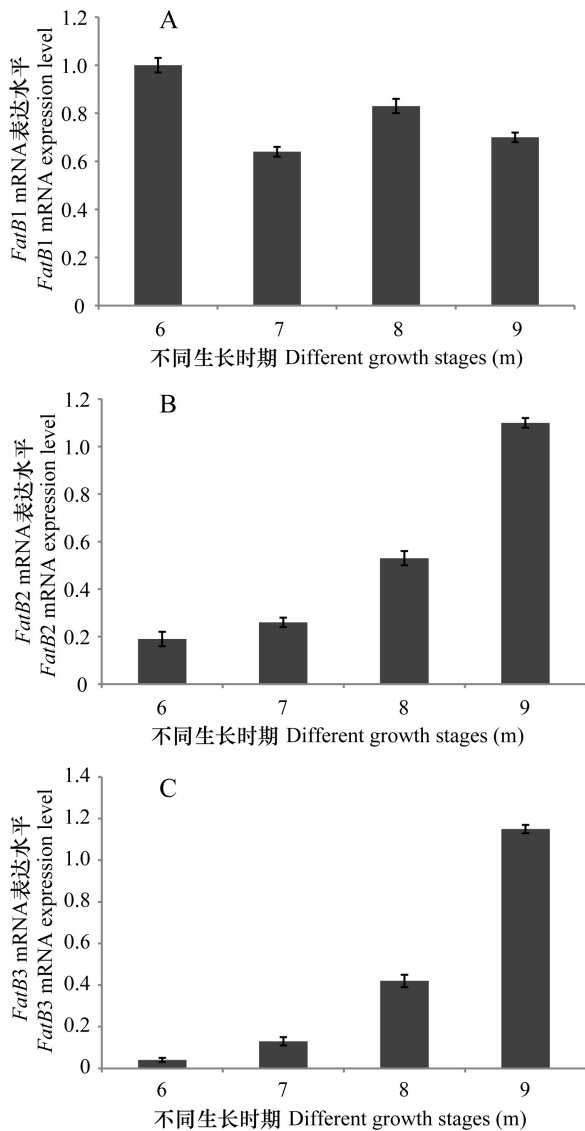


图 6 椰子果肉生长四个生长时期(第 6、7、8、9 个月) *FatB1*、*FatB2*、*FatB3* 基因表达水平变化
Fig. 6 Changes of *FatB1*, *FatB2* and *FatB3* gene expression level in four growth stages of coconut flesh growth (the 6th, 7th, 8th and 9th month)

4.8 倍和 27.8 倍。此时, C12 和 C14 的相对含量均达到最大, 其中 C12 为 49.9%, 是第 6 个月的 4.1 倍, C14 为 20.3%, 是第 6 个月的 2.7 倍。本研究通过对 *FatB* 基因在果肉四个发育阶段的表达进行定量验证, 发现 *FatB1* 的大量表达与 C16 和 C18 脂肪酸的积累相一致, *FatB2* 和 *FatB3* 的大量表达与 C12 和 C14 中低碳链脂肪酸的积累相一致。这一结果与 Yandeau-Nelson et al. (2011) 的研究结果存在一定差异。分析其主要原因是脂肪酸的合成

是一个由多种酶和多个基因相互协调、共同作用的复杂过程, 仅依据脂肪酸的积累和 *FatB* 基因的表达变化趋势不能说明 *FatB* 基因具体负责哪种脂肪酸的合成, 为进一步验证各 *FatB* 基因对具体脂肪酸合成的调控功能, 可利用分子生物学手段, 将关键 *FatB* 基因克隆、转化到产油藻中, 同时检测转化藻中的脂肪酸成分及含量, 来验证其基因功能, 从而为椰子油品质的分子改良提供理论支持。

参考文献:

- BATUGAL P, RAO V, OLIVER J, 2005. Coconut genetic resources. IPGRI-Regional Office for Asia [J]. the Pacific and Oceania, Serdang, Malaysia.
- DAMAYANTI K, JEYAKUMAR SM, VAJRESWARI A, 2019. Reply to Letter re: 'Coconut oil consumption improves fat-free mass, plasma HDL-cholesterol and insulin sensitivity in healthy men with normal BMI compared to peanut oil' [J]. Clin Nutr, 38(5): 2473-2485.
- DENG FM, WANG H, ZHAO SL, 2013. Biological activity of coconut oil: Medicinal functions [J]. Chin J Trop Agric, 33(9): 60-64. [邓福明, 王挥, 赵松林, 2013. 椰子油的生理活性(1): 药用功能 [J]. 热带农业科学, 33(9): 60-64.]
- DUAN KJ, DENG FM, ZHAO SL, 2013a. Biological activity of coconut oil: Antioxidant activity [J]. Chin J Trop Agric, 33(9): 71-78. [段焱君, 邓福明, 赵松林, 2013a. 椰子油的生理活性(III): 抗氧化活性 [J]. 热带农业科学, 33(9): 71-78.]
- DUAN KJ, CHEN WJ, SONG F, et al., 2013b. Refining and comprehensive utilization of coconut oil [J]. Chin J Trop Agric, 33(5): 67-72. [段焱君, 陈卫军, 宋菲, 等, 2013b. 椰子油的精深加工与综合利用 [J]. 热带农业科学, 33(5): 67-72.]
- GENG W, 2010. The study on the fatty acid compositions in fresh flesh of coconut by GC-MS [J]. Guangdong Chem Ind, 37(1): 122-124. [耿薇, 2010. 新鲜椰子果肉脂肪酸成分的 GC-MS 分析 [J]. 广东化工, 37(1): 122-124.]
- GENG W, ZHENG MY, WEI YS, 2015. Fatty acid analysis of coconut flesh by GC-MS external standard method [J]. Food R & D, 4(6): 89-91. [耿薇, 郑敏燕, 魏永生, 2015. GC-MS 外标法分析椰子果肉中的脂肪酸含量 [J]. 食品研究与开发, 4(6): 89-91.]
- GUI Q, XI XF, 2016. Analysis of aromatic compounds and fatty acids composition in concentrated coconut milk by centrifugation using GC-MS [J]. Chin J Trop Agric, 36(4): 77-81. [桂青, 禰小凤, 2016. 基于 GC-MS 法的离心浓缩椰浆风味成分及脂肪酸组成分析 [J]. 热带农业科学,

- 36(4): 77-81.]
- GUARTE RC, MUHLBAUER W, KELLERT M, 1996. Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil [J]. *Postharvest Biol Technol*, 9(3): 361-372.
- JIANG ZL, YANG M, DU J, et al., 2015. Antibacterial and antiviral properties of glycerol monolaurate and its application in food [J]. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 30(2): 142-146. [蒋增良, 杨明, 杜鹃, 等, 2015. 月桂酸单甘油酯抑菌抗病毒特性及其在食品中的应用 [J]. *中国粮油学报*, 30(2): 142-146.]
- KRISHNAMOORTHY G, NARAYANA AI, PERALAM PY, et al., 2019. To study the effect of *Cocos nucifera* oil when incorporated into tissue conditioner on its tensile strength and antifungal activity: An *in vitro* study [J]. *J Ind Prosthodont Soc*, 19(3): 225-232.
- LI XY, DENG FM, ZHAO SL, 2013. Biological activity of coconut oil: Weight reducing and beautification [J]. *Chin J Trop Agric*, 33(9): 84-89. [李晓煜, 邓福明, 赵松林, 2013. 椰子油的生理活性(IV): 减肥与美容 [J]. *热带农业科学*, 33(9): 84-89.]
- LI XF, 2011. Cloning and analysis of genes of fatty acid biosynthesis-related enzymes (*KASI*, *FatB*) and genetic transformation of *ahFAD2B* in *Arachis hypogaea* L. [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University. [李晓斐, 2011. 花生脂肪酸合成关键酶(*KASI*/*FatB*)基因的克隆、序列分析与*ahFAD2B*遗传转化的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学.]
- LIU LY, RUAN CJ, WANG L, 2019. Multigene coordinated regulation of fatty acid formation in seed oil of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. *Mol Plant Breed*, 9(6): 1834-1842. [刘凌悦, 阮成江, 王莉, 2019. 文冠果种仁油脂脂肪酸形成的多基因协同调控 [J]. *分子植物育种*, 9(6): 1834-1842.]
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 25(4): 402-408.
- MARINA AM, CHE MAN YB, NAZIMAH SAH, 2009. Chemical properties of virgin coconut oil [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 86(4): 301-307.
- RINDENGAN B, AMRIZAL L, 2005. Farm level processing of virgin coconut oil and its economic implication [J]. *Cocoinfo Intl*, 12(1): 12-16.
- WANG Y, XIE RJ, 2002. Synthesis and application of coconut fatty acid monoethanolamide [J]. *Adv Fine Petrochem*, 3(5): 1-4. [王钰, 谢荣锦, 2002. 椰油酸单乙醇酰胺的合成及应用 [J]. *精细石油化工进展*, 3(5): 1-4.]
- XI XF, DENG FM, ZHAO SL, 2013. Biological activity of coconut oil: Regulating the plasma lipid [J]. *Chin J Trop Agric*, 33(9): 65-70. [谢小凤, 邓福明, 赵松林, 2013. 椰子油的生理活性(II): 调节血浆血脂 [J]. *热带农业科学*, (9): 65-70.]
- XIAO Y, YANG YD, XIA W, et al., 2013. Isolation and expression analysis of functional genes related to acyl-ACP thioesterase in *Cocos nucifera* L. [J]. *Guangdong Agric Sci*, 12(1): 149-152. [肖勇, 杨耀东, 夏薇, 等, 2013. 椰子 Acyl-ACP 硫酯酶相关基因的克隆及其表达分析 [J]. *广东农业科学*, 12(1): 149-152.]
- XIA W, LIU Z, YANG YD, 2013. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Cocos nucifera* during abiotic stress [J]. *Botanique*, 10(5): 1139-1147.
- YAN QL, DENG FM, ZHAO SL, 2013. Biological activity of coconut oil: Metabolism and balance [J]. *Chin J Trop Agric*, 33(9): 79-83. [颜巧丽, 邓福明, 赵松林, 2013. 椰子油的生理活性(V): 代谢与平衡 [J]. *热带农业科学*, 33(9): 79-83.]
- YANDEAU-NELSON MD, NIKOLAU BJ, CHIPMAN JP, 2011. Phylogenetic and experimental characterization of an acyl-ACP thioesterase family reveals significant diversity in enzymatic specificity and activity [J]. *BMC Biochem*, 12: 44-51.
- YUAN YJ, 2013. Cloning and functional verification of *Kasi*, *FatB* and *LPAAT* genes in coconut endosperm [D]. Haikou: Hainan University. [袁怡君, 2013. 椰子胚乳中 *KASI*/*FatB*/*LPAAT* 基因克隆及功能验证 [D]. 海口: 海南大学.]
- ZHAO YP, 2014. Preliminary studies on the impact of cottonseeds oil quality by simultaneous silencing *FAD2-1* and *FatB* genes [D]. Shihezi: Shihezi University. [赵彦朋, 2014. 同步抑制 *FAD2-1* 与 *FatB* 基因对棉籽油品质影响的初步研究 [D]. 石河子: 石河子大学.]
- ZHAO YP, LIU F, LI YJ, et al., 2015. Increasing oleic acid content in tobacco seeds by simultaneous silencing *FAD2* and *FatB* genes [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 35(2): 789-794. [赵彦朋, 刘峰, 李艳军, 等, 2015. 同步抑制 *FAD2* 与 *FatB* 基因提高烟草种子油酸组分含量的研究 [J]. *西北植物学报*, 35(2): 789-794.]
- ZHOU LX, LEI XT, CAO HX, 2019. Analysis of fatty acid components in different species of oil palm fruit by GC-MS [J]. *J S Agric*, 50(5): 1072-1077. [周丽霞, 雷新涛, 曹红星, 2019. GC-MS 分析不同品种油棕果肉中的脂肪酸组分 [J]. *南方农业学报*, 50(5): 1072-1077.]

(责任编辑 李 莉)