

普通烟草八氢番茄红素脱氢酶基因的原核表达及表达谱分析

钟晓武^{1,2,3}, 付强¹, 邹颀¹, 林世峰¹, 郭玉双¹, 赵杰宏¹, 任学良¹

¹贵州省烟草科学研究院/烟草行业烟草分子遗传重点实验室, 贵阳 550081; ²川北医学院附属医院医学研究中心, 南充 637000;

³川北医学院基础医学院生物学教研室, 南充 637000)

摘要:基于 NCBI 数据库中本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 的烟草八氢番茄红素脱氢酶 *PDS* 基因 (ABE99707) 的核苷酸序列, 设计并合成特异性引物, 以烟草栽培品种红花大金元叶片总 RNA 为模板, 通过 PCR 方法获得了烟草 *NtPDS* 基因的 cDNA 片段。序列分析表明, 该基因编码区为 1749 bp, 编码 582 个氨基酸, 推测该蛋白等电点为 7.53, 理论分子量为 65.04 kD。通过构建融合表达载体 pET-32a-NtPDS, 并转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 37 °C 下经 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 表达后, 产生了以可溶性蛋白形式存在的 NtPDS 融合蛋白, 并通过 Western blotting 验证融合蛋白获得表达。利用半定量 RT-PCR 技术进行组织表达模式分析发现, 该基因在烟草的叶片、花和茎中均有表达, 在根中没有表达。该结果为进一步研究烟草八氢番茄红素脱氢酶 NtPDS 的活性和生物学功能奠定了基础。

关键词:烟草; 八氢番茄红素脱氢酶; 原核表达; 表达谱

Prokaryotic Expression and Expression Pattern Analysis of Phytoene Desaturase Gene in Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

ZHONG Xiao-wu^{1,2,3}, FU Qiang¹, ZOU Jie¹, LIN Shi-feng¹, GUO Yu-shuang¹, ZHAO Jie-hong¹, REN Xue-liang¹

¹Guizhou Academy of Tobacco Science/Key Laboratory of Molecular Genetics of China National Tobacco Corporation, Guiyang 550081;

²Medicine Research Center, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000;

³Department of Biology, College of Basic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

Abstract: Based on the nucleotide sequence of phytoene desaturase gene of *Nicotiana benthamiana* published on NCBI, specific primers were designed and synthesized. With the total RNA from leaves of *Nicotiana tabacum* cv. Hongda used as the template, the *NtPDS* gene was obtained by PCR. Sequence analysis showed that the gene contained a full coding region of 1749 bp encoding 582 amino acids with the molecular weight of 65.04 kD and the isoelectric point of 7.53. The fragments of the *NtPDS* gene were cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a and the fusion expression vector pET-32a-NtPDS was constructed, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The fusion protein NtPDS in the form of soluble fraction was effectively expressed under 1 mmol/L IPTG concentrations at 37 °C for 4 hours. And then this result was proved by western blotting. The semi-quantitative PCR results revealed that the transcript of *NtPDS* gene was detectable in leaves, flowers, and stems, but no such transcript detected in the roots. It laid a foundation for the further study on the enzyme activity of NtPDS and its biological functions.

Key words: *Nicotiana tabacum*; phytoene desaturase; prokaryotic expression; expression profile

在植物中, 类胡萝卜素主要分布于叶绿体和有色体膜中, 是植物光合作用的重要辅助色素和光氧

收稿日期: 2013-09-12 修回日期: 2013-11-19 网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1421.013.html>

基金项目: 中国烟草总公司基因组重大专项 (110201201006); 贵州省科技厅农业攻关项目 (黔科合 NY 字 [2011] 3047 号); 中国烟草总公司重点项目 (中烟办 [2010] 221 号); 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金 (黔科合人字 [2013] 02 号)

第一作者主要从事烟草遗传育种与功能基因组研究。E-mail: zwx_strive@163.com

通信作者: 任学良, 主要从事烟草遗传育种与基因组学研究。E-mail: renxuel@126.com

化作用的保护剂,也是构成植物器官颜色的重要色素^[1-3]。在烟草中类胡萝卜素是最重要的萜烯类化合物之一,不仅直接影响烟叶的外观质量,而且还直接和间接地影响烟叶的内在品质,其相关降解产物与烟叶的香气质和香气量也有密切的相关性^[4]。因此,研究烟草类胡萝卜素生物合成及其调节机理一直是国内外烟草行业的一个热点。

八氢番茄红素脱氢酶(PDS, phytoene desaturase)是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一,八氢番茄红素在PDS的作用下生成 ζ -胡萝卜素,然后在ZDS催化下 ζ -胡萝卜素向番茄红素转化,进而合成其他下游类胡萝卜素^[5]。研究表明,PDS在类胡萝卜素合成途径中具有调控作用^[6]。许多除草剂的抑制剂(如吡草伏和氟啶酮)与PDS结合后,抑制了PDS的催化活性,积累了大量的八氢番茄红素,从而影响类胡萝卜素的合成^[7]。Z. R. Sun等^[8]研究发现,PDS基因的表达与花和果实中类胡萝卜素含量呈正相关。PDS基因还是植物中的一个内源基因,国内外很多研究通过沉默PDS基因检测和报告基因,研究新基因的功能^[9]。比如,将PDS基因中的某段序列克隆到沉默载体并转入植物中,就能够引起叶片斑驳、发黄等现象。目前关于烟草类胡萝卜素生物合成途径中相关基因的分离和鉴定国内外报道较少,而PDS在烟草类胡萝卜素生物合成途径中的具体作用和功能目前也还不清楚。本研究以NCBI数据库中本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)的PDS(ABE99707)核酸序列设计特异引物,从栽培烟草红花大金元克隆获得*NtPDS*基因片段,利用生物信息学方法研究该基因的序列特征及结构,然后在大肠杆菌中进行原核表达,为后续研究其生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验所用植物材料为普通烟草(*Nicotiana tabacum*)品种红花大金元开花期(盆栽培养80 d)中部叶片,取新鲜叶片保存于80℃备用。

1.2 菌株、载体及主要试剂

HiFi *Taq* 酶、pEASY T1-simple 载体和大肠杆菌菌种 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I、DNA Marker DL2000 等 PCR 扩增试剂购自大连 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶和反转录试剂盒购自 Promega 公司;DNA 回收试剂盒和 PCR Clean-up 试剂盒购自 AXYGEM 公司;原核表达载体 pET-32a 和 BL21 (DE3) 表达菌株为

本实验室保存;蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司;鼠抗 6 \times His tag、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 购自碧云天生物技术研究。卡那霉素、IPTG 等分析纯药品均购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 的克隆

取红花大金元的叶片作为 RNA 提取材料,利用 TRIZOL 法严格按照 Invitrogen 公司试剂盒说明书操作步骤提取总 RNA,在逆转录酶的作用下,合成 cDNA 第 1 链。以其为模板,根据 NCBI 数据库中本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)的 PDS(ABE99707)核酸序列设计特异引物,其中正向引物:PDS1-F:5'-CGCGGATCCATGCCCAAAATTGGACTTGTCTTCT-3',反向引物:PDS1-R:5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAACTACGCTTGCTTCTGCCAA-3'进行 PCR 扩增,在正反向引物的 5' 端分别加入 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切位点(下划线部分)和保护碱基(斜体部分)。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,60℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min 30 s,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化目的片段连接到 pEASY T1-simple 载体,重组质粒命名为 pEASY T1-NtPDS,然后通过热击转化转入 DH5 α 感受态细胞中,利用蓝白斑筛选和菌液 PCR 鉴定阳性克隆^[10-11],并把阳性克隆送到华大基因进行测序。

1.4 *NtPDS* 基因的生物信息分析

利用 ExPASy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) 的在线软件对该蛋白质的理化性质进行基本分析,运用 SMART 在线程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析其蛋白结构域,运用 NCBI 网站 (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) 中的 BLAST 工具进行基因同源性的比对。利用 MatGAT V2.02 软件^[12],采用矩阵全局比对法(Matrix Global Alignment)计算所选物种 PDS 氨基酸序列的相似度及一致性。利用 ClustalX 1.83 软件^[13]对普通烟草、本氏烟和 8 种常见植物 PDS 氨基酸序列进行比对,利用 ESPrit 在线软件进行作图及分析 (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>),利用 MEGA v4.0 软件^[14]采用邻接法(NJ, neighbor-joining)自举检验 1000 次构建系统进化树。

1.5 *NtPDS* 基因的原核表达载体构建及诱导表达

测序验证正确后,将重组质粒 pEASY T1-NtPDS 和原核表达载体 pET-32a(+) 分别用 *Bam*HI 和 *Not* I 双酶切并回收纯化,用 T4 连接酶连接过夜并转化大肠杆菌 DH5 α 后,利用菌液 PCR 筛选阳性克隆,然后

进行双酶切及其测序验证,融合表达载体命名为 pET-32a-NtPDS。取 1 μ L 测序验证正确的重组质粒 pET-32a-NtPDS 转化至表达菌株 BL21 (DE3) 感受态细胞中,挑取单菌落,接种于 10 mL 的 2 \times YT 培养基中(加入卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 摇床 220 r/min 振荡培养至 OD 为 0.6 ~ 1.0 之间,加入 1 mmol/L IPTG 在 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 h,对照不加 IPTG 诱导。诱导后的菌液以 8000 r/min,4 $^{\circ}$ C,离心 15 min,弃上清收集菌体,然后用 850 μ L 的 Binding buffer(20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,5% 甘油,pH 8.0)重悬菌体,液氮冻融 3 次后,置于冰水混合物中超声破碎 10 min(输出功率为 200 W,超声 1s,间歇 3 s)。然后 12000 r/min,4 $^{\circ}$ C,离心 15 min,上清液转移至新的离心管中,沉淀再用 850 μ L 的 Binding buffer 重悬。各取 20 μ L 的样品,加入 5 μ L 的 5 \times 上样缓冲液,沸水中变性 10 min 左右。处理好的样品离心后,取 10 μ L 上清液进行 15% SDS-PAGE 电泳,然后进行考马斯亮蓝染色,根据电泳的结果判断目的蛋白是否表达,以包涵体或可溶形式表达^[15]。

将上述处理好的样品进行 SDS-PAGE 电泳后转到 PVDF 膜上,静置于 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,加入 1:2000 鼠抗 His 抗体作为一抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,然后用 TBST(50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5,150 mmol/L NaCl,0.05% Tween 20)洗涤 3 次,1:4000 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体作为二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,最后用 ChemiScope 化学发光成像系统(CLiNX 公司)进行曝光。

1.6 NtPDS 基因表达特征的 RT-PCR 检测

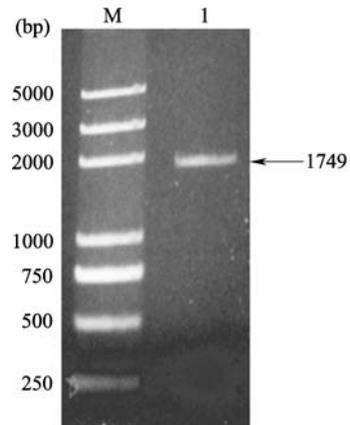
提取红花大金元开花期(盆栽培养 80 d)植株的根、茎、叶片和花的总 RNA,合成 cDNA 第 1 链,运用半定量 RT-PCR 检测普通烟草 NtPDS 的表达量情况,以烟草 β -actin 为内参。NtPDS 的正反引物为 PDS2-F:5'-ACGCCCACTAAACCATT-3',PDS2-R:5'-TCACCCTATCAGGCACAC-3'; β -actin 的正反引物为 β -actin-F:5'-GTGTTATGTTGTTGTTGTTG-3', β -actin-R:5'-ATTGTAAGTTGTTTCGTG-3'。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,58 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共 25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 NtPDS 基因的克隆及序列分析

以普通烟草叶片 cDNA 为模板,利用特异引物进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测发现成功克

隆到一条特异带,该片段大小在 1~2 kb 之间(图 1)。然后对该片段进行回收纯化,经连接、转化、筛选阳性克隆、测序,结果表明 NtPDS 基因的开放阅读框架(ORF,open reading frame)大小为 1749 bp,编码 582 个氨基酸。在线软件预测其等电点为 7.53,理论分子量为 65.04 kD,没有信号肽。通过 SMART 功能域分析,结果显示 NtPDS 蛋白质在 120~562 区域具有一个 Amino_oxidase 功能结构域。



M:DNA Marker DL2000;1:NtPDS 基因 PCR 产物

M:DL 2000 DNA Marker,1:PCR product of NtPDS gene

图 1 NtPDS 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of PCR amplification of NtPDS gene

对普通烟草与 8 种不同物种的 PDS 氨基酸序列进行了同源性比较,结果如表 1 所示。普通烟草 PDS 基因序列与辣椒(Capsicum annuum)的同源性最高,相似性(similarity)和一致性(identity)分别达到了 97.1% 和 95.0%,与玉米(Zea mays)的同源性最低,相似度和一致性分别为 80.7% 和 74.2%。多序列比对结果发现,所有植物 PDS 的氨基酸序列保

表 1 烟草与 8 种不同物种的 PDS 基因氨基酸序列相似性(对角线下方)和一致性(对角线上方)

Table 1 Similarity (below the diagonal) and identity (above the diagonal) of PDS among *N. tabacum* and eight plants at amino acid level (%)

	NtPDS	CaPDS	SIPDS	CsPDS	McPDS	AtPDS	GmPDS	OsPDS	ZmPDS
NtPDS	95.0	94.2	79.9	80.3	77.8	77.8	74.6	74.2	
CaPDS	97.1	95.9	93.8	79.6	80.1	77.3	77.3	74.7	
SIPDS	95.4	95.9	85.6	80.1	80.3	78.4	78.4	75.1	
CsPDS	85.4	85.6	85.6	85.6	93.1	77.8	77.8	75.2	
McPDS	85.1	85.2	85.1	95.3	95.3	77.1	77.1	76.1	
AtPDS	84.5	85.2	85.3	84.2	83.1	83.1	100	75.9	
GmPDS	84.5	85.2	85.3	84.2	83.1	100	100	75.9	
OsPDS	82.1	82.4	82.1	83.8	84.3	82.5	82.5	82.5	
ZmPDS	80.7	81.1	80.9	83.1	82.2	81.6	81.6	91.5	

阴影部分代表相似性的值,其中最高与最低值均用粗体标注

The values of similarities are shaded and the highest and the lowest values are highlighted in bold

守性很高,而且都具有二核苷酸结合基序(GXGX₂GX₃AX₂LX₃GX₆EX₅GG)、底物转运基序[Px(D,E)x(L,I,V,T)(R,K)x(L,R)(L,I,V,M,F,Y)]和类胡萝卜素结合基序(AGDYTKQRYLASMEQATF-STAKL),如图2所示。系统发生分析表明(图3),普通烟草和本氏烟PDS与辣椒、番茄的PDS 4种茄

科植物聚成一支,禾本科植物水稻和玉米的PDS聚成一支,苦瓜和黄瓜两种葫芦科植物的PDS聚成一支,拟南芥及大豆的PDS也聚成一支。从图3的结果发现普通烟草PDS基因与本氏烟、辣椒、番茄的PDS基因的分子系统进化关系最近,与禾本科植物水稻和玉米最远。

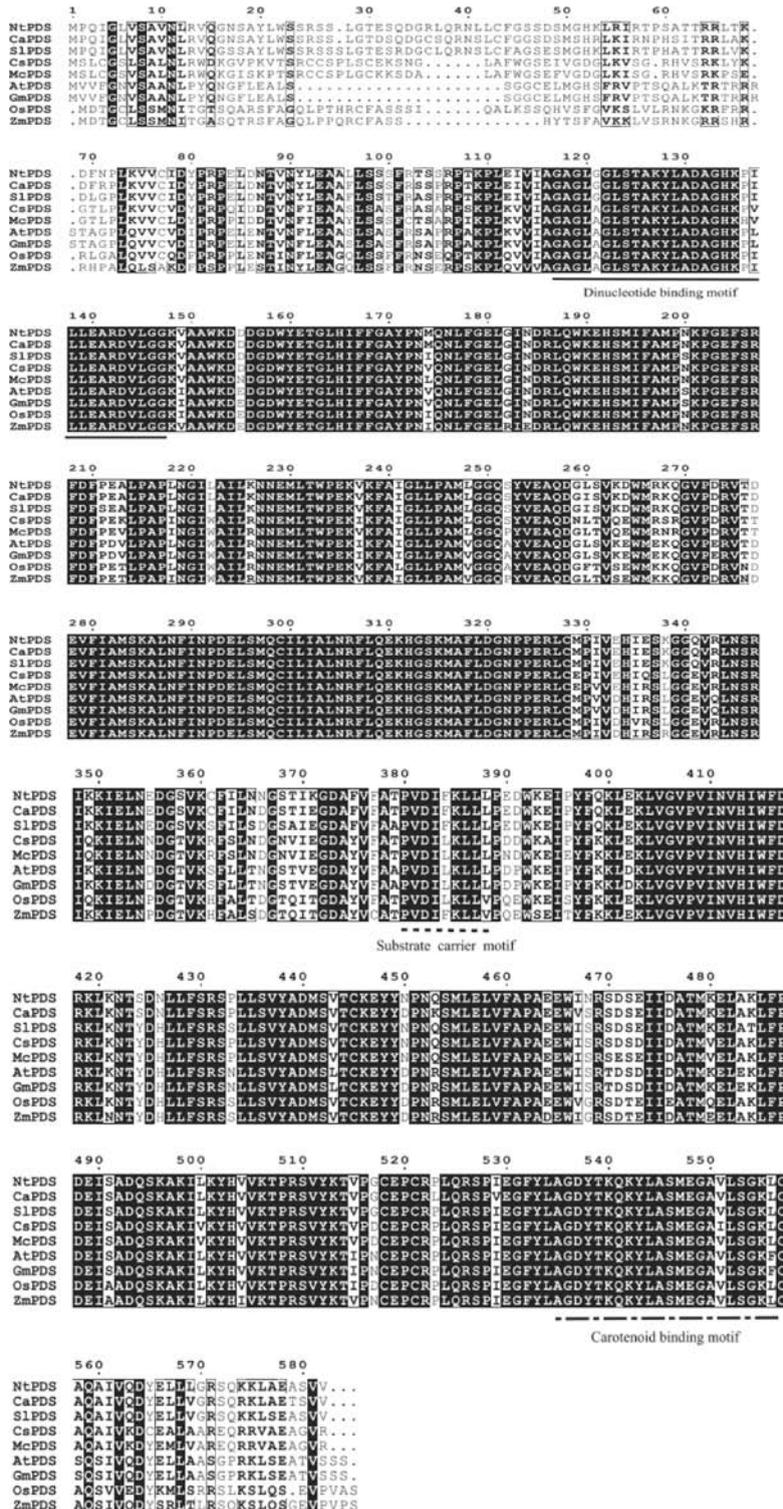


图2 不同物种中PDS的蛋白序列比对

Fig. 2 Multiple alignments of the deduced amino acid sequences of PDS in tobacco and other species

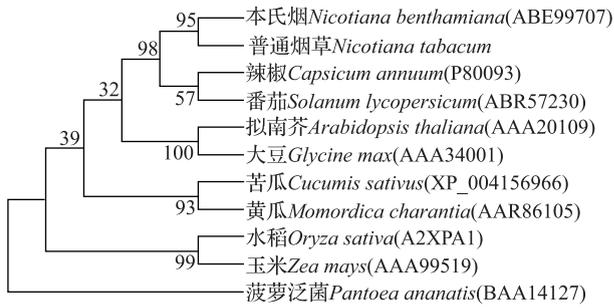


图3 烟草与8种植物 PDS 氨基酸序列的 NJ 系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree between the tobacco PDS amino acids and 8 other selected plants

2.2 *NtPDS* 基因的原核表达及 western blotting 分析

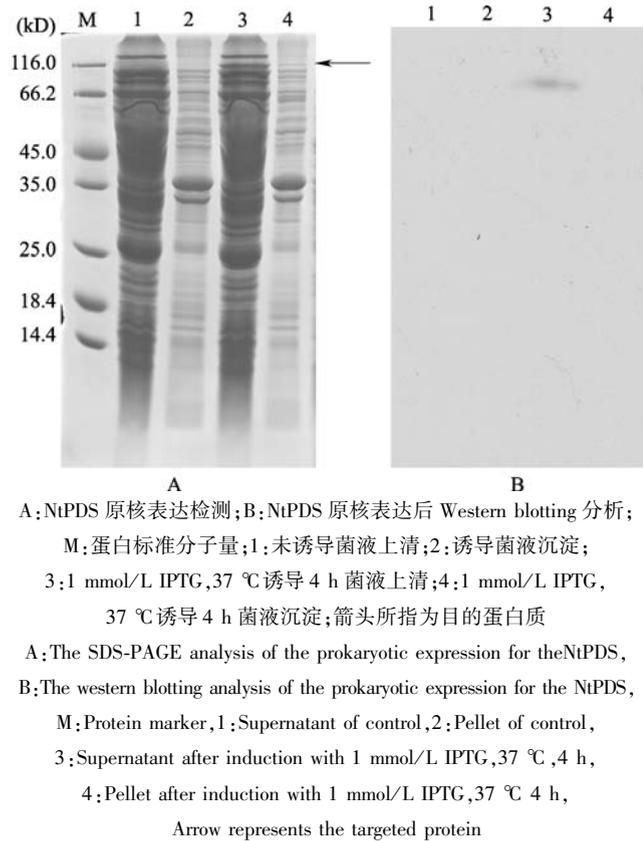
将鉴定阳性的重组表达质粒 pET-32a-*NtPDS* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 宿主菌, 挑取阳性克隆振荡培养, 当大肠杆菌处于对数生长期时加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导表达 4 h, 离心收集不同诱导培养时间的工程菌。通过 SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色发现, 与对照相比, 诱导后的上清液在 66.2 ~ 116 kD 之间有特异条带, 由于重组蛋白中 His 标签蛋白及质粒序列带来的氨基酸约 21.0 kD, 因此所表达的蛋白条带大小与 *NtPDS* 蛋白预测的 65.04 kD 基本吻合, 说明 *NtPDS* 重组蛋白成功以可溶的形式在大肠杆菌中获得了表达 (图 4A)。表达的 *NtPDS* 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 转到 PVDF 膜上然后用 6 × His 单克隆抗体进行重组蛋白的 western blotting 分析, 86 kD 处均出现一条特异性的抗原-抗体结合带 (图 4B), 进一步证明了 *NtPDS* 重组蛋白质获得表达。

2.3 *NtPDS* 基因的组织表达分析

提取红花大金元开花期 (盆栽培养 80 d) 植株的不同组织, 抽提 RNA 并反转录合成 cDNA。利用合成的 cDNA 和基于 *NtPDS* 基因序列设计的特异引物进行 RT-PCR, 以烟草 β -actin 基因为内参, 检测普通烟草 *NtPDS* 基因在各组织转录水平的表达特征。RT-PCR 检测结果显示, 该基因在花和叶片中的表达量比较高, 茎也有所表达, 但是在根中不表达, 说明内胡萝卜素主要在花和叶片中积累 (图 5)。

3 讨论

自 1991 年 D. Chamovitz 等^[16] 在抗达草灭的组囊藻 (*Anacystis nidulans* R2) 中发现并最终获得正常



A: *NtPDS* 原核表达检测; B: *NtPDS* 原核表达后 Western blotting 分析;

M: 蛋白标准分子量; 1: 未诱导菌液上清; 2: 诱导菌液沉淀; 3: 1 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导 4 h 菌液上清; 4: 1 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导 4 h 菌液沉淀; 箭头所指为目的蛋白质

A: The SDS-PAGE analysis of the prokaryotic expression for the *NtPDS*,

B: The western blotting analysis of the prokaryotic expression for the *NtPDS*,

M: Protein marker, 1: Supernatant of control, 2: Pellet of control,

3: Supernatant after induction with 1 mmol/L IPTG, 37 °C, 4 h,

4: Pellet after induction with 1 mmol/L IPTG, 37 °C 4 h,

Arrow represents the targeted protein

图4 *NtPDS* 重组蛋白原核表达检测
Fig. 4 SDS-PAGE of *NtPDS* recombinant protein prokaryotic expression

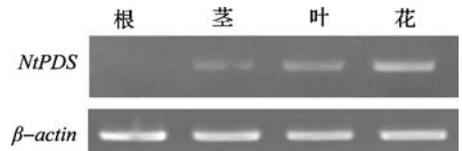


图5 *NtPDS* 基因在不同组织中的表达

Fig. 5 *NtPDS* gene expression in different organs

的 *PDS* 基因后, *PDS* 基因已经从大豆、番茄、辣椒、玉米、拟南芥等许多植物中分离获得, 这些基因的 cDNA 全长一般为 1.9 ~ 2.3 kb, 编码氨基酸 566 ~ 582 个。然而 G. E. Bartley 等^[17-18] 发现番茄 *PDS* 基因转录区包括 15 个外显子和 14 个内含子, 长度达 7.7 kb, 而且有研究证明其是以单拷贝形式存在的^[19]。前人的研究表明, 植物的 *PDS* 序列存在一些共同的功能结构区域, 是所有类胡萝卜素脱氢酶具有的共同特征^[20]。本研究从栽培烟草中克隆获得了普通烟草 *NtPDS* 基因, 其 cDNA 长 1749 bp, 编码 582 个氨基酸残基, 通过多序列比对分析发现普通烟草 *NtPDS* 基因编码的氨基酸与之相符合, 说明所得序列编码的蛋白是烟草类胡萝卜素脱氢酶。普通烟草 *NtPDS* 基因编码的氨基酸与其他植物 *PDS* 的保守性很高, 具有类胡萝卜素脱氢酶典型基序

GXGX₂ GX₃ AX₂ LX₃ GX₆ EX₅ GG, 能够结合 NADP、NAD 及 FAD 等^[21-22]。

植物类胡萝卜素是许多叶片、花和果实中的主要色素,PDS 是植物类胡萝卜素合成中去饱和的非常重要的一类酶,在植物的花和果实显色中起着重要作用^[23]。PDS 是类胡萝卜素合成途径中的限速酶,参与线状类胡萝卜素生物合成^[7]。该酶表达受到抑制后,会导致八氢番茄红素的累积,最终影响植物的叶片、花和果实中类胡萝卜素的合成^[24]。2002 年朱长甫等^[25]采用 Northern blotting 方法在龙胆中发现 PDS 基因只在花和叶中表达,在茎中不表达。陈段芬等^[26]研究表明中国水仙 *NTPDS1* 基因在开花期的叶片、鳞片、根系和花中均有表达,说明该基因为组成型表达。C. Y. Chiou 等^[27-28]在文心兰研究中检测到 PDS 基因在花和叶片中均有表达,在根中的表达量最低,而且提出黄色花的形成受类胡萝卜素途径控制,红色花的形成受类黄酮途径控制。本研究发现普通烟草 *NtPDS* 基因只在茎、叶片和花中表达,在根中没有表达,具有相同的表达模式,推测普通 *NtPDS* 基因在烟草叶片类胡萝卜素积累和花的显色中可能起着重要作用。利用大肠杆菌异源表达重组蛋白质来鉴定体外酶学特性就成为一种良好的方法。本研究成功构建了 pET-32a-NtPDS 原核表达载体,并且在大肠杆菌 BL21 (DE3) 宿主菌中获得了成功表达,为进一步研究其酶活性及其生物学功能奠定基础。

参考文献

- [1] Tracewell C A, Vrettos J S, Bautista J A, et al. Carotenoid photo oxidation in photosystem [J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 385: 61-69
- [2] 高桂珍,伍晓明,陆光远,等. 油菜种子类胡萝卜素总量测定方法的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 414-417
- [3] 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
- [4] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 124-128, 196-204
- [5] Lu S, Li L. Carotenoid metabolism; biosynthesis, regulation, and beyond [J]. J Integr Plant Biol, 2008, 50(7): 778-785
- [6] Chamovitz D, Sandmann G, Hirschberg J. Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis [J]. J Biol Chem, 1993, 268(23): 17348-17353
- [7] Simkin A J, Laboure A M, Kuntz M, et al. Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves [J]. Z Naturforsch C, 2003, 58(5-6): 371-380
- [8] Sun Z R, Cunningham Jr F X, Gantt E. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(19): 11482-11488
- [9] Fofana I B, Sangare A, Collier R, et al. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava [J]. Plant Mol Biol, 2004, 56(4): 613-624
- [10] Sam Brook J, Rus Sell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M], 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 96-99, 636-643
- [11] 刘春燕,魏学军,张娜,等. *TcLr45* 凝集素类受体蛋白激酶基因克隆与序列分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 486-491
- [12] Campanella J J, Bitincka L, Smalley J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences [J]. BMC Bioinform, 2003, 4(1): 29
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX [M]. Current protocols in bioinformatics, 2002, doi: 10. 1002/0471250953. bi0203s00
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599
- [15] 焦蓉,刘贯山,刘好宝,等. 普通烟草鸟氨酸转氨酶基因 *Nt^δ-OAT* 的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 588-595, 600
- [16] Chamovitz D, Pecker I, Hirschberg J. The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon [J]. Plant Mol Biol, 1991, 16: 967-974
- [17] Bartley G E, Scolnik P A. Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol, 1994, 45: 287-301
- [18] Bartley G E, Scolnik P A. Plant carotenoids: pigments for photo-protection, visual attraction, and human health [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1027-1038
- [19] Corona V, Aracri B, Kosturkova G, et al. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development [J]. Plant J, 1996, 9: 505-512
- [20] 朱跃辉,姜建国,林庆生. 盐藻八氢番茄红素脱氢酶 cDNA 的分离及序列分析[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(9): 21-23
- [21] Krugel H, Krubasik P, Weber K, et al. Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1439(1): 57-64
- [22] Li M, Gan Z, Cui Y, et al. Structure and function characterization of the phytoene desaturase related to the lutein biosynthesis in *Chlorella protothecoides* CS-41 [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(4): 3351-61
- [23] Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, et al. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit [J]. Plant Physiol, 2004, 134(2): 824-830
- [24] Bartley G E, Scolnik P A. Plant carotenoids: pigments for photo-protection, visual attraction, and human health [J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 1027-1038
- [25] 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
- [26] 陈段芬,彭镇华,高志民. 中国水仙八氢番茄红素脱氢酶基因 (*PDS*) 的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 574-578
- [27] Chiou C Y, Yeh K W. Differential expression of MYB gene (*Og-MYB1*) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium Gower Ramsey* [J]. Plant Mol Biol, 2008, 66: 379-388
- [28] Chiou C Y, Pan H A, Chuang Y N. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars [J]. Planta, 2010, 232: 937-948