

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.04.016

# 万寿菊胡萝卜素羟化酶基因 *TeCHYE* 克隆与分析

王瑞鹏, 刘茜, 杨智强, 张博昆, 黄姿, 牛向丽

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**  $\alpha$ -胡萝卜素  $\epsilon$ -环羟化酶( $\alpha$ -carotene  $\epsilon$ -ring hydroxylase, CHYE)是植物类胡萝卜素合成途径下游关键酶,催化叶黄素的形成。万寿菊(*Tagetes erecta* L.)是菊科园艺作物,富含类胡萝卜素,尤其是叶黄素,可用于天然色素的提取。文章根据万寿菊的转录组数据,通过花组织 RNA 提取、反转录合成 cDNA,以克隆获得编码万寿菊  $\alpha$ -胡萝卜素  $\epsilon$ -环羟化酶的基因 *TeCHYE*,连接于克隆载体 pEASY-Blunt。序列分析结果显示,该基因为读码框全长 1 656 bp、编码相对分子质量约 62 kDa 的亲水性蛋白。进化分析表明,CHYE 基因在植物中保守存在,万寿菊 *TeCHYE* 与同科植物向日葵 *HaCHYE* 同源性最高。进一步对万寿菊叶片、不同发育时期花组织中叶黄素的质量比及其 *TeCHYE* 基因表达水平进行分析,结果显示, *TeCHYE* 在花的发育过程中表达水平显著升高,表明其参与了叶黄素在万寿菊花中的合成积累。

**关键词:** 万寿菊; 叶黄素;  $\alpha$ -胡萝卜素  $\epsilon$ -环羟化酶; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:** Q943.2; S511.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2023)04-0535-06

## Cloning and analysis of carotene hydroxylase gene *TeCHYE* in *Tagetes erecta* L.

WANG Ruipeng, LIU Qian, YANG Zhiqiang, ZHANG Bokun, HUANG Zi, NIU Xiangli  
(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:**  $\alpha$ -carotene  $\epsilon$ -ring hydroxylase(CHYE) is a key downstream enzyme of the carotenoid synthesis pathway in plants, catalyzing the formation of lutein. Marigold(*Tagetes erecta* L.) is an ornamental crop of Compositae, which is rich in carotenoids, especially lutein, to be used for natural pigments extraction. In this paper, cDNA from marigold flower was synthesized by RNA extraction and reverse transcription to clone the *Tagetes erecta* L.  $\alpha$ -carotene  $\epsilon$ -ring hydroxylase(*TeCHYE*) gene based on the transcriptome data. Then, *TeCHYE* was ligated to the cloning vector pEASY-Blunt. The sequence analysis indicated the 1 656 bp open reading frame of *TeCHYE*, encoding a hydrophilic protein with relative molecular weight of 62 kDa. The phylogenetic analysis suggested that CHYE gene conserves in plant species, and *TeCHYE* showed the highest identity with homologous *HaCHYE* from sunflower belonging to the same family. The content of lutein, as well as the expression level of *TeCHYE*, in marigold leaves and flower tissues at different development stages were furtherly analyzed. The significantly increased level of *TeCHYE* in developmental flowers suggested its involvement in the synthesis and accumulation of lutein in marigold.

**Key words:** *Tagetes erecta* L.; lutein;  $\alpha$ -carotene  $\epsilon$ -ring hydroxylase(CHYE); gene cloning; expression analysis

类胡萝卜素是植物体重要的色素次生代谢产物。在植物类胡萝卜素的生物合成途径中,两分

子的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)在八氢番茄红素合成酶

收稿日期:2021-03-24;修回日期:2021-04-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31671266)

作者简介:王瑞鹏(1994—),男,安徽合肥人,合肥工业大学硕士生;

牛向丽(1971—),女,河南周口人,博士,合肥工业大学研究员,硕士生导师,通信作者, E-mail:niu\_xiangli@163.com.

(phytoene synthase, PSY) 的催化下形成八氢番茄红素, 后者在八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS)、 $\xi$ -胡萝卜素脱氢酶 ( $\xi$ -carotene desaturase, ZDS)、类胡萝卜素异构酶 (carotenoid isomerase, CRTISO) 等的作用下脱氢、异构形成反式番茄红素。番茄红素在不同环化酶 (lycopene cyclase, LCY) 作用下, 分别生成  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素, 这是类胡萝卜素合成途径中的一个关键分支点。此后两者经过连续羟化分别形成不同的含氧类胡萝卜素 (Xanthophylls)<sup>[1]</sup>。这种羟化反应包括由细胞色素 P450 家族类胡萝卜素羟化酶 (cytochrome P450-type monooxygenase 97, CYP97) 和亚铁血红素依赖型  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶 ( $\beta$ -carotenoid hydroxylase, CHYB) 催化的 2 种路径, 两者同属于类胡萝卜素羟化酶家族<sup>[2]</sup>。其中, CYP97 家族负责具有  $\epsilon$  环的  $\alpha$ -胡萝卜素的羟基化, 简称为 CHYE, 而具有  $\beta$  环的  $\beta$ -胡萝卜素的羟基化则由 CHYB 家族完成, 通过羟基化最终分别合成叶黄素 (Lutein)、玉米黄素 (Zeaxanthin) 等重要植物色素, 与番茄红素等共同组成植物的天然类胡萝卜素功能成分<sup>[3]</sup>。植物中类胡萝卜素的生物合成途径保守存在, 但不同植物物种在各自生存环境的适应进化过程中, 由于相关合成途径基因及其表达水平的差异最终积累不同含量的色素组分, 呈现丰富多变的色泽。

万寿菊 (*Tagetes erecta* L.) 是菊科万寿菊属草本植物, 原产于墨西哥, 因其花形大、色彩绚丽、易于栽培, 常作为园艺花卉在世界各地栽培种植<sup>[4]</sup>。由于万寿菊花中富含类胡萝卜素, 尤其是叶黄素, 而这些色素成分是维持人体健康所必需的营养素, 具有抗氧化、防止退行性视力疾病、抗癌、抗辐射等重要功能<sup>[5-6]</sup>, 但在人体内无法合成, 必须从膳食中摄取或补充<sup>[7]</sup>。叶黄素是类胡萝卜素合成途径中  $\alpha$  分支的终产物, 作为含氧类胡萝卜素家族的重要成员之一, 既有多种生物活性又具有增色作用, 因此在医药、化妆品、饲料等领域被广泛应用<sup>[8]</sup>。富含叶黄素的万寿菊花也因此成为用于提取天然色素成分的主要植物资源, 但目前对其类胡萝卜素合成途径基因的克隆和分析报道较少。本课题组通过万寿菊转录组高通量测序获得了万寿菊 CHYE (*TeCHYE*) 基因的组装推测序列, 在本文中进一步从花中克隆分离该基因, 通过生物信息学分析以及在万寿菊叶片和不同发育时期花组织中的表达水平测定, 对其功能进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 植物材料

万寿菊 (*Tagetes erecta* L.) 栽培品种 ‘Juwang’ 种植于合肥工业大学植物培养室。分别采集生长约 70 d 万寿菊植株的叶片 (L)、花蕾 (F1)、未盛开花 (F2)、盛开后 3 d 的花 (F3) 组织, 用于 RNA 提取、叶黄素质量比测定。

#### 1.1.2 试剂药品

TRIzol 购于 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒、高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒均购于北京全式金生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒均购于天根生化科技有限公司; 引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件, 引物合成和测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成; 其他试剂均为国外原装或国产分析纯。

#### 1.1.3 载体与菌株

pEASY-Blunt 克隆载体购于北京全式金生物技术有限公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 万寿菊 RNA 提取与 cDNA 合成

将采集的万寿菊组织样品液氮研磨, 利用 TRIzol 提取总 RNA, 并以 Nanodrop 2000 超微量分光光度计检测 RNA 的纯度、浓度; 然后按照反转录试剂盒操作步骤将所提取 RNA 经过反转录, 合成 cDNA, 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

#### 1.2.2 万寿菊 *TeCHYE* 基因的扩增

基于本课题组万寿菊转录组数据, 获得万寿菊 *TeCHYE* 基因组序列, 并据此序列设计的基因克隆引物 CHYEF/R 见表 1 所列。

表 1 本实验所用引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
CHYEF1	TAACACCTACAAACCACCAACCA
CHYER1	ACGGGGAAAAATTATAGACATTA
CHYEF2	ATTTTCATCTTTCATCATCCTCAC
CHYER2	CCATGAATGCTTGTATGTAGAAGT
CHYERTF	GCTACGTGATGACCTTTTGTCAAT
CHYERTR	CGGTCAACTTCTCTTGTGCGCT
TIF6F	TAAGACCTGGTGGTGGAAATAGA
TIF6R	CAGCACCATGAGGACGAAGA

以上述反转录 cDNA 为模板, 利用巢式 PCR

对 *TeCHYE* 基因进行扩增。PCR 反应程序如下:

预变性(98 °C、2 min);变性(98 °C、10 s),退火(55 °C、20 s),延伸(72 °C、90 s),重复 30 个循环;最后延伸(72 °C、5 min)。通过 1%琼脂糖凝胶电泳分离检测扩增产物。

### 1.2.3 *TeCHYE* 基因的克隆

利用 DNA 纯化试剂盒对扩增产物进行纯化,然后将纯化后扩增产物与克隆载体 pEASY-Blunt 进行连接。连接产物通过热休克法转化大肠杆菌感受态细胞,涂布于含有卡那霉素的固体培养基中,37 °C 培养 16 h。然后挑取单克隆进行培养,以引物 CHYEF2、CHYER2 进行菌落 PCR 鉴定。取阳性克隆菌液进行质粒提取、送样测序,并比对测序结果。

### 1.2.4 *TeCHYE* 基因生物信息学分析

利用蛋白组学分析平台(ExPASy, <https://www.expasy.org/>) ProtParam 和 ProtScale 对 *TeCHYE* 编码蛋白的理化性质进行分析,使用同源建模方法(SWISS-MODEL)对 *TeCHYE* 蛋白三维结构进行预测,并运用 RasWin 软件对其进行注释优化。将 *TeCHYE* 基因序列在美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)数据库进行对比,利用 MEGA 7.0 软件,使用邻接法(Neighbor Joining)构建进化树进行进化分析,并对保守性较高的蛋白用 Esprict 3.0(<https://esprict.ibcp.fr/>)在线软件进行氨基酸序列比对分析。

### 1.2.5 *TeCHYE* 基因表达分析

以万寿菊‘Juwang’的叶片和不同发育阶段花组织样品提取 RNA、反转录合成 cDNA。依据 *TeCHYE* 克隆测序结果设计定量检测引物 CHYERTF/R(分别位于编码序列第 1 017 碱基和第 1 124 碱基处),内参为万寿菊 *TIF6* 基因<sup>[9]</sup>,相应引物 TIF6F/R 序列见表 1,对其进行实时荧光定量 PCR,该反应体系(20 μL)如下:2×PerfectStart Green qPCR SuperMix 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,模板 cDNA(1:30 稀释)4 μL,无菌双蒸水 5.2 μL。扩增程序(两步法)如下:94 °C、30 s;94 °C、5 s,60 °C、30 s,40 个循环。在 Bio-Rad CFX96 Real-time PCR 系统运行,利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对实时荧光定量 PCR 结果进行分析。

### 1.2.6 万寿菊不同组织叶黄素质量比测定

将万寿菊叶、花组织采样后 45 °C 烘干。置于

研钵中加入液氮迅速研磨成粉末。称取 0.1 g 置于试管中,先后加入 0.1% BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)-乙醇 0.8 mL、50% KOH 0.2 mL,涡旋振荡混匀,然后 50 °C 水浴锅水浴 1 h,每隔 20 min 涡旋 1 次。水浴完成待冷却后,加入 1 mL 丙酮超声提取 1 h,吸取 10 μL 提取液滤液,利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定叶黄素质量比。色谱条件如下:色谱柱 Symmetry C18(5 μm, 4.6 mm×250 mm);柱温 30 °C;流动相为乙腈、二氯甲烷、甲醇,三者体积比为 7:2:1;流速为 1 mL/min;检测波长<sup>[10]</sup>为 445 nm。根据标准曲线计算样品中叶黄素的质量比。

### 1.2.7 数据分析

本实验所测得数据均采用 SPSS 22 软件进行统计学分析。

## 2 结果分析

### 2.1 *TeCHYE* 基因克隆结果分析

以万寿菊花 cDNA 为模板,利用特异巢式 PCR 引物 CHYEF/R 对 *TeCHYE* 基因进行 2 轮扩增,将第 2 轮 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1a 所示。图 1a 中:M 代表 DNA Marker;1 代表 *TeCHYE* 基因扩增产物。

由图 1a 可知,本实验获得了与预期大小(1 656 bp)基本一致的目的条带,且条带清晰,没有其他明显的非特异扩增产物。将此扩增产物纯化后与 pEASY-Blunt 克隆载体连接,转化大肠杆菌感受态。

利用基因特异引物 CHYEF2/R2 对卡那霉素抗性平板上生长的单克隆进行 PCR 鉴定,结果如图 1b 所示。

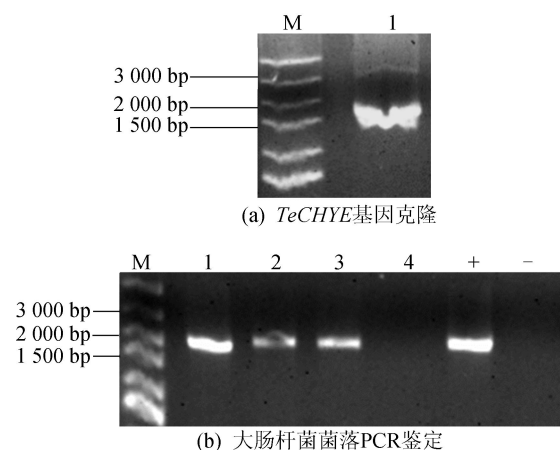


图 1 *TeCHYE* 基因克隆载体的构建

图 1b 中: M 代表 DNA Marker; 1~4 代表单克隆编号; + 代表正对照, 为 *TeCHYE* 基因扩增产物; - 代表负对照, 为 pEASY-Blunt 空载体扩增产物。

从图 1b 可以看出, 单克隆 1~3 可能连接有 *TeCHYE* 基因。然后将鉴定为阳性的单克隆进行测序验证。测序结果表明, 本研究获得了万寿菊 *TeCHYE* 基因全长编码序列, 其与转录组组装序列仅有少数碱基的差异, 进一步说明组装结果较为准确。

## 2.2 *TeCHYE* 基因生物信息学和表达分析结果

通过蛋白组学分析平台 (ExPASy) 对 *TeCHYE* 编码蛋白的理化性质进行分析。分析结果显示, *TeCHYE* 含有 552 个氨基酸, 相对分子质量为 62 125. 21; 理论等电点为 6. 62; 不稳定系数为 35. 79, 属于稳定蛋白; 亲水性平均值为 -0. 174, 属于亲水性蛋白。

通过同源建模方法进一步对 *TeCHYE* 的三级结构进行预测, 并采用软件优化模型, 所具有的  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、转角等结构如图 2 所示。图 2 中: 粉色表示  $\alpha$  螺旋; 黄色表示  $\beta$  折叠; 淡蓝色表示转角; 白色表示其他结构; 方框标注为亚铁血红素的识别结合。



图 2 *TeCHYE* 蛋白三级结构预测

利用植物 *CHYE* 基因序列所构建的系统进化树如图 3 所示。图 3 中: *Te* (*Tagetes erecta*, 万寿菊); *Ha* (*Helianthus annuus*, 向日葵 XM022130222. 2); *Cc* (*Cynara cardunculus*, 大蓟 XM025127352. 1); *Ls* (*Lactuca sativa*, 莴苣 XM02390889 6. 1); *Cm* (*Chrysanthemum morifolium*, 杭菊 KX85384 9. 1); *Cs* (*Cucumis sativus*, 黄瓜 XM 004143239. 3); *Ps* (*Papaver somniferum*, 罂粟 XM026562158. 1); *Nt* (*Nicotiana tabacum*, 烟草 XM016580209. 1); *Sl* (*Solanum*

*lycopersicum*, 番茄 NM001247129. 2); *Rc* (*Ricinus communis*, 蓖麻 XM015719409. 2); *Jc* (*Jatropha curcas*, 麻风树 XM020682561. 2); *Hb* (*Hevea brasiliensis*, 橡胶树 XM0 21821728. 1); *Pm* (*Prunus mume*, 梅花 XM008243131. 1); *Pa* (*Prunus avium*, 甜樱桃 XM021947619. 1); *Zj* (*Ziziphus jujuba*, 枣 XM016043092. 2); *Cs* (*Cannabis sativa*, 大麻 XM030652736. 1); *Eg* (*Eucalyptus grandis*, 巨桉 XM010 052026. 3); *Bo* (*Bixa orellana*, 红木 KT359009. 1); *Cs* (*Croton stellatopilosus*, 巴豆 HG917436. 1); *Vr* (*Vitis riparia*, 河岸葡萄 XM034837759. 1); *Vv* (*Vitis vinifera*, 酿酒葡萄 XM019221707. 1); *Cq* (*Chenopodium quinoa*, 藜麦 XM021859450. 1)。

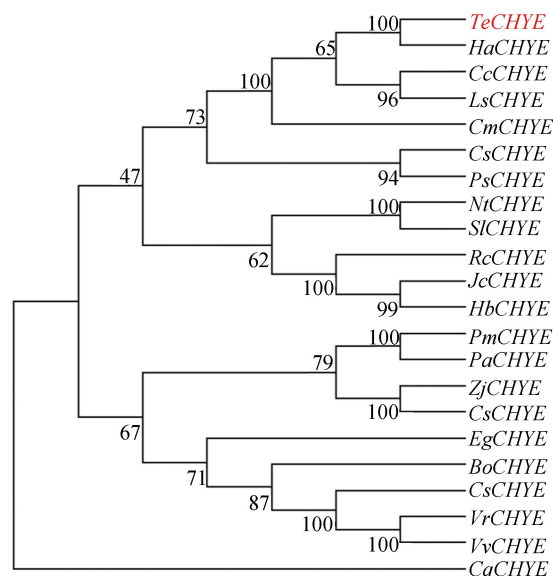


图 3 *TeCHYE* 基因系统进化分析

数据库比对结果表明 *CHYE* 基因在植物中普遍存在, 其中万寿菊 *TeCHYE* 与藜麦 (*Chenopodium quinoa*) 同源基因相似性最低, 为 73. 66%, 而与同科植物向日葵 (*Helianthus annuus*) 的同源性最高, 为 87. 53%。与 *TeCHYE* 同源性较高的不同植物物种 *CHYE* 蛋白的氨基酸序列比对结果如图 4 所示。

‘Juwang’ 叶片 (L) 以及不同发育时期 (F1、F2、F3) 的花组织如图 5a 所示, 对各组织中 *TeCHYE* 基因的表达水平进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果如图 5b 所示, 图 5b 中不同字母表示有显著差异 ( $P < 0. 05$ ), 下同。由图 5b 可知, *TeCHYE* 基因在叶片和各发育时期的花中均有表达, 但在发育阶段的未盛开花 (F2) 中表达水平最高。

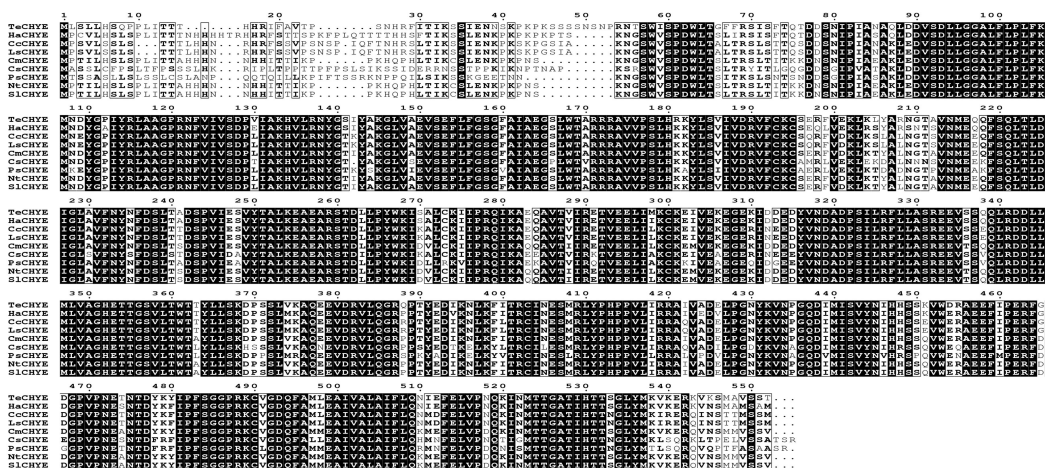
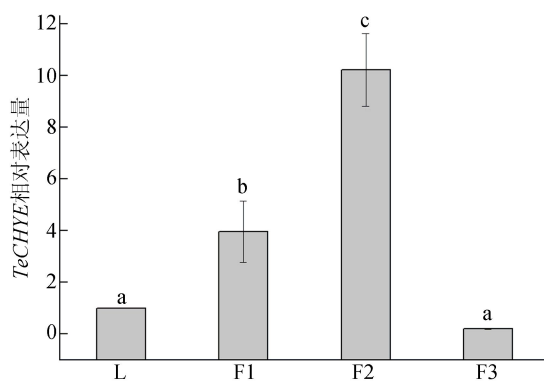


图 4 不同植物的 CHYE 蛋白氨基酸序列比对



(a) 万寿菊 'Juwang' 各组织



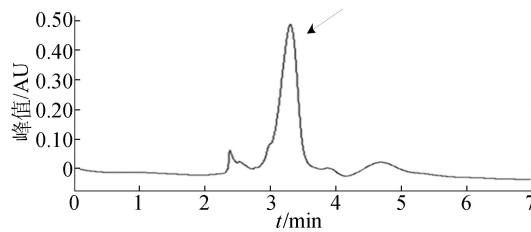
(b) *TeCHYE* 基因的相对表达量

图 5 *TeCHYE* 基因表达量分析

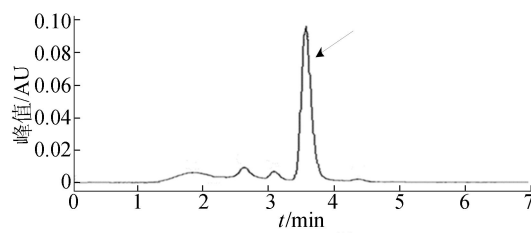
### 2.3 叶黄素质量比分析

对上述万寿菊组织中的叶黄素进行提取,利用 HPLC 方法对叶黄素质量比进行检测,结果如图 6 所示。图 6 中,箭头所指为叶黄素色谱峰。由图 6 可得万寿菊 'Juwang' 叶黄素质量比如图 7 所示,由图 7 可知,万寿菊叶片(L)、花蕾(F1)、未盛开花(F2)、盛开 3 d 花(F3)中叶黄素质量比分别为 10.62、44.49、79.32、57.01  $\mu\text{g/g}$ ,不同发育阶段花组织中叶黄素质量比均明显高于叶片,是叶片的 5~10 倍。万寿菊花组织是合成积累叶黄素的主要部位,且随着发育程度加深,花中叶黄素质量比显著增加,但在完全盛开后略有下降,表明在成熟后期叶黄素可能通过代谢途径转化为其

他次生物质。



(a) 叶黄素标准品



(b) 'Juwang' 样品

图 6 叶黄素标准品和 'Juwang' 样品的 HPLC 谱图

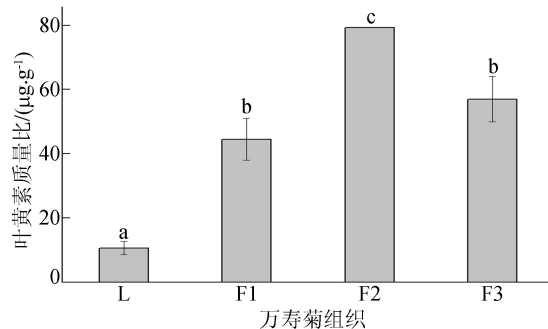


图 7 万寿菊 'Juwang' 叶黄素质量比分析

### 3 讨论

万寿菊颜色多样,有明黄、橙黄、橘黄、橘红,色彩深浅不一<sup>[11]</sup>。但无论颜色深浅,叶黄素均为万寿菊花中主要色素成分,因此这种颜色差异主要取决于叶黄素的含量<sup>[12-13]</sup>。本实验所选用橙

色万寿菊品种‘Juwang’,其花中叶黄素质量比也显著高于叶片,是合成积累以及用于天然叶黄素提取的组织。但目前对万寿菊叶黄素合成途径相关基因的克隆报道并不多,本文对催化 $\alpha$ 胡萝卜素形成叶黄素的 $\alpha$ -胡萝卜素 $\epsilon$ 环羟化酶基因 $TeCHYE$ 进行了克隆,获得其完整编码序列。进化分析表明万寿菊 $TeCHYE$ 与同科植物向日葵 $HaCHYE$ 同源性最高,也进一步说明进化分析的可信性。所预测 $TeCHYE$ 编码蛋白三级结构与拟南芥同源 $AtCYP97C1$ 蛋白结构类似。有报道认为, $AtCYP97C1$ 主要定位于叶绿体膜,催化 $\alpha$ -胡萝卜素 $\epsilon$ 环和 $\beta$ 环的羟基化,但对 $\beta$ 胡萝卜素的 $\beta$ 环仅有很低的催化活性<sup>[14-16]</sup>。当最佳底物 $\alpha$ -胡萝卜素耗尽时,植物才发挥 $\beta$ 胡萝卜素羟化酶活性<sup>[17]</sup>。本文中所检测万寿菊 $TeCHYE$ 基因的表达模式与相应组织中叶黄素质量比也显示相似趋势,因此 $TeCHYE$ 可能具有类似功能,催化叶黄素在万寿菊花中的合成。在课题组前期的转录组深度测序分析中<sup>[9]</sup>, $CHYE$ 在万寿菊中只发现了本文所克隆的1个基因序列,不存在多个拷贝,考虑到万寿菊花中叶黄素的高合成积累, $TeCHYE$ 基因可能在其中发挥重要作用。

已有研究表明,万寿菊所合成叶黄素可以与脂肪酸(主要是饱和脂肪酸)结合,主要以叶黄素酯的形式存在<sup>[18]</sup>。在相同的光、热条件下,叶黄素酯的稳定性要优于叶黄素<sup>[19]</sup>。此外,以叶黄素酯提取的天然色素成分也更有利于人体、饲养动物的吸收利用。而通过 $CHYE$ 催化 $\alpha$ -胡萝卜素 $\epsilon$ 环引入羟基形成叶黄素,这种羟基化也为叶黄素进一步与脂肪酸形成叶黄素酯,在万寿菊花组织中稳定积累提供了条件。文献<sup>[20]</sup>对牵牛花的研究表明,通过 $CHYE$ 羟基化促进叶黄素酯的积累是其花瓣呈色的重要原因。

综上所述,本研究通过 $TeCHYE$ 基因克隆与分析,为植物类胡萝卜素合成途径及可能的遗传改良应用提供了新的基因资源。后续可以利用番茄等模式园艺作物进行遗传转化,通过分析过表达株系果实色素表型进一步验证其功能并评估应用潜力。

### [参 考 文 献]

[1] 于菁文,张奕,胡鑫,等. 番茄果实中类胡萝卜素合成与调控的研究进展[J]. 中国蔬菜,2019(7):23-35.  
[2] 尹航,龚一富,俞凯,等. 绿色杜氏藻类胡萝卜素羟化酶基因家族分子特征及胁迫表达分析[J]. 农业生物技术学报,2019,27(2):269-279.

[3] CUI H L, YU X N, WANG Y, et al. Gene cloning and expression profile of a novel carotenoid hydroxylase (CYP97C) from the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26: 91-103.  
[4] 李乔仙,高月娥,段新慧,等. 万寿菊及其副产物[J]. 云南畜牧兽医,2012(2):36-37.  
[5] 张坤生. 万寿菊中类胡萝卜素的分离及性质研究[D]. 天津:天津商业大学,2008.  
[6] 孙玉敬,乔丽萍,钟烈洲,等. 类胡萝卜素生物活性的研究进展[J]. 中国食品学报,2012,12(1):160-166.  
[7] 王敏,王晓黎,沈慧,等. 叶黄素预防心血管疾病的研究进展[J]. 职业与健康,2020,36(3):424-427.  
[8] 刘乐,展俊岭,高子怡,等. 万寿菊中叶黄素提取工艺研究现状[J]. 绿色科技,2018(20):210-211.  
[9] FENG G D, HUANG S X, LIU Y, et al. The transcriptome analyses of *Tagetes erecta* provides novel insights into secondary metabolite biosynthesis during flower development [J]. Gene, 2018, 660: 18-27.  
[10] 田丽,冯国栋,刘莹,等. 色素万寿菊不同栽培品种农艺性状和叶黄素量的比较[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2018,41(5):703-707.  
[11] 冯国栋. 万寿菊转录组分析及类胡萝卜素合成途径分子机制研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2019.  
[12] 刘晓丛,曾丽,张邀月,等. 万寿菊类胡萝卜素裂解双加氧酶基因 $CCD4b$ 的克隆与表达分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2018,36(2):1-8,21.  
[13] 宋昊,何泽超,章杰赵,等. 万寿菊花中叶黄素的提取[J]. 化工设计,2003,13(4):10-12.  
[14] TIAN L, MAGALLANES-LUNDBACK M, MUSETTI V, et al. Functional analysis of  $\beta$ - and  $\epsilon$ -ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2003, 15(6):1320-1332.  
[15] FIORE A, DALL'OSTO L, CAZZANIGA S, et al. Elucidation of the  $\beta$ -carotene hydroxylation pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Letters, 2006, 580: 4718-4722.  
[16] KIM J, SMITH J J, TIAN L, et al. The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50(3):463-479.  
[17] FIORE A, DALL'OSTO L, CAZZANIGA S, et al. A quadruple mutant of *Arabidopsis* reveals a  $\beta$ -carotene hydroxylation activity for LUT1/CYP97C1 and a regulatory role of xanthophylls on determination of the PSI/PSII ratio [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 1471-1486.  
[18] 李大婧,刘春泉. 万寿菊叶黄素的提取及分析方法研究进展[J]. 食品科学,2005,26(9):582-586.  
[19] 朱海霞,郑建仙. 叶黄素(Lutein)的结构、分布、物化性质及生理功能[J]. 中国食品添加剂,2005(5):48-55.  
[20] YAMAMIZO C, KISHIMOTO S, OHMIYA A, et al. Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(3):709-719.

(责任编辑 闫杏丽)