

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.11.017

万寿菊八氢番茄红素合成酶基因的克隆与表达分析

邱雅琼, 张恩启, 卢熠灿, 田彬, 鲁传富, 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:八氢番茄红素合成酶(PSY)是植物类胡萝卜素生物合成途径中的主要限速酶,催化番茄红素的合成。万寿菊(*Tagetes erecta* L.)花中富含类胡萝卜素,提示其合成途径催化酶基因可能具有较高活性。文章利用转录组数据克隆获得编码万寿菊PSY的基因 *TePSY*,连接于克隆载体 pEASY-Blunt。测序结果显示, *TePSY* 全长读码框为 1 272 bp,编码相对分子质量约 48 kDa 的亲水性蛋白;进化分析表明, *PSY* 基因在植物中保守存在, *TePSY* 与同科植物向日葵同源基因相似性最高;实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)显示, *TePSY* 在万寿菊花组织中表达,丰度先升高,至成熟时降低。将 *TePSY* 用于构建植物表达载体 pBTEX-*TePSY*,进一步利用农杆菌介导法在烟草叶片中瞬时表达,并进行蛋白印迹(western blot, WB)检测,结果表明,在植物体内表达预期大小 *TePSY* 蛋白产物,可用于后续 *TePSY* 功能分析。

关键词:万寿菊;八氢番茄红素合成酶(PSY);基因克隆;表达分析;蛋白印迹(WB)

中图分类号:Q943.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2024)11-1547-06

Cloning and expression analysis of phytoene synthase gene in *Tagetes erecta* L.

QIU Yaqiong, ZHANG Enqi, LU Yican, TIAN Bin, LU Chuanfu, NIU Xiangli

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Phytoene synthase(PSY) is the rate-limiting enzyme in the carotenoid biosynthetic pathway of plants, catalyzing the biosynthesis of lycopene. Marigold(*Tagetes erecta* L.) is rich in carotenoids in its flowers to imply possible high activity of the related catalase genes in biosynthesis pathway. In this paper, *TePSY*, a gene encoding for PSY of marigold, was cloned based on the transcriptomic data and ligated into the cloning vector pEASY-Blunt. The sequencing results showed that *TePSY* has a full-length frame of 1 272 bp for a hydrophilic protein with a relative molecular mass of 48 kDa. Evolutionary analysis suggested that *PSY* gene is conserved in plants, and *TePSY* has the highest similarity to the homologous gene from the same family plant of sunflower. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction(PCR) indicated the expression of *TePSY* in marigold flowers, the abundance increases with flower development and decreases at maturity. *TePSY* was furtherly used for plant expression vector pBTEX-*TePSY* construction and *Agrobacterium*-mediated transient expression in tobacco leaves and then subjected to western blot(WB). The results showed the expected protein product of *TePSY* expressed in plant system for further functional analysis of marigold *TePSY*.

Key words: marigold(*Tagetes erecta* L.); phytoene synthase(PSY); gene cloning; expression analysis; western blot(WB)

万寿菊(*Tagetes erecta* L.)是一种菊科属草本植物,原产于墨西哥和危地马拉,因其艳丽的花

色作为一种园林观赏植物被广泛种植^[1]。万寿菊花中含有较高类胡萝卜素而呈现橙黄至橘红色,

收稿日期:2022-05-13;修回日期:2022-06-22

基金项目:安徽省科技创新平台重大科技资助项目(202305a12020030);合肥工业大学产学研校企合作资助项目(W2022JSKF0793; W2023JSKF1185)

作者简介:邱雅琼(1998—),女,安徽宿州人,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。

可用于天然色素的提取^[2]。在自然界中,类胡萝卜素是广泛分布的植物色素之一^[3],为花或果实提供多样的颜色,可诱导授粉、传播动物行为。同时,类胡萝卜素也是植物和人体不可或缺的重要功能成分。在植物中,类胡萝卜素作为光合作用的辅助色素,保护植物免受光氧化损伤,并作为植物激素脱落酸合成的重要前体物质^[4];在人体中,类胡萝卜素为维生素 A 生物合成提供前体,并作为抗氧化剂降低年龄相关黄斑变性、癌症、心血管疾病和其他慢性疾病的风险^[5]。

在高等植物中,类胡萝卜素合成的前体牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP)来自于质体中的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4 磷酸途径^[6]。类胡萝卜素生物合成的第 1 步是在八氢番茄红素合成酶(PSY)催化下缩合 2 个 GGPP 分子生成无色的 15-顺式八氢番茄红素,PSY 也成为这一合成途径的主要限速酶^[7]。无色八氢番茄红素通过八氢番茄红素脱氢酶、 ζ -胡萝卜素异构酶和 ζ -胡萝卜素去饱和酶,形成 7,7',9,9'-番茄红素,再经过异构酶催化合成全反式番茄红素^[8-9]。PSY 的丰度可以直接影响植物体内类胡萝卜素的合成,其表达受到上、下游基因的调控^[10],如牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶是类胡萝卜素合成最直接前体 GGPP 的催化酶,它的缺失直接阻断下游 PSY 的合成^[11];PSY 基因沉默后植株叶片出现漂白,也反馈调节使 PSY 基因表达受到抑制^[12]。

PSY 通常以数个成员组成的基因家族的形式存在于多数植物中,并呈现不同程度的组织特异性表达^[4]。PSY 基因参与植物果实、叶片和根部类胡萝卜素的生物合成^[13]。在番茄中,PSY 负责果实和叶片类胡萝卜素的生物合成^[14];在小麦中,PSY 参与光合作用保护绿色组织免受光氧化降解,并与根部类胡萝卜素的诱导合成有关^[15];在拟南芥中,PSY 催化根部类胡萝卜素的形成^[16]。虽然研究认为拟南芥只含有 1 个 PSY 基因,但在其他植物中的 PSY 基因有 2~3 个家族成员^[17-18]。对于富含类胡萝卜素的万寿菊,PSY 是由多拷贝组成的基因家族,甚至万寿菊类胡萝卜素合成途径中多个催化酶基因可能均存在基因扩增,这也是其合成积累高色素的一个推测原因^[19]。鉴于 PSY 基因在该次生代谢途径的重要性,本文对其中一个转录组差异表达的 PSY 基因(命名为 *TePSY*)进行克隆分离,获得全长编码序列,并对 *TePSY* 进行生物信息学、表达模式分析,为后续相关遗传转化功能检测提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 植物材料

万寿菊(*Tagetes erecta* L.)‘Juwang’(橙色花)品种、烟草(*Nicotiana benthamiana*)种植于合肥工业大学植物培养室。

1.1.2 试剂

TRIzol 购于 Invitrogen 公司;反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)试剂盒、TransStart® FastPfu DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、dNTPs 均购于北京全式金生物技术有限公司;DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒均购于天根生化科技有限公司;FLAG 标签小鼠单克隆抗体购于美国 Sigma 公司;PageRuler Plus Prestained Protein Ladder、western blot ECL Substrate 均购于美国 Thermo Scientific 公司;其他试剂均为国外原装或国产分析纯。pEASY-Blunt 克隆载体购于北京全式金生物技术有限公司;植物表达载体 pBTEX(带有 FLAG 蛋白标签)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV2260 均由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 提取与反转录

取万寿菊花组织样品液氮研磨,以 TRIzol 提取法提取总 RNA,并利用 Nanodrop 2000 微量分光光度计检测质量浓度和纯度;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,存放于 -20 °C。

1.2.2 *TePSY* 基因克隆测序

依据转录组分析得到的 *TePSY* 基因组序列,利用 Primer Premier 软件在非翻译区设计巢式 PCR 引物,具体如下。

PSYF1:ACTAGCATAATCTTTATTGACAGCA;

PSYR1:TATTGACCATTCTCATCATCTAAAC;

PSYF2:GGGTACCCTTTTTTCATATCAAGAACCAAC;

PSYR2:GCGTCGACGTTTGAAACTAAGTTTCTTGATG。

以上 4 种引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以反转录 cDNA 为模板进行 *TePSY* 基因扩增,然后利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。扩增产物纯化后与 pEASY-Blunt 载体连接,连接产物转入大肠杆菌感受态细胞,在含有 50 mg/L 卡那霉素的培养基中筛选。对所生长单克隆以载体通用引物 M13F(GTTGTAAA

ACGACGGCCAG)、M13R(CAGGAAACAGCTATGAC)进行菌落 PCR 鉴定,将阳性克隆菌进行测序,并比对测序结果。

1.2.3 *TePSY* 生物信息学分析

本文利用蛋白分析平台(ExPASy, <https://www.expasy.org/>)分析 *TePSY* 基因编码蛋白的理化性质;利用同源建模方法(SWISS-MODEL)预测 *TePSY* 蛋白三维结构;利用 MEGA7.0 软件将克隆获得的 *TePSY* 基因序列与美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中已登录的植物同源基因进行比对,采用邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树进行分析。

1.2.4 *TePSY* 基因表达量分析

万寿菊幼苗生长至株高 12~18 cm、叶片 3~4 对时进行移栽,生长至约 70 d 进入花期。由于花期较长,同一植株上有处于不同发育时期的花组织。以直径 5 mm 花蕾开始定为 DP0,取随后第 6、15、21 天的万寿菊花组织,分别记为 DP6、DP15、DP21。取不同发育时期万寿菊花和叶(L)组织样品,进行 RNA 提取、反转录。以 cDNA 为模板, *TeTIF6* 作为内参基因^[19],利用定量 PCR 对 *TePSY* 表达水平进行检测。 *TeTIF6* 内参定量引物序列为 TIF6F: TAAGACCTGGTGGTG GAAATAGA、TIF6R: CAGCACCATGAGGAC GAAGA; *TePSY* 定量引物序列为 qPSYF: GCTTTAGGCATTGCTAATCAACTC、qPSYR: CAAATATGTCTTCATCCGACAATC。每个反应均设 3 次重复,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目的基因表达水平定量分析。

1.2.5 pBTEX-*TePSY* 载体的构建

将连接 *TePSY* 基因的 pEASY-Blunt 载体以 *Kpn* I、*Sal* I 双酶切、回收纯化,与同样双酶切的 pBTEX 表达载体进行连接。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,以含有卡那霉素的培养基进行筛选。随后挑取单克隆以引物 PSYF2、PSYR2 进行菌落 PCR、酶切鉴定,将阳性菌落测序验证。以测序正确的阳性克隆提取质粒,转化农杆菌株 GV2260。筛选鉴定农杆菌阳性克隆,并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.6 *TePSY* 蛋白在烟草叶片中的表达

将转入植物表达载体 pBTEX-*TePSY* 的农杆菌活化,挑取单克隆于含有卡那霉素和利福平的液体培养基, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 12 h。吸取 $300\text{ }\mu\text{L}$ 菌液于 2.7 mL 培养液中,培养 6~8 h,再将菌液

离心,加入 3 mL 诱导液(AB 盐、IM 培养液、200 mmol/L 乙酰丁香酮、25 mg/mL 卡那霉素),重悬后培养 12 h。暗处静置 10 min,吸取上清离心,以 3 mL 现配缓冲液(50 mmol/L 2-吗啉乙磺酸、200 mmol/L 乙酰丁香酮)重悬菌液,测定 A_{600} 值为 0.5~1.0。取一次性无针头注射器,吸取农杆菌菌液注入生长约 5 周的烟草上部叶片中,避光处理 4 h,然后置于光照下 48 h,使外源 *TePSY* 基因利用烟草叶片体系进行瞬时表达。

液氮研磨上述烟草叶片样品,取约 200 mg 加入 200 μL 蛋白裂解液(50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、150 mmol/L 氯化钠、5 mmol/L 乙二胺四乙酸、10% 甘油、1% 聚乙烯吡咯烷酮、20 $\mu\text{mol/L}$ 二硫苏糖醇、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟),充分涡旋后放置于冰上 10 min, $12\text{ }000\text{ r/min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。吸取上清,加入上样缓冲液, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,进行 PAGE 电泳(100 V, 1.5 h)、转膜(250 mA, 1 h)。转膜后以 5% 脱脂奶粉为封闭液室温封闭 1 h,然后以 anti-FLAG 小鼠单克隆抗体室温孵育 1 h,以 TBST 缓冲液(250 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、1.34 mol/L 氯化钠、27 mmol/L 氯化钾、0.1% 吐温 20)每次 10 min 洗膜 3 次,加入 western blot ECL Substrate,利用化学发光仪对 *TePSY* 蛋白在植物体内表达情况进行检测。

2 结果分析

2.1 *TePSY* 基因的克隆

2.1.1 目的基因 *TePSY* 的扩增

以万寿菊花组织反转录得到的 cDNA 为模板,设计 *TePSY* 特异引物进行巢式 PCR,对扩增产物进行 PAGE 电泳,结果如图 1 所示。图 1 中,1、2 代表 *TePSY* 基因扩增产物。

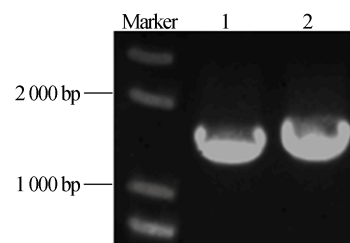


图 1 *TePSY* 基因 PCR 扩增产物的 PAGE 电泳图

图 1 呈现清晰的特异性条带,条带大小与预期序列长度(1 301 bp)基本一致,无其他明显非特异扩增产物。

2.1.2 *TePSY* 连接 pEASY-Blunt 克隆载体

将 *TePSY* 扩增产物与克隆载体 pEASY-

Blunt 连接,并转化大肠杆菌感受态细胞。将所生长单克隆以载体通用引物 M13F、M13R 进行菌落 PCR 鉴定,结果如图 2 所示。图 2 中:1~4 代表单克隆编号;-为负对照;+为正对照。将阳性单克隆菌液进行测序,对比结果显示获得了 *TePSY* 基因全长编码序列,与转录组组装序列相比,在编码区中间部分有少量差异,这也进一步说明虽然可以通过转录组测序算法拼接获得基因序列信息,但全长基因的实际克隆与验证是必需的。

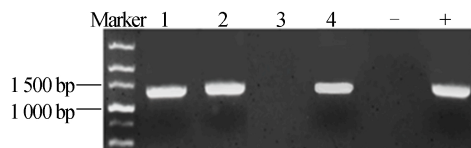


图 2 *TePSY* 连接 pEASY-Blunt 载体菌落 PCR 鉴定

2.2 *TePSY* 基因生物信息学分析结果

通过蛋白分析平台对 *TePSY* 编码蛋白的理化性质进行分析。结果显示, *TePSY* 共编码 423 个氨基酸,相对分子质量为 47 796.84;理论等电点为 7.97;不稳定系数为 45.87,属于不稳定蛋白;亲水性平均值为 -0.272,属于亲水性蛋白。通过同源建模方法进一步对 *TePSY* 的氨基酸序列建模,预测其蛋白三维结构,如图 3 所示。图 3 中,红色方框内为 2 个镁离子配体。

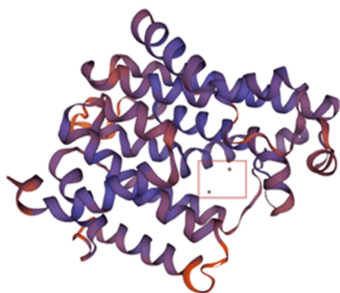


图 3 *TePSY* 蛋白三维结构预测

将 *TePSY* 与 NCBI 数据库中其他植物同源基因进行比对,构建系统进化树,如图 4 所示。图 4 中:*TePSY* 为万寿菊 (*Tagetes erecta*) *PSY* 基因; *HaPSY* 为向日葵 (*Helianthus annuus*, AJ308385.1) *PSY* 基因; *LsPSY* 为莴苣 (*Lactuca sativa*, KM398074.1) *PSY* 基因; *CmPSY* 为菊花 (*Chrysanthemum morifolium*, AB205050.1) *PSY* 基因; *CbPSY* 为甘菊 (*Chrysanthemum boreale*, KC202434.1) *PSY* 基因; *SmPSY* 为水飞蓟 (*Silybum marianum*, MW768909.1) *PSY* 基因;

BnPSY 为欧洲油菜 (*Brassica napus*, NM-001315972.1) *PSY* 基因; *CcPSY* 为水盾草 (*Cacombia caroliniana*, KM398083.1) *PSY* 基因; *CaPSY2* 为番红花 (*Crocus ancyrensis*, KT737476.1) *PSY* 基因; *ElPSY* 为刺桐 (*Erythranthe lewisii*, KR053166.1) *PSY* 基因; *CsPSY* 为黄瓜 (*Cucumis sativus*, GQ203104.1) *PSY* 基因; *FtPSY* 为苦荞麦 (*Fagopyrum tataricum*, KC571227.1) *PSY* 基因; *CdPSY* 为金鱼藻 (*Ceratophyllum demersum*, KM398050.1) *PSY* 基因; *VvPSY1* 为葡萄 (*Vitis vinifera*, JQ319634.1) *PSY* 基因; *DkPSY* 为柿子 (*Diospyros kaki*, FJ594485.1) *PSY* 基因; *VmPSY* 为欧洲越橘 (*Vaccinium myrtillus*, KR706538.1) *PSY* 基因; *RmPSY* 为羊躑躅 (*Rhododendron molle*, KX230461.1) *PSY* 基因; *RjPSY* 为日本杜鹃 (*Rhododendron japonicum*, LC021368.1) *PSY* 基因; *LaPSY* 为丝瓜 (*Luffa aegyptiaca*, KX092450.1) *PSY* 基因; *SePSY* 为海芦笋 (*Salicornia europaea*, AY789515.1) *PSY* 基因。结果表明, *TePSY* 与向日葵同源基因相似性最高,与丝瓜和海芦笋的同源基因相似最低。

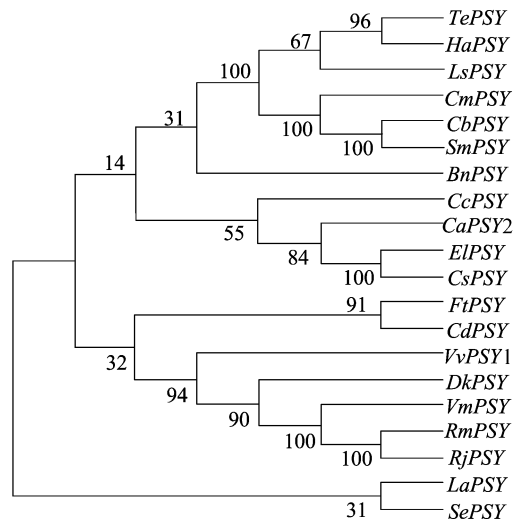


图 4 不同植物 *PSY* 基因系统进化分析

2.3 *TePSY* 基因在万寿菊花组织中的表达分析

万寿菊生长周期短,但花期相对较长,可持续约 120 d,每株可收获数十朵成熟花。栽培品种 ‘Juwang’ 在播种约 70 d 后进入开花期,对其不同发育时期花组织 (DP6、DP15、DP21) 和叶 (L) 中 *TePSY* 基因的表达水平进行定量 PCR 检测,结果如图 5 所示。图 5 中,不同字母表示有显著差

异($P < 0.05$)。

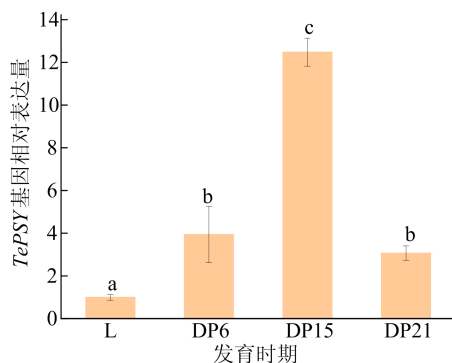


图 5 不同发育时期花中 *TePSY* 相对表达量

由图 5 可知,与叶片相比,*TePSY* 在花的不同发育时期表达均有升高,随花的成熟,*TePSY* 表达水平先升高后降低,在 DP15 时期达到最高。

2.4 *TePSY* 植物表达载体构建

利用已转入 *TePSY* 基因克隆载体的测序菌液提取质粒,以 *Kpn* I 和 *Sal* I 进行质粒双酶切、T4 连接酶连接 *TePSY* 目的片段与 pBTEX 植物表达载体,然后转化大肠杆菌感受态细胞。通过筛选培养、单克隆菌落 PCR 鉴定,获得可能转入 pBTEX-*TePSY* 连接载体的阳性克隆。进一步对阳性克隆进行质粒提取、酶切鉴定,结果如图 6 所示。图 6 中:M 代表 DNA Marker;1、2 代表阳性克隆的质粒酶切产物。图 6 结果为与 *TePSY* 预期大小相同目的片段,初步表明 *TePSY* 已连接于 pBTEX 载体上。最后通过阳性克隆质粒测序,确认 pBTEX-*TePSY* 构建完成,*TePSY* 编码序列已连接于植物表达载体,无序列突变、移码等。

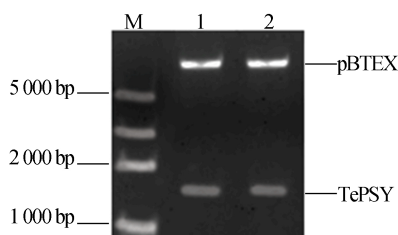


图 6 pBTEX-*TePSY* 植物表达载体酶切鉴定

2.5 *TePSY* 蛋白在烟草叶片中的表达

将注射菌液通过农杆菌介导进行瞬时表达的烟草叶片取样,液氮研磨,提取蛋白进行蛋白印迹(western blot, WB)分析,结果如图 7 所示。图 7 中:1 代表注射 pBTEX 载体的对照样品;2 代表 pBTEX-*TePSY* 表达产物。由于在 pBTEX 载体

中 *TePSY* 编码蛋白与 FLAG 标签融合,所表达蛋白可与 α -FLAG 抗体结合,显示与预期大小基本一致的单一一条带蛋白产物,而注射空白载体的对照样品则无相应条带。结果表明,所构建 *TePSY* 表达载体可在植物体内进行表达,用于后续的 *TePSY* 功能分析。

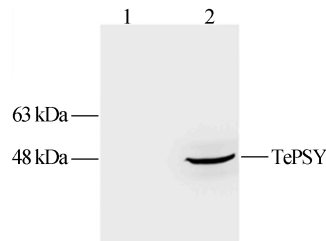


图 7 蛋白印迹检测 *TePSY* 在烟草中的表达

3 讨 论

万寿菊是世界各地广泛栽培的园艺植物,含有丰富的类胡萝卜素,其类胡萝卜素成分和含量的差异形成了绚丽多彩的花色,并通过色素提取使这种天然活性成分在食品和制药等行业得以广泛应用^[20]。高等植物中,类胡萝卜素是在质体中通过类异戊二烯途径合成的^[21],是一大类具有多萜类骨架的次生代谢物质,根据结构差异可分为胡萝卜素族和叶黄素族,其中番茄红素是合成这两族的共同前体^[22]。而催化八氢番茄红素合成的八氢番茄红素合成酶 *PSY* 成为这一生物合成途径的关键酶之一^[23]。在进化中多种植物也形成了多个成员的 *PSY* 基因家族,各家族成员表现不同的组织特异性,实现特定组织中类胡萝卜素的合成与功能^[24]。作为影响类胡萝卜素积累的限速酶,*PSY* 也成为对生物合成途径进行遗传操作的重要靶酶和植物色素遗传改良的目的基因^[25]。

本研究以高色素含量万寿菊品种‘Juwang’为实验材料,利用巢式 PCR 对 *TePSY* 基因进行克隆,获得了该基因全长编码序列,并对其进行初步的生物信息学分析。通过定量检测显示,*TePSY* 在万寿菊花的各发育阶段表达,在 DP15 时期表达量最高,是叶片的约 12 倍。本文万寿菊 *TePSY* 表达趋势与黄秋葵花中的同源基因^[26] 相似。为进一步验证 *TePSY* 编码序列在植物体内的翻译,通过植物表达载体构建,利用瞬时表达体系和 western blot 方法,检测了 *TePSY* 蛋白在植物体内的表达。因此,本研究通过 *TePSY* 基因

克隆与表达分析,为后续 *TePSY* 基因功能探讨和植物色素遗传改良提供了基因资源和研究基础。

[参 考 文 献]

- [1] ZHANG Z C, HU S H, PENG Y Q, et al. The complete chloroplast genome of Mexican marigold (*Tagetes erecta* L. Asteraceae)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2019, 4(2): 3587-3588.
- [2] 曾水玉. 万寿菊试管开花及其分子机制的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [3] GUPTA P, RODRIGUEZ-FRANCO M, BODANAPU R, et al. *Phytoene synthase 2* in tomato fruits remains functional and contributes to abscisic acid formation[J]. Plant Science, 2022, 316: 111177.
- [4] CAZZONELLI C I, POGSON B J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 266-274.
- [5] YAZDANI M, SUN Z X, HUI Y, et al. Ectopic expression of ORANGE promotes carotenoid accumulation and fruit development in tomato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(1): 33-49.
- [6] FRASER P D, ROMER S, SHIPTON C A, et al. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(2): 1092-1097.
- [7] SATHASIVAM R, RADHAKRISHNAN R, KIM J K, et al. An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants[J]. South African Journal of Botany, 2020, 140: 290-302.
- [8] KACHANOVSKY D E, FILLER S, ISAACSON T, et al. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of *phytoene synthase 1* expression by *cis*-carotenoids[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(46): 19021-19026.
- [9] CHAVARRIAGA-AGUIRRE P, PRIAS M, LÓPEZ D, et al. Molecular analysis of the expression of a *crtB* transgene and the endogenous *psy2-y1* and *psy2-y2* genes of cassava and their effect on root carotenoid content[J]. Transgenic Research, 2017, 26: 639-651.
- [10] 李正风, 王燃, 王庆东, 等. 植物八氢番茄红素合成酶基因研究进展[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2021, 51(2): 169-175.
- [11] 贾翠翠. 枸杞 *LcGGPS* 和 *LcGS* 基因的克隆及抗逆功能分析[D]. 天津: 天津大学, 2015.
- [12] RAMARAJ S, JANG-SEU K. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries[J]. Marine Drugs, 2018, 16(1): 1856-1865.
- [13] HARTWIG S, FRISTER T, ALEMDAR S, et al. Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2014, 97: 61-71.
- [14] MOEHS C P, TIAN L, OSTERYOUNG K W, et al. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 45: 281-293.
- [15] DIBARI B, MURAT F, CHOSSON A, et al. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 221-234.
- [16] LATARI K, WUST F, HUBNER M, et al. Tissue-specific apocarotenoid glycosylation contributes to carotenoid homeostasis in Arabidopsis leaves [J]. Plant Physiology, 2015, 168(4): 1550-1562.
- [17] CAO H B, LUO H M, YUAN H, et al. A neighboring aromatic-aromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato Phytoene synthases [J]. Plant Physiology, 2019, 180(4): 1988-2003.
- [18] 李宁, 王柏柯, 杨生保, 等. 21 种植物八氢番茄红素合成酶的生物信息学分析[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(12): 2157-2165.
- [19] 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.
- [20] BURLEC A F, PECIO L, KOZACHOK S, et al. Phytochemical profile, antioxidant activity, and cytotoxicity assessment of *Tagetes erecta* flowers[J]. Molecules, 2021, 26(5): 1201-1215.
- [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[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 349-357.
- [22] LI F Q, VALLABHANENI R, WURTZEL E T. *PSY3*, a new member of the Phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis [J]. Plant Physiology, 2008, 146(3): 1333-1345.
- [23] 李春季, 李炳学, 韩晓日. 八氢番茄红素脱氢酶的研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(11): 1680-1690.
- [24] AMPOMAH-DWAMENA C, DRIEDONKS N, LEWIS D, et al. The Phytoene synthase gene family of apple (*Malus x domestica*) and its role in controlling fruit carotenoid content[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 185-198.
- [25] 姜娜娜, 李长生, 王锋辉, 等. 番茄类胡萝卜素的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 10979-10980.
- [26] 李永平, 陈敏氢, 朱海生, 等. 黄秋葵八氢番茄红素合成酶 *PSY* 基因的克隆与分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(10): 1938-1947.

(责任编辑 闫杏丽)