

# 鹤望兰番茄红素 $\beta$ -环化酶基因*SrLCYB*的克隆及表达分析

樊荣辉<sup>1,2,3</sup> 黄敏玲<sup>1,2,3\*</sup> 钟淮钦<sup>1,2,3</sup> 林 兵<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; <sup>2</sup>福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

<sup>3</sup>福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

**摘要** 采用RACE方法从鹤望兰(*Strelitzia reginae* Banks)黄色花萼中克隆到1个LCYB基因(lycopene beta-cyclase, *SrLCYB*)。其cDNA全长为1 908 bp(GenBank收录号: KT428725), 具有完整的开放阅读框(open reading frame, ORF), 共1 515个碱基, 编码504个氨基酸。鹤望兰*SrLCYB*的氨基酸序列与其他物种都有一定的同源性, 其中与百合的LCYB同源性最高, 达到82%。系统进化树分析显示, 鹤望兰*SrLCYB*与芭蕉蛋白亲缘关系较近。应用荧光定量PCR分析表明, *SrLCYB*在黄色花萼中高表达, 且在花发育的始花期和盛花期表达量最高。应用UPLC(ultra performance liquid chromatography)对 $\beta$ -胡萝卜素含量进行分析, 类 $\beta$ -胡萝卜素在黄色花萼中含量最高, 且在花发育的盛花期含量最高。结果表明, *SrLCYB*基因表达与 $\beta$ -胡萝卜素含量成正相关。

**关键词** 鹤望兰; 番茄红素 $\beta$ -环化酶; 类胡萝卜素生物合成; 基因克隆; UPLC

## Cloning and Expression Analysis of a Lycopene Beta-cyclase Gene in *Strelitzia reginae* Banks

Fan Ronghui<sup>1,2,3</sup>, Huang Minling<sup>1,2,3\*</sup>, Zhong Huaiqin<sup>1,2,3</sup>, Lin Bing<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China; <sup>2</sup>Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China; <sup>3</sup>Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

**Abstract** In this study, the full-length cDNA sequence of *LCYB* (lycopene beta-cyclase) gene (*SrLCYB*) was cloned from yellow sepals of *Strelitzia reginae* Banks using RACE techniques. The cDNA sequence was 1 908 bp in total length and included a whole open reading frame of 1 515 bp, encoding a polypeptide containing 504 amino acids. Its amino acid sequence was highly conserved compared with other *LCYB* homologues and shared up to 82% homology with *LCYB* from *Lilium lancifolium*. Phylogenetic analysis indicated that *SrLCYB* was more related to *LCYB* from *Musa* spp. AAB Group. The result from fluorescent quantitative PCR analysis indicated that *SrLCYB* was highly expressed in early flowering period and blooming period, the transcript level was highest in yellow sepals. The result

收稿日期: 2015-12-03 接受日期: 2016-02-03

福建省科技重大专项(批准号: 2012NZ0002)、花卉育种科技创新团队(批准号: CXTD-2-17)、福建省自然科学基金(批准号: 2014J01113)、福建省省属公益类科研院所专项(批准号: 2015R1026-2)、福建农科院导师制青年人才创新基金(批准号: 2014QB-17)和福建农科院作物所青年开放基金(批准号: 2015QN-6)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-87586106, E-mail: huangml618@163.com

Received: December 3, 2015 Accepted: February 3, 2016

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Fujian Province (Grant No.2012NZ0002), Team of Technology Innovation by Flower Breeding (Grant No.CXTD2011), the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2014J01113), the Special Project of Provincial Public Research Institutes in Fujian Province (Grant No.2015R1026-2), the Tutorial Young Talents Innovation Fund from Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.2014QB-17) and Youth Open Fund of Crops Research Institute from Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.2014QN-6)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-87586106, E-mail: huangml618@163.com

网络出版时间: 2016-04-07 14:39:08 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160407.1439.002.html>

from UPLC analysis indicated that beta-carotene contents were the highest in yellow sepals and in blooming period. These results suggested that the change in *SrLCYB* in expression levels was positively related to beta-carotene contents.

**Keywords** *Strelitzia reginae* Banks; Lycopene  $\beta$ -cyclase; carotenoid biosynthesis; gene cloning; UPLC

鹤望兰(*Strelitzia reginae* Banks)又称天堂鸟,为旅人蕉科鹤望兰属多年生观赏植物,原产南非。因其姿态奇特、花期长久,素有“鲜切花之王”的美誉,被作为高档切花材料而广泛用于各类插花。

类胡萝卜素(carotenoid)是通过异戊二烯途径合成而呈现黄色、橙色或红色的一类化合物<sup>[1-2]</sup>。研究表明,水仙、文心兰、百合、鸢尾等花卉的橙黄色花主要由类胡萝卜素生物合成途径控制<sup>[3-6]</sup>。在黄花龙胆、金盏菊等以类胡萝卜素为主要色素种类的植物中,番茄红素 $\beta$ -环化酶(lycopene beta-cyclase, *LCYB*)与八氢番茄红素脱氢酶基因(phytoene desaturase, *PDS*)、 $\zeta$ -胡萝卜素脱氢酶基因( $\zeta$ -carotene desaturase, *ZDS*)等基因协调作用,在转录水平上调节花中类胡萝卜素的积累<sup>[7]</sup>。Tinoi等<sup>[8]</sup>报道,与鹤望兰同属于姜目的美人蕉黄色花的主要发色团为类胡萝卜素,但在鹤望兰中未见相关报道。本研究首次克隆了*SrLCYB*基因全长,并应用荧光定量PCR对*SrLCYB*基因的表达进行了分析,这为研究*SrLCYB*分子调控机制奠定基础,对揭示*SrLCYB*基因在鹤望兰花色形成中的作用具有重要的理论意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

以福建省农科院花卉研究中心种质资源圃栽培的鹤望兰品种为供试材料,实验在福建省农业科学院观赏园艺创新团队实验室完成。不同组织(蓝色花瓣、黄色花萼、叶、茎、根)及各发育时期的花(花蕾前期、花蕾中期、花蕾后期、始花期、盛花期)均采自8年龄的鹤望兰,液氮速冻后,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存,用于表达分析研究。

### 1.2 总RNA提取及cDNA合成

取上述存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的样品,按通用植物总RNA快速提取试剂盒说明书(百泰克生物技术有限公司)分别提取总RNA,用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测RNA的完整性。使用M-MLV反转录酶进行逆转录,按照TaKaRa公司产品说明书进行操作。

### 1.3 *SrLCYB*基因序列的克隆

根据GenBank上发表的百合(*Lilium lancifolium*)、宫灯百合(*Sandersonia aurantiaca*)、番红花(*Crocus sativus*)、水仙(*Narcissus tazetta*)的*LCYB*保守氨基酸序列和核苷酸序列,通过Primer Premier 5软件设计简并引物LCYB-F和LCYB-R(表1),以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应条件为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, 35个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段并连接到载体pMD18-T(大连宝生物工程有限公司),转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ (本实验室保存),通过蓝白斑筛选及PCR扩增鉴定阳性克隆后进行测序[生工生物工程(上海)股份有限公司],得到*SrLCYB*中间片段。

按逆转录酶说明书,通过AP引物和PrimeScript逆转录酶(大连宝生物工程有限公司)合成cDNA第一链。应用通用引物AUAP和特异引物LCYB-3'进行5'RACE扩增。

逆转录产物用RNase H处理,将纯化的cDNA加尾后,用PCR产物纯化试剂盒纯化。以加尾产物1  $\mu\text{L}$ 为模板,用包含多聚dC尾巴序列的AAP引物和5'RACE特异引物LCYB-5'-1进行第1轮扩增。以稀释40倍的第1轮PCR产物1  $\mu\text{L}$ 为模板,用巢式基因特异引物AUAP和5'RACE特异引物LCYB-5'-2继续进行第2轮扩增。

根据获得的*SrLCYB*基因cDNA全长,设计ORF引物*SrLCYB*-F和*SrLCYB*-R,进行*LCYB* cDNA ORF克隆,验证已获得的序列。

### 1.4 生物信息学分析

用NCBI的ORF Finder对*SrLCYB*的cDNA序列开放阅读框进行查找;利用NCBI网站的BLAST程序搜索相似性序列;通过BioXM预测该蛋白质的分子量和等电点;使用Clustal X 1.81软件进行多重序列比对;采用MEGA 4.0进行系统进化树构建。

### 1.5 实时荧光定量分析

根据*SrLCYB*全长序列,设计一对引物P1和P2(表1),其扩增长度为244 bp,以鹤望兰表达相对稳

表1 鹤望兰*SrLCYB*基因克隆及表达分析所用引物

引物名称	引物序列	作用
Primer name	Primer sequence	Function
AP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T) <sub>17</sub> -3'	Reverse transcription primer
AAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(G) <sub>8</sub> -3'	Anchored primer
AUAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'	
LCYB-F	5'-AA(C/T)AA(T/C)TATG G(A/T)G T(C/T)T GGG T-3'	For the conserved fragment
LCYB-R	5'-CCA TGC CA(A/G)TA(A/C)CGA GGT TC-3'	
LCYB-3'	5'-CTT CCT TAG TCG CTC GTC CAG G-3'	3'RACE
LCYB-5'-1	5'-GCT ATT TCT CTC TTT CAA CTC CG-3'	5'RACE
LCYB-5'-2	5'-CAG GAT TGT AAG GCT TAT CGT AC-3'	
SrLCYB-F	5'-ATG GAT ACC ATG CTT AGA ACT C-3'	For the cDNA of ORF
SrLCYB-R	5'-CTA ACT TTT CTC CCG TAG CAA G-3'	
P1	5'-AAA GGG TCG TGG GAA TAG GA-3'	For the expression of <i>SrLCYB</i>
P2	5'-AAG TCG AGT TTA AGCA GGA TA-3'	
18S-F	5'-CTG AGA AAC GGC TAC CAC AT-3'	For the internal control
18S-R	5'-ACC CAA GGT CCA ACT ACG AG-3'	

定的18S rRNA(GenBank登录号: AF069229.1)为内参,设计引物18S-F和18S-R,扩增长度为250 bp。按照Power SYBR Green PCR Master Mix(ABI公司,美国)说明书在ABI7500实时定量PCR仪上进行PCR反应。反应体系为: 12.5  $\mu$ L Power SYBR Green PCR Master Mix, 1  $\mu$ L cDNA, 正、反向引物各0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L), 补蒸馏水至总体积25  $\mu$ L。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C预变性10 min; 95  $^{\circ}$ C变性15 s, 56  $^{\circ}$ C退火1 min, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min, 共40个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。每个反应3个重复, 采用ABI 7500分析软件中Comparative CT( $\Delta\Delta$ CT)法分析试验结果。

### 1.6 类胡萝卜素提取及超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)测定

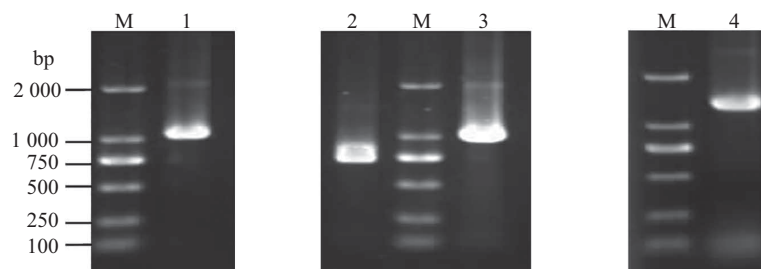
1 g样品用50 mL丙酮:石油醚(1:1)浸提剂于50  $^{\circ}$ C避光浸提3 h, 至残渣发白。用旋转蒸发器于40  $^{\circ}$ C下将浸提液蒸干, 用20 mL的石油醚[含0.1% butylated

hydroxytoluene (BHT)]溶解, 加入20 mL 10% KOH-甲醇溶液, 若有乳化现象, 加入10% NaCl去乳化。收集上层石油醚相, 转至分液漏斗, 用双蒸水反复洗涤石油醚相, 至水相为中性, 加入10 g无水硫酸钠, 过滤, 经旋转蒸发器40  $^{\circ}$ C蒸干, 用丙酮(含0.1% BHT)定容至2 mL。类胡萝卜素的分离和鉴定采用ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7  $\mu$ m)(WATERS公司, 美国), 以乙腈:甲醇=9:1为流动相, 在450 nm下测定。

## 2 结果

### 2.1 *SrLCYB*全长cDNA克隆及序列分析

根据LCYB蛋白质保守序列设计一对简并引物LCYB-F和LCYB-R, 以鹤望兰黄色花萼cDNA为模板进行PCR扩增, 得到一条约1 000 bp的条带(图1), 目的片段经回收测序为986 bp。序列经BLASTp分

M: DNA标准分子量DL2000; 1: *SrLCYB*中间片段扩增产物; 2: 3'RACE扩增产物; 3: 5'RACE扩增产物; 4: ORF。M: DNA marker DL2000; 1: product of *SrLCYB* gene fragment; 2: product of 3'RACE; 3: product of 5'RACE; 4: ORF.图1 鹤望兰*SrLCYB*基因的克隆Fig.1 Cloning of *SrLCYB* gene in *Strelitzia reginae* Banks

析表明, 该片段与多种植物的LCYB基因具有很高的同源性, 初步认定它是鹤望兰LCYB基因的片段。

通过3'RACE和5'RACE分别得到长度为707 bp的3'末端和1 012 bp的5'末端(图1), 与中间序列分别有454 bp和342 bp的重叠区段, 经BLAST检索认为它是鹤望兰LCYB的3'端和5'端序列。将3'RACE序列、中间序列和5'RACE获得的序列进行比对拼接得到一条长度为1 908 bp的cDNA全长序列, 包含完整的开放阅读框1 515 bp, 预测的理论等电点为4.78, 分子量为125.31 kDa, 登录号为KT428725。

2.2 SrLCYB编码氨基酸的同源性分析

将SrLCYB编码的氨基酸序列与GenBank中其他植物LCYB同源蛋白质序列比对, 结果显示, SrLCYB与其他LCYB氨基酸序列具有较高同源性, 并具有多个保守区域(图2)。其中, 与葡萄(CAN69313)的同源性高达83%, 与百合(ADW08476)、水仙(AFH53820)、宫灯百合(AF489520\_1)等序列的同源性也分别达到了82%、80%、80%。推导出的SrLCYB氨基酸序列含有“FLYAIVIP”序列和FAD/NAD(P)结合区。

为了分析SrLCYB与其他LCYB同源蛋白质的系统进化关系, 将其与其他21种植物LCYB同源蛋

白质进行多重序列比对, 并用MEGA 4.0构建了系统发育树。结果显示, SrLCYB与芭蕉LCYB的亲缘关系最近, 其次与宫灯百合LCYB亲缘关系较近(图3)。

2.3 SrLCYB基因的表达分析

以鹤望兰18S rRNA为内参, 用荧光定量PCR技术检测LCYB在鹤望兰花发育阶段及不同组织上的表达分析。结果表明, SrLCYB在鹤望兰始花期后表达量逐渐增加, 到盛花期达到最高(图4)。对不同组织的分析结果表明, SrLCYB在黄色花萼中表达量最高, 叶片次之, 在蓝色花瓣、根、茎表达量最低(图5)。

2.4 类胡萝卜素含量分析

应用超高效液相色谱(UPLC)对鹤望兰不同花发育时期及不同组织进行类胡萝卜素含量测定, 结果显示, β-胡萝卜素是鹤望兰黄色花萼主要发色团(表2)。随着花的发育, β-胡萝卜素含量逐渐升高, 盛花期达到最高(825.80 μg/g FW), 花蕾前期含量最低(0.25 μg/g FW)。在不同组织中, 黄色花萼的β-胡萝卜素总含量最高(854.27 μg/g FW), 其次是叶片(265.37 μg/g FW), 蓝色花瓣中含量最低(0.11 μg/g FW)。α-胡萝卜素只在叶片(191.08 μg/g FW)和茎(39.96 μg/g FW)中表达, 在蓝色花瓣(0.07 μg/g FW)中微量表达。

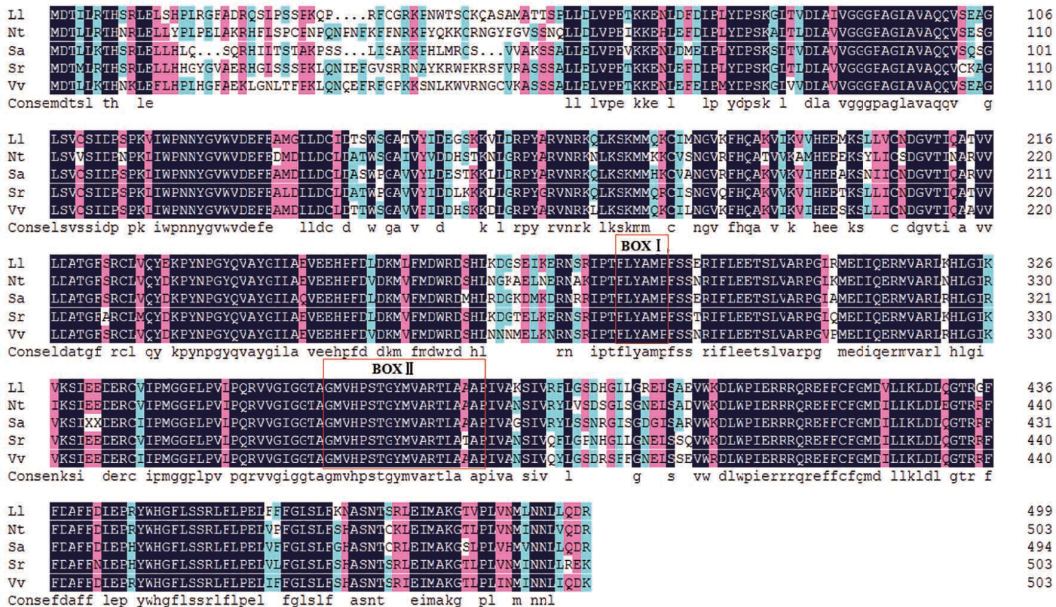


图2 鹤望兰SrLCYB氨基酸同源性分析

Fig.2 Homology analysis of SrLCYB in Strelitzia reginae Banks

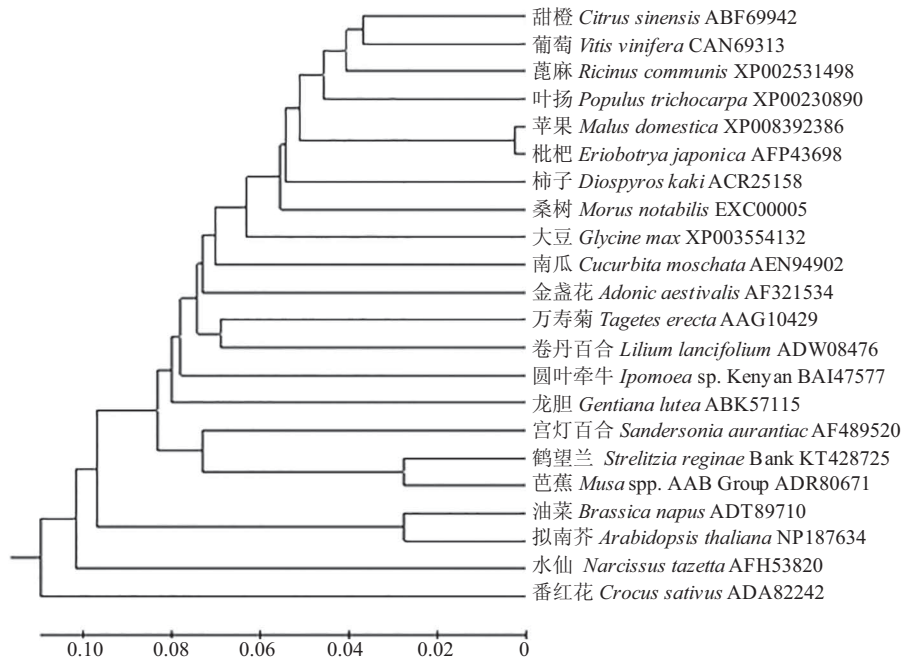
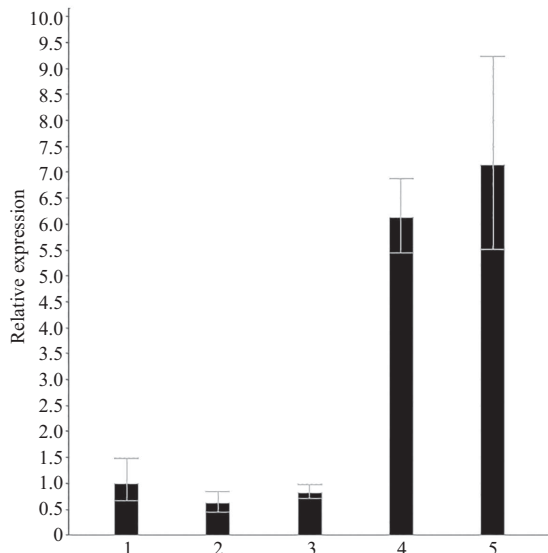


图3 鹤望兰SrLCYB与其他植物21个LCYBs蛋白的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of LCYB in *Strelitzia reginae* Banks with 21 other plant LCYBs

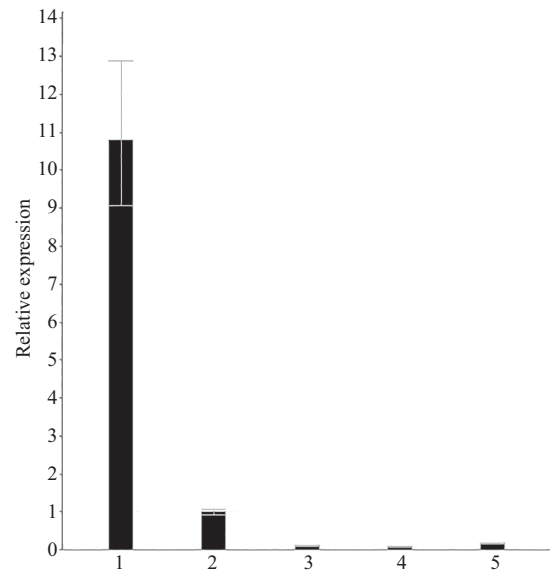


1: 花蕾前期; 2: 花蕾中期; 3: 花蕾后期; 4: 始花期; 5: 盛花期。

1: early bud period; 2: mid-bud period; 3: late-bud period; 4: early flowering period; 5: blooming period.

图4 鹤望兰花发育过程中SrLCYB的表达

Fig.4 Expression of SrLCYB in different flowering development



1: 黄色花萼; 2: 叶片; 3: 茎; 4: 根; 5: 蓝色花瓣。

1: yellow sepals; 2: leaf; 3: stem; 4: root; 5: blue petals.

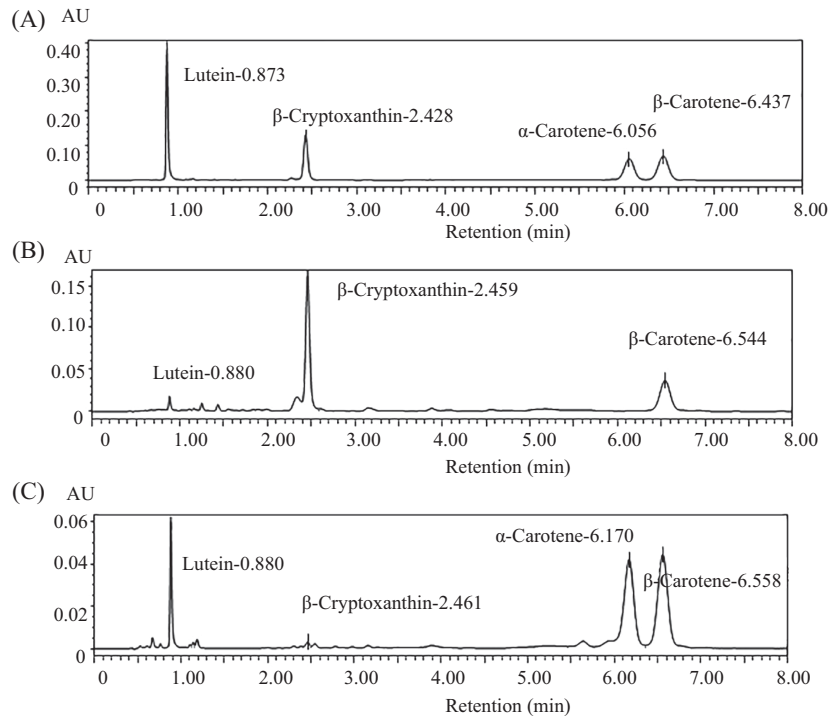
图5 SrLCYB在鹤望兰不同组织中的表达

Fig.5 Expression of SrLCYB in different tissue

### 3 讨论

本研究采用RACE方法获得鹤望兰LCYB基因全长序列, 共1 908 bp, 开放阅读框1 515 bp。序列分析显示, LCYB具有高度保守的区域存在, 这些高度保守的残基与催化功能有关<sup>[9]</sup>。SrLCYB编码的蛋白

质在中、后部与其他植物LCYB的氨基酸同源性很高, 且包含植物LCYB的共同特征“FLYAIVIP”序列和FAD/NAD(P)结合区<sup>[10]</sup>。分子系统进化分析显示, SrLCYB同其他植物的LCYB具有较高的同源性, 其中与同属于姜目的芭蕉亲缘关系最近, 聚为一支。



A: 类胡萝卜素标准样色谱图; B: 鹤望兰黄色花萼中类胡萝卜素提取物色谱图; C: 鹤望兰叶片中类胡萝卜素提取物色谱图。

A: the UPLC chromatogram of carotenoids standards; B: the UPLC chromatogram of carotenoids extracted from yellow petals in *Strelitzia reginae*; C: the UPLC chromatogram of carotenoids extracted from leaf in *Strelitzia reginae* Banks.

图6 鹤望兰类胡萝卜素含量的UPLC分析

Fig.6 Analysis of carotenoid component and content of *Strelitzia reginae* Banks with UPLC

表2 鹤望兰不同花发育时期及不同组织中类胡萝卜素含量

Table 2 Carotenoid contents in different growth periods of flowering and different tissues from *Strelitzia reginae* Banks

不同时期及组织 Different periods and tissues		类胡萝卜素含量(μg/g FW)	
		Carotenoid (μg/g FW)	
		β-carotene	α-carotene
Different growth periods of flowering	Early bud period	0.25±0.12 <sup>a</sup>	ND
	Mid-bud period	23.99±2.13 <sup>b</sup>	ND
	Late-bud period	77.93±5.16 <sup>c</sup>	ND
	Early flowering period	516.67±67.85 <sup>d</sup>	ND
	Blooming period	825.80±95.43 <sup>e</sup>	ND
Different tissues	Yellow sepals	854.27±85.36 <sup>a</sup>	ND
	Leaf	0.11±0.10 <sup>b</sup>	0.07±0.04 <sup>a</sup>
	Stem	0.33±0.22 <sup>b</sup>	ND
	Root	35.97±5.64 <sup>c</sup>	39.96±5.16 <sup>b</sup>
	Blue petals	265.37±31.67 <sup>d</sup>	191.08±35.7 <sup>e</sup>

a、b、c、d代表多重比较SNK检验在 $P=0.05$ 显著性水平下的差异显著。ND表示未检出。

a, b, c, d show the different significant differences at  $P=0.05$  level in SNK test. ND: not detected.

文心兰的*LCYB*基因在根和叶中均有表达,在花中表达量最高,并且在花发育的整个过程都有表达,在盛花期表达量最高<sup>[4]</sup>。Han等<sup>[11]</sup>在桂花中的研究表明,*LCYB*在橘黄色花中的表达量随花的发育逐渐变高,到盛花期达到最高。本研究通过荧光定量

PCR的方法对*SrLCYB*在鹤望兰不同组织表达情况进行分析,发现鹤望兰*SrLCYB*在黄色花萼中表达量最高,在蓝色花瓣和根中表达量很低,推测*SrLCYB*的表达与黄色花的形成有关,蓝色花的形成受其他途径控制。另外,对鹤望兰花发育过程中的表达情

况进行分析发现, *SrLCYB*在始花期表达增加, 到盛花期表达量最高, 说明*SLCYB*在黄色花萼发育过程中起着重要作用, 推测*SrLCYB*可能在转录水平上对鹤望兰黄色花的形成起调控作用。

在类胡萝卜素生物合成途径中, 番茄红素被2分子的*LCYB*转化成 $\beta$ -胡萝卜素, 也可被1分子*LCYB*和1分子番茄红素 $\epsilon$ 环化酶(*lycopene epsilon cyclase*, *LCYE*)基因转化成 $\alpha$ -胡萝卜素。*LCYB*是合成 $\beta$ -胡萝卜素和 $\alpha$ -胡萝卜素的关键酶基因。在木瓜果实中, *LCYB*将番茄红素全部转化为 $\beta$ -胡萝卜素<sup>[12]</sup>, 在鹤望兰的黄色花萼中也只形成 $\beta$ -胡萝卜素, 未有 $\alpha$ -胡萝卜素。在胡萝卜中, 过表达或沉默*LCYB*基因, 都能相应地增加或减少 $\beta$ -胡萝卜素的含量<sup>[13]</sup>。在鹤望兰不同花发育时期及不同组织中,  $\beta$ -胡萝卜素含量的变化对应于*LCYB*基因表达量的变化, 两者成正相关。

番茄红素 $\beta$ -环化酶是类胡萝卜素生物合成过程中的关键酶, 对于番茄红素环化形成 $\beta$ -胡萝卜素和含 $\beta$ -环的胡萝卜素具有重要调控作用, 其编码基因成为应用植物基因工程技术改善转基因植物中类胡萝卜素含量的重要靶点<sup>[14]</sup>。目前, 已从番茄<sup>[15]</sup>、辣椒<sup>[16]</sup>、黄花龙胆<sup>[17]</sup>、柑橘<sup>[7]</sup>、胡萝卜<sup>[13]</sup>、金盏花<sup>[18]</sup>等多种植物中克隆到编码番茄红素 $\beta$ -环化酶的完整基因或部分片段。本研究成功分离了鹤望兰*SrLCYB*基因, 并对其组织表达特异性进行了分析, 为进一步研究*SrLCYB*的功能及其在鹤望兰黄色花形成中的作用及调控机制奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- 王玉萍, 刘庆昌, 翟红. 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在植物基因工程中的应用. 分子植物育种(Wang Yuping, Liu Qingchang, Zhai Hong. Expression and regulation of genes related to plant carotenoid biosynthesis and their application in plant gene engineering. *Molecular Plant Breeding*) 2006; 4(1): 103-10.
- Ohmiya A. Diversity of carotenoid composition in flower petals. *Japan Agricultural Research Quarterly* 2011; 45(2): 163-71.
- Valadon LR, Mummery RS. Carotenoids in floral parts of a *Narcissus*, a *Daffodil* and a *Tulip*. *Biochem J* 1968; 106(2): 479-84.
- Chiou CY, Pan HA, Chuang YN. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars. *Planta* 2010; 232(4): 937-48.
- Ootani S, Hayashi K. Further search for watersoluble carotenoids in yellow flowers of several plants. *Res Inst Evolut Biol Sci Rep* 1982; 1(2): 71-6.
- Yamagishi M, Kishimoto S, Nakayama M. Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of Asiatic hybrid lily. *Plant Breeding* 2010; 129(1): 100-7.
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol* 2004; 134(2): 824-30.
- Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL. Determination of major carotenoid constituents in petal extracts of eight selected flowering plants in the north of Thailand. *Chiang Mai J Sci* 2006; 33(3): 327-34.
- Ronen G, Cohen M, Zimlir D, Hirschberg J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J* 1999; 17(4): 341-51.
- Cunningham FX, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, Dallapenna D, Gantt E. Functional analysis of the  $\beta$  and  $\zeta$ -lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 1996; 8(9): 1613-26.
- Han Y, Wang X, Chen W, Dong M, Yuan W, Liu X. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans*. *Tree Genetics & Genomes* 2014; 10(2): 329-38.
- Devitt LC, Fanning K, Dietzgen RG, Holton TA. Isolation and functional characterization of a lycopene  $\beta$ -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *J Exp Bot* 2010; 61(1): 33-9.
- Moreno JC, Pizarro L, Fuentes P, Handford M, Cifuentes V, Stange C. Levels of lycopene  $\beta$ -cyclase modulate carotenoid gene expression and accumulation in *daucus carota*. *PLoS One* 2013; 8(3): 58144-56.
- 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. 植物生理与分子生物学学报(Zhu Changfu, Chen Xing, Wang Yingdian. Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*) 2004; 30(6): 609-18.
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FJ, Hirschberg J. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol* 1996; 30(4): 807-19.
- Huguency P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, et al. Metabolism of cyclic carotenoids: A model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J* 1995; 8(3): 417-24.
- Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G. cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petal of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1625(3): 305-8.
- del Villar-Martinez AA, Garcia-Saucedo PA, Carabez-Trejo A, Cruz-Hernandez A, Paredes-Lopez O. Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during development in marigold. *J Plant Physiol* 2005; 162(9): 1046-56.