

栀子八氢番茄红素合成酶基因的分离及表达分析

高蓝*, 朱碧云

(广东药学院基础学院, 广州 510006)

摘要: 为探讨栀子(*Gardenia jasminoides*)果实中藏花素的合成机理, 克隆了栀子类胡萝卜素生物合成的关键酶八氢番茄红素合成酶(GjPSY)基因的全长 cDNA。结果表明, 推导的 GjPSY 氨基酸序列与双子叶植物来源的 GjPSY 亲缘关系较近。采用 HPLC 检测栀子果实中的藏花素-1 含量为(3.96 ± 1.48) mg g⁻¹, 在叶片中未检出。通过 RT-PCR 分析表明, GjPSY 在栀子叶片和果实中均有表达, 且表达水平一致。因此推测, GjPSY 的转录水平与果实中藏花素-1 的合成无关。

关键词: 栀子; 阿朴类胡萝卜素; 藏花素; 八氢番茄红素合成酶; 基因表达

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.05.010

Isolation and Expression of Phytoene Synthase Gene in *Gardenia jasminoides*

GAO Lan*, ZHU Bi-yun

(School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to understand the synthesis mechanism of crocin in *Gardenia jasminoides* fruits, the full-length cDNAs of phytoene synthase gene *GjPSY* from *G. jasminoides* were cloned. The results showed that the deduced amino acid sequence of GjPSY had close relation with those from dicotyledonous plants. The content of crocin-1 in fruits was (3.96 ± 1.48) mg g⁻¹ by HPLC, while crocin-1 was not detected in leaves. It was revealed that crocin-1 exclusively accumulated in fruits. The RT-PCR analysis revealed that the expression of *GjPSY* in fruits was not differences from that in leaves. Therefore, it was suggested that the crocin synthesis in *G. jasminoides* fruits had not correlation with transcription level of *GjPSY* gene.

Key words: *Gardenia jasminoides*; Apocarotenoids; Crocin; Phytoene synthase; Gene expression

栀子(*Gardenia jasminoides*)为茜草科(Rubiaceae)栀子属植物, 原产于亚洲, 有上千年的种植历史。栀子果实被用于提取染料和食用色素, 在中国也是传统的中草药。藏花素、藏花酸和京尼平苷是栀子果实中的主要次生代谢产物^[1]。藏花酸是一种阿朴类胡萝卜素, 具有 C₂₀ 骨架, 两端各有 1 个羧基。藏花素是藏花酸的单或双糖苷类物质, 其中藏花酸的二龙胆糖苷, 即藏花素-1 (Crocine-1), 是栀子果实中的主要藏花素成分。栀子果实的橙色或红色主要来自藏花素和藏花酸, 藏花素和藏花酸也是栀子中的两种主要活性成分^[2-3]。

类胡萝卜素多为 C₄₀ 骨架化合物, 植物、真菌和细菌中的红、黄和橙色多是由类胡萝卜素产生。在类胡萝卜素合成途径中的第 1 个 C₄₀ 化合物是八氢番茄红素, 其合成酶——八氢番茄红素合成酶(PSY, Phytoene synthase)是类胡萝卜素合成途径中的 1 个关键酶, 它将两个 C₂₀ 化合物香叶基香叶基焦磷酸(GGPP, Geranylgeranyl pyrophosphate)分子催化缩合为八氢番茄红素(图 1)。八氢番茄红素合成酶目前已从多种植物中分离获得, 其基因 PSY 也已克隆得到, 如辣椒(*Capsicum frutescens*)^[4]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[5]、玉米(*Zea mays*)^[6]、柑

收稿日期: 2013-03-06

接受日期: 2013-05-02

作者简介: 高蓝(1964~), 女, 教授, 研究方向为植物分子生物学。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gaolangdpu@yahoo.cn

橘(*Citrus sinensis*)^[7]、中粒咖啡(*Coffea canephora*)^[8]等。同时,有些植物中含有单一的 *PSY* 基因,有些则含有多种 *PSY* 基因,如番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[9-10]、木薯(*Manihob esculenta*)^[11]和一些禾本科(Poaceae)植物有 2 种 *PSY* 基因^[12];禾本科的水稻(*Oryza sativa*)、高粱(*Sorghum vulgare*)和玉米中含有 3 种 *PSY* 基因^[13]。在藏红花(*Crocus sativus*)中,藏花酸和藏花素由类胡萝卜素的玉米黄素衍变而来,其中藏花酸是由玉米黄素双加氧酶裂解玉米黄素后再经氧化产生^[14]。在栀子中藏花素是通过糖基转移酶将藏花酸糖苷化产生^[15]。

栀子果实中能积累藏花酸和藏花素,但是对其生物合成途径中的相关酶类尚未明晰,对八氢番茄红素合成酶的研究有助于了解类胡萝卜素生物合成的调控机理,分离藏花酸和藏花素合成过程中的相关酶对了解其合成及合成的调节机理具有重要意义。本研究克隆了栀子类胡萝卜素合成的关键酶八氢番茄红素合成酶基因(*GjPSY*)的全长 cDNA,测定了栀子果实和叶片中的藏花素-1 的含量,并首次报道了 *GjPSY* 在栀子叶片和果实中的表达水平,为通过基因工程方法提高栀子中藏花酸和藏花素类物质含量提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

栀子(*Gardenia jasminoides*)植株培养于广东药学院。采集栀子成熟叶片和花后 16 周的栀子果实,果肉为橙色。所有材料贮存于 -80°C 。CreatorTM SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司。Primescript one step RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 大连公司。藏花素-1 (Crocic-1)的对照品购于 Sigma-Aldrich 公司。乙腈、甲醇为色谱纯,其它生化试剂等为分析纯。

1.2 藏花素-1 含量的测定

以改良的 HPLC^[16]测定栀子叶片和果实中藏花素-1 (Crocic-1)的含量。叶片和果实在液氮中研磨后以 50% (V/V)的甲醇-水溶液提取,在超声处理 30 min 后以 $10000 \times g$ 离心 10 min,取上清液在 -20°C 下贮存。HPLC 分析时,上清液以 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,以 DiamonsilTM C18 (2) 柱($250 \text{mm} \times 4.6 \text{mm}$, $5 \mu\text{m}$)(Dikma 公司,中国)分析,梯度洗脱。仪器为 Waters 2995 HPLC 仪(Waters 公司,美国),配备 2996 光电二极管阵列检测器检测。数据分析

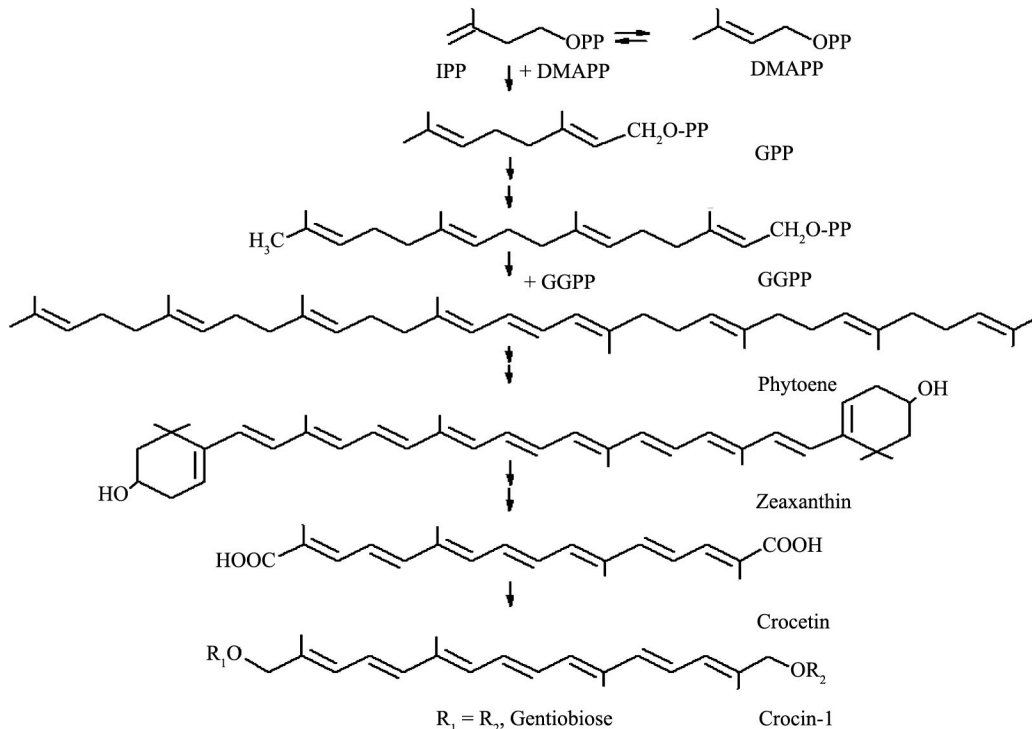


图 1 Crocin 的生物合成途径^[16]。IPP: 异戊烯焦磷酸; DMAPP: 二甲基丙烯焦磷酸; GPP: 香叶基焦磷酸; GGPP: 香叶基香叶基焦磷酸。

Fig. 1 Biosynthesis pathway of crocin^[16]. IPP: Isopentenyl diphosphate; DMAPP: Dimethylallyl diphosphate; GPP: Geranyl diphosphate; GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate.

以 Empower 2 软件完成。洗脱条件为: 10%~20% 乙腈溶液(乙腈/水, V/V), 0~20 min; 20%~50% 乙腈溶液, 20~25 min, 流速为 1 mL min⁻¹, 检测波长 440 nm。目标峰通过与藏花素-1 对照品的保留时间和吸收光谱的比较而确定。通过标准曲线确定藏花素-1 的含量, 共进行 3 次重复实验。

1.3 *GjPSY* 基因的克隆

以 CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 法^[17] 提取柘子果实中的总 RNA。按照 CreatorTM SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒的说明书从总 RNA 构建柘子果实的 cDNA 文库。将获得的 SMART 双链 cDNA 克隆接入 pDNR-LIB 载体并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH-5 α 。

根据植物八氢番茄红素合成酶基因 *PSY* 的保守区设计简并引物, F1: 5'-ATHTGGCNATHAY-GTNTGG-3' 和 F2: 5'-RAARTTRTTRTARTCRITN-GCYTC-3', 从 cDNA 文库的细菌裂解液中扩增 *PSY* 基因。获得了 *GjPSY* 基因的中间片段, 将该片段回收并测序, 命名为 *GjPSY-M*。根据 *GjPSY-M* 片段序列分别设计 5' 端特异引物 GSP1: 5'-GCGATA-CAACAATAGCGATGCCCATACAG-3' 和 3' 端特异引物 GSP2: 5'-GTGCAGGAGAACGGATGAGC-TGGTT-3', 配合文库构建试剂盒提供的 5' 端和 3' 端的质粒检测通用引物, 采用 RACE 方法从 cDNA 文库中获得 *GjPSY* 基因的 5' 端和 3' 端序列。获得的片段分别命名为 5'*GjPSY* 和 3'*GjPSY*, 将片段回收和测序并进行序列分析, 与 *GjPSY-M* 拼接出 *GjPSY* 的全长 cDNA。根据全长 *GjPSY* 序列, 经过 BLAST 比对和开放阅读框(ORF)序列分析, 分别设计引物 F1: 5'-CGCCATTAATAATGTCTGTCGCTTTGC-TATGGGTTG-3' 和 F2: 5'-ATGCTCGAGGGCCTT-TGCTAGTGGAGATGATGTTCT-3', 从 cDNA 文库的细菌裂解液中扩增得到 *GjPSY* 的 ORF 序列。

1.4 *GjPSY* 基因的表达分析

从柘子果实和叶片中分别提取总 RNA, 采用 Primescript one step RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 分析, 反应所用 *GjPSY* 特异引物分别为 F1: 5'-GAC-ATACTTGCTGGAAAGGTCAC-3' 和 F2: 5'-GCTA-GTGGAGATGATGTTCTTGG-3'。以组成性表达的 *RPS25-1* 基因(40S 核糖体小亚基蛋白 25-1 基因, GenBank 登录号: GU797554)为内参, *RPS25-1* 基

因的特异引物分别为 F1: 5'-CAGAAGAAGAAGA-AGTGGAGCAA-3' 和 F2: 5'-TGGTAGCTCTGGT-GTATATCTGC-3'。RT-PCR 反应程序为: 95℃ 2 min, 接着 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 次循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 柘子叶片和果实中藏花素-1 的含量

使用甲醇-水溶液提取柘子叶片和果实中的藏花素-1, 提取液用于 HPLC 分析。通过与 crocin-1 对照品的保留时间和吸收光谱进行比较, 在果实样品中观察到 crocin-1 峰, 在叶片样品中未观察到 crocin-1 峰(图 2)。同时, 检测到果实中 crocin-1 的含量为 (3.96 ± 1.48) mg g⁻¹。

2.2 *GjPSY* 基因的克隆

为了克隆 *GjPSY* 基因, 构建了柘子果实的 cDNA 文库, 以简并引物从 cDNA 文库中扩增得到 *GjPSY* 基因 cDNA 的中间片段 *GjPSY-M*, 长度为 688 bp。接着通过 5' RACE 获得了长度为 1596 bp 的 5'*GjPSY* 片段; 通过 3' RACE 获得了长度为 956 bp 的 3'*GjPSY* 片段。将 5'*GjPSY*、*GjPSY-M* 和 3'*GjPSY* 共 3 个片段序列进行拼接, 得到全长 cDNA, 长度为 1876 bp。根据全长序列从 cDNA 文库中扩增得到 ORF 序列(图 3); 经序列分析, 此全长 cDNA 含有 1314 bp 的 ORF, 5' 端非翻译区为 393 bp, 3' 端非翻译区为 169 bp, 命名为 *GjPSY* (GenBank 登录号: HQ599860)。预测 *GjPSY* 基因编码的蛋白质含有 437 个氨基酸, 分子量为 49.3 kDa, 等电点为 8.82。

2.3 *GjPSY* 的序列分析

GjPSY 的氨基酸序列经 BLAST 分析, 结果表明, *GjPSY* 与多种植物的八氢番茄红素合成酶的序列相似, 它们均含有两个保守的富含天冬氨酸的模体 DXXXD。这个模体被认为可通过 Mg²⁺ 结合于底物的焦磷酸基团, 在八氢番茄红素合成酶催化两个 GGPP 分子缩合的反应中发挥重要作用^[18]。采用 ClustalW2 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)对相似度较高(相似度为 55%~93%)的 18 条来自多种植物的八氢番茄红素合成酶序列进

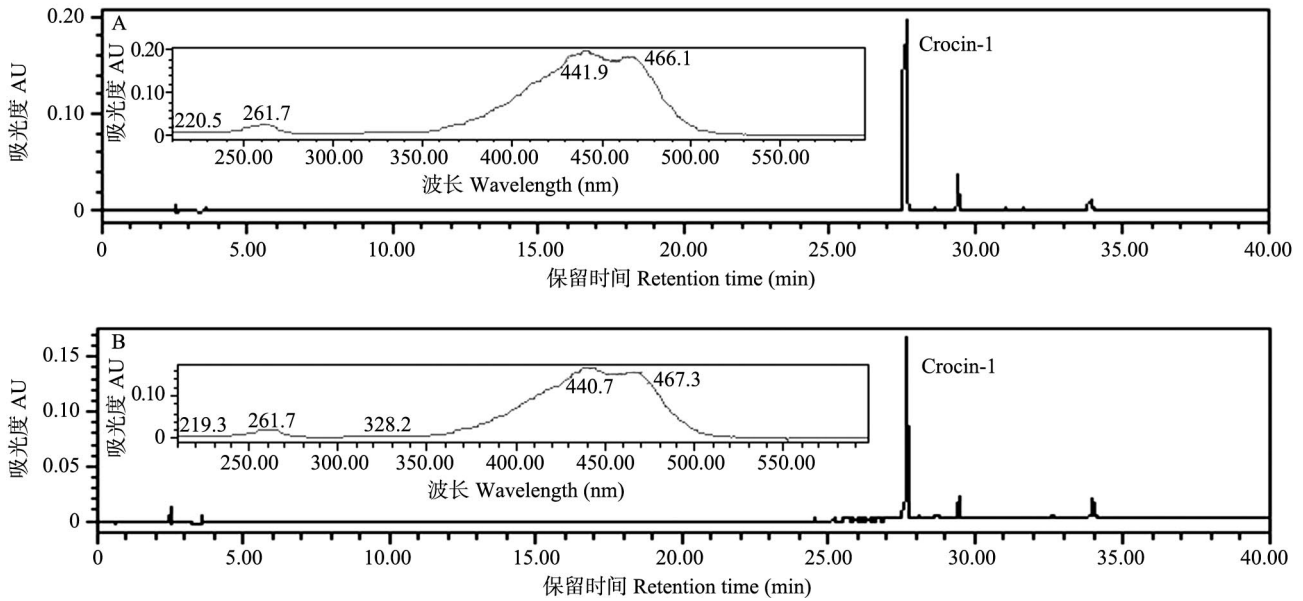


图2 梔子果实的甲醇-水提取液的HPLC图谱。主峰是crocin-1,检测波长440 nm,插图为crocin-1的在线吸收光谱。A:果实;B: crocin-1 对照品。
Fig. 2 HPLC of methanol-water extract from *Gardenia jasminoides* fruits. The main peak is crocin-1 monitored at 440 nm of wave length. A: Fruits; B: Standard for crocin-1. Illustrations are showing online absorption spectrum of crocin-1.

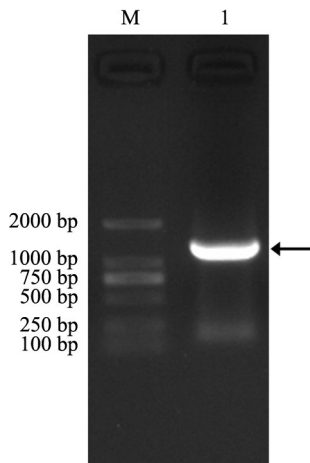


图3 梔子 *GjPSY* 基因的PCR扩增图谱。M: DL 2000 marker; 1: *GjPSY*-ORF。

Fig. 3 Amplification of *GjPSY* gene. M: DL 2000 marker; 1: *GjPSY*-ORF.

行同源进化比对,采用Mega 4.1软件构建氨基酸序列的NJ (Neighbor-joining)系统进化树,用重复1000次的自展支持率(Bootstrap)检验各分支的置信值(图4)。结果表明, *GjPSY* 与中粒咖啡的 *PSY* 最为相似,与番茄和拟南芥 *PSY* 的相似度均大于来自禾本科的玉米及水稻的。而在与玉米和水稻的各3种 *PSY* 的比对中可知, *GjPSY* 与 *PSY1* 最为相似,而与 *PSY3* 关系最远。

2.4 *GjPSY*的表达分析

分别提取梔子叶片及果实中的总RNA,采用RT-PCR法分析 *GjPSY* 的表达水平(图5)。以组成性表达的 *RPS25-1* 为内参。结果表明, *GjPSY* 的转录水平在叶和果实中表现一致。

3 讨论

类胡萝卜素是异戊烯类色素,在植物的光合作作用和光保护作用中发挥作用,是人体中重要的营养物质,是维生素A的前体。由类胡萝卜素衍生的阿朴类胡萝卜素,如藏花酸和藏花素既可作为色素使用,也具有药用作用。有研究表明,藏花素和藏花酸具有防止动脉粥样硬化、抗炎、抗细胞增殖、预防视网膜变性、神经保护作用和改善胰岛素抵抗等作用。八氢番茄红素合成酶是类胡萝卜素生物合成中的第一个限速酶, *PSY* 基因在单子叶和双子叶植物中广泛存在基因复制现象,这个基因家族中各个基因的表达往往具有组织特异性,或对环境胁迫等因素产生应答。目前对多种植物的 *PSY* 基因的分离、表达及转基因植物的分析研究方兴未艾^[19-22]。

在柑橘果实中, *PSY* 基因随着果实的成熟表达上调,不同品种上调幅度不同^[7],可见柑橘的 *PSY*

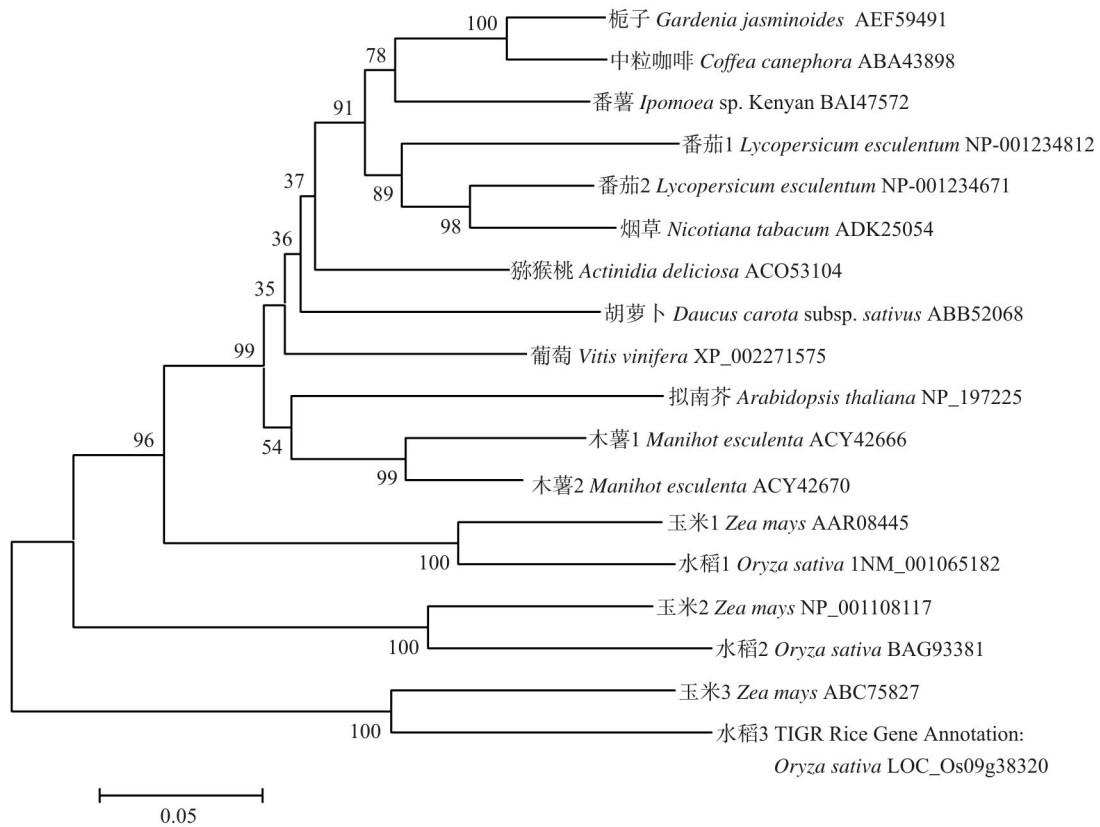


图4 来自不同植物的18个PSY的亲缘关系图谱。节点上的数字为重复1000次的自展支持率(Bootstrap)。
Fig. 4 Phylogeny of 18 PSY amino acid sequences from different plants. Bootstrap support values (1000 replicates) are shown at nodes.

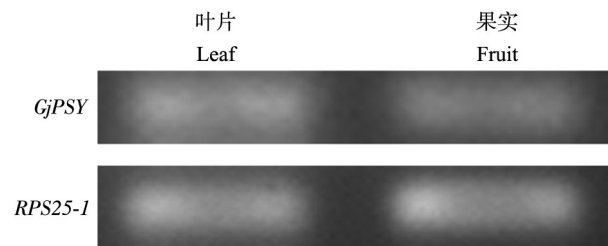


图5 栀子叶和果实中GjPSY基因的转录水平
Fig. 5 Transcription expression of GjPSY gene in Gardenia jasminoides leaves and fruits

表达模式与GjPSY不同。番茄中有两个PSY基因:PSY1和PSY2,它们均在幼苗、成熟叶片及果实中表达。PSY1在幼苗和果实成熟后期的表达高于PSY2,而PSY2主要在成熟叶片中表达^[23],推测PSY1是由PSY2经基因扩增产生的平行同源基因^[24]。GjPSY的氨基酸序列与番茄的PSY2的氨基酸序列较相似(相似度达81%,与PSY1的相似度为75%),并且在果实中的表达水平与叶中相近,提示它不是与果实成熟相关的基因。两个番茄PSY1突变体,一个是W180*无义突变,一个是

个氨基酸替换突变体P192L,对它们果实中的类胡萝卜素的含量和比例进行了分析^[25]。W180*的果实为黄色果肉,直到成熟颜色都不发生变化,代谢分析表明在果实中没有类胡萝卜素,其PSY1蛋白失去活性,证明PSY1是唯一在果实成熟过程中发挥作用的PSY。P192L果实也为黄色,直到破色期后的第3天才转为红色,这是由于八氢番茄红素合成的减少造成番茄红素和β-胡萝卜素的积累延迟,其PSY1蛋白的活性被抑制。与GjPSY的氨基酸序列比对表明,W180*发生突变的氨基酸对应于GjPSY的W204,P192L突变体的氨基酸相当于GjPSY中的P216,这两个氨基酸均在两个DXXXD模体之间,且在多种植物的PSY中高度保守。

木薯中的两个PSY基因在不同组织中的表达也不相同,叶中PSY1和PSY2均有高水平的表达,在根和花药中的表达水平均较低,但根中PSY2的表达是PSY1的10倍^[11]。另外,木薯的PSY1可对高盐胁迫响应^[11],PSY2中的单碱基突变导致的单氨基酸突变(A191D)可使木薯根中的类胡萝卜素含量提高20倍^[26]。A191氨基酸位于两个DXXXD

模体之间的较保守的区域。本研究中分析的来自12种植物的18条PSY氨基酸序列中A191均为丙氨酸。GjPSY的氨基酸序列与木薯PSY2的相似度为76%，与PSY1相似度为74%，所以更接近PSY2。但从以上与番茄和木薯的序列比对及表达分析还难以明确判断GjPSY的功能。

玉米、高粱、小麦和水稻各有3个PSY基因，都编码有功能的八氢番茄红素合成酶。小麦中的3个PSY基因中，只有PSY1与面粉的黄色素含量有关，PSY2只获得了部分序列，PSY3的启动子区存在可应答脱落酸ABA的顺式作用元件。其PSY1的表达与籽粒中类胡萝卜素的积累正相关，PSY2则与叶中类胡萝卜素的合成相关，在叶中表达最多^[13,27]。PSY3在未受到胁迫的叶中的表达比PSY1和PSY2低，在根中稍多一点。在外源ABA且受胁迫的根中，3种PSY的表达均有增加，以PSY3的增加最多，即PSY3对ABA的反应远大于PSY1和PSY2^[27]。与小麦的比较分析也难以判断GjPSY的种类和作用。玉米的PSY1主要在叶片和胚乳中表达，并与胚乳中类胡萝卜素的积累呈正相关关系；其PSY2的表达则与光诱导的脱黄化过程正相关；PSY3在根和胚乳中大量表达，可被干旱、高盐和外源ABA处理所诱导^[6]。水稻胚乳中不含类胡萝卜素，3种PSY基因在胚乳中都无表达；而在进行光合作用的组织中，3种基因都有表达^[13]。水稻的OsPSY1和OsPSY2在根和叶中的表达均高于OsPSY3，其中OsPSY1和OsPSY2均受光调控，OsPSY1表达最多。OsPSY3不被光诱导但在根中的表达可被高盐或干旱所诱导^[13]。通过分析水稻、玉米和拟南芥的PSY基因的结构及它们的启动子区，认为OsPSY1是单子叶和双子叶植物的古老PSY基因的遗存，OsPSY2和OsPSY3均是OsPSY1的平行同源基因^[13]。因此，我们推测GjPSY相当于玉米和水稻中的PSY1。

参考文献

- [1] Machida K, Oyama K, Ishii M, et al. Studies of the constituents of *Gardenia* species: II. Terpenoids from *Gardenia fructus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(5): 746–748.
- [2] Kazi H A, Qian Z Y. Crocetin reduces TNBS-induced experimental colitis in mice by downregulation of NFκB [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2009, 15(3): 181–187.
- [3] Mehri S, Abnous K, Mousavi S H, et al. Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC₁₂ cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(2): 227–235.
- [4] Romer S, Huguency P, Bouvier F, et al. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196(3): 1414–1421.
- [5] Scolnik P A, Bartley G E. Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104(4): 1471–1472.
- [6] 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 Physiol*, 2008, 146(3): 1333–1345.
- [7] Tao N G, Hu Z Y, Liu Q, et al. Expression of phytoene synthase gene (*Psy*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(6): 837–843.
- [8] Simkin A J, Moreau H, Kuntz M, et al. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(10): 1087–1106.
- [9] Bartley G E, Viitanen P V, Bacot K O, et al. A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(8): 5036–5039.
- [10] Bartley G E, Scolnik P A. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2: A second tomato gene encoding phytoene synthase [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(34): 25718–25721.
- [11] Arango J, Wüst F, Beyer P, et al. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses [J]. *Planta*, 2010, 232(5): 1251–1262.
- [12] Gallagher C E, Matthews P D, Li F, et al. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1776–1783.
- [13] Welsch R, Wüst F, Bär C, et al. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(1): 367–380.
- [14] Bouvier F, Suire C, Mutterer J, et al. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 47–62.
- [15] Nagatoshi M, Terasaka K, Owaki M, et al. UGT75L6 and UGT94E5 mediate sequential glucosylation of crocetin to crocin in *Gardenia jasminoides* [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(7): 1055–1061.
- [16] Castillo R, Fernández J A, Gómez-Gómez L. Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(2): 674–689.

- [17] Bekesiova I, Nap J P, Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17(3): 269–277.
- [18] Guo R T, Cao R, Liang P H, et al. Bisphosphonates target multiple sites in both *cis*- and *trans*-prenyltransferases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10022–10027.
- [19] Fu Z Y, Chai Y C, Zhou Y, et al. Natural variation in the sequence of *PSY1* and frequency of favorable polymorphisms among tropical and temperate maize germplasm [J]. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(4): 923–935.
- [20] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(46): 19021–19026.
- [21] Robertson F P, Koistinen P K, Gerrish C, et al. Proteome changes in tomato lines transformed with phytoene synthase-1 in the sense and antisense orientations [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(16): 6035–6043.
- [22] Mlalazi B, Welsch R, Namanya P, et al. Isolation and functional characterisation of banana phytoene synthase genes as potential cisgenes [J]. *Planta*, 2012, 236(5): 1585–1598.
- [23] Fraser P D, Enfissi E M, Halket J M, et al. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: Effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3194–3211.
- [24] Giorio G, Stigliani A L, D'Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): New data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns [J]. *FEBS J*, 2008, 275(3): 527–535.
- [25] Gady A L, Vriezen W H, van de Wal M H, et al. Induced point mutations in the phytoene synthase 1 gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening [J]. *Mol Breed*, 2012, 29(3): 801–812.
- [26] Welsch R, Arango J, Bär C, et al. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(10): 3348–3356.
- [27] Dibari B, Murat F, Chosson A, et al. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses [J/OL]. *BMC Genom*, 2012, 13: 221. doi: 10.1186/1471-2164-13-221.