

新基因、新种质、新品种
 New Gene & Germplasm

中国水仙八氢番茄红素脱氢酶基因(*PDS*)的克隆及表达分析

陈段芬^{1*} 彭镇华^{2**} 高志民^{1*}

1 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京, 100102; 2 中国林业科学研究院林业研究所, 北京, 100091

* 同等贡献作者

** 通讯作者, pengzh@icbr.ac.cn

摘要 八氢番茄红素脱氢酶(*PDS*)是影响类胡萝卜素合成的一个重要限速酶, 在植物花色发育过程中起着重要作用。采用 RT-PCR 技术从中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)幼嫩花蕾中分离到一个新的水仙花色发育相关的 *PDS* 基因, 命名为 *NTPDS1* (GenBank 登记号: EU138883)。该基因长 1 719 bp, 具有一个 1 713 bp 的完整开放读码框(ORF), 编码 570 个氨基酸。序列分析表明, *NTPDS1* 编码的氨基酸序列与其它植物的 *PDS* 蛋白有很高的相似性。系统进化树分析显示, *NTPDS1* 与喇叭水仙亲缘关系最近。利用半定量 PCR 技术进行组织表达模式分析发现, 该基因在中国水仙的花、叶片和根中均有表达, 但以花器官中表达量最高; 在花瓣和副冠中的表达量高于雄蕊和雌蕊。

关键词 中国水仙, *PDS* 基因, 序列分析, 半定量 PCR

Cloning and Expression Analysis of *PDS* Gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis*

Chen Duanfen^{1*} Peng Zhenhua^{2**} Gao Zhimin^{1*}

1 International Center for Bamboo and Rattan, SFA Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing, 100102; 2 Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091

* The authors who contribute equally

** Corresponding author, pengzh@icbr.ac.cn

Abstract Phytoene desaturase (*PDS*) is one of the key enzymes in the carotene biosynthesis pathway and plays an important role in the process of flower color development. A new gene, named as *NTPDS1* (GenBank accession number: EU138883), was cloned from the first strand of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* cDNA through RT-PCR by using primers designed according to the *PDS* gene family conserved region. The sequence consists of 1 719 bp, has an open reading frame of 1 713 bp encoding a polypeptide of 570 amino acids. Homology analysis showed that the deduced *NTPDS1* protein was highly homologous to other *PDS* proteins from different species. Phylogenetic analysis also indicated that *NTPDS1* was more related to *PDS* of *Narcissus pseudonarcissus*. The semi-quantitative PCR results revealed that the transcript of *NTPDS1* gene was detectable in vegetative and flowers, especially high in flowers. Within open flowers, levels were highest in the organs of petals and corana while lower in stamen and pistils.

Keywords *Narcissus tazetta* var. *chinensis*, *PDS* gene, Sequence analysis, Semi-quantitative PCR

水仙是石蒜科(*Amaryllidaceae*)水仙属(*Narcissus*)多年生鳞茎植物, 是著名观赏兼药用植物, 在世界各国广泛种植(陈俊愉, 2001)。近 150 年来, 国外在水仙育种领域取得了重大进展, 品种已达上万个之多。这些品种花型奇特, 花色绚丽, 极大丰富了世界园林景观(Blanchard, 2004)。久负盛名的中国水仙(*Narcissus*

tazetta var. *chinensis*)花姿秀美, 花香馥郁, 不仅是中国著名的十大传统名花之一, 更是中国传统出口花卉中的佼佼者。但长期以来, 中国水仙仅有“金盏银台”和“玉玲珑”等少数品种, 且花色仅有黄白二色。因此, 花色创新一直是中国水仙育种的重要目标之一。由于中国水仙为同源三倍体植物, 利用有性杂交

或实生选种选育新品种具有极大的困难,而近年来的花色分子育种研究为运用基因工程来丰富中国水仙花色提供了新思路(吴菁华等,2005)。

水仙属植物花朵中色素的主要成分为类胡萝卜素(Schledz et al., 1996)。目前,植物类胡萝卜素生物合成所涉及的酶大多得到了鉴定,而且在分子水平上阐明了类胡萝卜素生物合成的主要路径,这为中国水仙花色改良提供了有益的参考(黄彬城等,2006)。八氢番茄红素脱氢酶(PDS)是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一,参与线状类胡萝卜素生物合成。该酶催化八氢番茄红素脱氢生成 9,9'-二顺式- ζ -胡萝卜素,再经由 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ZDS)和类胡萝卜素异构酶(CRTISO)生成番茄红素,进而合成类胡萝卜素(朱长甫等,2004)。用吡草伏和氟啶酮与其活性位点结合后,PDS的催化活性丧失,导致大量的八氢番茄红素积累,从而影响类胡萝卜素的合成(Sandmann and Mitchell, 2001; Simkin et al., 2003)。在番茄、柑橘、黄花龙胆、金盏菊等花或果实中以类胡萝卜素为主要色素种类的植物中,PDS基因的表达增强与花和果实中类胡萝卜素含量呈正相关(Sun et al., 1998)。该基因与八氢番茄红素合酶基因(PSY)、 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因(ZDS)等基因协调作用,在转录水平上调节花或成熟果实中类胡萝卜素的积累(Kato et al., 2004)。中国水仙 PDS 基因的克隆和表达分析,为进一步研究八氢番茄红素脱氢酶的调控功能奠定分子基础,将有助于通过基因工程来实现丰富中国水仙花花色的育种目标。

1 材料与方法

1.1 植物材料和菌株

中国水仙品种为购自中国漳州的“金盏银台”。经 4℃处理 30 d 后,20℃水培 10 d,剥取鳞茎内幼嫩花蕾用于 RNA 提取。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由本实验室保存。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取中国水仙幼嫩花蕾的 RNA (Gao et al., 2006)用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3 基因的克隆与测序

根据 PDS 基因家族的保守区序列设计引物,用于 RT-PCR,引物 1:5'-GGCATGAGCATTGTTGGGTTA GTTTC-3'; 引物 2:5'-CTAGACAACAGTCATCTCG

GCTG-3'。上述引物由上海生物工程技术有限公司合成。

以中国水仙 cDNA 为模板,进行梯度 PCR。在引物 1 和引物 2 的反应体系中应用宝生物工程公司的 LA Taq 酶,反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃ 1 min,57~59℃ 1 min,72℃ 2 min,36 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物电泳分析后用上海申能博彩生物科技有限公司试剂盒回收,按照 Promega 的 pGEM-T easy 载体快速连接试剂盒操作流程,将回收的 DNA 片段连到载体上,转化大肠杆菌,经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析后,送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

1.4 序列的生物信息学分析

利用 DNASTAR、SMART 和 Clustl W 等生物软件分析测定 cDNA 序列及其编码蛋白质的结构特点,并与国际核酸和蛋白质数据库联网进行 blast 比较分析。

1.5 NTPDS1 基因的组织表达分析

用 Trizal 法从中国水仙花期的不同器官和花不同部位提取 RNA,反转录成 cDNA 第一链。以中国水仙 18S rRNA 基因为内标调整 cDNA 用量和循环数,使内标基因在不同组织的表达丰度一致,并在此条件下扩增不同组织中目的基因的表达情况,用光密度值差异来表示目的基因在不同组织的表达量。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与结构分析

以反转录合成的中国水仙 cDNA 作为模板,用引物 1 和引物 2 进行扩增反应,PCR 产物在 0.8%的琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色结果显示,在 1 700 bp 左右有一条亮带,与预测的基因片段相符,初步确定为目的基因片段(图 1)。回收后与 pGEM-T easy 载体

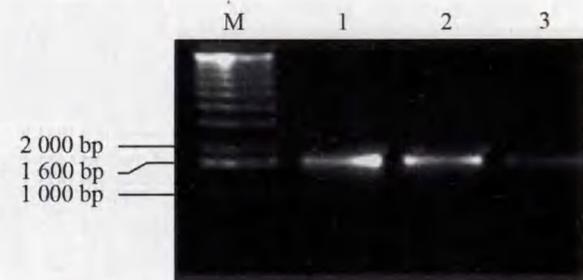


图 1 梯度 PCR 产物电泳结果

注: 1: 57.5℃; 2: 58.0℃; 3: 58.7℃; M: 1 kb 分子量标记

Figure 1 DNA fragments amplified by gradient PCR

Note: 1: 57.5℃; 2: 58.0℃; 3: 58.7℃; M: 1 kb ladder

连接,转化后将阳性克隆送公司测序。测序结果表明,插入片段为 1 719 bp,含有一个完整的开放阅读框(1 713 bp),GenBank 登记号为 EU138883。

利用 MotifScan、DNASTar 等生物学软件及 NCBI 在线 Blast 对 EU138883 的序列进行分析发现,该基因包含一个完整的开放读码框,编码 570 个氨基酸,其编码肽链包含 1 个吡啶二硫酸核苷酸氧化还原酶保 NAD/FAD 结合单元(301~396),具备胡萝卜素脱氢酶的共同特征。该基因命名为 *NTPDS1*。其编码蛋白的等电点和分子量分别为 7.29 和 63 520.81 D。

2.2 氨基酸序列比较与系统进化树分析

通过 NCBI 在线 Blast 软件,将 *NTPDS1* 基因编码的蛋白与数据库中已知的序列进行比较分析,结果显示 *NTPDS1* (EU 138883)与喇叭水仙(*N. pseudonarcissus*)的 PDS (X 78815)、番红花(*Crocus sativus*)的 PDS (AY183118)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 PDS3 (NM_117498)、水稻(*Oryza sativa*)的 PDS (AC 079663)和葡萄(*Vitis vinifera*)的 PDS (Cu 459224)有着较高的一致性,氨基酸一致性均达 80%以上,其中与喇叭水仙的 PDS 一致性最高,达 97%,其次是番红花,一致性达 83%。图 2 为 *NTPDS1* 编码的蛋白质与喇叭水仙、番红花和拟南芥的蛋白质序列的 Clustal W 比较分析结果,可以看出 4 个物种的氨基酸序保守性很高。

	MSIVGLVSAVCPSPGGIKQRYFSKGLDNLQGFXSSECLGIQLQVPVPFSSGIRPS	Majority
1	MSIVGLVSAVCPSPGGIKKRYFSKGLDNFQGFSTSECLGIQLQVPVPFSSGIRPS	NTPDS1 (EU1388)
1	MSIVGLVSVVCPSPGGIKKRYFSKGLDNFQGFSECLGIQLQVPVPFSSGIRPS	PDS1 (X78815)
1	MNLVGLVSAVSPSTGITAQPKY-----LPGFAGSECLFCPLKFFVSSSARMRFT	PDS (AY183118)
1	MVVFENVSAANLP---YQNGE-----LEALSSGGCELMGHSFRVPTSQALKTR	PDS3 (NM_11749)
	PRA----TSLQVVKDCRPELEGAVNFLEAAQLSASFSSPRPEKGLVVVAG	Majority
55	PRA----TSLQVVKDCRPELEGAVNFLEAAQMSASFSSPRPEKGLVVVVG	NTPDS1 (EU1388)
55	PRA----TSLQVVKDCRPELEGAVNFLEAAQLSASFSSPRPEKGLVVVVG	PDS1 (X78815)
49	RRAG---TPIKVFCKDYPPELESAVNFLEAAQFSASFSSGFRPDKGLQIVVAG	PDS (AY183118)
46	TERRSTAGPLQVVCVDIPEPELNTVNFLEAAQLSASFSSAFRPAKPLKVVVAG	PDS3 (NM_11749)
	AGLAGLSTAKYLADAGHKPILLEARDVLGGKIAAWKDKDGDWYETGLHIFFGAY	Majority
105	AGLAGLSTAKYLADAGHKPILLEARDVLGGKVAAWKDKDGDWYETGLHIFFGAY	NTPDS1 (EU1388)
105	AGLAGLSTAKYLADAGHKPILLESRDVLGGKIAAWKDKDGDWYETGLHIFFGAY	PDS1 (X78815)
100	AGLAGLSTAKYLADAGHKPILLEARDVLGGKIAAWKNDGDWYETGLHIFFGAY	PDS (AY183118)
100	AGLAGLSTAKYLADAGHKPLLEARDVLGGKIAAWKDEGDWYETGLHIFFGAY	PDS3 (NM_11749)
	PNVQNLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPNKPGEFSRFDPEVLPAPLNGIWAAIL	Majority
159	PNVQNLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPNKPGEFSRFDPEVLPAPLNGIWAAIL	NTPDS1 (EU1388)
159	PNVQNLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPNKPGEFSRFDPEVLPAPLNGIWAAIL	PDS1 (X78815)
154	PNVQNLFGELGIDDRQLQWKEHSMIFAMPEKPGEFSSRFDPEALPAPLNGIWAAIL	PDS (AY183118)
154	PNVQNLFGELGINDRLQWKEHSMIFAMPSKPGEFSSRFDPEVLPAPLNGIWAAIL	PDS3 (NM_11749)
	RNNEMLTWPEKVRFAIGLLPAMVGGQAYVEAQDGLTVTEWMRRQGVPDRVNDDEV	Majority
213	RNNEMLTWPEKVRFAIGLLPAMVGGQAYVEAQDGLTVTEWMRRQGVPDRVNDDEV	NTPDS1 (EU1388)
213	RNNEMLTWPEKVRFAIGLLPAMVGGQAYVEAQDGLTVTEWMRRQGVPDRVNDDEV	PDS1 (X78815)
208	RNNEMLTWPEKVRFAIGLLPAMVGGQAYVEAQDGLTVKEWMMKRGQVPERVTDDEV	PDS (AY183118)
208	RNNEMLTWPERIKFAIGLLPAMVGGQAYVEAQDGLSVKEWMEKQGVPERVTDDEV	PDS3 (NM_11749)
	FIAMSKALNF INPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLPCMPVVD	Majority
267	FIAMSKALNF INPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLPCMPVVD	NTPDS1 (EU1388)
267	FIAMSKALNF INPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLPCMPIVD	PDS1 (X78815)
262	FIAMSKALNF INPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLPCMPIVD	PDS (AY183118)
262	FIAMSKALNF INPDELSMQCILIALNRFLQEKHGSKMAFLDGNPPERLPCMPVVD	PDS3 (NM_11749)
	HIQSLGGEVQLNSRLQKIELNPDGTVKHFVVLGNGNIITGDAYVVAAPVDILKLL	Majority
321	HIQSLGGRVQLNSRLQKIELNPDGTVKHFVVLGNGNIITGDAYVVAAPVDILKLL	NTPDS1 (EU1388)
321	HIQSLGGRVQLNSRLQKIELNPDGTVKHFVVLGNGNIITGDAYVVAAPVDILKLL	PDS1 (X78815)
316	HIQSLGGEVHLNSRLQKIDLNSDGTVMHFLLSNGNIIRGDAYVVAAPVDIVKLL	PDS (AY183118)
316	HIRSLGGEVQLNSRIKQKIELNDGTVKSEFLITNGSTVEGDAYVVAAPVDILKLL	PDS3 (NM_11749)
	LPQEWKEIPYFKKLDKLVGVPVINVHIWFDRLKNTYDHLFFSRSPLLSVYADM	Majority
375	LPQEWREILYFKKLDKLVGVPVINVHIWFDRLKNTYDHLFFSRSPLLSVYADM	NTPDS1 (EU1388)
375	LPQEWREIPYFQKLDKLVGVPVINVHIWFDRLKNTYDHLFFTRSPLLSVYADM	PDS1 (X78815)
370	LPQEWKEISYFSKLEKLVGVPVINVHIWFDRLKNTYDHLFFSRSPLLSVYADM	PDS (AY183118)
370	LEDPWKEIPYFKKLDKLVGVPVINVHIWFDRLKNTYDHLFFSRSNLLSVYADM	PDS3 (NM_11749)

	SVTCKEYYDPNRSMLLELVFAPAEWISRS DSEI IDATMKELAKLFPDEIAADQS	Majority
429	SVTCKEYYDPNRSMLLELVFAPAEWISRS DSEI IEATMKELAKLLPNEIAADQS	NTPDS1 (EU1388)
429	SVTCKEYYDPNRSMLLELVFAPAEWISRS DSEI IERTMKELAKLFPDEIAADQS	PDS1 (X78815)
424	SVTCKEYYDPNRSMLLELVFAPAEHEWISCS DSEI IDATMKELAKLFPDEISADQS	PDS (AY183118)
424	SVTCKEYYDPNRSMLLELVFAPAEWISRT DSDI IDATMKELAKLFPDEISADQS	PDS3 (NM_11749)
	KAKILKYHVVKTPRSVYKTI PDCEPCRPLQRSP IEGFYLAGDYTRKQYLASMEG	Majority
483	KAKILKYHVVKTPRSVYKTI PDCEPCRPLQRSP IEGFYLAGDYTRKQYLASMEG	NTPDS1 (EU1388)
483	KAKILKYHVVKTPRSVYKTI PDCEPCRPLQRSP IEGFYLAGDYTRNQYLASMEG	PDS1 (X78815)
478	KAKILKYHVVKTPRSVYKTI PDCEPCRPSQRSP FEGFYLAGDYTRKQYLASMEG	PDS (AY183118)
478	KAKILKYHVVKTPRSVYKTI PNCEPCRPLQRSP IEGFYLAGDYTRKQYLASMEG	PDS3 (NM_11749)
	AVLSGKLCQAQSI VQDYELLVAR-SKKASTAEMTVV	Majority
537	AVLSGKLCQAQSI VQDYELLVRR-SKKASTAEMTVV	NTPDS1 (EU1388)
537	AVLSGKLCQAQSI VQDYELLVRR-SKKASTAEMTVV	PDS1 (X78815)
532	AVLSGKLCQAQSI VQDYDLLVAR-SEKCPQPEMTIA	PDS (AY183118)
532	AVLSGKLCQAQSI VQDYELLVAASGPRKLS EATVSSS	PDS3 (NM_11749)

图2 *NTPDS1* 编码的氨基酸序列与其他物种 *PDS* 蛋白的序列比较
Figure 2 Alignment of *NTPDS1* protein with other *PDS* proteins

对 *NTPDS1* 基因编码的蛋白和其他 5 个同源性最高的物种的 *PDS* 蛋白进行系统进化分析发现, *NTPDS1* 与喇叭水仙的 *PDS1* 的遗传距离最近, 之后则是番红花(AY183118)和水稻(AC 079663)。拟南芥(NM_117498)和葡萄(Cu 459224)与 *NTPDS1* 的蛋白质同源性分别为 85% 和 82%, 均高于水稻的 80%, 却未能与 *NTPDS1* 聚在一起(图 3)。

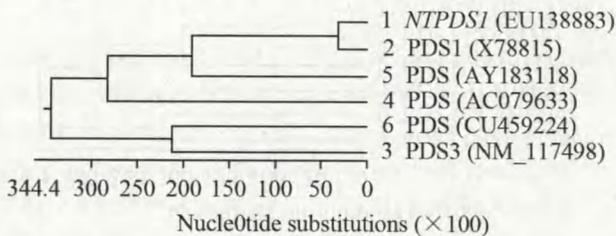


图3 *NTPDS1* 基因编码蛋白的系统进化树分析
Figure 3 Phylogenetic tree analysis of proteins encoded by *NTPDS1* gene

2.3 *NTPDS1* 基因组织表达分析

中国水仙 *NTPDS1* 基因的半定量 PCR 分析结果表明, 开花期的叶片、鳞片、根系和花中均有该基因的表达(图 4), 说明该基因为组成型表达, 但表达量

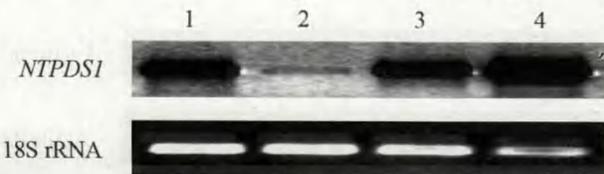


图4 *NTPDS1* 基因在不同器官中的表达
注: 1: 叶片; 2: 鳞片; 3: 根系; 4: 全花
Figure 4 *NTPDS1* gene expression in different organs
Note: 1: Leaf; 2: Scale leaf; 3: Root; 4: Flower

存在明显差异。在花中表达量最高, 其次为叶片和根系, 在鳞片中有微量表达。在花器官的花瓣中表达量最多, 其次为副冠、雄蕊和雌蕊(图 5)。这种表达模式说明, 该基因在中国水仙花色发育中起着重要作用, 尤其是花瓣和副冠的显色方面。



图5 *NTPDS1* 基因在花中不同部位的表达
注: 1: 花瓣; 2: 副冠; 3: 雄蕊; 4: 雌蕊
Figure 5 *NTPDS1* gene expression in different parts of flower
Note: 1: Petal; 2: Corana; 3: Stamen; 4: Pistil

3 讨论

到目前为止, *PDS* 基因已从玉米、水稻、辣椒、拟南芥、喇叭水仙、番茄、柑橘等植物以及盐藻和细菌中分离出来, 而且研究表明, 植物和几种绿藻的 *PDS* 序列存在一些共同的功能结构区域, 所有类胡萝卜素脱氢酶具有的共同特征(朱跃辉等, 2005)。序列分析表明中国水仙 *NTPDS1* 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中国水仙类胡萝卜素脱氢酶的一种。

同时, 系统进化树分析表明 *NTPDS1* 与喇叭水仙的 *PDS1* 的遗传距离最近, 但喇叭水仙大多颜色鲜艳, 有些品种的花瓣和副冠呈亮黄色乃至橘红色, 而中国水仙花瓣一般为白色, 副冠为黄色, 由此推测, *PDS* 基因编码氨基酸的差异可能是造成此差异的因

素之一。

植物类胡萝卜素是许多花和果实中的主要色素,对园艺植物的观赏性起着重要的作用,而八氢番茄红素脱氢酶(PDS)正是类胡萝卜素合成途径中的限速酶之一,该酶表达受到抑制后,会导致八氢番茄红的累积,最终影响类胡萝卜素的合成,所以 PDS 在植物的花和果实显色中起着重要作用 (Bartley and Scolnik, 1995; Kato et al., 2004; Zhu et al., 2002)。中国水仙 *NTPDS1* 基因的表达模式也表明该基因对花朵中类胡萝卜素含量的调控作用。因此,该基因的克隆将有助于深入研究其在中国水仙中的功能及其调控机理,为进一步通过基因工程手段改良中国水仙花色奠定了基础。

参考文献

- Bartley G.E., and Scolnik P.A., 1995, Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health, *Plant Cell*, 7(7): 1027-1038
- Blanchard J.W., 2004, *Narcissus conspectus*, *Plantsman*, 3(11): 44-51
- Chen J.Y., ed., 2001, Chinese flower cultivars taxonomy, China Forestry Press, Beijing, China, pp.1-18 (陈俊愉, 主编, 2001, 中国花卉品种分类学, 中国林业出版社, 中国, 北京, pp.1-18)
- Gao Z.M., Li X.P., Li L.B., and Peng Z.H., 2006, An effective method for total RNA isolation from bamboo, *Chinese Forestry Science and Technology*, 5(3): 52-54
- Huang B.C., Ji J., Wang G., and Zheng Y.X., 2006, Advances of carotenoid in plants, *Tianjin Nongye Kexue (Tianjin Agricultural Sciences)*, 12(2): 13-17 (黄彬城, 季静, 王罡, 郑阳霞, 2006, 植物类胡萝卜素的研究进展, 天津农业科学, 12(2): 13-17)
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M., Hyodo H., and Yano M., 2004, Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit, *Plant Physiol.*, 134(2): 824-830
- Sandmann G., and Mitchell G., 2001, *In vitro* inhibition studies of phytoene desaturase by bleaching ketomorpholine derivatives, *Agric. Food Chem.*, 49(1): 138-141
- Schledz M., Al-Babili S., Von Liting J., Haubruck H., Rabbani S., Kleinig H., and Beyer P., 1996, Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering, *Plant J.*, 10: 781-792
- Simkin A.J., Laboure A.M., Kuntz M., and Sandmann G., 2003, Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves, *Naturforsch.*, 58(5-6): 371-380
- Sun Z.R., Cunningham Jr. F.X., and Gantt E., 1998, Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(19): 11482-11488
- Wu J.H., Lv L.X., and Zhang Z.Z., 2005, A study on genetic relationship among several narcissus cultivars by RAPD markers, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 21(8): 299-301 (吴菁华, 吕柳新, 张志忠, 2005, 用 RAPD 标记研究多花水仙若干品种类型的亲缘关系, 中国农学通报, 21(8): 299-301)
- Zhu C., Yamamura S., Koiwa H., Nishihara M., and Sandmann G., 2002, cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*, *Plant Mol. Biol.*, 48: 277-285
- Zhu C.F., Chen X., and Wang Y.D., 2004, Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering, *Zhiwu Shengli Yu Fenzi Shengwuxue Xuebao (Journal of Plant Physiology and Molecular Biology)*, 30(6): 609-618 (朱长甫, 陈星, 王英典, 2004, 植物类胡萝卜素生物合成及其相关基因在基因工程中的应用, 植物生理与分子生物学学报, 30(6): 609-618)
- Zhu Y.H., Jiang J.G., and Lin Q.S., 2005, Cloning and sequence analysis of phytoene desaturase cDNA from *dunaliella salina*, *Shipin Yu Fajiao Gongye (Food and Fermentation Industries)*, 31(9): 21-23 (朱跃辉, 姜建国, 林庆生, 2005, 盐藻八氢番茄红素脱氢酶 cDNA 的分离及序列分析, 食品与发酵工业, 31(9): 21-23)