

معرفی فایتوئین سنتاز بعنوان یک ژن محدود کننده در بیان کاروتنوئیدها در برگ ذرت (*Zea mays*)

محمد احمدآبادی

استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، کیلومتر ۳۵ جاده تبریز-مراغه، تبریز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کاروتنوئیدها یکی از فراوانترین رنگدانه ها در طبیعت بوده و اهمیت زیادی در رژیم غذایی انسان و دام دارند. بنابراین افزایش میزان کاروتنوئیدها در گیاهان، بخصوص در غلات که غذای اصلی انسان و دام را تشکیل می دهند، می تواند اهمیت فوق العاده ای در افزایش عملکرد و ارزش غذایی گیاه داشته باشد. از میان آنزیمهایی که در مسیر سنتز کاروتنوئیدها دخیل هستند، فایتوئین سنتاز بعنوان یک آنزیم کلیدی شناخته شده است. تاکنون سه نوع آنزیم فایتوئین سنتاز در ذرت کشف شده است، با این حال، تحقیقات نشان داده اند که همه ی این آنزیمها فعالیت یکسانی در تمام بافتها ندارند. اینکه آیا با وجود سه نوع آنزیم فایتوئین سنتاز، افزایش بیان این آنزیم می تواند مسیر سنتز کاروتنوئیدها را در جهت افزایش تولید آنها در گیاه تغییر دهد، تا حدود زیادی ناشناخته است.

مواد و روش ها: کشت بافت و انتقال ژن با استفاده از روش ابداع شده توسط احمدآبادی و همکاران انجام گرفت (۱). برای استخراج DNA از برگهای ذرت، از روش Doyle و Doyle استفاده شد (۵). برای تایید حضور ژنهای خارجی انتقال یافته به گیاهان تراریخت باززا شده، واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. آنالیز محتوای رنگدانه های استخراج شده از گیاهان تراریخت با روش HPLC انجام گرفت.

یافته ها: در این تحقیق، ما از طریق بیان یک ژن فایتوئین سنتاز خارجی در گیاه ذرت، نشان دادیم که این گیاه پتانسیل بسیار بالایی برای افزایش میزان کاروتنوئیدها از طریق بیان ژن فایتوئین سنتاز دارد و بنابراین، ژن فایتوئین سنتاز در گیاه ذرت بعنوان یک ژن محدود کننده در مسیر سنتز کاروتنوئیدها محسوب می شود. گیاهان تراریخت بدست آمده، از نظر رشد، تکامل و عملکرد کاملا مشابه گیاهان غیر تراریخت بودند، در حالی که سطح عمومی کاروتنوئیدها بطور معنی داری افزایش نشان داد. در این میان، بتا-کاروتن که پیش ماده ویتامین A می باشد، به میزان قابل توجهی افزایش نشان داد.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می دهند که ذرت پتانسیل بالایی در افزایش میزان کاروتنوئیدها، بویژه بتا-کاروتن دارد که این ویژگی در برنامه های اصلاحی ذرت در جهت بهبود ارزش غذایی این محصول حائز اهمیت است.

کلمات کلیدی: ذرت، کاروتنوئید، فایتوئین سنتاز، مهندسی ژنتیک

مقدمه

انسان و دام نیز بعنوان آنتی اکسیدانت و پیش ماده ویتامین A اهمیت زیادی دارند (۶). بنابراین، دستکاری مسیر متابولیکی کاروتنوئیدها در جهت افزایش سنتز آنها، می تواند نقش مهمی در افزایش کیفیت و کمیت محصول داشته باشد. با این حال، دستکاری موفق یک مسیر متابولیکی بدون داشتن اطلاعات کافی از نحوه تنظیم آن مسیر ممکن نخواهد بود. مطالعات متعدد روی بیان ژن فایتوئین سنتاز (*PSY*) نشان داده اند که ارتباط نزدیکی بین میزان رونوشتهای این ژن و سطح کاروتنوئیدها وجود دارد (۸، ۱۵) و بنابراین *PSY* بعنوان یک

کاروتنوئیدها شامل گروه بزرگی از ترکیبات متنوع می باشند که در باکتری ها، قارچ ها، جلبک ها و گیاهان یافت می شوند. در گیاهان عالی، این رنگدانه ها در فرایندهای متعددی از قبیل فتوسنتز، تحمل استرس نوری و حرارتی و تولید هورمون آبسزیک اسید دخالت دارند (۱). کاروتنوئیدها در رژیم غذایی

آدرس نویسنده مسئول: تبریز کیلومتر ۳۵ جاده تبریز-مراغه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی
Email: m.ahmadabadi@azaruniv.edu

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۹/۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۲

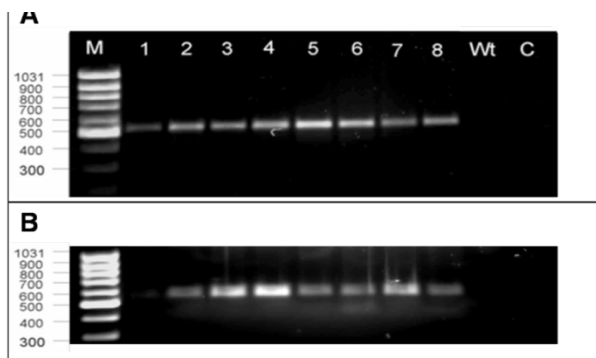
آنزیم محدود کننده که بیان بیشینه‌ی آن می‌تواند باعث افزایش سنتز کاروتنوئیدها شود، معرفی شده است. صحت این نتایج با افزایش بیان این ژن از طریق انتقال یک نسخه از *PSY* خارجی به تعدادی از گیاهان نیز به اثبات رسیده است (۳، ۱۱، ۱۸). با اینکه *PSY* در ژنوم آرآبیدوپسیس تنها به تعداد یک نسخه وجود دارد، اما در اکثر گیاهان زراعی دولپه و تک لپه و بخصوص غلات بیش از یک نسخه *PSY* شناسایی شده است (۱۷). در گیاه ذرت بعنوان یکی از غلات مهم در جهان، تا بحال ۳ نسخه از ژن *PSY* گزارش شده است که همه‌ی آنها پروتئین عملکردی تولید می‌کنند (۷، ۱۳). با بررسی رونوشت‌های این ۳ نسخه در بافتهای مختلف ذرت پیش بینی شده که هر کدام از این نسخه ها برای بیان در بافت ویژه ای تخصص یافته اند (۱۳). با این حال، تا کنون مدارک زیادی برای اثبات اینکه پروتئین حاصل از هر کدام از این نسخه ها نتواند در بافت خاصی از قبیل بافت برگ فعالیت کند ارائه نشده است. با توجه به اینکه مقادیر قابل توجهی از رونوشت‌های هر ۳ نسخه، البته با نسبت‌های متفاوت، در برگ‌های ذرت گزارش شده است (۱۳)، این سوال پیش می‌آید که آیا با وجود بیان این ۳ نسخه در برگ، هنوز هم پتانسیلی برای افزایش سطح کاروتنوئیدها در این بافت از طریق بیان بیشینه‌ی *PSY* وجود دارد؟، و به عبارتی دیگر، آیا با وجود بیان ۳ نسخه *PSY* در برگ‌های ذرت، باز هم این آنزیم در مسیر سنتز کاروتنوئیدها در برگ‌های ذرت محدود کننده می‌باشد؟ بدون بررسی‌های لازم در این خصوص پیش بینی نتایج حاصل از دستکاری مسیر سنتز کاروتنوئیدها در ذرت از طریق بیان ژن *PSY* بسیار سخت و یا حتی غیرممکن خواهد بود. برای پاسخ به این سوالات، در این مطالعه ما یک ژن *PSY* خارجی را تحت کنترل پروموتور عمومی CaMV-۳۵S به گیاه ذرت انتقال داده و نتایج حاصل از بیان این پروتئین در برگ‌ها بعنوان اندام‌های غنی از کاروتنوئید که خود ۳ نسخه از *PSY* داخلی را بیان می‌کنند (۱۲)، مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از بذور هیبرید F۱ تلاقی Pa۹۱×H۹۹ اهدائی پروفیسور بوک از انستیتو ماکس پلانک آلمان استفاده گردید. کشت بافت و انتقال ژن با استفاده از روش ابداع شده توسط احمدآبادی و همکاران (۱) انجام گرفت. برای این منظور قطعات

کوچک برگی از گیاهچه‌های استریل ذرت تهیه و پس از کشت در محیط کالوس زایی $ML\ 1\ G_1$ (۱) در دمای $25\ ^\circ C$ قرار داده شدند. کالوس‌های جنین‌زا پس از تکثیر برای انتقال ژن به روش تفنگ ژنی مورد استفاده قرار گرفتند. در وکتور انتقال ژن، *cdNA* ژن فایتوئین سنتاز (۳) گیاه نرگس تحت کنترل پروموتور $\beta\text{-5S}$ از ویروس موزائیک گل کلم قرار داده شد. پس از شلیک ذرات طلائی پوشیده شده با وکتور انتقال ژن به کالوس‌های جنین‌زا با استفاده از دستگاه تفنگ ژنی، گزینش کالوس‌های تراریخته با استفاده از سیستم گزینش ژن فسفو مانوز ایزومراز (*pmi*) قند مانوز (۱) انجام گرفت. کالوس‌های تراریخت احتمالی که روی محیط حاوی مانوز رشد کردند، پس از تایید اولیه با روش کلروفنل (۱)، روی محیط باززایی حاوی مانوز انتقال یافتند. برای استخراج DNA از برگ‌های ذرت، از روش Doyle و Doyle (۵) استفاده شد. برای تایید حضور فیزیکی ژن‌های انتقال یافته شامل ژن گزینشگر *pmi* و ژن *PSY*، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای هر کدام از این ژنها برای *pmi* جفت پرایمر PMI-F: ACA GCC PMI-R: GTT TGC CAT CAC و ACT CTC CAT TCA TTC CAG، و برای *PSY* جفت پرایمر P۳۵S: TTG AGA GZ۳۵S: CTT TTC AAC AAA GG متصل می‌شود، و PSY-R: GGG ATC TCT ATA GCT و GAA AC که در داخل ژن *PSY* فرود می‌آید) انجام شد. این واکنش شامل ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده از بافت برگی گیاهان تراریخته، ۲۰۰ میکرومول از هر کدام از داکسی نوکلئوتیدها (dNTP)، ۲ میلی مول $MgCl_2$ ، ۸۰ نانوگرم از هر کدام از پرایمرها، و ۲ واحد از آنزیم Taq-DNA پلیمرز بود. برنامه PCR نیز شامل مرحله دناتوراسیون اولیه (۳ دقیقه در $95\ ^\circ C$)، ۳۰ چرخه تکثیر (هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در $95\ ^\circ C$ ، ۳۰ ثانیه در $60\ ^\circ C$ و ۴۵ ثانیه در $72\ ^\circ C$)، و مرحله پایانی (۶ دقیقه در $72\ ^\circ C$) بود. در نهایت، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی گردید. برای اندازه‌گیری سطوح کاروتنوئیدها در برگ‌های گیاهان تراریخته و مقایسه آنها با سطوح کاروتنوئیدها در گیاهان غیر تراریخت، رنگدانه‌ها با روش تایر و یوکمن^۱ (۱۹) از بافت برگ گیاهان تراریخت

۲). همچنین، مشاهده ی قطعه ۶۰۰ جفت بازی از PCR گیاهان تراریخته با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی کاست *PSY*، نشان دهنده انتقال موفق این کاست به درون ژنوم گیاهان تراریخت بود. در هر دو آزمایش، باندهای تکثیر شده، در گیاهان غیرتراریخت وجود نداشتند.



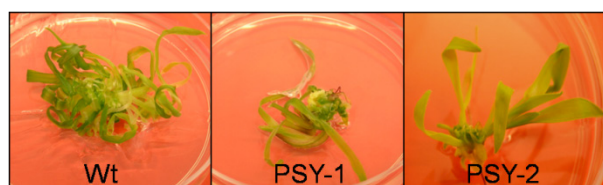
شکل ۲) الکتروفورز نتایج حاصل از آزمایش PCR بر روی DNAهای استخراج شده از گیاهان تراریخته احتمالی. مشاهده باندهای ۵۱۴ جفت بازی (A) و ۶۰۰ جفت بازی (B)، به ترتیب نشان دهنده حضور فیزیکی ژنهای *PSY* و *pmi* خارجی در گیاهان تراریخته (۱-۸) می باشد. گیاهان ۱-۴ و ۵-۸ به ترتیب چهار گیاه باززا شده از دو لاین تراریخت مستقل می باشند. Wt: گیاه غیر تراریخت، C: کنترل منفی (بدون DNA).

آنالیز محتوای رنگدانه های استخراج شده از گیاهان تراریخت با روش HPLC و مقایسه آنها با گیاهان غیرتراریخت نشان داد که سطح عمومی کاروتنوئیدها در گیاهان تراریخت حدود ۱۷٪ نسبت به نوع غیرتراریخت افزایش پیدا کرده است (جدول ۱). نکته ی قابل توجه اینکه، این گیاهان هیچ گونه ناهنجاری مورفولوژیکی نشان ندادند و دارای رشد طبیعی بوده و همانند تیپ غیرتراریخت بذور سالم تولید کردند (داده ها نشان داده نشده اند). بطور کلی، در گیاهان تراریخته، محتوای چندین کاروتنوئید شامل نتوگزانتین (~۲۸٪)، ویولاگزانتین (~۲۰٪) و لوتئین (~۱۶٪) افزایش معنی داری نشان داد. با این حال، میزان زئاگزانتین و آنترگزانتین تقریباً ثابت ماند. عدم افزایش سطح این دو رنگدانه می تواند به وجود چرخه گزانتوفیلی در گیاهان مرتبط باشد. در این چرخه، بسته به شرایط محیطی و بویژه استرس نوری، ویولاگزانتین ابتدا به آنتر- و سپس به زئا-گزانتین تبدیل می شود (۱۴)، ولی در شرایط طبیعی، فعالیت این چرخه در جهت تولید ویولاگزانتین می باشد. لازم به ذکر است که نتایج مشابهی نیز در مطالعات قبلی که بیان ژن *PSY*

و غیر تراریخت که در شرایط کاملاً مشابه بازرایی و پرورش یافته بودند، استخراج شده و بوسیله ی دستگاه HPLC مدل ۱۱۰۰ Agilent جداسازی، شناسایی و اندازه گیری شدند. همه ی رنگدانه ها شامل کاروتنوئیدها، گزانتوفیلها و نیز کلروفیل، در برابر مقادیر شناخته شده از کارتنوتئیدهای استاندارد (Sigma-Aldrich, Germany)، اندازه گیری شده و سپس، میزان آنها بر اساس وزن خشک بافت محاسبه گردید. این آزمایش ۳ بار تکرار شد و هر بار ۳ نمونه اندازه گیری شدند. مقایسه میانگین های حاصل با استفاده از آزمون T-Student انجام گرفت.

یافته ها

در این آزمایشات، پس از چندین مرحله گزینش کالوسهای شلیک شده روی محیط حاوی مانوز، دو کالوس تراریخت مستقل بدست آمد. پس از تایید اولیه کالوسها با روش کلروفیل (۱)، بازرایی گیاهان تراریخت روی محیط حاوی مانوز انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱) بازرایی گیاهان از کالوسهای تراریخت احتمالی پس از انتقال ژن *PSY* با روش تفنگ ژنی و گزینش روی محیط حاوی مانوز. PSY-۱ و PSY-۲: گیاهان باززا شده از دو کالوس تراریخت مستقل، Wt: گیاهان باززا شده از کالوسهای غیر تراریخت بعنوان کنترل.

گیاهان باززا شده پس از ریشه دار شدن در محیط پایه MS (۱۶)، برای رشد به گلخانه انتقال یافتند. رشد و تکامل گیاهان تراریخته کاملاً طبیعی بود و هیچ گونه تفاوت مورفولوژیکی بین آنها و گیاهان غیرتراریخت مشاهده نشد (داده ها نشان داده نشده اند). برای تایید حضور ژنهای خارجی انتقال یافته به گیاهان تراریخت باززا شده، واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی ژن گزینشگر *pmi* و ژن *PSY* بر روی DNA ژنومی استخراج شده از برگهای گیاهان تراریخته انجام گرفت. تکثیر یک قطعه ۵۱۴ جفت بازی از ژنوم گیاهان تراریخته با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن *pmi* حضور فیزیکی این ژن در ژنوم گیاهان تراریخت را تایید کرد (شکل

را در گیاه آرابیدوپسیس تشدید کرده بودند، مشاهده شده است (۱۴).

جدول (۱) محتوای کاروتنوئید و کلروفیل در برگهای گیاهان غیرتراریخت و تراریخته ذرت با بیان بیشینه PSY. لاینهای ۱ و ۲، دو لاین تراریخت مستقل می باشند. مقادیر کاروتنوئیدها بر اساس μg در هر گرم وزن خشک برگ نشان داده شده اند.

نام ترکیب	گیاه غیرتراریخت	لاین ۱	لاین ۲
نوگزانترین	$57/9 \pm 4/1$	$76/4 \pm 7/5^{***}$	$75/3 \pm 6/5$
ویولاگزانتین	$279/1 \pm 13/6$	$320/4 \pm 9/2$	$326/2 \pm 18/2^{***}$
انترگزانتین	$213/4 \pm 8/4$	$37/0^a$	$207/5 \pm 5/7^{n.s.}$
لوتئین	$561/9 \pm 54/6$	$760/0 \pm 21/3$	$755/2 \pm 33/3^{***}$
زناگزانتین	$102/6 \pm 8/9$	$11/3^{n.s.}$	$6/1^{n.s.}$
کلروفیل B	$3318/0 \pm 238/6$	$3541/8 \pm 151/6^*$	$3562/6 \pm 180/2^*$
کلروفیل A	$12027/0 \pm 795/8$	$12595/9 \pm 718/6^{n.s.}$	$12653/7 \pm 520/5^*$
بتا-کاروتن	$108/4$	$93/8^{***}$	$100/3^{***}$
مقدار کل کاروتنوئیدها	$2615/7 \pm 191/4$	$3053/2 \pm 85/4^{***}$	$3043/4 \pm 98/6^{***}$
مقدار کل کلروفیل ها	$1024/8$	$16137/6 \pm 867/8^{n.s.}$	$16216/3 \pm 698/3^{n.s.}$

مقادیری که در مقایسه با نوع غیرتراریخت اختلاف معنی داری داشتند با ستاره علامت گذاری شده اند. "****": معنی دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد، "***": معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، "a": مقدار در سطح احتمال ۵ درصد کاهش معنی دار داشته است، "n.s.": تفاوت از نظر آماری غیر معنی دار بود.

بحث

تا بحال گزارشهای متعددی از افزایش سطح کاروتنوئیدها در برخی گیاهان از طریق بیان بیشینه PSY چاپ شده اند (۹)، با این حال، این مطالعه اولین گزارش در خصوص بیان بیشینه این آنزیم در ذرت می باشد. بطور کلی، نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که با وجود شناسایی ۳ نسخه متفاوت از ژن PSY در ذرت (۷، ۱۳)، این آنزیم هنوز در بافتی مانند برگ که مقادیر زیادی از کاروتنوئیدها را تولید می کند، محدود کننده می باشد و بنابراین، با افزایش بیان آن می توان پتانسیل تولید کاروتنوئیدها را در ذرت، بدون هر گونه اثر منفی روی رشد و تکامل گیاه، افزایش داد. نکته جالب اینکه، با وجود رقابت مسیرهای سنتز کاروتنوئیدها و کلروفیل در استفاده از پیش ماده مشترک این دو مسیر، بیان بیشینه PSY و افزایش تولید کاروتنوئیدها، نه تنها تاثیر منفی روی سطح تولید کلروفیل ها

نگذاشت، بلکه مقادیر آنها تا حدودی نیز افزایش نشان داد. افزایش میزان کلروفیل به موازات افزایش میزان کاروتنوئیدها در بیان بیشینه PSY در برخی گیاهان دیگر از قبیل توتون و آرابیدوپسیس نیز مشاهده شده است (۴، ۱۴). با این حال، در برخی از آزمایشات، نتایج متفاوتی بدست آمده است (۹). با توجه به اینکه در کلروپلاستها، اکثر مولکولهای کاروتنوئید با کلروفیل و پروتئینهای درگیر در فرایند فتوسنتز، کمپلکس تشکیل می دهند (۲)، بنابراین می توان گفت که در شرایط عدم کمبود پیش ماده، میزان کلروفیل برگها نیز برای حفظ نسبت کاروتنوئید به کلروفیل افزایش پیدا می کند. نتیجه جالب دیگر اینکه، علاوه بر افزایش معنی دار سطح عمومی کاروتنوئیدها در گیاهان تراریخت، سطح بتا-کاروتن برگهای این گیاهان نیز در مقایسه با تیپ غیرتراریخت حدود ۲۱ درصد افزایش یافته بود. این نتایج نشان می دهد که برگهای ذرت، که بخش عمده بیوماس این گیاه را تشکیل می دهند، پتانسیل بسیار بالایی برای افزایش میزان بتا کاروتن از طریق دستکاری مسیر سنتز کاروتنوئیدها دارند، که این مسئله می تواند در تولید علفه دامی با ارزش غذایی بالاتر از اهمیت فوق العاده ای برخوردار باشد.

منابع

1. Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res*, 2007; 16(4):437-448.
2. Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J*, 2004; 40(2):188-199.
3. Burkhardt PK, Beyer P, Wunn J, Klott A, Armstrong GA, Schledz M, von Lintig J, Potrykus I. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J*, 1997; 11(5):1071-1078.
4. Busch M, Seuter A, Hain R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, 2002; 128(2):439-453.
5. Doyle J, Doyle J. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 1990; 12:13-15.
6. Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, 2004; 43(3):228-265.
7. Gallagher CE, Matthews PD, Li F, Wurtzel ET. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiol*, 2004; 135(3):1776-1783.
8. Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell*, 1993; 5(4):379-387.
9. Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol*, 2008; 26(3):139-145.
10. Havaux M, Dall'osto L, Bassi R. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol*, 2007; 145(4):1506-1520.
11. Howitt CA, Pogson BJ. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, cell & environment*. 2006; 29(3):435-445.
12. Li F, Tsfadia O, Wurtzel ET. The phytoene synthase gene family in the Grasses. subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis. *Plant Signal Behav*, 2009; 4(3):208-211.
13. Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol*, 2008; 146(3):1333-1345.
14. Lindgren LO, Stalberg KG, Hoglund AS. Seed-specific over-expression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiol*, 2003; 132(2):779-785.
15. Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, Dellapenna D. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol Biol*, 2001, 45(3):281-293.
16. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962; 15:473-497.
17. Qin X, Coku A, Inoue K, Tian L. Expression, subcellular localization, and cis-regulatory structure of duplicated phytoene synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Planta*, 2011; 234(4):737-748.
18. Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY. Seed-specific over-expression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J*, 1999; 20(4):401-412X.
19. Thayer SS, Bjorkman O. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis research*, 1990; 23:331-343.