

调控红花类黄酮合成 MYB 转录因子基因克隆及表达分析

陈江^{1,2}, 唐小慧^{1,2}, 任超翔^{1,2}, 裴瑾^{1,2*}, 吴沂芸^{1,2}, 吴清华^{1,2}, 王黎^{1,2}, 王倩^{1,2}

1. 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 在红花 *Carthamus tinctorius* 中克隆调控类黄酮合成的 MYB 转录因子基因, 通过序列及表达分析初步鉴定参与调控类黄酮合成的 MYB 转录因子基因。方法 对已报道调控类黄酮合成 MYB 转录因子进行序列比对, 设计简并引物克隆核心序列, 采用 RACE 技术克隆 MYB 转录因子基因全长, 利用生物信息学方法分析基因序列, 采用半定量 PCR 分析基因在红花不同组织及不同花期的表达情况。结果 克隆得到 3 个调控类黄酮合成候选 MYB 转录因子基因, 命名为 CtFRMYB1、CtFRMYB2 及 CtFRMYB3。序列全长分别为 1 223、1 080、1 348 bp, 蛋白质相对分子质量分别为 17 878.15、28 766.45、27 987.89。序列分析表明 3 个转录因子都具 DNA 结合功能, 属 MYB 转录因子家族。进化分析表明 CtFRMYB1 和 CtFRMYB2 同 AtMYB12 关系较近。表达分析表明 CtFRMYB1 和 CtFRMYB2 仅在花中表达且在花期 3 (开花第 3 天) 表达量较高。结论 成功克隆 3 个调控类黄酮合成候选 MYB 转录因子基因 CtFRMYB1、CtFRMYB2 及 CtFRMYB3, 经生物信息学及表达分析初步鉴定到 2 个调控红花类黄酮合成 MYB 转录因子基因 CtFRMYB1 及 CtFRMYB2, 为红花类黄酮合成的调控机制研究奠定基础。

关键词: 红花; 类黄酮; MYB 转录因子; 基因克隆; RACE; 序列分析; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4523-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.025

Cloning and expression analysis of MYB transcription factor gene involved in regulation of flavonoids biosynthesis in *Carthamus tinctorius*

CHEN Jiang^{1,2}, TANG Xiao-hui^{1,2}, REN Chao-xiang^{1,2}, PEI Jin^{1,2}, WU Yi-yun^{1,2}, WU Qing-hua^{1,2},
WANG Li^{1,2}, WANG Qian^{1,2}

1. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

2. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To clone the MYB transcription factor gene in safflower, the sequence information and gene expression were analyzed to preliminarily identify the MYB transcription factor gene involved in regulation of flavonoid biosynthesis. **Methods** All the sequences of MYB transcription factor gene that was reported to involved in regulation of flavonoid biosynthesis were analyzed. The degenerate primers were designed to clone the core sequence. The full length of MYB transcription factor genes were cloned by RACE. The bioinformatics were used to analyze the sequences. The expression of MYB transcription factor genes in different tissues and different developmental stages of flower were analyzed by semi-quantitative PCR. **Results** Three candidate MYB transcription factors were cloned, named as CtFRMYB1, CtFRMYB2 and CtFRMYB3. The full lengths of the sequence were 1 223 bp, 1 080 bp and 1 348 bp, respectively. And the molecular weight were 17 878.15, 28 766.45 and 27 987.89, respectively. All three transcription factors have DNA binding domain and belong to the MYB family. Homologous analysis showed that CtFRMYB1 and CtFRMYB2 were closely related to AtMYB12. Expression analysis showed that CtFRMYB1 and CtFRMYB2 were only expressed in flowers, and the expression level was higher in flowering stage 3. **Conclusion** Three candidate MYB transcription factor genes involved in regulation of flavonoid biosynthesis (CtFRMYB1, CtFRMYB2 and CtFRMYB3) were successfully cloned. Two MYB transcription factor genes (CtFRMYB1 and CtFRMYB2) were identified by bioinformatics and expression analysis. These result laid a foundation for the molecular mechanism analysis of flavonoid biosynthesis.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; flavonoids; MYB transcription factor; gene clone; RACE; sequence analysis; expression analysis

收稿日期: 2017-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573544); 四川省科技支撑计划 (2014SZ0156); 成都中医药大学校基金 (ZRY1610, ZRQN1647)

作者简介: 陈江 (1986—), 男, 讲师, 主要从事药用植物资源鉴定及次生代谢调控研究。Tel: 13096363851 E-mail: janshen1986@163.com

*通信作者 裴瑾 (1970—), 女, 教授, 主要从事中药品质与资源开发。Tel: 13880369322 E-mail: peixjin@163.com

红花是菊科一年生草本植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 具有活血通经、祛瘀止痛的功效, 为活血化瘀常用中药。红花黄酮类成分, 特别是羟基红色素 A、山柰酚等化合物为红花活血化瘀主要有效成分, 其量高低直接影响了红花的品质。调控类黄酮合成相关转录因子的研究, 不仅为解析红花类黄酮合成分子调控机制、阐明红花有效成分的积累规律奠定基础, 同时对应用生物技术提高红花品质、培育优质红花品种具有重要意义。

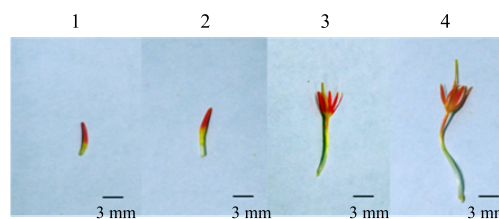
MYB 转录因子广泛参与调控类黄酮的合成, 国内外已有多篇文章进行了综述^[1-3]。在拟南芥中, 较早发现并证实的调控类黄酮合成的 MYB 转录因子基因为 AtMYB12^[4], 其能单独结合类黄酮合成早期基因启动子, 如查耳酮合成酶基因 (CHS)、查耳酮异构酶基因 (CHI) 及黄酮醇羟化酶基因 (F3H) 等基因启动子, 调控类黄酮合成功能基因表达, 影响类黄酮的合成。AtMYB12 同源基因 AtMYB11 和 AtMYB111 也被证明参与调控类黄酮的合成^[5]。同时, 在其他物种中也发现了调控类黄酮合成 MYB12 的同源基因, 如番茄 SIMYB12^[6]、龙胆花 GtMYBP3 和 GtMYBP4^[7]。在红花中, 调控类黄酮合成的 MYB 报道较少。

本研究主要参考拟南芥相关报道^[4,8], 重点分析 AtMYB12, 同时对已报道的参与调控类黄酮合成的 MYB 转录因子基因序列进行分析。设计简并引物, 克隆调控类黄酮合成 MYB 转录因子核心区域, 再利用 RACE 技术对调控红花类黄酮合成 MYB 转录因子基因全长进行克隆。此外, 实验还对克隆到的 MYB 转录因子基因序列及表达进行分析, 初步鉴定参与调控类黄酮合成的 MYB 转录因子基因, 为解析红花类黄酮合成分子调控机制及应用生物技术提高红花品质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

红花种子采自新疆塔城县地方老品种, 2015 年种植成都中医药大学温江校区药用植物园。经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L.。取幼苗期的根、茎、叶, 同时取不同发育时期的花 (图 1), 时期 1 对应红花开花前第 4 天, 时期 2 对应红花开花前第 1 天, 时期 3 对应红花开花第 3 天, 时期 4 对应红花开花第 5 天。田间取样后立即将样品在液氮中冷冻, 储存于 -80 °C 冰箱备用。根、茎、叶及花用于基因在不同组织表达分析, 不同发育时期的花用于基因表达谱分析。



1~4 表示取样的 4 个花期

1—4 indicates four stages of flower development used in the experiment

图 1 不同发育时期的花

Fig. 1 Flowers at different developmental stages

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 冷冻的红花材料液氮研磨, 用 TRIzol (Tiangen, 中国) 进行裂解, 利用 TRIzol 伴侣试剂盒 (Tiangen, 中国) 进行 RNA 提取, 具体实验方法见商品使用说明书。提取的 RNA 通过用凝胶电泳进行完整度检测, 通过 NanoDropTM 分光光度计 ND1000 (Thermo Fisher Scientific, 澳大利亚) 进行浓度测定。利用试剂盒 RR047A (Takara, 中国) 在 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国) 上进行 RNA 的反转录。RNA 提取和反转录过程中的耗材为去除 RNA 酶的材料。

1.2.2 调控类黄酮合成 MYB 转录因子核心序列的克隆 使用红花各组织部位混样的 cDNA 作为克隆模板, 通过对已报道调控类黄酮 MYB 转录因子序列分析, 设计简并引物 (正向: 5'-GRBTDMGRAARGGTKCWTGGA-3'; 反向: 5'-GCWATHARDGAC CAYCTRTT-3') 进行 PCR 反应, 克隆核心序列。反应程序如下: 94 °C、5 min, 94 °C、30 s, 42 °C、30 s, 72 °C、1 min, 35 个循环, 72 °C、7 min。产生具有预期大小的 DNA 片段, 利用胶回收试剂盒回收片段, 克隆到载体 pMD19-T (Takara, 中国), 挑取单克隆并送擎科测序 (Tsingke, 中国)。

1.2.3 RACE 技术克隆全长 使用 SMART 快速扩增法 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 系统 (BD-Clontech, Palo Alto, 美国) 对核心序列 5' 和 3' 端进行扩增。首先用 5'-RACE CDS Primer 和 3'-RACE CDS Primer 分别反转录用于 5' 和 3' 端扩增的 cDNA。其次, 利用试剂盒自带的 UPM 为引物, 同时设计核心序列特异引物 GSP, 分别以反转录的 5' 和 3' 端扩增用 cDNA 为模板, 克隆 5' 和 3' 端的侧翼序列。得到 5' 和 3' 端的侧翼序列后, 对序列进行拼接, 得到全长序列。

根据全长序列, 设计全长克隆引物, 对全长进

行克隆。克隆的 PCR 片段经胶回收后,克隆到载体 pMD19-T (Takara, 中国) 中,挑取单克隆送擎科 (Tsingke, 中国) 测序。

1.2.4 序列分析 利用 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行序列比对和查找,使用 ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) 对序列开发阅读框及氨基酸进行预测,使用 ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) 对蛋白质的相对分子质量、等电点、平均疏水性进行分析,使用 GO (http://www.geneontology.org/) 及 Pfam (http://pfam.xfam.org/) 对克隆基因进行功能注释。使用 DNAMAN 软件 (版本 4.0, Lynnon Biosoft, Quebec, 加拿大) 进行核苷酸序列和蛋白质比对的分析。使用 MEGA 4.0 软件^[9]进行进化树分析。实验中克隆的 3 个基因分别为命名为 CtFRMYB1、CtFRMYB2 及 CtFRMYB3。

1.2.5 半定量 PCR 实验 利用 Primer 5 设计定量引物,以红花 60 S 为内参,实验中克隆到的 3 个基因及内参基因定量引物见表 1。使用 2X PCR mix (Tiangen, 中国) 进行半定量 PCR 实验。反应体系如下: 10 μ L 2 $\times$ PCR mix, 1 μ L cDNA 模板 (40 ng 左右), 正向引物和反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 加 H₂O 至 20 μ L。首先利用内参基因 PCR 反应的凝胶电泳条带亮度来调整转录因子 PCR 反应时需加模板量,PCR 模版量调整好后,再进行目的转录因子基因的半定量 PCR 反应,通过凝胶电泳检测各转录因子基因表达量。由于内参基因表达量较高,而转录因子表达量较低,因而各自半定量 PCR 时反应程序有区别。实验中 60 S 内参基因半定量 PCR 程序如下: 94 $^{\circ}$ C、5 min, 94 $^{\circ}$ C、

表 1 基因半定量引物

Table 1 Gene primers for semi-quantitation	
基因名	序列 (5'→3')
CtFRMYB1	F: ACTCACCTTATTAGTTAGA R: TCAGAAACATATCATTGT
CtFRMYB2	F: TTCTATGCTTCAAAACAC R: ATGACATGCTTAAGGATT
CtFRMYB3	F: CGCTAGGTTTGGGAACAA R: CGCTAATCCGAATTTCATG
60 S (内参)	F: CATCCATTATCCAACAATC R: AAGAGTAATCAGTCTCCA

30 s, 56 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 20 个循环, 72 $^{\circ}$ C、5 min。转录因子基因半定量 PCR 程序如下: 94 $^{\circ}$ C、5 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 56 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C、5 min。

2 结果

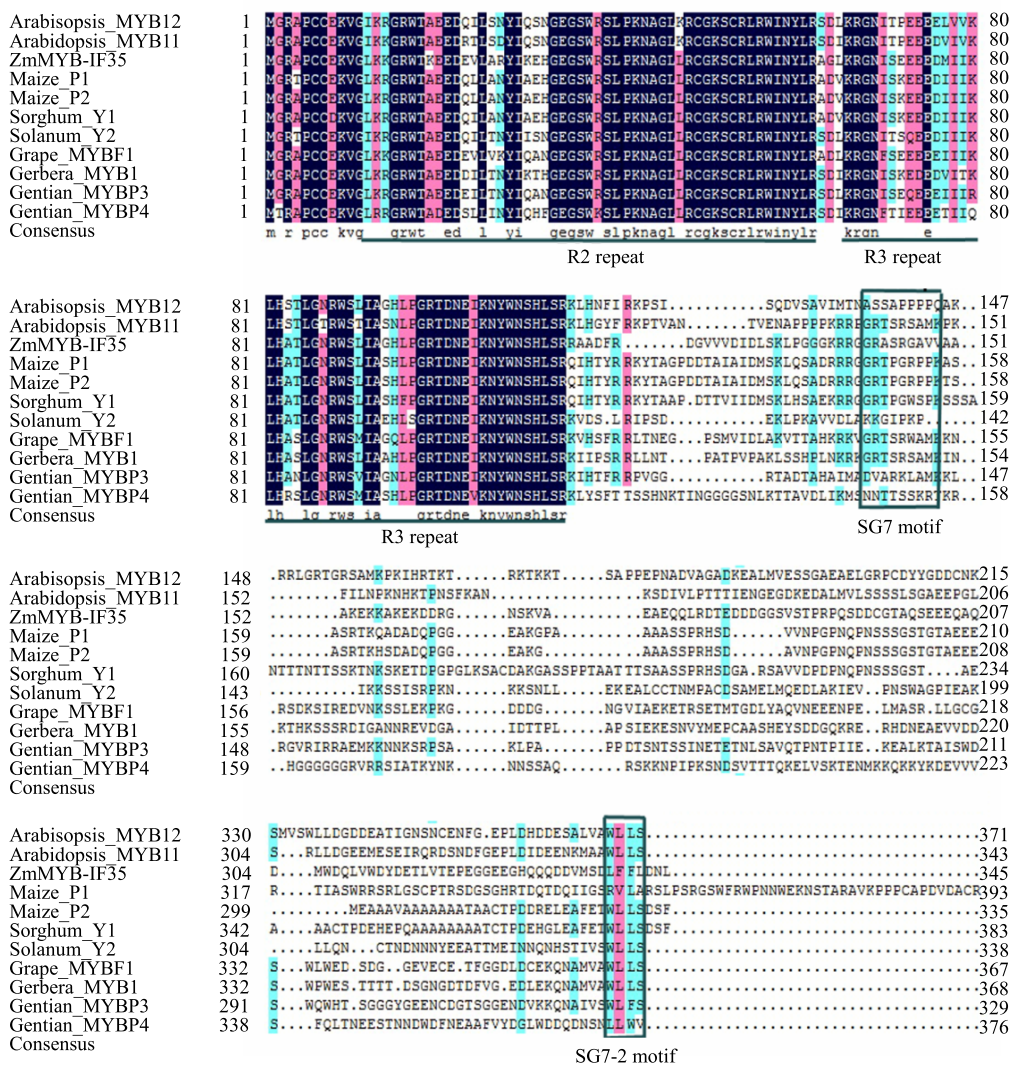
2.1 调控类黄酮合成 MYB 转录因子序列分析

经 ATMYB12 在 NCBI 中比对后,实验选择了 11 个已报道具调控类黄酮合成功能的转录因子进行分析,包括玉米类黄酮合成调控基因 P1 和 P2 及番茄类黄酮合成调控基因 SIMYB12 等 (表 2)。蛋白序列比对分析表明所有调控类黄酮合成的 MYB 转录因子在 N 端较为保守,特别是在 R2R3 结构域上相似性较高,而在 C 端结构差异较大。虽然 MYB 转录因子在 C 端结构差异较大,但是在 C 端仍然存在 2 个较为保守的结构域 SG7 (GRTxRSxMK) 和 SG7-2 ([W/x] [L/x]LS) (图 2)。研究报道^[10-11], SG7 和 SG7-2 结构域是调控类黄

表 2 调控类黄酮合成转录因子基因信息

Table 2 Transcription factor gene information of flavonoids synthesis

基因名	登录号	物种	功能
P1	M73028	maize	属于 MYB 同源基因,负责调节玉米果皮及穗轴中类黄酮色素的合成
P2	AF210616	maize	P1 进化复制产生,在花药和花丝中行使功能
Y1	AY860968	sorghum	负责果皮、颖片及叶片中鞣红的调控合成
MYB1	AJ554697	gerbera	未知
SIMYB12	EU419748	tomato	调节番茄果实中的类黄酮的生物合成
MYB11	NM_116126	<i>Arabidopsis</i> sp.	调节查耳酮合成酶基因及黄酮醇合成基因的表达,主要在顶端分生组织中行使功能
MYB12	DQ224277	<i>Arabidopsis</i> sp.	调节查耳酮合成酶基因及黄酮醇合成基因的表达,主要在根中行使功能
MYBF1	FJ948477	grape	激活黄酮醇合成酶及其他几个参与黄酮醇合成基因的其他几个启动子
MYBP3	AB733016	gentian	增强查耳酮合成酶基因的启动子活性及类黄酮合成早期生物合成基因的启动子活性
MYBP4	AB289446	gentian	增强查耳酮合成酶基因的启动子活性及类黄酮合成早期生物合成基因的启动子活性
ZmMYB-IF35AF521880.1		maize	结合 A1 启动子,但不激活其表达



R2 repeat 和 R3 repeat 为 R2R3 类 MYB 转录因子典型结构域, SG7 和 SG7-2 为调控类黄酮合成特殊结构域

R2 repeat and R3 repeat are typical domains of the R2R3 MYR transcription factor, SG7 and SG7-2 are special domains for the regulation of flavonoid synthesis

图 2 MYB 转录因子蛋白序列比对

Fig. 2 Protein sequence alignment of MYB transcription factor

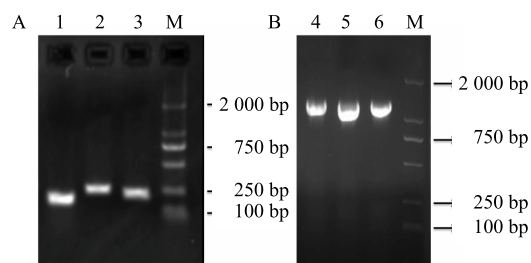
酮 MYB 类转录因子的特征之一。

2.2 调控红花类黄酮合成 MYB 转录因子基因全长克隆

根据调控类黄酮核心序列设计简并引物 (F: 5'-GRBTDMGRAARGGTCWGTGA-3'; R: 5'-GCWATHARDGACCAYCTRTT-3'), 克隆 MYB 核心序列。经第 2 轮菌液 PCR 后, 实验得到了 3 个核心片段 (图 3-A)。利用 RACE 分别对 3 个核心序列的 3'端和 5'端进行克隆, 再对基因全长进行克隆。实验成功克隆了 3 个全长基因 (图 3-B)。克隆得到的 3 个基因分别命名为 CtFRMYB1、CtFRMYB2 和 CtFRMYB3。

2.3 调控红花类黄酮合成 MYB 转录因子基因序列分析

克隆的 3 个基因 CtFRMYB1、CtFRMYB2 和



1~3-3 个核心序列 4~6-CtFRMYB1、CtFRMYB2、CtFRMYB3
M-Marker

1—3-3 core sequences 4—6-CtFRMYB1, CtFRMYB2, and CtFRMYB3 M-Marker

图 3 核心序列 (A) 及 CtFRMYB1、CtFRMYB2 和 CtFRMYB3 (B) 全长克隆

Fig. 3 Core sequence cloning (A) and full-length cloning of CtFRMYB1, CtFRMYB2, and CtFRMYB3 (B)

CtFRMYB3 序列已上传至 NCBI，登录号分别为 KY554784、KY554785 和 KY554786。其中，CtFRMYB1 全长 1 223 bp，CtFRMYB2 全长 1 080 bp，CtFRMYB3 全长 1 348 bp。利用常用生物信息学网站及软件，对克隆的转录因子基因序列进行分析（表 3）。3 个转录因子预测蛋白质相对分子质量分别为 17 878.15、28 766.45 及 27 987.89，注释结果显示 3 个转录因子都具有 DNA 结合功能，属

MYB 类转录因子。
近期官丽莉等^[12]在红花中克隆得到一个 MYB 转录因子基因 CtMYB1，实验将克隆到的 3 个转录因子基因 CtFRMYB1、CtFRMYB2 和 CtFRMYB3 同红花中已报道的 CtMYB1 及拟南芥中调控类黄酮合成基因 AtMYB12 进行进化分析（图 4）。结果表明，相对于 CtMYB1、CtFRMYB3、CtFRMYB1 和 CtFRMYB2 同 AtMYB12 亲缘关系更为接近。

表 3 MYB 转录因子基因序列信息
Table 3 Information of MYB transcription factor gene sequence

基因名	全长/bp	开放阅读框/bp	氨基酸/aa	相对分子质量	等电点	平均疏水性	GO 注释	Pfam 注释
CtFRMYB1	1 223	489	162	17 878.15	4.82	-0.307	DNA 结合功能	Myb 类蛋白
CtFRMYB2	1 080	741	246	28 766.45	8.18	-0.787	DNA 结合功能	Myb 类蛋白
CtFRMYB3	1 348	804	267	27 987.89	8.58	-0.324	DNA 结合功能	Myb 类蛋白

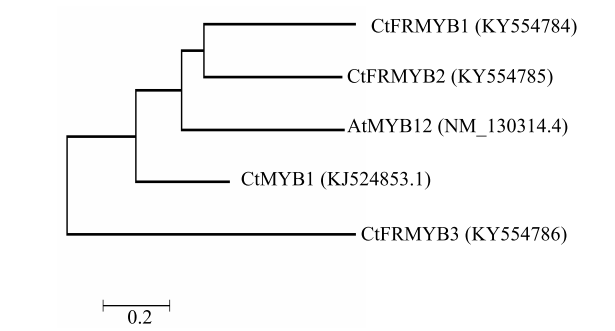


图 4 MYB 序列分析

Fig. 4 Evolution analysis of MYB transcription factor gene sequence

2.4 调控红花类黄酮合成 MYB 转录因子基因表达分析

实验对 CtFRMYB1、CtFRMYB2 和 CtFRMYB3 基因表达进行了分析。首先，提取红花不同组织部位（叶、茎、根及花）RNA（图 5-A），采用半定量 PCR 对 3 个 MYB 转录因子基因在不同组织部位表达进行分析。结果表明，CtFRMYB1 和 CtFRMYB2 在花中表达，而在叶、茎及根中不表达，CtFRMYB3 则在叶、茎、根及花中均有表达（图 6-A）。

此外，实验提取了花发育不同时期的 RNA（图 5-B），同样利用半定量 PCR 对 3 个 MYB 转录因子基因在花发育不同时期表达进行分析。结果表明，CtFRMYB1 和 CtFRMYB2 在 4 个发育期都有表达，且在时期 3 表达量较高，而 CtFRMYB3 在 4 个时期都有表达，但在 4 个发育时期表达量变化不大，且

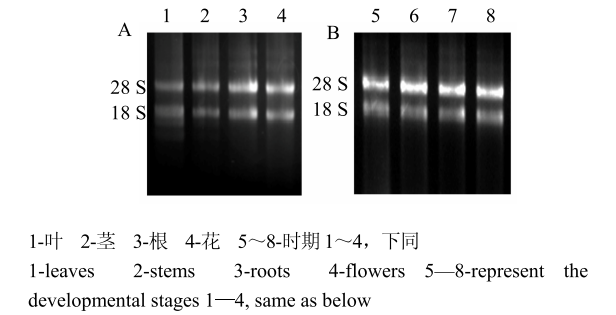


图 5 不同组织 (A) 及不同发育期 (B) RNA 图
Fig. 5 RNA of different tissues (A) and different developmental stages of flowers (B)

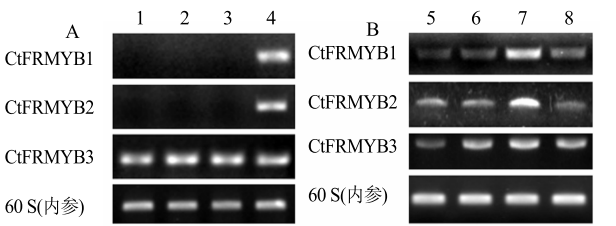


图 6 不同组织 (A) 及不同发育期 (B) CtFRMYB1、CtFRMYB2 和 CtFRMYB3 表达分析
Fig. 6 Expression analysis of CtFRMYB1, CtFRMYB2, and CtFRMYB3 of different tissues (A) and different developmental stages of flowers (B)

都有较高表达量（图 6-B）。

3 讨论

红花黄酮类成分，特别是羟基红色素 A、山奈酚等化合物，为红花活血化瘀主要有效成分，其量高低直接影响了红花的品质，调控其合成提高红花

品质具有重要意义。然而,当前红花中有关红花类黄酮合成的研究多集中在了功能基因的克隆,例如李亚葵^[13]对 CHS 进行了克隆,朱振贤^[14]对 F3H 进行了克隆,刘飞^[15]对多个类黄酮功能基因进行了克隆(包括 CHS、CHI 等)。近来,Huang 等^[16]及 Li 等^[17]分别利用高通量技术,也筛选和鉴定了黄酮类成分合成相关功能基因。同时本课题组也对 CHS^[18]及 CHI^[19]进行了克隆。

相对于红花类黄酮功能基因的研究,红花类黄酮合成的调控研究较少。MYB 转录因子作为一类重要的调控因子,广泛参与黄酮类合成的调控,已是黄酮类化合物合成研究领域的热点之一^[1-3]。而在红花中,仅 CtMYB1 被克隆^[12]。本研究利用 RACE 方法,成功从红花中克隆到 3 个 MYB 转录因子(CtFRMYB1、CtFRMYB2 及 CtFRMYB3)。将红花中克隆的 CtMYB1 及拟南芥 AtMYB12 同本实验克隆的 3 个基因进行进化分析,结果表明 CtFRMYB1、CtFRMYB2 与 AtMYB12 关系较近,而 CtMYB1 和 CtFRMYB3 同 AtMYB12 关系较远。AtMYB12 被报道能结合类黄酮合成早期基因启动子调控类黄酮的合成^[4],这表明相对于 CtMYB1 和 CtFRMYB3, CtFRMYB1 和 CtFRMYB2 更可能参与调控类黄酮的合成。

红花中类黄酮的积累主要在花中积累,且在开花 3 d 左右(本实验时期 3)有快速积累^[20]。与此同时,红花类黄酮合成功能基因,如 CHS^[18]及 CHI^[19]等在 3 d 左右表达量最高。实验对克隆的 3 个 MYB 转录因子基因表达进行了分析,CtFRMYB1、CtFRMYB2 仅在红花中表达且在时期 3 表达量较高,这与红花类黄酮的积累及相关功能基因的表达趋势一致,暗示了 CtFRMYB1、CtFRMYB2 更可能参与红花类黄酮调控。后续实验将进一步对克隆的 CtFRMYB1、CtFRMYB2 进行功能验证。本研究在红花中成功克隆到 3 个调控类黄酮合成 MYB 转录因子基因,通过序列及表达分析初步鉴定到 2 个调控类黄酮合成候选基因,为红花类黄酮合成的调控深入研究奠定基础。

参考文献

[1] Lai Y, Li H, Yamagishi M. A review of target gene specificity of flavonoid R2R3-MYB transcription factors and a discussion of factors contributing to the target gene selectivity [J]. *Frontiers Biol*, 2013, 8(6):

577-598.

- [2] Liu J, Osbourn A, Ma P. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(5): 689-708.
- [3] 邢文, 金晓玲. 调控植物类黄酮生物合成的 MYB 转录因子研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(3): 689-696.
- [4] Mehrrens F, Kranz H, Bednarek P, *et al.* The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2): 1083-1096.
- [5] Stracke R, Ishihara H, Huep G, *et al.* Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling [J]. *Plant J*, 2007, 50(4): 660-677.
- [6] Ballester A R, Molthoff J, De V R, *et al.* Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: deregulated expression of the gene encoding transcription factor SlMYB12 leads to pink tomato fruit color [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(1): 71-84.
- [7] Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, *et al.* Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers [J]. *J Exper Bot*, 2012, 63(18): 6505-6517.
- [8] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, *et al.* MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573-581.
- [9] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [10] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(5): 447-456.
- [11] Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, *et al.* The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1513-1530.
- [12] 官丽莉, 张雪, 韩怡来, 等. 红花转录因子 CtMYB1 基因的克隆及原核表达 [J]. *中草药*, 2015, 46(17): 2603-2609.
- [13] 李亚葵. 红花的组织培养及品质相关的基因克隆 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.

- [14] 朱振贤. 红花的组织培养和品质相关基因的克隆及分析 [D]. 南京: 南京林业大学, 2011.
- [15] 刘 飞. 红花黄酮类化合物生物合成途径关键酶基因的克隆与功能验证 [D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [16] Huang L, Yang X, Sun P, *et al.* The first illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38653.
- [17] Li H, Dong Y, Yang J, *et al.* De novo transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30987.
- [18] 康亚兰, 裴 瑾, 刘 薇, 等. 红花查尔酮合成酶基因的克隆、生物信息学分析及表达 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2385-2389.
- [19] 陈翠平, 裴 瑾, 吴沂芸, 等. 红花查尔酮异构酶基因的克隆分析表达及 HSYA 动态累积关系 [J]. 中药材, 2016, 39(3): 499-503.
- [20] 张 雪. 红花黄色素生物合成转录因子基因 CtMYB1 的克隆、表达分析及功能初步研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.