

• 药材与资源 •

红花 CtWD40 基因克隆及表达分析

董园园¹, 李俊锋², 彭鸿远², 王一非², 王 刚¹, 王丽艳¹, 姚 娜¹, 刘秀明¹, 李海燕^{1,2*}

1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

摘要:目的 克隆红花 WD40 (CtWD40) 转录因子, 分析其不同组织间的表达水平及与红花羟基黄酮素含量的相关性。方法 以红花花瓣转录组 WD40 候选基因为参考, 克隆获得 CtWD40 基因序列。同时对该转录因子保守结构域、蛋白三维结构及系统发育等内容进行生物信息学分析, 荧光定量 PCR 方法研究了该基因在红花不同组织中基因表达差异, 并采用 HPLC 法测定红花各花期花瓣中羟基红花黄酮素 A 含量。结果 成功克隆 CtWD40 基因并且发现该蛋白序列中 8 个保守 WD 结构域, 通过系统发育分析发现 CtWD40 与菊科 WD40 蛋白亲缘关系最近。结论 CtWD40 基因在不同花期花瓣组织中出现先升高后降低表达趋势, 皮尔森相关系数分析揭示 CtWD40 在花瓣中基因表达水平与羟基红花黄酮素 A 含量具有显著相关性。

关键词: 红花; CtWD40; 转录因子; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)15-3660-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.022

Clone and expression analysis of CtWD40 in *Carthamus tinctorius*DONG Yuan-yuan¹, LI Jun-feng², PENG Hong-yuan², WANG Yi-fei², WANG Gang¹, WANG Li-yan¹, YAO Na¹, LIU Xiu-ming¹, LI Hai-yan^{1,2}

1. Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To clone CtWD40 transcription factors (TFs) and analyze its expression level in different tissues of *Carthamus tinctorius* and relationship with the content of hydroxysafflor yellow A (HSYA). **Methods** CtWD40 gene was obtained by cloning the WD40 candidate gene from transcriptome of *C. tinctorius* as reference. Its conserved domain, three-dimensional structure and phylogeny analysis were analyzed by bioinformatics methods. The CtWD40 expression pattern was also analyzed by qRT-PCR method, in the same time, HSYA content in different petals were analyzed by HPLC. **Results** Gene sequence of CtWD40 was obtained and eight conserved WD domains were found in CtWD40 gene sequences. Phylogenetic analysis revealed that CtWD40 had a closed homology with WD40 from composite plants. **Conclusion** The expression of CtWD40 gene was first increased and then decreased in petal tissues of different flowering stages. Pearson coefficient revealed significant correlation between CtWD40 expression and HSYA content in *C. tinctorius* petal.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; CtWD40; transcription factor; gene cloning; expression analysis

WD40 是真核生物中普遍存在的一个超基因转录因子家族, 它们在结构上包一个或几个高度保守的 WD 型结构域, 也因此被称为 WD40 重复蛋白 (WDR)。最初 WD40 转录因子被认为是 G 蛋白 β 亚基受体, 该结构域包括 43 个氨基酸残基, N 末端为甘氨酸-组氨酸二肽 (GH) 结构, C 末端为典型的色氨酸-天冬氨酸二肽结构 (WD) [1], 携带该基

序的蛋白称为 WD40 蛋白。通常情况下, WD40 域包含 40~60 个氨基酸, 保守基序由精氨酸/谷氨酸-色氨酸/酪氨酸-天冬氨酸/谷氨酸-精氨酸/赖氨酸 (D/E-W/Y-D/E-R/K) 构成 [2], 该域折叠形成 β 螺旋结构, 与 DDB1 等不同类型蛋白质或 DNA 相互作用 [3], 通过对 WD40 基因功能域鉴定, 发现其广泛参与细胞凋亡、RNA 修饰与加工、蛋白降解、信号

收稿日期: 2019-02-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31501366); 吉林省科技厅项目 (20170520089JH); 吉林省教育厅项目 (JKH20190918KJ)

作者简介: 董园园 (1985—), 女, 吉林人, 讲师, 研究方向为植物分子生物学。

*通信作者 李海燕 (1971—), 女, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子生物学。

Tel: (0431)84533427 Fax: (0431)84533347 E-mail: hyl99@163.com

转导等基础分子过程^[4-7]。

WD40 转录因子家族成员已陆续在不同植物物种中被鉴定, 伴随不同植物基因组数据资源(JGI: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 的公开, 分别有 269、225、200、100 个 WD40 转录因子在拟南芥^[8]、谷子^[9]、水稻^[10]、西红柿^[11]中被陆续注释或克隆鉴定, 其中 85 个拟南芥 WD40 基因, 78 个水稻 WD40 基因基于植物全基因组数据获得^[12]。有关 WD40 基因研究也趋于多样化: 除 WD40 基因序列组成、蛋白结构域特征、系统进化分析外, 基因功能研究方面, 已经发现该转录因子与植物生长、次生代谢、逆境响应等生物过程密切相关。在拟南芥中, 过表达 WD40 可抑制植物生长素积累导致分生组织生长限制^[13]; Kong 等^[14]研究者发现 TaWD40 基因在小麦种子萌发过程中与盐胁迫、干旱胁迫调控紧密相关。到目前为止, WD40 基因在植物次生代谢调控方面, 发现其与黄酮类化合物的合成密切相关: 在欧洲甜樱桃果实中^[15], WD40 通过介导 PAL、4CL 基因的表达参与花青素合成调控; Aguilar 等^[16]研究者在辣椒中发现 WD40 能够特异性调节花青素合成过程中 CHS、F3'H 等基因表达水平; Zhu 等^[17]在烟草黄酮合成途径中发现 WD40 转录因子可与 R2-R3 型 MYB 转录因子结合, 并以复合体结构操控 DFR 和 ANS 基因表达。

红花 *Carthamus tinctorius* L. 是药油兼用的重要经济作物, 其花瓣含有丰富的黄酮类化合物红花黄色素 (safflor yellow, SY), 该药用成分在心脑血管疾病治疗方面疗效突出。拟南芥、樱桃、烟草等植物的黄酮类化合物合成调控研究中, 均揭示了 WD40 通过调控关键酶基因的转录水平, 进而催化黄酮及类黄酮化合物发生多羟化反应^[16-18]。本课题组前期在红花不同组织转录组测序研究中共预测到 89 个 CtWD40 候选转录因子^[19], 该转录因子家族在红花中数量较多, 推测其可能与红花黄酮及类黄酮化合物合成调控相关。本研究参考前期红花花瓣转录组研究结果, 以候选 WD40 基因为参照^[19], 在花瓣 cDNA 文库中成功克隆了 1 个 CtWD40 基因, 利用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法分析其在红花不同组织中的表达差异, 并分析其与不同花期花瓣中羟基红花黄色素 A 含量的相关性, 以期揭示该基因在 SY 合成途径中的重要功能。

1 材料与试剂

1.1 材料

本研究使用的“吉红一号”红花品种购自新疆塔城, 由吉林农业大学生物反应器工程中心保存, 并种植于人工气候室, 待进入花期后, 分别于花蕾期、初花期、盛花期、衰落期时间点收集花瓣组织, 以花蕾期花瓣作为对照, 同时收集根、茎、叶材料进行组织特异性表达分析。全部材料均液氮速冻, 至于 -80 °C 超低温冰箱内长期保存。对照品羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA), 批号 111637-200905, 购自森贝伽有限公司, 质量分数大于 98%。

1.2 试剂

Invitrogen TRIzol 试剂 (赛默飞世尔有限公司); PrimerScript RT reagent kit 试剂盒、SYBR Advantage qPCR premix 试剂盒 (宝生物工程有限公司); T-easy 载体 (全式金生物有限公司); KQ-100 型超声波仪器 (昆山舒美有限公司)。

2 方法

2.1 总 RNA 提取

将收集红花花瓣等组织液氮内充分研磨, 取 100 mg 植物材料置于无 RNA 酶的 1.5 mL Eppendorf 离心管内, 使用 Invitrogen TRIzol 试剂并参照说明书进行总 RNA 提取。将获得的总 RNA 用 DEPC 水溶解, NanoDrop2000 测定 260 nm 下总 RNA 浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。

2.2 CtWD40 基因的克隆

利用 PrimerScript RT reagent kit 试剂盒将红花盛花期花瓣组织总 RNA 逆转录成 cDNA。根据红花花瓣转录组数据 (SRA 数据库登录号 047279.2) 中 WD40 候选基因为参照, 根据 CDS 序列设计合成引物序列分别为上游: (5'-ATGCCAAACACGCTCGTCATAG-3') 和下游: (5'-TCATTCACCGTCGTCAGATACA-3'), 产物长度为 1 053 bp。PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 72 °C、5 min。将扩增的 DNA 片段克隆到 T-easy 载体上, 挑选阳性克隆进行测序。

2.3 基因的生物信息学

2.3.1 序列分析 CtWD40 基因序列测序后去除载体序列, 提交 NCBI 数据库进行 BLASTN 和 BLASTX 比对分析, 搜索同源核酸序列及蛋白质序列。使用 DNAMAN、Swiss-Model 工具进行蛋白结构域及高级结构预测分析。

2.3.2 系统发育分析 根据 CtWD40 基因克隆测序结果, 推测编码氨基酸序列, 使用 GenBank BLASTX 利用 Nr 数据库进行比对分析, 搜索相似度较高的不同物种 WD40 蛋白序列, 利用 MEGA 6.0 进行氨基酸序列进化分析, 使用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树。

2.4 CtWD40 在红花不同组织中基因表达分析

为研究 CtWD40 基因在红花不同组织中的表达模式, 以 18 S rRNA 为内参基因, 利用实时荧光定量 PCR 技术分别检测 CtWD40 在根、茎、叶片、花蕾期花瓣、初花期花瓣、盛花期花瓣、衰落期花瓣中转录水平差异。按“2.1”项方法提取上述材料总 RNA 后, 使用 PrimerScript RT reagent kit 试剂盒合成 cDNA; 使用 SYBR Advantage qPCR premix 试剂盒对基因进行表达分析鉴定。CtWD40 荧光定量 PCR 基因引物分别为上游: 5'-TCGTTTGA-GCCCGGTATTGTTA-3'; 下游: 5'-TGCAAGAG-AGAGAAGGCCAA-3'。18 S rRNA 荧光定量 PCR 基因引物分别为上游: 5'-GAGAAACGGCTACCA-CATCCAA-3'和下游: 5'-TCGTTTGA-GCCCGGTATTGTTA-3', 扩增产物长度为 120 bp, 生物学重复次数为 3 次。使用 Mx3000 荧光定量 PCR 仪器 (罗氏) 进行扩增, 反应条件如下: 使用 2 步法, 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 循环 40 次。

2.5 红花不同花期花瓣中 HSYA 含量测定

2.5.1 色谱条件 使用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (岛津 CLASS 色谱工作站, 日本), 甲醇-0.8%磷酸溶液为流动相甲醇-0.8%磷酸水溶液 (28:72)。体积流量 800 μL/min。柱温 30 °C, 检测波长 406 nm, 进样量 20 μL。色谱图见图 1。

2.5.2 对照品溶液的制备 称取 HSYA 对照品 10 mg, 使用 25%甲醇溶解后, 定容至 50 mL, 作为对照品溶液, 用于标准曲线的制备。

2.5.3 供试品溶液的制备 红花花瓣烘干后研磨成粉, 称取 0.06 g 样品精密加入 25%甲醇 50 mL 并溶解, 密塞后并称重。KQ-100 型超声波仪器震荡 30 min, 放冷后 25%甲醇补充质量。

2.5.4 标准曲线的绘制 精密吸取 HSYA 对照品溶液 2.5 mL 置 5 mL 量瓶中, 定容, 逐级稀释, 即得系列混合对照品溶液。根据“2.5.1”项条件进行测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 根据 HSYA 标准曲线计算得回归方程 $Y=19\,829 X-$

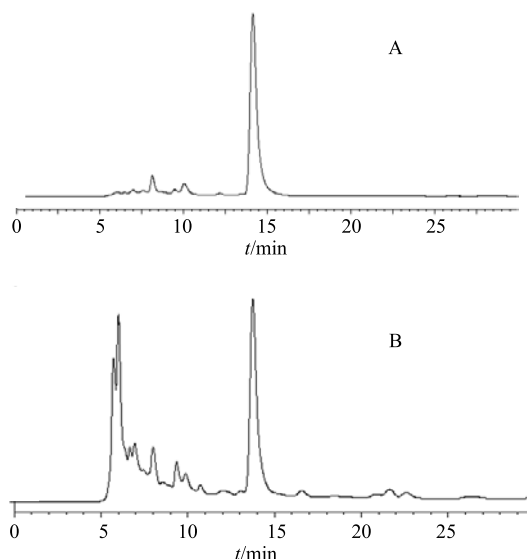


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的色谱图

Fig. 1 HPLC of control (A) and samples (B)

21 128, $r^2=1.000\,0$ 。

2.5.5 精密度试验 取红花黄色素对照品溶液 (质量浓度为 25 μg/mL) 适量, 根据“2.5.1”项色谱条件进样测定 6 次, 记录峰面积, RSD 为 6.78%, 表明仪器精密度良好。

2.5.6 重复性试验 精密称取对照品 6 份, 根据“2.5.2”项方法制备供试品溶液, 根据“2.5.1”项色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果表明 HSYA 平均值为 5.82 μg/mL, RSD 为 5.25%, 表明本方法重复性良好。

2.5.7 稳定性试验 供试品溶液室温放置, 分别于 0、2、4、8、16、32 h, 根据“2.5.1”项色谱条件进样测定, 记录峰面积, 供试品中 HSYA 峰面积 RSD 为 5.13%, 表明供试品溶液室温放置 32 h 内稳定。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取样品粉末 0.06 g, 加入质量浓度为 25 μg/mL HSYA 对照品溶液 5 mL, 再精密加入 25%甲醇 40 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷, 称定质量, 甲醇补充质量, 平行制备 6 份供试品溶液。根据“2.5.1”项色谱条件进样测定, RSD 为 5.89%。

3 结果与分析

3.1 CtWD40 基因克隆及序列分析

通过 PCR 方法扩增获得长度为 1 053 bp 的 CtWD40 基因片段 (图 2)。测序结果表明获得的 cDNA 片段具有 1 个完整的编码框, 可编码 350 个

氨基酸残基。使用 DNA MAN 软件对红花 CtWD40 等 8 个 WD40 氨基酸序列进行多重氨基酸序列比对分析, 结果鉴定到 8 个位于 WD 结构域位于 WD40 氨基酸保守区序列内部(图 3)。氨基酸残基长度分布 2~9 个, 氨基酸序列结构特征为 WD 或 W(X)*n*D。同

源模建法分析 CtWD40 蛋白高级结构, 结果发现该蛋白质具有明显的主链和环区结构 (图 4)。

3.2 CtWD40 基因系统发育分析

氨基酸序列相似性分析在蛋白进化研究中至关重要。为研究红花 WD40 转录因子的进化关系, 利用 MEGA 6.0 软件使用 NJ 法对红花、山杏、草莓、马铃薯等共 19 个 WD40 蛋白序列进行系统发育分析, 系统进化树构建结果见图 5。研究结果发现, 蛋白亲缘关系较近的种属在进化树上距离最近。红花、向日葵、莴笋 3 个 WD40 转录因子聚在同一个进化枝上, 具有较近亲缘关系。红花、向日葵、莴笋均为菊科植物, 红花 WD40 与莴笋 WD40 亲缘关系最近。此外, 茄科植物烟草、马铃薯、番茄、潘那利番茄 WD40 转录因子集中分布在另一个进化枝上, 说明其亲缘关系较近。

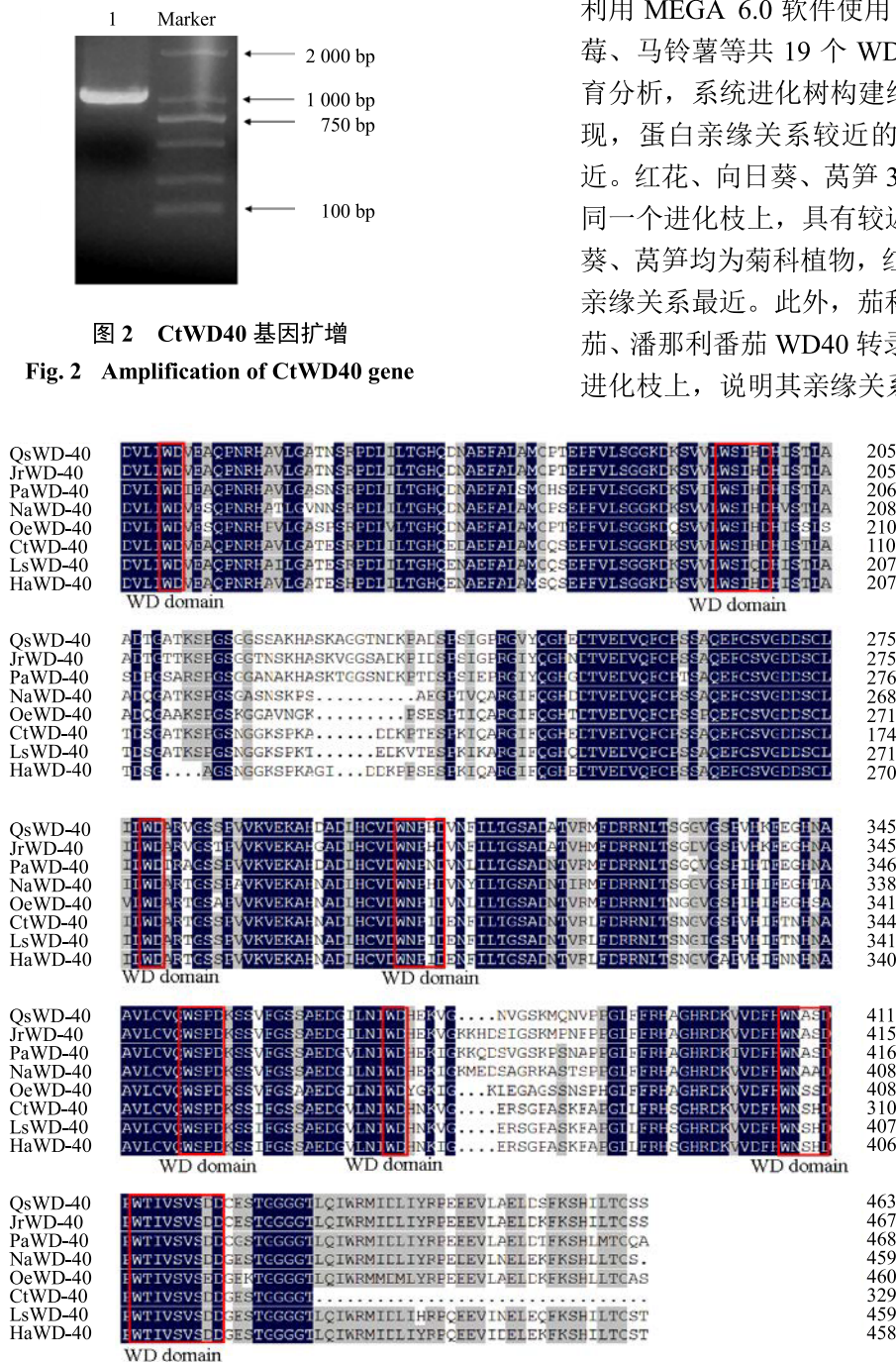


图 2 CtWD40 基因扩增
Fig. 2 Amplification of CtWD40 gene

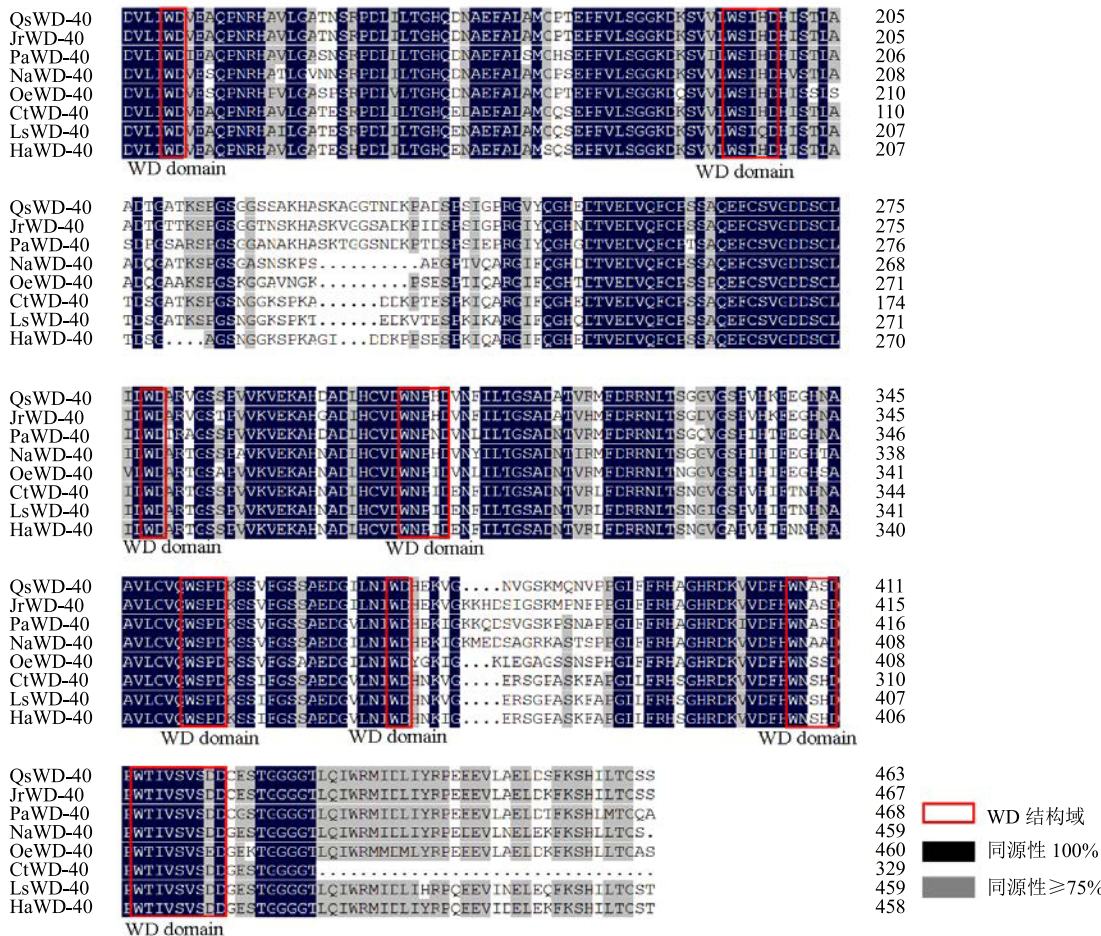


图3 CtWD40 基因与其他物种的氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acids sequence alignment of CtWD40 with other WD40 protein sequences

LsWD-40-*Lactuca sativa* (XP_023758383.1) HaWD-40-*Helianthus annuus* (XP_021984499.1) QsWD-40-*Quercus suber* (XP_023872668.1)
 NaWD-40-*Nicotiana attenuate* (XP_019234393.1) OeWD-40-*Olea europaea* (XP_022844462.1) JrWD-40-*Juglans regia* (XP_018843375.1)
 PaWD-40-*Prunus avium* (XP_021827169.1)



图 4 CtWD40 蛋白质三维结构预测

Fig. 4 Three-dimensional structure model prediction of CtWD40

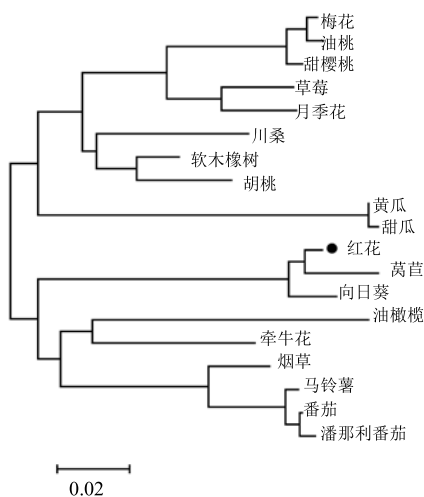


图 5 CtWD40 转录因子系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of CtWD40

3.3 红花不同组织中 CtWD40 基因表达分析

基因表达分析结果发现, CtWD40 基因在红花不同组织中均存在表达(图 6)。在不同花期花瓣中 CtWD40 基因表达呈现先高后低趋势。CtWD40 在花瓣组织中显著高表达, 相对花蕾期, 初花期及衰落期, CtWD40 基因在盛花期花瓣中具有最高表达水平, 为花蕾期的 5.48 倍。在叶片、根、茎组织中 CtWD40 表达也有一定差异。

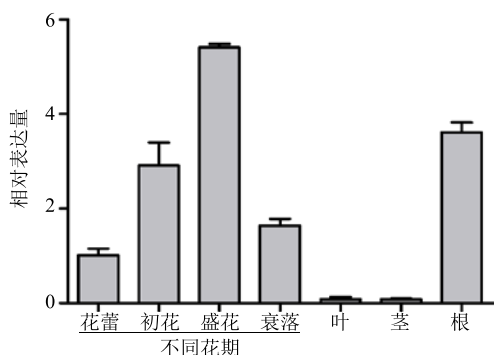


图 6 不同红花组织中 CtWD40 基因表达分析

Fig. 6 Expression level of CtWD40 in different safflower tissues

3.4 不同花瓣组织中 HSYA 含量分析

HSYA 在不同时间花瓣中含量呈现先升高后降低趋势(图 7), 盛花期花瓣中质量分数最高, 为 (47.59 ± 0.01) mg/g, 在花蕾期、初花期及衰落期质量分数分别为 (28.48 ± 0.01) 、 (38.16 ± 0.01) 、 (28.74 ± 0.01) mg/g。分析 CtWD40 基因表达水平与 HSYA 含量的相关性, 皮尔森相关系数为 0.936 ($P=0.020$), 说明 CtWD40 在红花不同花期花瓣中基因表达水平与 HSYA 量具有相关性。

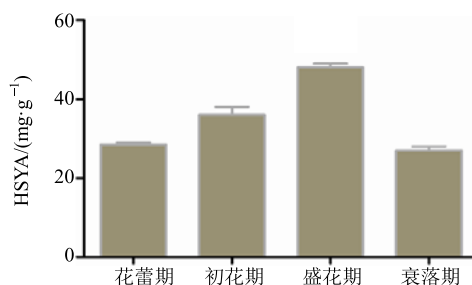


图 7 不同花期花瓣中 HSYA 含量分析

Fig. 7 HPLC analysis of HSYA in safflower petal samples

4 讨论

作为植物中广泛存在的超转录因子家族, WD40 转录因子家族成员在拟南芥、水稻、谷类中的陆续发现揭示了其在植物中功能调控的多样性。WD40 转录因子通过介导蛋白质相互作用的方式参与一系列生物过程, 包括次生代谢化合物合成、植物器官形态建设、组织分化等。尤其在黄酮代谢途径研究中, 多项研究结果均揭示 WD40 转录因子与 MYB、bHLH 互作后调控黄酮及类黄酮化合物的生物合成过程。本研究首次克隆并鉴定了红花 CtWD40 转录因子基因, 该转录因子具有 8 个典型的 WD 保守结构域, 确保了 WD40 蛋白在生物过程中的功能行使。

与其他植物 WD40 蛋白同源比对分析, 发现其与向日葵 WD40 及莴笋 WD40 蛋白序列相似性最高, 亲缘关系最近, 且红花、向日葵、莴笋均属菊科植物, 该结果说明上述 3 种菊科植物在进化史上物种分化时间相对最短, 符合红花与其他双子叶植物的进化关系, 系统发育分析结果也辅助证实了 CtWD40 转录因子的编码序列扩增正确。

WD40 在不同组织中的时空表达特异性推测可能是导致表型差异的原因之一。研究报道指出 WD40 是植物黄酮及类黄酮化合物合成过程的主要调节因子, WD40 不同家族成员不同植物中均存在时空表达差异。棉花纤维发育研究中发现 9

个 WD40 转录因子表达水平与棉纤维发育阶段相关^[20]; 大豆中 161 个 WD40 转录因子呈现出不同的组织特异性表达模式^[21]; Liu 等^[22]在对奇异果色素积累的研究中发现多数 WD 转录因子在不同发育阶段果实中呈组成型表达, 但 WDR1 和 WDR2 2 个转录因子在绿色果实中特异性高表达。本研究揭示了 CtWD40 在不同阶段花瓣组织中的表达模式及与 HSYA 积累水平具有相关性。

CtWD40 在盛花期花瓣中表达水平显著升高, 暗示该基因在在花期演变过程中可能存在重要的调控作用。植物特异性组织或器官中代谢物积累水平、特定生长周期中信号诱导等因素都会影响植物表型特征改变^[23]。本研究中 HSYA 是红花花瓣中的主要黄酮类物质, 也是引起花瓣颜色变化的主要黄酮类化合物。WD40 转录因子参与多种植物的黄酮及类黄酮化合物的合成调控, 且 CtWD40 在花瓣中的基因表达趋势与 HSYA 含量变化趋势具有显著正相关性, 暗示了 CtWD40 基因极有可能参与了红花黄色素合成的分子机制。

本研究克隆并获得了 CtWD40 基因序列, 并对其蛋白结构、保守结构域及系统发育等内容进行了相应研究。在花瓣组织中的表达情况推测该转录因子可能与红花的黄色素合成调控相关。在该基因调控的分子机制调控方面, CtWD40 转录因子介导的黄酮合成机制有待深入开展。

参考文献

- [1] Smith T F, Gaitatzes C, Saxena K. The WD repeat: A common architecture for diverse functions [J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(5): 181-185.
- [2] Angers S, Li T, Yi X. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery [J]. *Nature*, 2006, 443(7111): 590-593.
- [3] Jin J, Arias E E, Chen J. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1 [J]. *Mol Cell*, 2006, 23(5): 709-721.
- [4] Wakasugi M, Kawashima A, Morioka H. DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(3): 1637-1640.
- [5] Ajuh P, Sleeman J, Chusainow J. A direct interaction between the carboxyl-terminal region of CDC5L and the WD40 domain of PLRG1 is essential for pre-mRNA splicing [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(45): 42370-42381.
- [6] Higa L A, Wu M, Ye T. CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(11): 1277-1283.
- [7] Chen R H, Miettinen P J, Maruoka E M. A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF-beta receptor [J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 548-552.
- [8] Van N S, Ludwig P. The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: Conservation and divergence in structure and function [J]. *BMC Genomics*, 2003, 4(1): 50-54.
- [9] Mishra A K, Muthamilarasan M, Khan Y. Genome-wide investigation and expression analyses of WD40 protein family in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86852.
- [10] Ouyang Y, Huang X, Lu Z. Genomic survey, expression profile and co-expression network analysis of OsWD40 family in rice [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 100-105.
- [11] Zhu Y, Huang S, Miao M. Genome-wide identification, sequence characterization, and protein-protein interaction properties of DDB1 (damaged DNA binding protein-1)-binding WD40-repeat family members in *Solanum lycopersicum* [J]. *Planta*, 2015, 241(6): 1337-1350.
- [12] Burchill L, Velkoska E, Dean R G. Acute kidney injury in the rat causes cardiac remodelling and increases angiotensin-converting enzyme 2 expression [J]. *Exp Physiol*, 2008, 93(5): 622-630.
- [13] Liu W C, Zheng S Q, Yu Z D. WD40-REPEAT 5a represses root meristem growth by suppressing auxin synthesis through changes of nitric oxide accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 93(5): 883-893.
- [14] Kong D, Li M, Dong Z. Identification of TaWD40D, a wheat WD40 repeat-containing protein that is associated with plant tolerance to abiotic stresses [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(3): 395-410.
- [15] Starkevic P, Paukstyte J, Kazanaviciute V. Expression and anthocyanin biosynthesis-modulating potential of sweet cherry (*Prunus avium* L.) MYB10 and bHLH genes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126991.
- [16] Aguilar B. Virus-induced silencing of MYB and WD40 transcription factor genes affects the accumulation of anthocyanins in chilli pepper fruit [J]. *Biol Plant*, 2014, 58(1): 567-574.
- [17] Zhu Q, Sui S, Lei X. Ectopic expression of the coleus R₂R₃ MYB-Type proanthocyanidin regulator gene SsMYB3 alters the flower color in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139392.
- [18] Li Y, Shan X, Gao R. Two IIIIF Clade-bHLHs from *Freesia hybrida* play divergent roles in flavonoid biosynthesis and trichome formation when ectopically

- expressed in *Arabidopsis* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 30514.
- [19] Li H, Dong Y, Yang J. 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.
- [20] Salih H, Gong W, Du X M. Genome-wide characterization, identification and expression analysis of WD40 proteins family in cotton [J]. *Genome*, 2018, 61(7): 539-547.
- [21] Bian S, Li X, Mainali H. Genome-wide analysis of DWD proteins in soybean (*Glycine max*): Significance of Gm08DWD and GmMYB176 interaction in isoflavonoid biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178947.
- [22] Liu Y, Zhou B, Qi Y. Expression differences of pigment structural genes and transcription factors explain flesh coloration in three contrasting kiwifruit cultivars [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8(1): 1507-1513.
- [23] Mateus A R, Marques P M, Oostra V. Adaptive developmental plasticity: Compartmentalized responses to environmental cues and to corresponding internal signals provide phenotypic flexibility [J]. *BMC Biol*, 2014, 12(1): 97-102.