

孙海燕, 安泽伟, 李 琴, 等. 三色堇 *DFR* 基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 34–37.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.009

# 三色堇 *DFR* 基因的克隆及表达分析

孙海燕<sup>1</sup>, 安泽伟<sup>2</sup>, 李 琴<sup>1</sup>, 王 健<sup>1</sup>

(1. 海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228;

2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737)

**摘要:**从三色堇花瓣中克隆了 1 个花色素合成结构基因的全长 cDNA, 命名为 *VwDFR*。*VwDFR* cDNA 全长为 1 340 bp, 编码 347 个氨基酸组成的蛋白, 与胡杨的 *DFR* 序列具有较高的序列一致性。*VwDFR* 蛋白含有典型的植物 *DFR* 蛋白的保守功能结构域, 属于 *SDR* 超基因蛋白家族成员。*VwDFR* 基因在三色堇不同组织中的表达存在明显差异, 在初花期的花瓣中表达量最高, 且色斑区高于非色斑区。结果说明, *VwDFR* 可能与三色堇花色形成有关。此结果为深入研究三色堇花色形成奠定了基础。

**关键词:**三色堇; *DFR*; 基因克隆; 表达分析; 花色素合成

**中图分类号:** Q785      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0034-04

花形态的多样性是大自然最美丽的礼物之一, 总是令生物学家着迷。生物学家对产生花卉多样性的发育遗传机制进行了深入的研究, 发现金鱼草和矮牵牛是探索花对称性<sup>[1]</sup>、花色<sup>[2-4]</sup>、花瓣纹理<sup>[5]</sup>的优秀模式植物。随着研究的深入, 花斑的形成逐渐被学者关注。植物花斑是指在其花瓣大小、形态和位置上基本固定的色斑<sup>[6]</sup>, 主要是由于花色素在特定区域积累形成的, 如三色堇黄底紫斑品种 Rhinegold 和白底紫斑品种 Mont Blanc 的花斑部分的组成色素是飞燕草素和矢车菊素<sup>[7-8]</sup>。因而, 花色素在花瓣上积累的分子机理是花斑形成原因的研究重点。

花青素又称花色素, 属类黄酮化合物, 是一类植物次生代谢产物, 广泛存在于植物细胞液泡中。自然界中主要有 6 类花色素, 即天竺葵色素 (pelargonidin)、芍药花色素 (peonidin)、矢车菊素 (cyanidin)、牵牛花色素 (petunidin)、飞燕草色素 (delphinidin) 和锦葵花色素 (malvidin), 其生物合成和调控已有较深入的研究。花青素生物合成途径的前体物质是 4-香豆酰 CoA 与 3-丙二酰 CoA, 最后形成花的颜色涉及的一系列酶有: 查尔酮合酶 (CHS)、查尔酮异构酶 (CHI)、黄烷酮 3-羟化酶 (F3H)、二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR)、花色素合成酶 (ANS) 和 UDP-葡萄糖类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 (UGT) 等<sup>[9-10]</sup>。

二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR) 是花青素生物合成中类黄酮途径的第一个酶, 负责将 3 种二氢黄酮醇 (DHK、DHQ 和 DHM) 还原为无色花色素苷, 缺失 DFR 活性的突变体会产生白色。在一些植物中, DFR 有严格的底物特异性, 不能利用

二氢槲非醇 (DHK) 生产天竺葵素, 因而缺乏橙/砖红色。Johnson 等将兰属 *DFR* 基因转入矮牵牛后, 不能有效合成天竺葵素, 而将非洲菊中能还原 DHK 的 *DFR* 导入到白色矮牵牛中, 得到了砖红色花朵<sup>[11]</sup>。可见, 围绕 *DFR* 基因进行基因操作也可以改造花色。

三色堇 (*Viola × wittrockiana* Gams) 是堇菜科堇菜属的一种多年生常作二年生栽培的草本花卉。由于其花色丰富、明艳, 花期长, 是花坛、花境、盆花等常用早春花卉, 有“花坛皇后”之美誉, 在园林绿化方面有很高的应用价值。鉴于 *DFR* 基因对植物色彩的形成非常关键, 分离三色堇花瓣中 *DFR* 基因并研究其表达调控特点, 将有助于阐明 *DFR* 基因在三色堇花斑形成过程中的作用。本研究拟从三色堇花瓣中克隆 *DFR* 基因的 cDNA 全长序列, 进一步对 *VwDFR* 进行生物信息学及系统进化分析, 并采用实时荧光定量 PCR 技术研究 *VwDFR* 在三色堇不同组织中的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

本试验材料为花色黄底黑斑的三色堇 (*Viola × wittrockiana* Gams) 品种, 种植于海南大学园艺园林学院基地。

### 1.2 菌株与试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 菌株购自天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒 (K1642) 购自 Fementas 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Sigma 公司; LA *Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体和实时荧光定量 PCR 试剂 SYBR Premix ExTaq™ II 购自大连宝生物公司; 引物合成和测序由上海英俊生物技术有限公司完成。其他生化试剂均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.3 方法

**1.3.1 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链合成** 三色堇花瓣总 RNA 的提取采用改良 Trizol 法<sup>[12]</sup>, 其他组织的 RNA 提取方法按照常规方法进行。cDNA 第一链合成使用 Fementas 公司逆转录试剂盒, 操作步骤参照产品说明书。

收稿日期: 2015-05-19

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31060265, 31260488); 海南大学中西部计划学科建设 (编号: ZXBHJH-XK008)。

作者简介: 孙海燕 (1986—), 女, 重庆开县人, 硕士, 从事园林植物资源与遗传改良。E-mail: shy0228@sina.com。

通信作者: 王 健, 男, 湖北宜昌人, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事园林植物分子生物学。Tel: 0898-66267907; E-mail: wjhnaul@163.com。

1.3.2 三色堇 *ANS*、*DFR* 基因全长 cDNA 克隆 比对 GenBank 上登录的不同物种的 *DFR* 基因,依据其保守区域序列设计特异性引物,扩增得到其保守区片段,然后根据扩增得到的序列分别设计 3' - RACE 和 5' - RACE 引物(表 1)扩增 3'和 5'端片段,具体方法参照文献[13]。根据测序所得 *DFR* 基因的 3'和 5'端序列,利用 DNAMAN 软件进行序列拼接,获得其全长 cDNA 拼接序列。根据所得的全长拼接序列设计特异性引物(表 1),使用 *Taq plus* DNA polymerase 进行全长 cDNA 扩增,引物终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ,扩增程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,54  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  2 min,共 32 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化目的条带,克隆至 pMD8 - T 载体上,测序确认。

1.3.3 生物信息学分析 利用 NCBI 在线 Blast 工具和

DNAMAN 软件对全长 cDNA 序列进行比对分析和开放阅读框预测;利用在线软件 Expasy 进行氨基酸组成、稳定系数、亲水系数等分析;利用 MEGA 5.10 软件,以邻近法构建系统进化树。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 分析(qRT - PCR) 采用罗氏公司的 LightCycler 2.0 系统进行荧光定量 PCR,分析 *VwDFR* 基因在初花期根、茎、叶、花不同组织中的表达情况。以 *actin* 基因作为内参基因同时进行定量分析,对样品进行均一化。反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 2  $\mu\text{L}$  模板、10  $\mu\text{L}$  2  $\times$  SYBR Premix 和上下游混合引物 0.6  $\mu\text{L}$  及 ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu\text{L}$ ;反应程序 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;94  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  20 s,共 45 个循环。靶基因和内参基因的引物设计见表 1,数据处理采用系统自带软件。

表 1 *VwDFR* 全长基因克隆和表达分析引物

基因	引物信息	
	用途	序列(5'→3')
<i>VwDFR</i>	片段扩增	DFR - 1F:GCTACNCCYATGGAYTTYGADTC;DFR - 1R:CRAARTACATCCADSCDGTTCATYTT
	3'RACE	DFR - 2:TACGATGAATCTAACTGGAGCG;DFR - 3:AGTTCGTCGCCTCTGTCAAG
	5'RACE	DFR - 4:CCCTTTGAACAGTTTTGGCTT;DFR - 5:ACTCCATAGACTGTTCGGCTTGA
	全长 cDNA 扩增	DFR - 6F:ATGGGATCAGGAGACGAAGG;DFR - 6R:TTCAGAAGCTATAATCAAACAAGGAG
	荧光定量分析	DFR - 7F:TCAAGCCGACAGTCTATGGAG;DFR - 7R:CGCTCCAGTTAGATTCATCGT
$\beta$ - <i>actin</i>	荧光定量分析	Actin - F:TGTTACCACAACCTGCCGA;Actin - R:CTGGAAGAAGCTCAGGACAC

2 结果与分析

2.1 *VwDFR* 的克隆

搜索比对其他植物 DFR 基因序列并找出保守区域,利用 PCR 扩增得到这个基因片段的特异性条带,长度为 241 bp(图 1 - A)。经分析发现它们均缺失 5'和 3'端,利用 5'和 3'

RACE 技术分别经过 2 轮扩增,得到 *DFR* 的 3'末端片段约 793 bp(图 1 - B)及 5'末端序列约 246 bp(图 1 - C)。上述片段进行 Blast 分析,确认与其他植物 DFR 同源。根据测序结果拼接后,设计引物扩增得到 1 340 bp 全长 cDNA 片段(图 1 - D)。

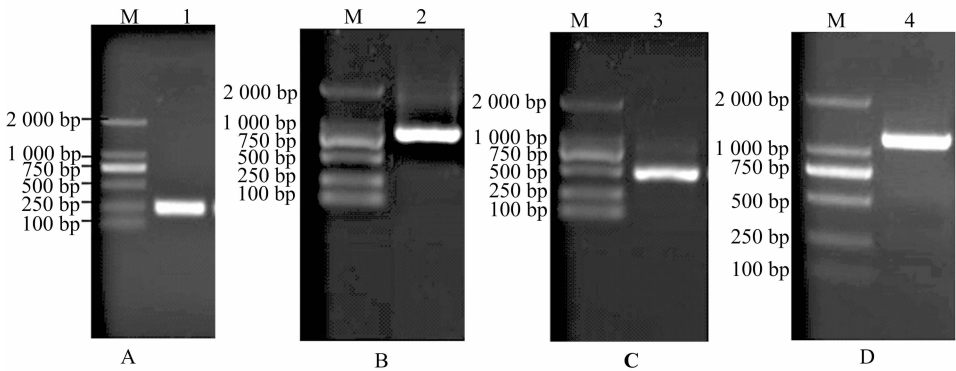


图 1 *VwDFR* 片段、3' 和 5' 末端序列及全长 cDNA 扩增

2.2 序列分析

序列分析发现,三色堇 *VwDFR* 基因含有 1 个完整的开放阅读框,起始密码子在 85 位,终止密码子在 1 128 位。其开放阅读框为 1 044 bp,编码 347 个氨基酸(图 2)。经氨基酸序列保守结构域分析发现该基因蛋白属于 SDR 蛋白家族,是 SDR superfamily 超基因家族中的一个,该基因家族有 2 个高度保守功能结构域,NADP 的结合功能域和底物特异结合功能域。如图 3 所示,*VwDFR* 基因在这 2 个功能域上是高度保守的。利用在线软件 Expasy 分析该基因所编码蛋白的理化性质,结果表明,*VwDFR* 蛋白的分子量为 8.61 ku,等电点为 5.08,不稳定系数为 0.29,平均亲水系数为 0.731,属于不稳

定型的疏水蛋白。此外,跨膜结构区预测结果表明,*VwDFR* 是跨膜蛋白。

2.3 系统进化分析

利用 DNAMAN 软件,根据 *VwDFR* 基因编码的氨基酸序列,在 NCBI 蛋白序列库中进行同源检索和比较得知,该蛋白与胡杨(*Populus euphratica*)、可可(*Theobroma cacao*)、甜橙(*Citrus sinensis*)、苹果(*Malus domestica*)等 15 种其他植物 DFR 蛋白有 73% ~ 83% 的同源性,其中与胡杨 DFR 蛋白同源性最高,为 83%。将 *VwDFR* 与这 15 条 DFR 蛋白序列进行多重比对并利用 Mega 5.10 构建系统进化树(图 4),发现 *VwDFR* 与杨柳科胡杨的 DFR 亲缘关系最近。从进化树还可

1 ACACCTTCTCCCATTC AARTTCCTTTTCTCTGTTGGTACAGACATTCATAAAGCAAAAAACAAGAACAGGAAACAGATAGATCATGGGA  
1 M G  
91 TCAGGAGACGAAGGTACCAATGTTGTTGTTGTGTGACTGGTGCTTCTGGCTTCATCGGTTTCATGGCTCATCATGAGGGTCTCTCGAGCAG  
3 S G D E G E T N V V V C V T G T A A G S G F I G S W L I M M R V L E Q  
181 GGCTACACCGTTCGAGCAACGGTTTCGCGACCCCTGCACAAATGTGAAGAGGTGAAGCATCTGCTGGAATTTGCCAAAGCGCAGCACCCCATCTC  
33 G Y T V T R A T V R D P D N V K K V K H L L E L P K A S T H L  
271 ACCTTATTTGGAAGGCTGACCTTTTCAGTGGAGGGAAGTTTGTGTAAGCAATTCAGGTTGTATGGAGTCTTCATGTTGCCATCCCCATG  
63 T L W K A D L S V E G S F D E A I Q G C N G V F H V A T P M  
361 GATTTCGACTCCAAGGACCTGAGAATGAAGTGATCAAGCCGACAGCTTATGGAGTACTGGACATCATGAAAGCATGTGTCAAAGGCCAAA  
93 D F D S K D P E N E V I K P T V Y G V L D I M K A C V K A K  
451 ACTGTTCAAAGGGTTGTGTTCACTTCATCTCGAGGAAGCTAGATGTTGAAGAACACAAAAACCTGTGTACGATGAATCTAACAGGAGC  
123 T V Q R G V V F T S S A G A C T V D V E E H K K P V T G T A A G C C T G T G A G A T G A T C T A A C A G G A G C  
541 GATTTCGGAGTTCTGCTCGCTGTCTGCAAAATGACTGGATGGATGTATTGTTTCCAAAGACATGGCAGAGAGAGCTGCATGGAAAGTTTGCT  
153 D L E F V R S V K M T G W M Y F V S K T L A E R A A W K F A  
631 GCGGAGAACAAAGATCGATTTTCATCAGTATCATACCACCTCTTGTGTTGGTCTCTTTATCATGCCATTAATGCCACCTAGCCTCATCACT  
183 A E N K I D F I S I I P P L V G F F I M P L M P P S L I T  
721 GCCCTGTCTTAATCAACGGGAATGAAGCTCATTAATGGAATATAAAGCTGGGAAGAACTATGTGCATTTGGATGATCTCTGTCAAGCTCAC  
213 A L S L I T G N E A H Y G I I K L G N Y V H L D D L L C Q A H  
811 ATATTTCTATTTCGAGCACCCGAAATCCGAGGGCCGATACCTTGTTCTGCAGAGGCTGCTACAATCCATGATCTTGCAAAAATGCTTGAGA  
243 I F L F E H P K S E G R Y I C S A E A A T I H D L A K M L R  
901 CAGAAGATACCTCGAGTACACATCCCTGAGTCAATGGCACCAGATGAGAATTTCAAATGTGTGTTCTCTCCAAAAAGGTTACGGAAT  
273 Q K Y P E Y N I P E S Y G T D E N L S K C V F S S K K V T D  
991 TTGGGGTTCCAGTTTAAGTACAACCTTAGAGGACATGTTTGTGGAGCTTGGAGACATGCAGGGAAAAGGCTGTGCTACCGCGACTGAAT  
303 L G F Q F K Y N L E D M F V G A V E T C R E K G L L P R L N  
1081 GATGACATGATGTTTCCAAAGCAGCGGAGGCACAGTTCCTAACTAAGGCTAGTACTGTTCTTGCTGGTCACAGCACTGCTTCCAGTTTCTTG  
333 D D I D V S K P A E A Q A G L S N +  
1171 TGCTTCTGTGTGTTTGTGTGCAAGATGTAATAACAGTGATCTGAACTCCTGTTGTTGATTATAGCTTCTGAATGCTATTAGTATTACATAT  
1261 TCTAATTTGTTGGAATGTGTAAATAGCTAAGATGATTTTGAAGTACTCCGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG

图2 *VwDFR* 的全长 cDNA 及所编码的蛋白序列

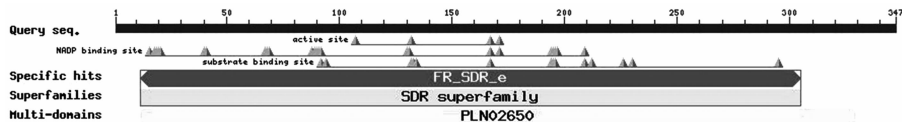


图3 VwDFR 蛋白保守结构域分析

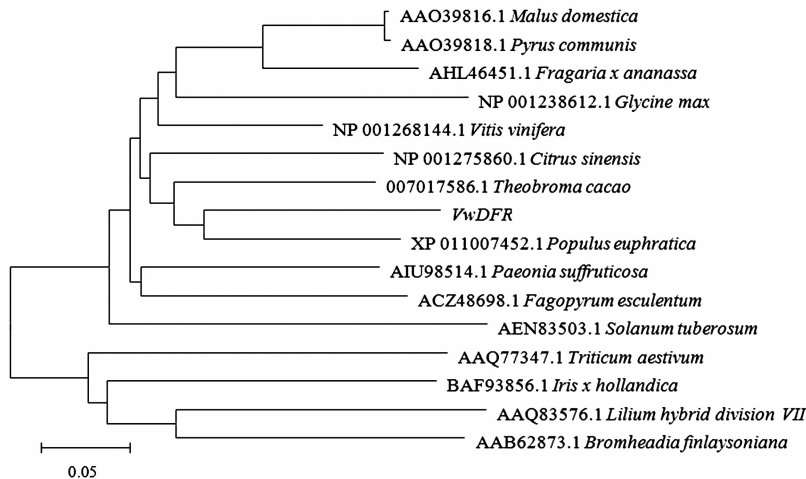


图4 三色堇 DFR 和其他植物 DFR 蛋白系统进化树分析

以看出, 16 条 DFR 蛋白序列明显地聚为 2 个类簇, 其中 *VwDFR* 与甜橙、可可、胡杨等双子叶植物的 DFR 聚为一支, 而其他单子叶植物的 DFR 聚为一支。总的来看, 同为双子叶的三色堇 *DFR* 基因, 与双子叶植物的亲缘关系更近一些, 因此 DFR 蛋白序列的进化基本符合植物分类学的进化规律。

#### 2.4 三色堇 *VwDFR* 基因荧光定量表达分析

在三色堇开花期进行取样,从同一株植株的根、茎、叶、花中分别提取总 RNA,反转录为 cDNA。利用实时荧光定量 PCR 分析三色堇 *DFR* 基因在根、茎、叶、花中的表达情况。结果(图 5)表明, *VvDFR* 在三色堇的根、茎、叶和花中均有表达,但表达水平具有明显差异。其中,在花色素大量积累的初花期花瓣中表达量最高,在茎中的表达量最低,说明 *VvDFR* 主要在花瓣中表达,且色斑区的表达水平高于非色斑区。

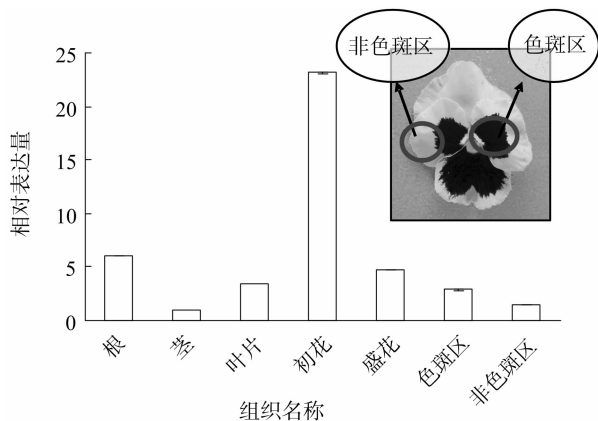


图5 三色堇 *VwDFR* 在不同组织中的表达

### 3 讨论与结论

本研究中利用 RT-PCR 同源克隆和 RACE 技术相结合的方法,从三色堇的花瓣中克隆得到花青素合成结构基因 *VvDFR* 全长 cDNA 序列。通过对其编码的氨基酸序列保守结构域分析表明,三色堇 *VvDFR* 编码蛋白 N 端存在 2 个高度保守功能结构域-NADP 的结合功能域和底物特异结合功能域,是植物 SDR superfamily 超基因家族蛋白的典型特征。本研究得到的 *VvDFR* 基因与其他植物 DFR 氨基酸序列的一致性较高,其中与杨柳科的胡杨 DFR 氨基酸序列一致性最高,为 83%。且系统进化分析表明,*VvDFR* 和胡杨的 DFR 亲缘关系较近,而与单子叶植物的鸢尾、百合和小麦等的亲缘关系较远,表明 *VvDFR* 基因的进化基本符合植物分类学的进化规律。

本研究中对三色堇不同组织器官的 *VvDFR* 荧光定量检测发现,在初花期的花瓣中表达量最高,这与李琴等的研究结果<sup>[14]</sup>一致,说明 *VvDFR* 是三色堇花色素合成的关键基因。此外,*VvDFR* 在根中的表达量也较高,这可能与 *DFR* 基因的表达存在组织特异性有关<sup>[15]</sup>。

花色素结构基因是花色素生物合成的基础,现有的研究表明,植物花瓣上的花斑是由于花色素基因的差异性表达而形成的<sup>[16]</sup>。*DFR* 基因首次从玉米 (*Zea mays*) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 中分离得到,后来相继从其他多种植物(如拟南芥、三叶草、玫瑰、兰花、非洲菊等)中克隆出 *DFR*<sup>[17-19]</sup>。研究发现一些植物花瓣上花斑的形成与 *DFR* 基因的差异性表达相关,如蝴蝶兰小丑型品种中其花瓣上大块的紫色色斑,主要由于是 *DFR* 基因在色斑区特异性表达导致<sup>[20]</sup>;在文心兰的花瓣和萼片中,其色斑形成的基础是因为 *OgCHI* 和 *OgDFR* 基因表达被遏制<sup>[21]</sup>;而在百合品种 Sorbonne 中,*LhDFR* 在无色斑的边缘区域表达水平很低,但在花被片的色点部位以及有色斑的中心部位高度表达<sup>[22]</sup>。

综上所述,笔者初步推测本试验所克隆得到的 *VvDFR* 基因可能在三色堇花瓣中存在差异性表达,三色堇花瓣花色及色斑的形成可能与 *VvDFR* 的表达有关。本研究结果为深入揭示三色堇花色及色斑形成奠定了基础,进而为创新花色奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Luo D, Carpenter R, Vincent C, et al. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum* [J]. Nature, 1996, 383 (663): 794-799.
- [2] Quattrocchio F, Wing J F, van Der Woude K, et al. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 1998, 13 (4): 475-488.
- [3] Quattrocchio F, Wing J, van Der Woude K, et al. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color [J]. The Plant Cell, 1999, 11 (8): 1433-1444.
- [4] Albert N W, Lewis D H, Zhang H, et al. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in Petunia are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning [J]. The Plant Journal, 2011, 65 (5): 771-784.

- [5] Perez-Rodriguez M, Jaffe F W, Butelli E, et al. Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers [J]. Development, 2005, 132 (2): 359-370.
- [6] 程金水. 园林植物遗传育种学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 36-40.
- [7] Endo T. Biochemical and genetical investigations of flower color in Swiss Giant Pansy, *Viola* × *Wittrockiana* Gams I Inter-relationships of pigment constituents occurring in ten varieties [J]. Jap J Bot, 1954, 14: 187-193.
- [8] Biochemical E T. Genetical investigations of flower color in Swiss Giant Pansy. *Viola* × *wittrockiana* Gams III; dominance relations in F<sub>1</sub> hybrids, with special reference to flower color and anthocyanin pigment constituents [J]. The Japanese Journal of Genetics, 1959, 34 (4): 116-124.
- [9] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Plant pigments for coloration: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. Plant J, 2008, 54: 733-749.
- [10] Griesbach, R. J. Biochemistry and genetics of flower color [J]. Plant Breed, 2005, 25: 89-114.
- [11] Johnson E T, Ryu S, Yi H, et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase [J]. The Plant Journal, 2001, 25 (3): 325-333.
- [12] 李琴, 王健, 赵钟鑫, 等. 三色堇花瓣总 RNA 3 种提取方法的比较 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (5): 24-26.
- [13] 祁银燕, 刘雅莉, 李莉, 等. 风信子 *DFR* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25 (24): 62-67.
- [14] Li Q, Wang J, Sun H Y, et al. Flower color patterning in pansy (*Viola* × *wittrockiana* Gams.) is caused by the differential expression of three genes from the anthocyanin pathway in acyanic and cyanic flower areas [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 84: 134-141.
- [15] Liu M S, Wang F, Dong Y X, et al. Expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes involved in anthocyanin biosynthesis in purple grains of wheat [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47 (9): 1107-1114.
- [16] 尚喙, 王健, 李琴, 等. 植物花斑形成分子机理研究进展 [J]. 园艺学报, 2014, 41 (7): 1485-1494.
- [17] 陶吉寒, 招雪晴, 苑兆和, 等. 石榴 *DFR* 基因的同源克隆及分析 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (4): 22-24.
- [18] Viljoen C D, Snyman M C, Spies J J. Identification and expression analysis of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase in *Clivia miniata* [J]. South African Journal of Botany, 2013, 87: 18-21.
- [19] 尚洁, 赵海燕, 朱武政. 枸杞 *DFR* 基因 cDNA 片段的克隆及生物信息学分析 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (10): 33-37.
- [20] Ma H, Pooler M. Anthocyanin regulatory/structural gene expression in *Phalaenopsis* [J]. Amer Soc Hort Sci, 2009, 134 (1): 88-96.
- [21] Chiou C Y, Yeh K W. Differential expression of *MYB* gene (*OgMYB1*) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium* Gower Ramsey [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 66 (4): 379-388.
- [22] Yamagishi M. Oriental hybrid lily Sorbonne homologue of LhMYB12 regulates anthocyanin biosyntheses in flower tepals and tepal spots [J]. Molecular Breeding, 2011, 28 (3): 381-389.