

研究报告

Research Report

## 黑果枸杞中调控花青素合成代谢的 *MYB* 基因克隆与序列分析

朱雪冰 刘宝龙 曹东 宗渊\*

中国科学院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810001

\* 通信作者, blliu@nwipb.cas.cn

**摘要** 黑果枸杞中富含花青素、蛋白质、多糖等多种对人体有益的营养物质, 是一种很好的药用植物。本研究对黑果枸杞 cDNA 进行 Solexa 高通量转录组测序并用 PCR 方法克隆黑果枸杞中 *MYB* 基因的转录因子 *SIAN2*。研究表明: 该基因全长 774 bp, 编码 257 个氨基酸, 分子量为 29 775.84, 等电点为 7.79, 具有两个属于 SANT 超基因家族的保守区, 蛋白具有一定的亲水性, 二级结构主要以  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲为蛋白质最大的结构原件, 跨膜区分析推测该蛋白质可能不具有跨膜区, 主要是在膜外进行作用。进化分析表明: *SIAN2* 基因与番茄、矮牵牛、辣椒等物种的调节基因的亲缘关系很近。本研究为解析黑果枸杞果实中调控花青素合成代谢基因分子遗传机理、为更好的利用花青素提供了科学依据。

**关键词** 黑果枸杞, *MYB*, 基因克隆, 生物信息学分析

## Cloning and Sequence Analysis of *MYB* Gene Regulating Anthocyanin Anabolism in the *Lycium ruthenicum*

Zhu Xuebing Liu Baolong Cao Dong Zong Yuan\*

Qinghai Provincial Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001

\* Corresponding author, blliu@nwipb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.017.003208

**Abstract** *Lycium ruthenicum* is rich in anthocyanidin, protein, polysaccharide and other nutrients beneficial to the human body, and it is a good medicinal plant. In this study, Solexa high-throughput transcriptome sequencing of *Lycium ruthenicum* was carried out, and PCR method was used to clone the transcription factor *SIAN2* of *MYB* gene in *Lycium ruthenicum* Murr.. The results showed this gene was 774 bp in length, encoding 257 amino acids, with a molecular weight of 29 775.84 and isoelectric point of 7.79, and had two conserved regions belonging to the SANT super-gene family. The protein had certain hydrophilicity, and the secondary structure mainly consisted of alpha helix and irregular coiling as the largest structural primitives of protein. The trans-membrane region analysis suggested that the protein might not have a trans-membrane region, but mainly acted outside the membrane. Evolutionary analysis showed: The *SIAN2* gene was closely related to the regulatory genes of tomato, petunia, pepper and other species. This study would provide a scientific basis for the analysis of molecular genetic mechanism of genes regulating anthocyanin anabolism in *Lycium ruthenicum* and for the better utilization of anthocyanin.

**Keywords** *Lycium ruthenicum*, *MYB*, Gene cloning, Bioinformatics analysis

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.), 蒙名为“乔诺英—哈尔马格”、藏药名“旁玛”, 系茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium* L.)植物, 是中国西北荒漠地区一种特

有的野生植物资源, 其浆果呈顶部略凹陷的球形, 成熟后为紫黑色, 无毒, 有甜味, 有大量的有益微量元素(夏园园等, 2015), 很多文献记载黑果枸杞具有抗

基金项目: 本研究由青海省科技厅创新服务平台项目(2018-ZJ-T08)、青海省重点研发计划(2018-NK-133)和中科院科技服务网络计划(STS 计划)共同资助

引用格式: Zhu X.B., Liu B.L., Cao D., and Zong Y., 2019, Cloning and sequence analysis of *MYB* gene regulating anthocyanin anabolism in the *Lycium ruthenicum*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 17(10): 3208-3213 (朱雪冰, 刘宝龙, 曹东, 宗渊, 2019, 黑果枸杞中调控花青素合成代谢的 *MYB* 基因克隆与序列分析, 分子植物育种, 17(10): 3208-3213)

氧化,养肝明目等功效,对于预防和治疗心脑血管系统疾病具有一定的帮助(林丽等,2013),是一种传统的中药材。黑果枸杞中花青素的含量是葡萄的 10.72 倍、树莓的 4.91 倍、紫甘蓝的 1.91 倍、蓝莓的 1.75 倍、紫薯的 4.45 倍(闫亚美等,2014,食品工业科技,35(16):133-136),被证实为花青素含量最高的植物,因此花青素也成为了黑果枸杞最主要的商品特征,可用于食品、医药、化妆品等(陈海魁等,2008,黑龙江农业科学,(5):155-157)。

植物界中各种各样的花与果的颜色由植物重要的次级代谢产物花青素控制着,花青素是属于黄酮类的一种水溶性色素(李进等,2006),对于植物而言花青素不仅赋予植物美观的颜色,而且在植物间传粉也有着很重要的作用,对人体也具有抗癌,抗菌,抗炎及抗衰老等很多益处。不同花青素之间的差异主要取决于羟基的数目、羟基的甲基化程度、糖分子附着的性质、数量和位置,附着在糖分子上的脂肪族或芳香酸的类型和数量等,到目前位置,一共发现了 20 种花色素(贾赵东等,2014)。花青素的生物代谢途径是在一系列复杂的酶促反应和相关转录因子的调控下合成,多数花青素苷分支由 MBW (MYB-BH-LH-WD40) 转录因子三元复合体调控(Petroni and Tonelli, 2011),可见 MYB 基因在调控花青素合成中的重要性。

MYB 转录因子有着很多生物学功能,比如参与植物的初生和次生代谢反应、植物细胞形态和模式的建成、多个生长发育过程及逆境胁迫应答反应等(左然等,2012),黄云吉等(2015)研究发现苦荞中的 MYB 转录因子可能参与抗高盐、干旱等非生物胁迫的应答反应。国内外很多研究已经通过实验证实 MYB 转录因子参与花青素合成代谢,CtMYB-TF5, CtMYB-TF6, CtMYB-tf7 等在红花的根、茎叶中的表达含量低,而在花中有很高的表达(陈江等,2018),还有 MYBA 及 MYB10 调控着蔷薇目植物苹果、梨、草莓等的花青素合成(Espley et al., 2007),MnMYB330 在桑葚果实发育过程中显著上调,与花青素在桑葚中的积累成正相关关系(李军等,2016 年)。在研究领域内,对 MYB 转录因子的研究越来越广泛,越来越多的相关 MYB 家族的基因及其相关的功能被挖掘,深入的了解 MYB 转录因子与花青素的关系对更好的利用花青素提供有效的依据,在本研究以黑果枸杞为研究对象,了解到果实中相关 MYB 的基因 *SIAN2*,对其进行克隆与生物信息学分析,不仅对黑果枸杞有了新的认识,而且为 MYB 转录因子的研究增加了新的内容。

## 1 结果与分析

### 1.1 *SIAN2* 基因的序列分析

通过 BLAST 程序在 NCBI 上将获得的的目的基因片段进行同源搜索比对发现了 MYB 基因的全长片段(图 1)。DNASTar 软件分析出该基因全长 774 bp。推测基因的开放阅读框编码 257 个氨基酸,ATG 为起始密码子,TGA 为终止密码子。分子量为 29 775.84,等电点为 7.79。负电荷残基数为 33 个,正电荷数为 34 个。

### 1.2 *SIAN2* 蛋白能域及亲水性的分析

利用 NCBI 的 BlastP 在线比对软件,在蛋白质保守区数据库进行蛋白质保守区预测。结果显示,该基因具有两个属于 SANT 超基因家族的保守区,第一个保守区是从第 8 个氨基酸到第 56 个氨基酸,为 48 个氨基酸长度,第二个保守区是从第 71 个氨基酸到 107 个氨基酸,为 37 个氨基酸长度(图 2)。用 ProtScale 在线软件进行亲疏水性预测,预测结果显示蛋白质疏水性最大值与最小值分别为 1.322 和 -3.378,而且疏水的平均值为 -0.845,这说明这些蛋白质具有一定的亲水性(图 3)。

### 1.3 *SIAN2* 二级结构及蛋白质跨膜分析

使用 SOPMA 工具进行分析二级结构则主要是以  $\alpha$ -螺旋(45.53%)和不规则卷曲(35.80%)为主,其次有延伸链(12.84%)、 $\beta$ -转角(5.84%) (图 4)。用 TMHMM-2.0 分析跨膜区,结果显示,该蛋白质不具有跨膜区,在膜外进行作用(图 5)。

### 1.4 *SIAN2* 亲缘性分析与多序列比对

利用 MEGA 4 软件对该基因与其他植物的氨基酸序列进行对比构建系统进化树(图 6),结果显示,黑果枸杞中 MYB 转录因子调控的 *SIAN* 基因与辣椒、矮牵牛、茄子等物种的调节基因的亲缘关系很近。在蛋白质数据库中用得到的氨基酸序列与亲缘关系近的几种物种的氨基酸序列进行同源性比对,结果发现枸杞氨基酸序列与番茄中 *LeANT1* 基因翻译的氨基酸序列相似系数为 58%;与矮牵牛中 *PhAN2* 基因所翻译的氨基酸序列相似度为 59%;与辣椒中 *CaA* 基因翻译的氨基酸序列相似系数为 76% (图 7)。

## 2 讨论

黑果枸杞中的花青素含量很高,花青素成为了

```

1 Met Met Asn Thr Ser Val Thr Ile Thr Lys Ser Ser Gly Val Arg Lys Gly Ala Trp Thr Glu Glu Glu Asp His Leu Leu Arg Lys Cys Ile Gln Lys Tyr
  ATGATGAATACTAGTGTACTATTACTAAATCATCTGGAGTGGAGAAAGGTGCATGGACTGAAGAGAGAGATCATCTTTTGAGAAAATGCATTCAAAAGT
  TAGATGAATAGATCACAATGATAATGATTTAGTAGACCTCACTCCTTTCCACGTACCTGACTTCTTCTTCTAGTAGAAAACCTTTTTACGTAAGTTTTCA
101 Tyr Gly Glu Gly Lys Trp His Gln Val Pro Ile Arg Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Arg Pro His Ile
  ACGGTGAAGGAAAATGGCATCAAGTTCCCATTAGAGCTGGTCTAAATAGATGCAGGAAGAGTTGTAGACTGAGTGGCTGAATTATCTAAGGCCACATAT
  TGCACCTTCCTTTTACCCTAAGTTCACGGGTAATCTCGACCAGATTTATCTACGTCCTTCTCAACATCTGACTCCACCAGCTTAATAGATTCCGGGTATA
201 Ile Lys Arg Gly Asp Phe Ser Ser Glu Glu Val Asp Leu Ile Leu Arg Leu His Lys Leu Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Gly Arg Leu Pro Gly
  AAGAGAGGTGACTTCTCTTCTGAGGAAAGTTGACCTTATCTTGGAGCTTCATAAGCTCTTAGGCAACAGATGGTCACTCATTGCGGTAGACTTCCGGGA
  TTTCTCTCACTGAAGAGAAAGACTCCTTCAACTGGAATAGAACTCCGAAGTATTGCGAATCCGTTGTCTACCAAGTGAACGCCCATCTGAAGGCCCT
301 Arg Thr Ala Asn Asp Val Lys Asn Tyr Trp Asn Thr His Leu Gln Arg Lys Leu Thr Ala Pro His Gln Gln Glu Arg Lys Tyr Asn Asn Ala Leu Lys Ile
  AGAACAGCAAACGATGTCAAATACTGGAACACACACCTACAGAGGAAGTTAACTGCTCCTCATCAACAAGAGAGAAAAGTACAATAATGCCCTCAAGA
  TCTTGTCTGTTGCTACAGTTTTTCATGACCTTGTGTGGATGCTCCTTGAATTGACGAGGAGTAGTTGTTCTCTCTTTCATGTTATACGGGAGTTCT
401 Ile Thr Glu Asn Thr Ile Leu Arg Pro Arg Pro Arg Thr Phe Thr Ser Ser Ser Ala Lys Asn Val Ser Phe Cys Ser Asn Lys Ser Ile Thr Asn Thr Val
  TCACAGAAAACACCATACTAAGACCTCGAACCCTCGAACCTTCACATCAAGTAGTGCAAGAAGATGTTTCTTTTTCAGCAACAAAAGTATCACAACACTGT
  AGTGTCTTTTGTGGTATGATTTCTGGAGCTGGAGCTTGGAAAGTGTAGTTCATCACGTTTCTTACAAAAGAAAACGTCGTTGTTTTCATAGTGTGTTGACA
501 Val Asp Lys Asn Ala His Asn Asn Glu Ile Leu Asn Ile Cys Glu Lys Pro Thr Gly Glu Thr Thr Ser Val Asp Glu Gly Val Gln Trp Trp Thr Ser Leu
  AGATAAAAACGCACACAACAATGAAATACTAAATATTTGTGAGAAGCCAACAGGTGAAACGACGTCGGTAGACGAGGAGTTCAATGGTGGACAAGTTTA
  TCTAATTTTTGCGTGTGTTACTTTTATGATTTATAAACACTCTTCGGTTGTCACCTTTGCTGCAGCCATCTGCTCCCTCAAGTTACCACCTGTTCAAAT
601 Leu Glu Asn Cys Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ala Glu Ala Phe Gly Ser Phe Asp Glu Glu Asn Met Leu Gln Ser Leu Leu His Glu Glu Ile Ser Pro Pro
  CTGGAAAATTTGCAATGAAACTGAGGAAGAAGCAGAAGCATTGGGAGCTTTGATGAAGAAAATATGTTACAAAAGTTTGTGATGAGGAAAATTTCAACCAC
  GACCTTTTAAAGTTACTTTGACTCCTTCTTCGCTTCGTAACCCCTCGAAACTACTTCTTTTATACAATGTTTCAAACAACGTACTCCTTTAAAGTGGTG
701 Pro Met Gln Gln Gly Gln Ser Gly Asn Trp Asp Asp Phe Ser Ala Asp Ile Asp Leu Trp Asn Leu Leu Asn ***
  CCATGCAACAAGGACAAAGTGGTAATTTGGGATGACTTTTCCGCTGATATTGACCTATGGAATCTACTGAATTAG
  GGTACGTTGTTCTCTGTTTCAACATAACCTACTGAAAAGGCGACTATAACTGGATACCTTAGATGACTTAATC
  
```

图 1 预测基因编码的氨基酸

Figure 1 Prediction of the amino acid encoded by genes

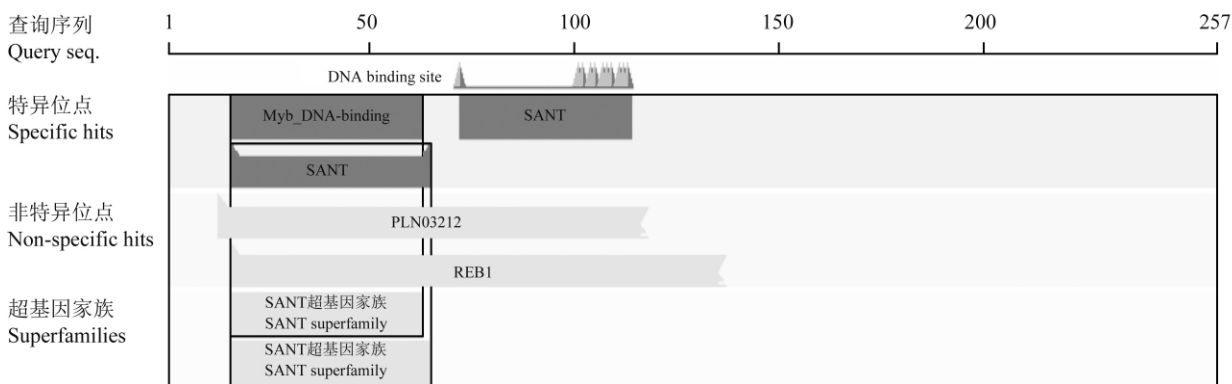


图 2 SIAN2 保守结构域分析

Figure 2 SIAN2 conserved domains analysis

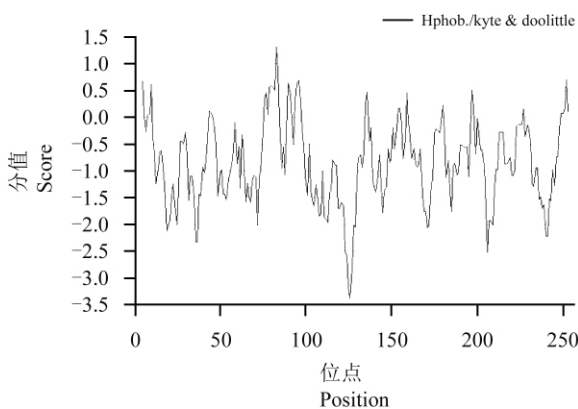


图 3 SIAN2 的疏水, 性亲水分析

Figure 3 Hydrophobic and hydrophilic analysis of SIAN2

黑果枸杞的主要商品特征。花青素生物合成与多个结构基因相关, 而这些结构基因的表达受控与转录因子, 这些转录因子主要包括 MYB、bHLH、WDR 三

大类。对于 MYB 转录因子的研究也是相对较多的, 最早在玉米中发现调控花青素合成的 MYB 类转录因子 ZmC1, 如果在玉米中发生 MYB 类调控基因的基因突变, 会引起玉米果实颜色的改变出现杂色玉米, 包括在水果、蔬菜及观赏类花卉中都会出现同一品种不同颜色的情况。并不是所有的 MYB 转录因子都具有正调控的作用, 有一些也会起到负调控的作用, 在拟南芥和矮牵牛中发现有抑制作用的 MYB, 它们与激活型 MYB 拮抗, 使花青素避免在不适合的组织和环境中过度的积累(Albert et al., 2014)。

对于 MYB 转录因子的克隆及表达分析在其他植物中也有研究, 陈江等(2018)在红花中克隆了 6 个 MYB 转录因子基因, 分别命名为 CtMYB-TF1、CtMYB-TF2、CtMYB-TF3、CtMYB-TF4、CtMYB-TF5、CtMYB-TF6, 序列分析表明 6 个基因都具有 MYB 转录



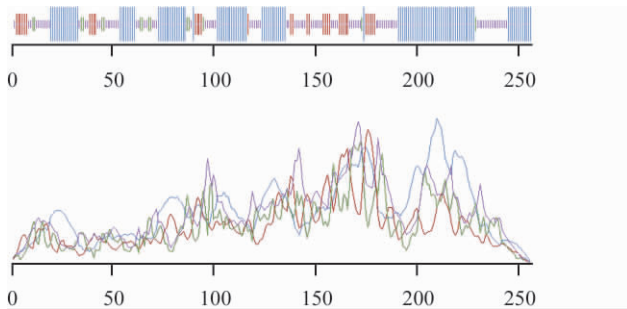


图 4 SIAN2 的二级结构的预测分析

注: 蓝色:  $\alpha$ -螺旋; 紫色: 无规则卷曲; 红色: 延伸链; 绿色:  $\beta$ -转角

Figure 4 Prediction and analysis of the secondary structure of SIAN2

Note: Blue: Alpha helix; Purple: Random coil; Red: Extended strand; Green: Beta turn

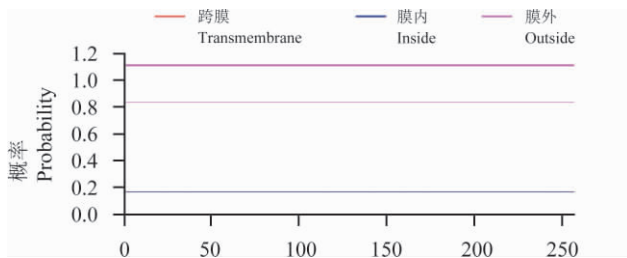


图 5 蛋白质序列跨膜区分析情况

Figure 5 Results of transmembrane domain analysis of protein sequences

因子核心结构域,且 *CtMYB-TF5* 和 *CtMYB-TF6* 在植物根茎叶中表达较低,在花中表达较高。丁蒙蒙等(2018)在楠木中共挖掘了 82 个 MYB 转录因子,转录因子蛋白所含的氨基酸数目为 50~121 个,分子量为 5.907~123.64 kD,都具有亲水性,以  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为主要二级结构原件,都具有高度的保守型。同时,对黑果枸杞中的 MYB 转录因子也有研究,王翠平等(2018)获得黑果枸杞 *LrMYB1R1* 基因,全长 1 496 bp,编码区为 927 bp,编码产物包含 308 个氨基酸,编码蛋白相对分子质量为 33 400,理论等电点为 7.80,属于 *R1-MYB* 基因,并与番茄和马铃薯等的 MYB 蛋白具有高度的相似性。

有研究证明 MYB 基因会参与植物逆抗胁迫的生理反应,程路等(2016)研究谷子抗旱品种 GG 在干旱胁迫后 Sioo2017 的表达量升高,并发现该转录因子与玉米中已经证实参与抵抗各种压力胁迫的 MYB-IF35 具有很高的同源性,黑果枸杞生长的地理环境也比较干旱且能低温条件下也能很好的生存,这种性质是否与黑果枸杞中 MYB 基因有关,目前没有报道,在今后对黑果枸杞的研究中可以去探究。

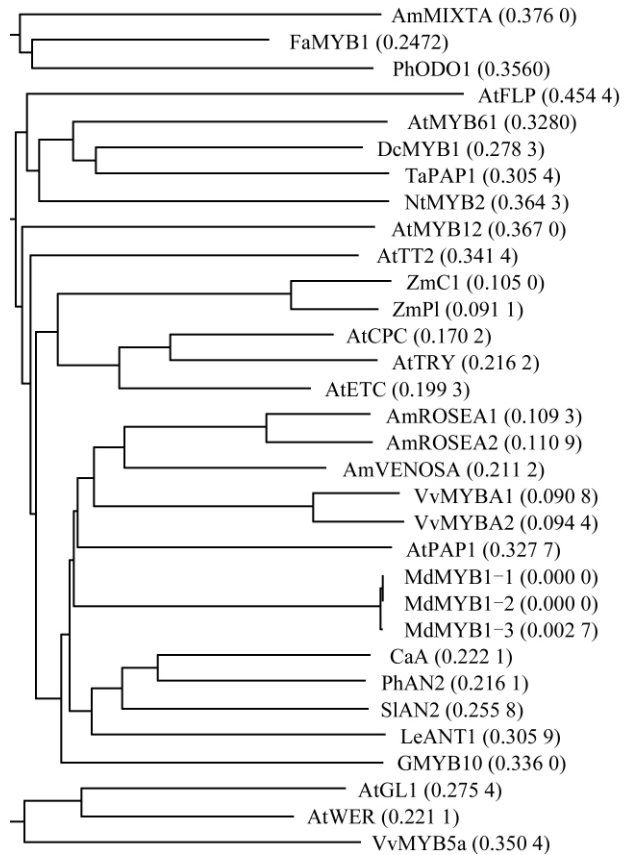


图 6 蛋白系统的进化树

Figure 6 Protein system phylogenetic tree

### 3 材料与方法

#### 3.1 实验材料

黑果枸杞植株 2013 年采集于青海省柴达木盆地诺木洪农场,移栽至中国科学院西北高原生物研究所内。黑果枸杞结果后,将新鲜的黑果枸杞果实采摘用液氮冷冻后保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中,备用。

#### 3.2 基因克隆

将保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用的黑果枸杞果实取出,采用 Tiangen RNAPrep 纯植物试剂盒进行 RNA 的提取,用浓度测定仪测定 RNA 浓度,将浓度检测合格的 RNA 送去华大基因公司用 Illumina Hiseq 2000 进行转录组测序,得到的原始数据经过过滤、组装及对基因的注释与分类等处理后获得黑果枸杞果实的转录组数据。利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(Thermo Scientific 公司)将黑果枸杞果实的 RNA 按试剂盒提供的步骤反转录成 cDNA,保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中用于基因克隆。从获得的黑果枸杞转录组数据中找出转录本,用 Premier 5.0 软件设计特异性引物,正向引物:5'-TGTC

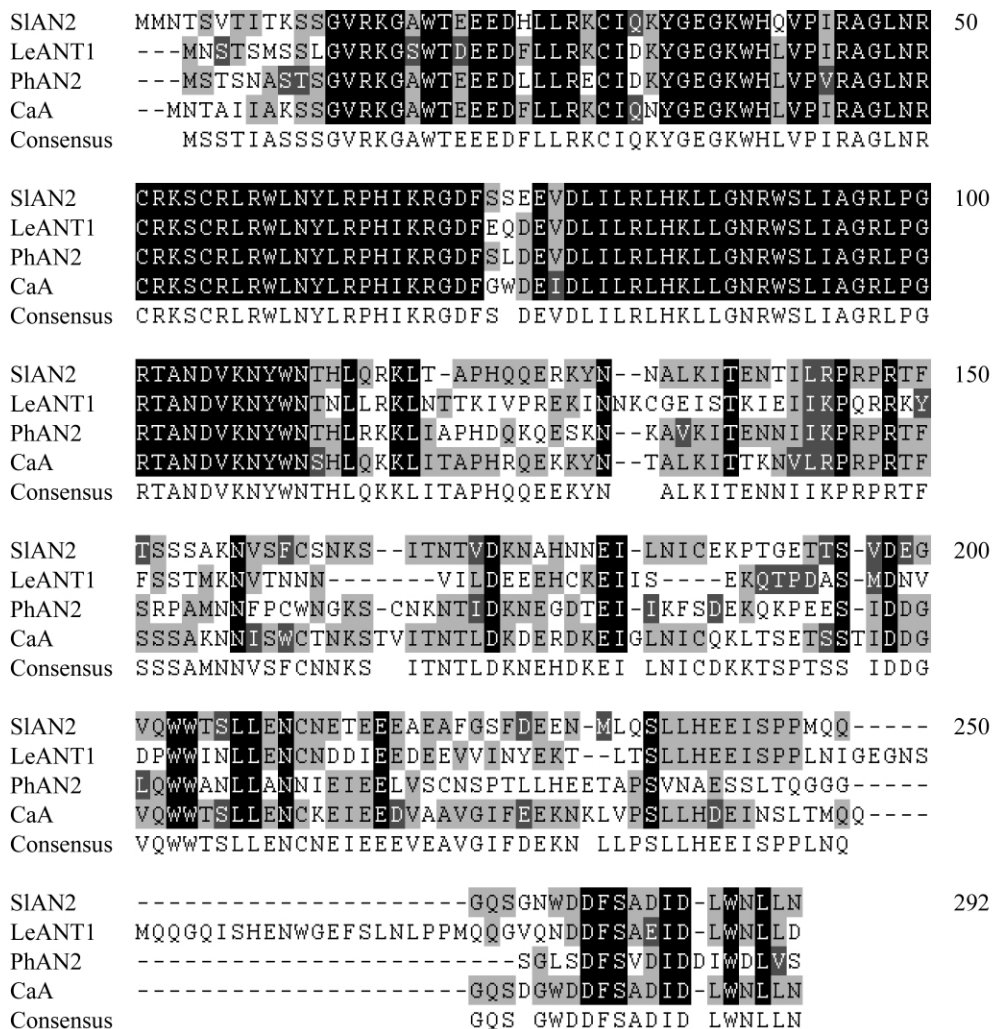


图7 SIAN2与番茄LeANT1蛋白的多序列比对分析

Figure 7 Multi-sequence alignment analysis of SIAN2 and tomato LeANT1 protein

TTAATGCTACTGATGG-3', 反向引物: 5'-ATGATG AATACTAGTGTTACTAT-3', 正反向引物预期的片段长度都为 1 200~1 300 bp。将 PCR 总反应体系设计成 50  $\mu$ L, 其中包含的反应物有: Buffer 10  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 正反向引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 33.5  $\mu$ L, 高保真酶 0.5  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 保持 10 min。在 PCR 产物中分别加入 5  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 1  $\mu$ L dNTPs, 0.2  $\mu$ L Taq DNA polymerase 在 PCR 仪上 72 $^{\circ}$ C 10 min 的条件下完成加 3' 端“A”, 再用 1%的凝胶电泳仪检测后利用 TIANgel Midi Purification Kit 琼脂糖凝胶回收试剂盒将 PCR 产物特异条带进行回收和纯化, 用相应的方法进行 pGEM-T Easy 载体连接, 将链接产物转入 *E. coli* 细胞, 并通过重组克隆筛选的阳性菌株送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行序列测序。

### 3.3 基因序列及其编码蛋白的分析

用 Vector NTI Suite 9.0 软件去除载体序列, 获得目的基因片段, 用 NCBI 在线数据库进行同源搜索比对, 再应用 DNASTar 软件进行 cDNA 序列开放阅读框的分析并推导出相应的氨基酸序列。利用 NCBI 的 BlastP 在线比对软件, 在蛋白质保守区数据库, 用推导的氨基酸序列进行蛋白质保守区预测; 应用 ProScale 在线软件, 以默认算法对氨基酸序列进行蛋白质疏水性预测; 应用 TMHMM 2.0 进行蛋白质序列的跨膜区分析, 应用 MEGA 4 软件与其他植物调节基因的氨基酸序列进行多序列对比, 在蛋白质数据库中用得到的氨基酸序列与亲缘关系最近的几种物种的氨基酸序列进行同源性比较。

### 作者贡献

朱雪冰是本研究的实验设计者和实验研究的执

行人,完成数据分析,论文初稿的写作;宗渊参与实验设计,试验结果分析;刘宝龙是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析;曹东完成指导论文写作和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢

本研究由青海省科技厅创新服务平台项目(2018-ZJ-T08)、青海省重点研发计划(2018-NK-133)和中科院科技服务网络计划(STS 计划)共同资助。

## 参考文献

- Albert N.W., Davies K.M., Lewis D.H., Zhang H., Montefiori M., Brendolise C., Boase M.R., Ngo H., Jameson P.E., and Schwinn K.E., 2014, A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots, *Plant Cell*, 26(1): 962-980
- Chen J., Tang X.H., Ren C.X., Chen X., He W., Zhang S.Y., Wu Q.H., and Pei J., 2018, Cloning and expression analysis of MYB transcription factor genes in safflower, *Yaoxue Xuebao (Acta Pharmaceutica Sinica)*, 53(1): 141-146 (陈江, 唐小慧, 任超翔, 陈骁, 何雯, 张思源, 吴清华, 裴瑾, 2018, 红花转录因子广泛参与调控黄酮类成分的合成, *药学学报*, 53(1): 141-146)
- Cheng L., Zhang B., Zhang Y.Y., Su Y.B., Wei D., Guo Z., and Li H.Y., 2016, MYB transcription factors and their relationship with drought tolerance in foxtail millet, *Shanxi Nongye Daxue Xuebao (Journal of Shanxi Agricultural University)*, 36(12): 846-867 (程路, 张彬, 张耀元, 苏彦冰, 魏东, 郭展, 李红英, 2016, 谷子 MYB 转录因子家族与抗旱关系的研究, *山西农业大学学报*, 36(12): 846-867)
- Ding M.M., Shi X.D., Gu Y.X., Dai J., Sheng Y.Z., Xu Y., and Zhuang G.Q., 2018, Transcriptome-based excavation and analysis of MYB family transcription factors in *Phoebe zhennan*, *Guangxi Zhiwu (Guihaia)*, 38(1): 90-100 (丁蒙蒙, 时小东, 顾雨熹, 代娇, 盛玉珍, 徐莺, 庄国庆, 2018, 基于转录组的楠木 MYB 转录因子的挖掘及分析, *广西植物*, 38(1): 90-100)
- Espley R.V., Hellens R.P., Putterill J., Stevenson D.E., Amma S. K., and Allan A.C., 2007, Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, *Md-MYB10*, *Plant J.*, 49(3): 414-427
- Huang Y.J., Deng R.Y., Gao F., Luo X.P., and Wu Q., 2015, Cloning and expression analysis of transcription factor gene *FlMYB21* from tartary buckwheat under abiotic stress, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(9): 1939-1945 (黄云吉, 邓仁榆, 高飞, 雒晓鹏, 吴琦, 2015, 苦荞转录因子基因 *FlMYB21* 的克隆及其非生物胁迫下的表达分析, *基因组学与应用生物学*, 35(9): 1939-1945)
- Jia Z.D., Ma P.Y., Bian X.F., Yang Q., Guo X.D., and Zhao Y.Z., 2014, Biosynthesis metabolic pathway and molecular regulation of plants anthocyanin, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica)*, 34(7): 1496-1506 (贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 杨清, 郭小丁, 谢一芝, 2014, 植物花青素合成代谢途径及其分子调控, *西北植物学报*, 34(7): 1496-1506)
- Li J., Zhao A.C., Liu C.Y., Lü R.H., Liu X.Q., and Xu M.D., 2016, Identification and function analysis of anthocyanin biosynthesis related MYB genes in mulberry, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica)*, 36(6): 1110-1116 (李军, 赵爱春, 刘长英, 吕蕊花, 刘晓清, 余茂德, 2016, 桑树花青素合成相关 MYB 类转录因子的鉴定与功能分析, *西北植物学报*, 36(6): 1110-1116)
- Li J., Zhao H.Y., Yuan H., Zhu C.Q., and Shi D.H., 2006, Study on the pigment of *Lycium ruthenicum* Murr., *Shipin Kexue (Food Science)*, 27(10): 145-160 (李进, 赵红艳, 原慧, 祝长青, 时德红, 2006, 黑果枸杞色素性质研究, *食品科学*, 27(10): 145-160)
- Lin L., Zhang P.S., Jin L., He Z.Y., and Gao S.F., 2013, Research progress of *Lycium ruthenicum*, *Zhongguo Yaofang (China Pharmacy)*, 24(47): 4493-4496 (林丽, 张裴斯, 晋玲, 贺正阳, 高素芳, 2013, 黑果枸杞的研究进展, *中国药房*, 24(47): 4493-4496)
- Petroni K., and Tonelli C., 2011, Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs, *Plant Science*, 181(3): 219-229
- Wang C.P., Chen J.W., Yan L., Qiao G.X., and Li J., 2018, Cloning and expression analysis of R1-MYB transcription factor in *Lycium ruthenicum*, *Zhongcaoyao (Chinese Traditional and Herbal Drugs)*, 49(1): 203-210 (王翠平, 陈建伟, 严莉, 乔改霞, 李健, 2018, 黑果枸杞 R1-MYB 转录因子基因的克隆及表达分析, *中草药*, 49(1): 203-210)
- Xia Y.Y., Mo R.N., Qu W., and Liu W.Y., 2015, Research progress in chemical constituents of *Lycium ruthenicum* Murr., *Yaoxue Jinzhan (Progress in Pharmaceutical Sciences)*, 39(5): 351-356 (夏园园, 莫仁楠, 曲玮, 柳文媛, 2015, 黑果枸杞化学成分研究进展, *药学进展*, 39(5): 351-356)
- Zuo R., Xu M.L., Chai G.H., and Zhou G.K., 2012, Function and regulation mechanism of plant MYB transcription factors, *Shengming Kexue (Chinese Bulletin of Life Science)*, 24(10): 1133-1140 (左然, 徐美玲, 柴国华, 周攻克, 2012, 植物 MYB 转录因子功能及调控机制研究进展, *生命科学*, 24(10): 1133-1140)