

红花 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}, 陈骁², 何雯², 张思源²,
吴清华^{1,2}, 裴瑾^{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: 红花是菊科一年生草本植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥花, 为活血化瘀常用中药。黄酮类成分是红花主要有效成分, MYB 转录因子广泛参与调控黄酮类成分的合成, 对红花 MYB 转录因子克隆及表达分析为解析红花黄酮类成分的调控机制、调控黄酮类成分的合成具有重要意义。本研究基于在线二代转录组数据, 首先利用 iTAK 软件对 MYB 转录因子进行注释, 设计引物对长片段 MYB 转录因子基因进行克隆, 其次对克隆到的 MYB 转录因子基因进行序列分析, 再次利用实时荧光定量 PCR 对克隆的 MYB 转录因子基因表达进行分析。注释筛选得到 8 个长片段 MYB 转录因子基因, 成功克隆到 6 个 MYB 转录因子基因, 分别命名为 *CtMYB-TF1*、*CtMYB-TF2*、*CtMYB-TF4*、*CtMYB-TF5*、*CtMYB-TF6* 及 *CtMYB-TF7*。序列分析表明, 克隆到的 6 个 MYB 转录因子基因都具有 MYB 转录因子核心结构域, 其中 *CtMYB-TF7* 转录因子同已报道黄酮类成分合成调控因子 *AtMYBL2* 及 *AtMYB12* 关系较近。表达分析表明, *CtMYB-TF5*、*CtMYB-TF6* 及 *CtMYB-TF7* 在根、茎及叶中表达量低, 在花中表达量高。研究结果为进一步研究红花黄酮类成分的分子调控奠定基础。

关键词: 红花; MYB 转录因子; 基因克隆; 表达分析; 黄酮类成分

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0141-06

Cloning and expression analysis of MYB transcription factor genes in safflower

CHEN Jiang^{1,2}, TANG Xiao-hui^{1,2}, REN Chao-xiang^{1,2}, CHEN Xiao², HE Wen²,
ZHANG Si-yuan², WU Qing-hua^{1,2}, PEI Jin^{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: Safflower is a dried flower of the annual herbaceous plant safflower (*Carthamus tinctorius* L.). As a traditional Chinese medicine, it was widely used in the regulation of blood circulation. Flavonoids are the main active ingredients in safflower. MYB transcription factors are involved in the regulation of flavonoids. The cloning and expression analysis of MYB transcription factor genes in safflower is of great significance, not only for clarifying the regulation mechanism of flavonoids biosynthesis in safflower, but also for the artificial regulation of flavonoid biosynthesis in safflower. Based on the transcriptome data, we used iTAK to annotate the MYB transcription factors in safflower. The MYB transcription factors were cloned and their sequences were analyzed. Besides, their expressions were analyzed by a Real-time PCR. In the experiment, eight long

收稿日期: 2017-06-26; 修回日期: 2017-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573544); 四川省教育厅科研项目 (17ZB0150); 四川省科技支撑计划资助项目 (2014SZ0156); 成都中医药大学基金资助项目 (ZRY1610, ZRQN1647).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-26-61800235, E-mail: peixin@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0614

fragment MYB transcription factors were screened and six MYB transcription factors was successfully cloned, named *CtMYB-TF1*, *CtMYB-TF2*, *CtMYB-TF4*, *CtMYB-TF5*, *CtMYB-TF6* and *CtMYB-TF7*, respectively. The six MYB transcription factors had the core domain of MYB transcription factor family, and evolutionary analysis showed that the *CtMYB-TF7* transcription factor was closely related to the factors *AtMYBL2* and *AtMYB12*. Expression analysis showed that the expression of *CtMYB-TF5*, *CtMYB-TF6* and *CtMYB-TF7* was low in roots, stems and leaves, and was high in the flower. The results provide a foundation for study of mechanism of molecular regulation of safflower flavonoids.

Key words: safflower; MYB transcription factor; gene cloning; expression analysis; flavonoids

红花是菊科一年生草本植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥花, 自东汉时期张仲景《金匱要略》中“妇人杂病篇”就有使用记载, 其质柔软, 味辛, 性温, 归心、肝经, 具有活血通经、祛瘀止痛的功效, 为活血化瘀常用中药。历史上红花以四川“川红花”、河南“怀红花”最为出名^[1]。当前红花在全国各地栽种范围较广, 新疆、云南、四川及河南等地均有种植, 特别是在新疆, 种植面积较大。

红花的化学成分按照结构包括黄酮、生物碱、聚炔、亚精胺、木脂素、倍半萜、有机酸、甾醇和烷基二醇等类型。其中黄酮类成分, 包括羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA)、槲皮素 (quercetin)、柚皮素 (naringenin) 等是红花主要有效成分。研究表明 HSYA 具有抗凝、抗缺氧、降血压、改善心脑血管供血不足等作用^[2,3], 山奈酚^[4]、槲皮素^[5]等在活血化瘀上也有较好效果。

MYB 转录因子广泛参与调控黄酮类成分的合成, 国内外已有多篇文章进行了综述^[6-8]。在模式植物拟南芥中, *AtMYB12* 能调控查尔酮合成酶基因 (*CHS*)、查尔酮异构酶基因 (*CHI*) 及黄酮醇羟化酶基因 (*F3H*) 等基因表达, 促进调控黄酮类成分的合成^[9]。其同源基因 *AtMYB11* 和 *AtMYB111* 也能调控黄酮类成分的合成^[10]。*AtMYBL2* 也被报道参与调控黄酮类成分的合成^[11]。而在红花中, 克隆报道的 MYB 转录因子较少。至今仅见 Guan 等^[12]克隆的 *CtMYB1* 一篇报道。

近年来, 为了深入研究红花黄酮类成分的合成

调控, 对红花进行了大量的转录组测序工作^[13-15]。本研究基于在线二代转录组数据, 利用 iTAK 软件对 MYB 转录因子基因进行注释, 设计引物对长片段 MYB 转录因子基因进行克隆, 其次对克隆到的 MYB 转录因子基因进行序列分析, 再次利用实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 对克隆的 MYB 转录因子基因表达进行分析。通过对红花 MYB 转录因子基因克隆及表达分析, 为进一步解析红花黄酮类成分的调控机制、调控黄酮类成分的合成奠定基础。

材料与方法

材料 红花为道地产区四川简阳地方品种, 经成都中医药大学药学院资源与鉴定系严铸云教授鉴定为红花 (*Carthamus tinctorius* L.)。2016 年 3 月底将红花种子种植于成都中医药大学温江校区药用植物园。红花 3 个时期的管状花混样用于 MYB 转录因子基因克隆 (3 个时期见图 1A)。红花根、茎、叶及 3 个时期的管状花用于 MYB 转录因子基因表达分析, 根、茎、叶的取样时间是在红花开花第一个时期。田间取样后立即液氮冷冻, 储存于 -80°C 冰箱备用。克隆用大肠杆菌 DH5a 菌株购自宝生物 (TaKaRa, Dalian, China)。

仪器与试剂 主要仪器有 PCR 仪 T100™ Thermal Cycler 型 (Bio-Rad, CA, USA), 高速低温离心机 CT15RE 型 (HITACHI, Japan), 凝胶成像系统 Gel Doc™ XR+ 型 (Bio-Rad, CA, USA), 实时荧光定量

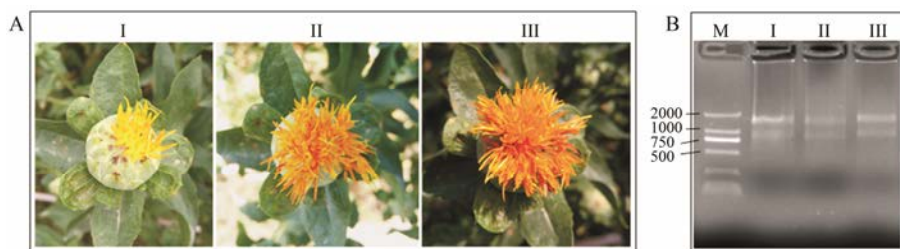


Figure 1 Construction of cDNA mixed template. A: The three periods (I, II and III) for flower development; B: RNA electrophoresis for the three periods, M represents 2 000 bp DNA Marker

PCR 仪 Bio-Rad CFX96 型 (Bio-Rad, CA, USA); 主要试剂有 2×TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix II (Transgen, Beijing, China), 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒 (Tiangen, Beijing, China), TRIzol (Invertrigen, MA, USA) 及 TRIzol 伴侣试剂盒 (Tiangz, Beijing, China), 感受态细胞制备试剂盒 (TaKaRa, Dalian, China), 克隆载体 pMD19-T (TaKaRa, Dalian, China), 引物合成及片段测序送擎科公司 (Tsingke, Beijing, China)。

序列获取及引物设计 本研究采用的转录组数据主要参考 Huang 等^[13]发表的在线数据, NCBI 登录号 SRA048496, 使用百迈克云平台 (<https://www.biocloud.net/>), 选择无参模型进行分析, 利用 iTAK 软件^[16]对调控因子进行注释, 筛选序列较长 MYB 转录因子基因, 以此序列利用 Primer5 对克隆引物进行设计。实验中筛选得到 8 条较长 MYB 转录因子基因序列, 设计的克隆引物见表 1。

Table 1 Primer sequences for MYB transcription factor gene cloning

Gene name	Primer sequence
<i>CtMYB-TFTF1</i>	F: TTTTCCGATGAACTCCAC R: CCCAAACCCTAAATCTTTT
<i>CtMYB-TFTF2</i>	F: TTTTACAATCGCTGGTCC R: AATCCCTCACTTCGTTCTT
<i>CtMYB-TFTF3</i>	F: TTTATCCCAACAACCTACTTCT R: CCAATACCAGGCTCTTTCT
<i>CtMYB-TFTF4</i>	F: GAAGACAGGAGGCTTGAA R: CACGATACGCATACCACA
<i>CtMYB-TFTF5</i>	F: GGCAAATTCGACGGATAA R: GGCTGGATAACTTGGGTT
<i>CtMYB-TFTF6</i>	F: GCTGCGATCTAATACCAT R: TTCACTAAAGTCTAACACCC
<i>CtMYB-TFTF7</i>	F: GACCTATCAGACGAGCAA R: AACAGCCAACAGTTACGA
<i>CtMYB-TFTF8</i>	F: CATTTCTTTCTTTCTTTC R: TTCATCTGCTTATTACTCAA

cDNA 混样模板的构建 将冷冻的红花材料液氮研磨, 用 TRIzol 进行裂解, 利用 TRIzol 伴侣试剂盒进行 RNA 提取, 具体实验方法见商品使用说明书。提取的 RNA 通过凝胶电泳进行完整度检测, 通过 NanoDropTM 分光光度计 ND1000 进行浓度测定。利用试剂盒 RR047A 在 PCR 仪上进行 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。将 3 个时期的花 RNA 同时提取并进行反转录, 将得到的 cDNA 混样, 用于后续 MYB 转录因子基因的克隆。

基因克隆 以构建的混样 cDNA 为模板, 以 2×TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix II 进行 PCR 反应。反应体系(20 μL): 2×TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix 10 μL, ddH₂O 7 μL, 上、下游引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL (50 ng·μL⁻¹)。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 34 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 12 °C 保温。1% 琼脂糖凝胶电泳后切取目的胶块, 利用胶回收试剂盒进行 DNA 片段回收, 回收片段利用 T 载体连接试剂盒连接到 T 载体中, 转化大肠杆菌进行克隆。

序列分析 使用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对序列开放阅读框及氨基酸进行预测, 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对蛋白质进行分子量、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 IBS1.0 对序列结构域进行作图 (<http://ibs.biocuckoo.org/online.php>)。使用 DNAMAN 软件 (版本 4.0, Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 进行核苷酸序列和蛋白质比对的分析。使用 MEGA4 软件相邻连接法 (neighbor-joining) 构建系统进化树, bootstrap 检验的重复次数为 500 次。

MYB 转录因子 Real-time PCR 分析 依据克隆的 MYB 转录因子序列, 利用 Primer 5 设计 Real-time PCR 用特异性引物, 设计参数选择克隆产物大小为 200~500 bp, 引物长度为 20±2 bp。引物序列见表 2, 其中红花 60S rRNA 为内参基因。设计的引物通过琼脂糖凝胶电泳测试引物的特异性。使用 SYBR

Table 2 Primer sequence for Real-time PCR

Gene name	Primer sequence
<i>CtMYB-TF1</i>	QF: CTTCTTTGAGCCTATCCTTACC QR: CTAATGGCACCTTCACCCCT
<i>CtMYB-TF2</i>	QF: CGGAGGAGGACGAGAAGAT QR: CGGCTGGTAGTTGTTGTTGA
<i>CtMYB-TF4</i>	QF: CTGTCGTCTGAGGTGGTGT QR: AGGTTTAGTTTGTAGCGTGT
<i>CtMYB-TF5</i>	QF: ATTTGGCAACAGATGGAC QR: GCAATAATCTTCGGGTCA
<i>CtMYB-TF6</i>	QF: GTCGTCTACCCAACTGC QR: AAGGAGGAGAACCAAGGA
<i>CtMYB-TF7</i>	QF: CGATACTCCAGAGCCGTTGA QR: ACTTTCCGCACTCCACA
<i>Ct60S</i>	QF: CATCCATTATCCAACAATC QR: AAGAGTAATCAGTCTCCA

PrimeScript RT-PCR 试剂盒进行 Real-time PCR 实验, 实验进行 3 次重复。反应体系 (20 μL): 2 \times SYBR II 10 μL , ddH₂O 7 μL , 上、下游引物各 1 μL , cDNA 模板 1 μL (约 50 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s, 共 43 个循环, 65~95 $^{\circ}\text{C}$ 进行熔解曲线绘制。

结果与分析

1 cDNA 混样模板构建

高质量的 cDNA 模板是基因克隆的关键因素之一。为了尽可能对筛选的 8 个转录因子进行克隆, 实验选择红花不同时期的混样 cDNA 作为克隆模板。本研究选择了红花 3 个时期 (图 1A), 对 3 个时期的管状花提取了 RNA (图 1B)。结果可知, 3 个样品提取的 RNA 条带清晰无降解。随后分别对 3 个时期的 RNA 进行反转录成 cDNA, 将 3 个时期的 cDNA 样品等量混和, 保证后续基因克隆有高质量的模板。

2 MYB 转录因子基因克隆

以构建的 cDNA 混样模板, 对筛选的 8 个 MYB 转录因子基因进行克隆 (图 2)。由图可知, 6 个转录因子基因 (*CtMYB-TF1*、*CtMYB-TF2*、*CtMYB-TF4*、*CtMYB-TF5*、*CtMYB-TF6* 及 *CtMYB-TF7*) 有清晰单一条带, 而 2 个转录因子 (*CtMYB-TF3* 及 *CtMYB-TF8*) 无明显条带。实验将 *CtMYB-TF1*、*CtMYB-TF2*、*CtMYB-TF4*、*CtMYB-TF5*、*CtMYB-TF6* 及 *CtMYB-TF7*

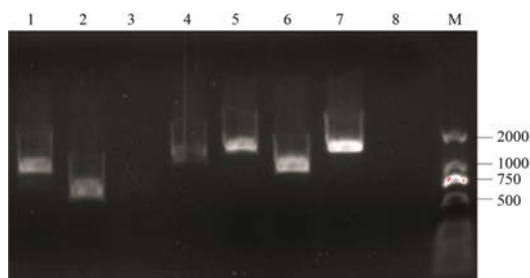


Figure 2 Gene cloning of MYB transcription factors. 1–8 represent *CtMYB-TF1*, *CtMYB-TF2*, *CtMYB-TF3*, *CtMYB-TF4*, *CtMYB-TF5*, *CtMYB-TF6*, *CtMYB-TF7* and *CtMYB-TF8*. M represents 2 000 bp DNA marker

目的条带切胶回收后连接到 pMD19-T 转入 DH5 α 进行克隆, 对阳性菌液送公司测序。返回结果表明, 实验成功对 6 个 MYB 转录因子基因进行了克隆。

3 序列分析

对克隆得到的 6 个 MYB 转录因子基因进行了序列分析 (表 3)。结果表明, *CtMYB-TF1* 的 CDS 长度为 903 bp、*CtMYB-TF2* 为 459 bp、*CtMYB-TF4* 为 1 131 bp、*CtMYB-TF5* 为 804 bp、*CtMYB-TF6* 为 723 bp 及 *CtMYB-TF7* 为 1 233 bp, 都具有 DNA 结合功能, 属 MYB 类转录因子。实验利用 Pfam 对克隆的 6 个转录因子蛋白序列进行了结构域预测, 发现克隆到的 6 个 MYB 转录因子均有 MYB 类转录因子家族 DNA 结合区域 (图 3)。研究已将克隆到 6 个 MYB 转录因子基因相关序列信息提交到 NCBI GenBank 中, 基因名 (GenBank 登录号) 分别为: *CtMYB-TF1* (MF156605)、*CtMYB-TF2* (MF156606)、*CtMYB-TF4* (MF156607)、*CtMYB-TF5* (MF156608)、*CtMYB-TF6* (MF156609) 及 *CtMYB-TF7* (MF156610)。

4 MYB 转录因子进化分析

本实验将克隆得到的转录因子对应氨基酸序列进行了进化分析, 实验选择了红花中已报道的 *CtMYB1*^[12]、拟南芥已报道的 *AtMYB12*^[9] 及 *AtMYBL2*^[11], 以及拟南芥转录因子库 (http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/index.php?sp_id=ALY) 中随机

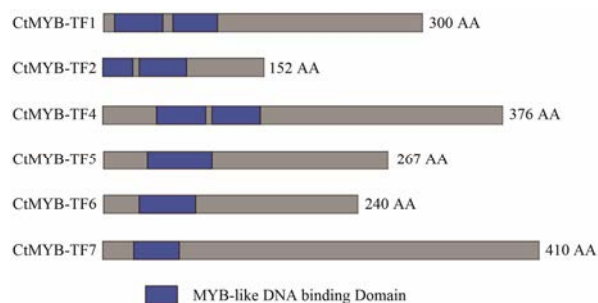


Figure 3 Protein domain analysis of MYB transcription factors. The gray frame indicates the full length of the corresponding MYB protein, the length is indicated by a number, and AA represent amino acids. The blue box represents the MYB DNA-binding domain

Table 3 Bioinformatics analysis of MYB transcription factor genes

Gene name	CDS length	Amino acid	Molecular weight	Isoelectric point	Average hydrophobicity	GO annotation	Pfam annotation
<i>CtMYB-TF1</i>	903	300	33 082.23	7.66	-0.684	DNA binding	Myb-like protein
<i>CtMYB-TF2</i>	459	152	17 706.31	11.77	-0.804	DNA binding	Myb-like protein
<i>CtMYB-TF4</i>	1 131	376	40 719.99	5.96	-0.653	DNA binding	Myb-like protein
<i>CtMYB-TF5</i>	804	267	30 064.59	9.35	-0.997	DNA binding	Myb-like protein
<i>CtMYB-TF6</i>	723	240	26 319.73	5.53	-0.414	DNA binding	Myb-like protein
<i>CtMYB-TF7</i>	1 233	410	44 439.50	8.55	-0.736	DNA binding	Myb-like protein

3 个 MYB 转录因子共 12 个转录因子进行了进化分析。结果 (图 4) 发现, 实验克隆到的 MYB 转录因子间彼此关系较远, 特别是 *CtMYB-TF4*、*CtMYB-TF5*、*CtMYB-TF6*、*CtMYB-TF7* 之间关系, 暗示克隆到转录因子可能具有不同的生物学功能, 特别是 *CtMYB-TF6* 同其他克隆到的 5 个转录因子关系较远。其中仅发现 *CtMYB-TF7* 转录因子同 *AtMYB12* 和 *AtMYBL2* 进化关系相对较近, 暗示 *CtMYB-TF7* 可能参与黄酮类成分的调控功能。

5 MYB 转录因子表达分析

实验利用 Real-time PCR 测定了克隆的 6 个 MYB 转录因子基因在根、茎、叶及花 3 个时期中相对表达量 (图 5)。*CtMYB-TF1* 在花中 3 个时期表达量相对

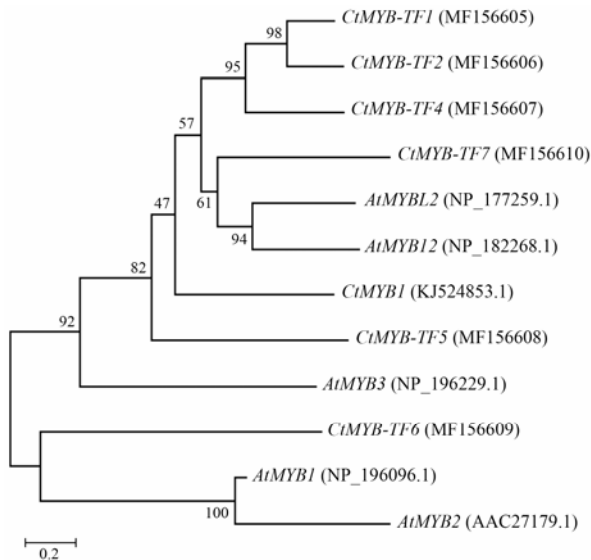


Figure 4 Evolution analysis of MYB transcription factors. The gene name is shown in the figure, and the parentheses represent the NCBI accession number

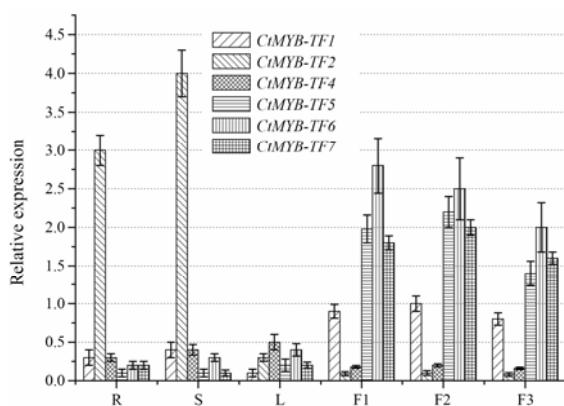


Figure 5 Tissue expression analysis of MYB transcription factor genes. The expression level of each gene is indicated by different grid lines, R represents root, S represents stem, L represents leaf, F1–F3 represents the three periods (I, II and III)

较高, 在根、茎及叶中表达量较低; *CtMYB-TF2* 在根和茎中表达量较高, 在叶和花 3 个时期中表达量较低; *CtMYB-TF4* 在根、茎、叶及花中均有表达, 但表达量较低; *CtMYB-TF5*、*CtMYB-TF6* 及 *CtMYB-TF7* 在根、茎及叶中表达量低, 在花 3 个时期表达量高。与其他部位和时期比较, *CtMYB-TF6* 在花时期 I 表达最高, *CtMYB-TF5* 及 *CtMYB-TF7* 在花时期 II 表达最高。

讨论

本研究参考 Huang 等^[13]发表的在线数据, 从筛选得到的 8 个较长片段的 MYB 转录因子基因序列, 成功克隆了 6 个 MYB 转录因子基因, 另外 2 个 MYB 转录因子基因没有克隆, 作者推测这 2 个 MYB 转录因子在花中表达量较低或不表达, 后面实验将可以构建红花其他部位的混样 cDNA, 以此为模板对 MYB 转录因子基因进行克隆。

进化关系远近可以一定程度反应功能的相关性。实验将克隆到的 6 个 MYB 转录因子基因, 连同红花中已报道的 *CtMYB1*^[12]和拟南芥中 *AtMYB12*^[9]及 *AtMYBL2*^[11]等 12 个 MYB 转录因子进行了进化分析。结果发现, 克隆 MYB 转录因子之间彼此关系较远, 其中 *CtMYB-TF7* 与已报道的两个黄酮类成分调控转录因子 *AtMYB12*^[9]和 *AtMYBL2*^[11]关系较近, 这暗示了 *CtMYB-TF7* 可能参与了黄酮类成分合成的调控。同时, 实验利用 RT-PCR 对克隆的 6 个转录因子进行了组织表达分析, 分析表明 *CtMYB-TF5*、*CtMYB-TF6* 及 *CtMYB-TF7* 在根、茎及叶中表达量低, 在花中表达量较高。其中 *CtMYB-TF6* 在花时期 I 表达量高, *CtMYB-TF5* 及 *CtMYB-TF7* 在花时期 II 表达量高。结合红花黄酮类成分主要在花中积累及进化关系, 表明 *CtMYB-TF7* 可能参与了红花黄酮类成分的调控功能, *CtMYB-TF5* 和 *CtMYB-TF6* 可能参与红花花中其他生理功能。后续研究将开展相关实验, 验证 *CtMYB-TF7* 转录因子是否参与调控红花黄酮类成分的合成。

MYB 转录因子家族成员众多, 广泛参与了植物的生长发育各个环节中。模式植物拟南芥已报道的转录因子就有近 200 个^[17]。本实验利用在线二代数据仅分析到 8 个较长 MYB 片段, 当前三代测序技术已陆续推出且在中药资源研究方面有较好应用^[18–20], 后续研究可以尝试利用三代测序仪器进行测序, 更全面的对红花 MYB 转录因子基因进行克隆。

References

- [1] Peng C. Chinese Genuine Regional Drug Vol. II (中华地道药材, 第二册) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011: 1757.
- [2] Zang BX, Jin M, Si N, et al. Antagonistic effect of hydroxy-safflor yellow A on the platelet activating factor receptor [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 696–699.
- [3] Zhu H, Wang Z, Ma C, et al. Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Planta Med, 2003, 69: 429–433.
- [4] Zang BX, Jin M, Wu W, et al. Inhibitory effect of kaempferol against binding of platelet activating factor to its receptor [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2004, 29: 789–791.
- [5] Zang BX, Jin M, Wu W, et al. Antagonistic effect of quercetin on the platelet activating factor receptor [J]. J Cardiovasc Pul Dis (心肺血管病杂志), 2004, 23: 105–107.
- [6] 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]. Front Biol, 2013, 8: 577–598.
- [7] Liu J, Osbourn A, Ma P. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. Mol Plant, 2015, 8: 689–708.
- [8] Xing W, Jin XL. Recent advances of MYB transcription factors involved in the regulation of flavonoid biosynthesis [J]. Mol Plant Breeding (分子植物育种), 2015, 13: 689–696.
- [9] Mehrtens 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: 1083–1096.
- [10] Stracke R, Ishihara H, Hupé 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: 660–677.
- [11] Dubos C, Gourrierc J, Baudry A, et al. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2008, 55: 940–953.
- [12] Guan LL, Zhang X, Han YL, et al. Cloning and prokaryotic expression of transcription factor CtMYB1 gene in *Carthamus tinctorius* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 2603–2609.
- [13] Huang L, Xiao Y, Pei S, et al. The first illumina-based *de novo* transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers [J]. PLoS One, 2012, 7: e38653.
- [14] Liu X, Dong Y, Yao N, et al. *De novo* sequencing and analysis of the safflower transcriptome to discover putative genes associated with safflor yellow in *Carthamus tinctorius* L. [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16: 25657–25677.
- [15] 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: e30987.
- [16] Zheng Y, Jiao C, Sun H, et al. iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases [J]. Mol Plant, 2016, 9: 1667–1670.
- [17] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15: 573–581.
- [18] Li QS, Li Y, Song JY, et al. High-accuracy *de novo* assembly and SNP detection of chloroplast genomes using a SMRT circular consensus sequencing strategy [J]. New Phytol, 2014, 204: 1041–1049.
- [19] Xu Z, Peters RJ, Weirather J, et al. Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis [J]. Plant J, 2015, 82: 951–961.
- [20] Xu Z, Luo H, Ji A, et al. Global identification of the full-length transcripts and alternative splicing related to phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 100–110.