

兔眼蓝莓组培红色突变株 *CHS* 基因的克隆与分析

刘艳艳, 朱芳明, 刘小珍, 张汉尧

(西南林业大学 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: 蓝莓 *Vaccinium* spp. 果实含有丰富的花青素, 但目前对蓝莓花青素合成相关基因的研究还较少。为分析蓝莓花青素合成相关基因, 也为今后高花青素含量品种的育种工作提供一定的生物信息学基础, 以红色突变兔眼蓝莓 *Vaccinium ashei* 为试验材料, 采用同源克隆方法, 克隆到查尔酮合成酶基因(*CHS*)的 cDNA 全长。生物信息学分析表明: 该基因 cDNA 全长 1 398 bp, 有 1 个 1 170 bp 的完整开放阅读框(ORF), 编码 389 个氨基酸。与杜鹃 *Rhododendron simsii*, 山茶 *Camellia japonica*, 红花油茶 *Camellia chekiangoleosa*, 中华猕猴桃 *Actinidia chinensis*, 高丛蓝莓 *Vaccinium corymbosum*, 苹果 *Malus domestica* 的 *CHS* 基因同源性分别为 90%, 83%, 83%, 83%, 83% 与 82%。兔眼蓝莓 *CHS* 基因编码的蛋白不存在信号肽, 无跨膜结构域, 定位于细胞质中, 肽链表现为疏水性, α -螺旋和随机卷曲是其蛋白质二级结构中量最大的结构元件, β -转角和 β -折叠散布于整个蛋白质中, 对编码的蛋白的结构域预测显示该蛋白含有类似查尔酮合成酶超家族(*CHS-like* 超家族)结构域。由此推测: 兔眼蓝莓 *CHS* 基因是高度保守的, 表达的蛋白为疏水性蛋白, 是一种结构和性质都相对稳定的蛋白。图 4 表 1 参 20

关键词: 生物信息学; 兔眼蓝莓; 组织培养; *CHS*; 花青素

中图分类号: S663; Q291 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2017)05-0864-07

Cloning and analysis of the *CHS* gene from a tissue culture of a red mutant strain in *Vaccinium ashei*

LIU Yanyan, ZHU Fangming, LIU Xiaozhen, ZHANG Hanyao

(Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Blueberries (*Vaccinium* spp.) have attracted much attention because of their abundant anthocyanins; however, there have been few studies on the genes related to anthocyanin biosynthesis in blueberries. To analyze related genes of anthocyanin biosynthesis in blueberries and also to provide some bioinformatics basis for breeding of plants with a high anthocyanin content, a red mutant *Vaccinium ashei* was selected as the experimental material, and the full-length cDNA of chalcone synthase gene (*CHS*) was cloned by the homologous cloning method. The bioinformatics analysis showed that the full-length cDNA was 1 398 bp and had an open-reading frame (ORF) which was 1 170 bp encoding 389 amino acids. The homology on the nucleotide level of the *CHS* gene with the *CHS* genes of several species were 90% for *Rhododendron simsii*; 83% for *Camellia japonica*, *Camellia chekiangoleosa*, *Actinidia chinensis*, and *Vaccinium corymbosum*; and 82% for *Malus domestica*. The *CHS* protein of *Vaccinium ashei* had no signal peptide and no transmembrane domain. It was located in the cytoplasm, the peptide chain was hydrophobic, the α -helix and random coil were the largest constructional elements in the protein secondary structure, and β -turns and β -sheets were interspersed throughout the protein. The domain prediction of the encoded protein showed that the protein contained the chalcone syn-

收稿日期: 2016-10-31; 修回日期: 2016-12-08

基金项目: 云南省林学一流学科建设资助项目(51600625); 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室开放基金资助项目(31360404)

作者简介: 刘艳艳, 从事林木生物技术研究。E-mail: 1255318156@qq.com。通信作者: 张汉尧, 教授, 博士, 博士生导师, 从事植物和微生物分子遗传学研究。E-mail: hanyaoz@163.com

these superfamily (CHS-like superfamily) domain. Thus inferred that the *CHS* gene of rabbit-eye blueberry was highly conserved, the expressed protein was hydrophobic, and it was a kind of protein with a relatively stable structure and properties. [Ch, 4 fig. 1 tab. 20 ref.]

Key words: bioinformatics; *Vaccinium ashei*; tissue culture; *CHS*; anthocyanin

花青素具有极强的抗氧化活性,是近年来研究较多的抗氧化剂;查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是花青素生物合成途径上的第 1 个关键酶,催化 1 分子的香豆酰 CoA 与 3 分子的丙二酰 CoA 反应,生成 4-羟基查尔酮。自 1983 年 KREUZALER 等^[1]利用差异筛选和杂交筛选相结合的方法从欧芹 *Petroselinum hortense* 中获得了第 1 个 *CHS* 基因后,对查尔酮合成酶及其编码基因的研究工作就屡有报道^[2-3]。研究发现,编码查尔酮合成酶(CHS)的基因组成了一个多基因家族,从葡萄 *Vitis vinifera* 中分离到的该家族的 3 个成员,分别被定名为 *CHS1*, *CHS2*, *CHS3*^[4];经氨基酸水平检测,发现 *CHS3* 与 *CHS1*, *CHS2* 的同源性均为 89%,*CHS1* 与 *CHS2* 同源性为 96%,说明 *CHS* 家族成员之间具有较高的同源性。进一步研究发现,*CHS1*, *CHS2* 主要在白葡萄、红葡萄的叶片及果皮的着色过程中表达,而 *CHS3* 主要在红葡萄果皮的着色过程中表达,表明 *CHS3* 主要参与花青素的合成,而 *CHS1*, *CHS2* 可能还参与合成其他代谢产物^[5]。柑橘属 *Citrus* 植物中也有 2 个 *CHS* 的 cDNA 序列被克隆出^[6-7],氨基酸序列上的同源性达到了 86.6%,但具体功能不尽相同,说明 *CHS* 家族成员尽管在氨基酸序列上有很高的同源性,但功能上并不是完全重叠。从目前已经克隆到的上百个 *CHS* 基因序列^[8-9]来看,*CHS* 基因在植物体内的表达具有时空特异性,主要集中于花和果皮等部位,且在特定的时期才会表达;其表达量与花和果皮的颜色直接相关^[10-12],许多果树如苹果 *Malus domestica*^[13],柑橘 *Citrus reticulata*^[14-15],沙梨 *Pyrus pyrifolia*^[16],葡萄^[5]等,在受到紫外线照射^[17]、降低温度^[18]等物理刺激后,*CHS* 基因的表达量增加,引起果实颜色加深。由此可见,*CHS* 基因在花青素生物合成途径中扮演着十分重要的角色。蓝莓 *Vaccinium* spp.为杜鹃花科 Ericaceae 越桔亚科 Vaccinioideae 越桔属 *Vaccinium* 植物,研究称其浆果花青素含量在水果中最为丰富。我们拟以红色突变兔眼蓝莓 *Vaccinium ashei* 为样品,克隆获得查尔酮合成酶基因(*CHS*),对获取的序列进行生物信息学分析,并与其他物种的相关基因进行对比,以期为今后高花青素含量品种的育种工作提供一定的生物信息学基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试材选用经组织培养 8 周的组培苗。液氮处理后,保存于-80 °C 备用。

1.2 主要试剂

试剂盒:RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒;PCR Mix;DNA 胶回收试剂盒;pLB 零背景快速克隆试剂盒。上述试剂盒均购自天根生化科技有限公司。cDNA 反转录试剂盒(SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit),购自 Clontech 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取与检测 用 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取兔眼蓝莓总 RNA。用核酸蛋白测定仪与琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 的定量与质量检测,合格的 RNA 样品在-70 °C 中保存。按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行操作,以 oligo(dT)寡核苷酸为引物,获得 cDNA 模板。以反转录所得的 cDNA 为模板进行扩增,扩增引物如下:*CHS*(F1): 5'-CCACAAAGGCCATAAAGGAA-3', *CHS*(R1): 5'-GGAGCTTGGTGAGCTGGTAG-3', *CHS*(F2): 5'-CCACAAAGGCCATAAAGGAA-3', *CHS*(R2): 5'-AGGAGCTTGGTGAGCTGGTA-3'。

1.3.2 目的片段的克隆 用 pLB 零背景快速克隆试剂盒克隆目的片段。挑取 1~3 个能在含有氨基青霉素的 LB 平板上生长的菌株并提取 DNA;用 *CHS* 基因扩增引物进行聚合酶链式反应(PCR);把产物送出测序。

1.4 数据分析

序列拼接由 ContigExpress 完成。依据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.cbs.dtu.dk/>,

expasy.org/等网站提供的生物信息学软件对克隆的基因序列作在线分析。用 NCBI-ORF Finder 进行开放阅读框(ORF)的查找和翻译;基于美国生物技术信息中心(NCBI)的 blast 功能进行氨基酸序列同源性分析;用 Clustal W 作同源序列的比对,用 MEGA 5.2 在序列比对的基础上构建系统发育树。用 ProtParam 在线工具分析基因组成及其理化性质:理化性质用 Expasy, 亚细胞定位用 TargetP 1.1, 信号肽预测用 SignalP 4.1, 跨膜结构域用 TMHMM 2.0。分别利用 SOPMA 及 Swiss-Mode 完成蛋白二级结构和三级结构的预测。使用 NCBI 提供的 Conserved Domain Search 进行蛋白功能域的预测分析。

2 结果与分析

2.1 *CHS* 基因序列及氨基酸序列推导

测序结束后,对序列进行拼接,得到长度为 1 398 bp 的 *CHS* 基因。含有 1 个完整的开放阅读框,长度为 1 170 bp,并基于此基因序列推导其氨基酸序列(图 1)。

```

85  atggtcacgctcaggaagt tcgcaaggcacaa cgggctgc aggtccggcgac tgtcatggc ca tcggcaccgc taccacacgaa c tgc
    M V T V E E V R K A Q R A A G P A T V M A I G T A T P P N C
175  gtcgac cagagc acgtaccggat ttc tactttcgga tcacaaac agcgagca caagacagagc tc aaggagaagt tc cagcgc at g tgc
    V D Q S T Y P D F Y F R I T N S E H K T E L K E K F Q R M C
265  gacaaa tccatgat caagaagc gt tacatgt acctaaac gaagaaat ct tgaaggaaaat cc cggcgt gt gcgagt acatggcacc ttc
    D K S M I K K R Y M Y L N E E I L K E N P G V C E Y M A P S
355  ttggac gc taggcaggac atggttgt ggtggaag tcccaaac tcggcaaga ggc tgcacaaagc cataaaggaa tggggc caacc
    L D A R Q D M V V V E V P K L G K E A A T K A I K E W G Q P
445  aaatccaaa atcactcact ttggcttc tgcacc accagcgg tgcgaca tgcgcggcggc gactac cagc tcac caagct cc tcggcctc
    K S K I T H L V F C T T S G V D M P G A D Y Q L T K L L G L
535  cgcccg tccgtaagcgt ctcatgat gtaccaa cagggt tgc tgc tggggcggc cggctc ccgtttggc caaggac tggcagagaa c
    R P S V K R L M M Y Q Q G C F A G G T V L R L A K D L A E N
625  aacaagggtgcccgggttctcgttgt t tgcctc gaga tcac tgc tgc tcttccg cgggccaagt gacacgcacc tcgacagt tt agt t
    N K G A R V L V V C S E I T A V T F R G P S D T H L D S L V
715  ggacaggc ccttttcgggga tggcgcgc gctat ta ttgtgggt gcagacc gat tcc gaagttgagaagcc at tggttgagttggtc
    G Q A L F G D G A A A I I V G A D P I P E V E K P L F E L V
805  tcggcagc ccaaac cattttac cagac agcgaagg ggc atcgat ggac accttcgggaa gtgggcct tactttccac ct tc caaggac
    S A A Q T I L P D S E G A I D G H L R E V G L T F H L L K D
895  gt tectggc t gatcgaagaac atcgaaaagc cctcac cgaggc ttttcagc cat tgggtatc tc tgcagtggaac tcaattttc tgg
    V P G L I S K N I E K A L T E A F Q P L G I S D W N S I F W
985  at tgcgacc c tggggcc tggccat tct agac caagtgaac tgaagt gaacc tcaagcc cgagaagc tacgggcc acagggcac gtg
    I A H P G G P A I L D Q V E L K C N L K P E K L R A T R H V
1 075 ctgagc gactac ggtaac atgtcgagc gcgtgtgc t gttcattttggat gaga tgaagaagaagtcggcc gaagaaggc tc aagac
    L S E Y G N M S S A C V L F I L D E M R K K S A E E G L K T
1 165 accggt gaggggctcgagtgggcgtgctgt tcggat tcggcggggc tgac tgttgagac tgtgtgctccacagc ttgtgcact tga
    T G E G L E W G V L F G F G P G L T V E T V V L H S L C T *

```

图 1 兔眼蓝莓 *CHS* 基因的开放阅读框序列及推导的氨基酸序列

Figure 1 ORF of *CHS* cDNA and its deduced amino acid sequence from *Vaccinium ashei*

2.2 *CHS* 氨基酸序列相似性比较与系统进化树分析

将兔眼蓝莓 *CHS* 基因核酸序列及其推导的氨基酸序列在 NCBI 中比对,选取与其同源性较高的 16 个物种(表 1),作进一步的进化判断及蛋白理化性质、结构功能分析。

被比对的 16 个物种中,高丛蓝莓、苹果、草莓、覆盆子、欧洲花楸、甜樱桃、中华猕猴桃、甜橙、番茄和葡萄等物种花青素集中在果实,杜鹃、红花油茶、山茶等物种花青素集中在花瓣,白梨则发生了

2个不同的大分支上。另一方面,甜橙是芸香科 Rutaceae 植物,番茄是茄科 Solanaceae 植物,但在系统树上,它们却聚类为1个小支。

2.3 查尔酮合成酶(CHS)的生物信息学分析

2.3.1 查尔酮合成酶(CHS)化学性质分析 ExPasy 在线软件对所得的查尔酮合成酶基因所编码蛋白质的理化性质分析结果表明:兔眼蓝莓中 CHS 基因预测编码氨基酸为 389 个,相对分子量 42 555.2,等电点 5.98,不稳定指数为 36.42,是相对稳定的蛋白。

2.3.2 查尔酮合成酶(CHS)信号肽分析 通过 SignalP 4.1 Server 对兔眼蓝莓 CHS 基因所编码蛋白质的信号肽进行预测,比对结果表明:查尔酮合成酶基因所编码蛋白质不具有分泌功能。

2.3.3 查尔酮合成酶(CHS)跨膜结构分析 用 TMHMM Server v.2.0 对获得序列的 CHS 蛋白跨膜结构进行分析。结果表明:兔眼蓝莓 CHS 蛋白整条肽链都位于细胞膜外,说明其基因编码的多肽不存在跨膜结构;结合信号肽预测结果,可以推断兔眼蓝莓 CHS 蛋白在细胞质基质中合成后,直接作用于细胞质基质中的特定区域,行使其催化功能。对其他植物的跨膜结构分析也得到了一致的结果,CHS 基因在大部分植物体内均不包含跨膜结构。

2.3.4 查尔酮合成酶(CHS)亲疏水性分析 ProtScale 预测的兔眼蓝莓 CHS 基因所编码蛋白质的亲疏水性,结果如图 3 所示。兔眼蓝莓 CHS 蛋白多肽链第 51 位具有最低分值-2.478,说明亲水性最强;第 342 位具有最高分值 2.422,说明疏水性最强。疏水性氨基酸均匀分布于整条肽链中,使整体表现为疏水性,但没有明显的疏水区域。ProtParam 分析可知:兔眼蓝莓 CHS 蛋白的脂溶指数(Aliphatic Index)为 91.49,总平均亲水性(GRAVY)为-0.071,预示其是一个脂溶性蛋白。与其他植物 CHS 蛋白的亲疏水性预测结果一致。

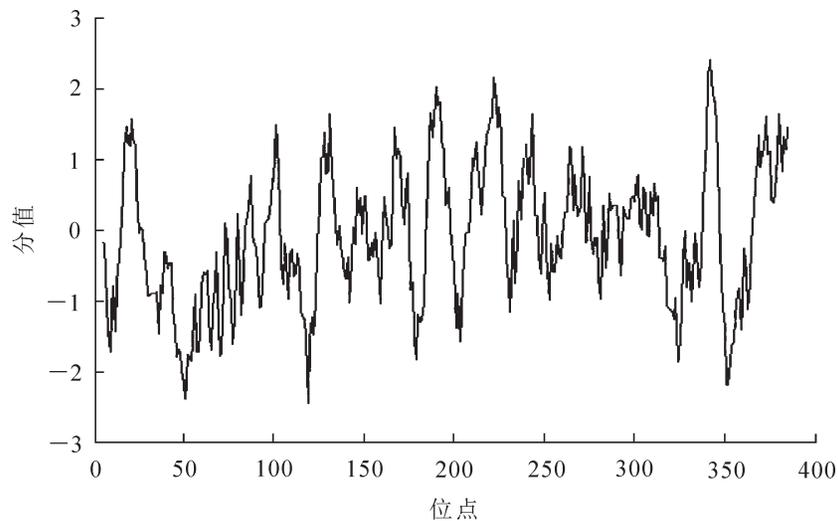


图3 兔眼蓝莓 CHS 蛋白亲水性/疏水性预测

Figure 3 Prediction of hydrophobicity / hydrophilicity for CHS in *Vaccinium ashei*

2.3.5 查尔酮合成酶(CHS)亚细胞定位 用 TargetP 1.1 对 CHS 蛋白进行的亚细胞定位结果显示:兔眼蓝莓 CHS 蛋白的叶绿体转运肽 cTP, 线粒体靶向肽 mTP 和分泌通路信号肽 SP 的数值都相当低(分别为 0.029, 0.235, 0.069; 阈值为 0.000), 可以认为兔眼蓝莓 CHS 蛋白并没有存在于叶绿体、线粒体中;而分泌通路信号肽数值跟信号肽预测一致,说明 CHS 蛋白并不是分泌蛋白。综合跨膜结构的预测结果,我们推测 CHS 蛋白应该位于细胞质基质中,在核糖体合成蛋白后,就在细胞质基质中发挥作用,参与催化对香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成查尔酮。对其他物种 CHS 蛋白的亚细胞定位也获得了类似的结果,不同物种中,CHS 蛋白均位于细胞质基质中。

2.3.6 查尔酮合成酶(CHS)蛋白结构功能域分析 使用 NCBI 提供的 Conserved Domain Search service (CD-Search)对兔眼蓝莓 CHS 蛋白功能域进行预测(图 4)。结果显示:兔眼蓝莓 CHS 蛋白属于 CHS 超家族,含有 CHS 超家族的结构域,即 Pro16-Leu384,是一种植物特异的 III 型聚酮合成酶(polyketide syn-

thase, PKS)。此外, 该蛋白还含有植物特异聚酮化合物合成酶(KAS-III)功能域^[8]和柚配基查尔酮合成酶(BcsA)功能域, 后者参与类黄酮合成等代谢过程。

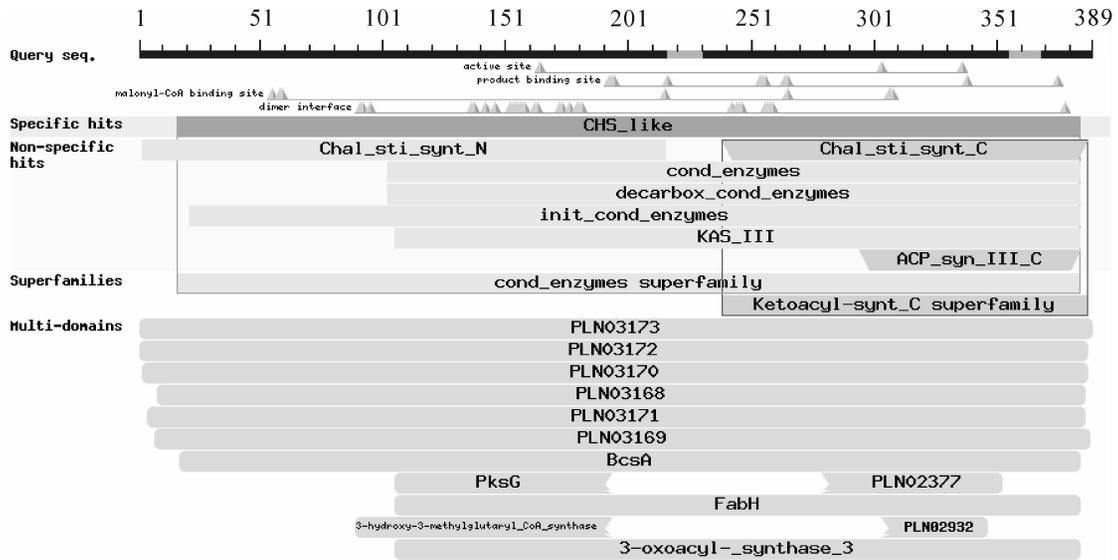


图 4 兔眼蓝莓 CHS 蛋白保守功能域的预测

Figure 4 Prediction of conserved domain in CHS protein of *Vaccinium ashei*

2.3.7 查尔酮合成酶(CHS)蛋白二级结构 用 SOPMA 对 CHS 蛋白二级结构进行预测, 发现兔眼蓝莓 CHS 蛋白二级结构中 α -螺旋的比例为 40.87%, β -折叠为 18.25%, β -转角 11.83%, 随机卷曲 29.05%; α -螺旋和随机卷曲是兔眼蓝莓 CHS 蛋白二级结构的主要结构原件, β -折叠和 β -转角虽然占得比例小, 但它们均匀分布在整個氨基酸序列上; α -螺旋为右手螺旋, 没有 3.010, 2.270, 4.416 等左手螺旋结构, 是较稳定的结构。这样的二级结构组成反映了兔眼蓝莓 CHS 蛋白是一种结构相对稳定的功能蛋白。

3 结论与讨论

查尔酮合成酶(CHS)广泛存在于各种植物中, 它是花色苷生物合成途径中的第一个关键酶, 在植物的花色苷积累、细胞发育与分化、抗胁迫以及外源基因的表达等过程中都起着重要作用^[19]。本研究采用同源克隆的方法, 获得了兔眼蓝莓红色突变株的 *CHS* 基因。该基因全长为 1 398 bp, 包含 1 个长为 1 170 bp 的开放阅读框, 编码 389 个氨基酸。序列比对分析显示, 该基因与杜鹃、山茶、红花油茶等的 *CHS* 基因在核苷酸水平及氨基酸水平上有较高的同源性。生物信息学分析结果显示, 兔眼蓝莓红色突变株 *CHS* 基因编码的蛋白质序列中没有信号肽, 没有跨膜结构, 侧面说明该基因编码的蛋白质没有参与跨膜转运。KATIYAR 等^[20]对拟南芥根组织中 CHS 酶和 CHI 酶的研究发现, 此两者共定位于内质网和液泡膜上; 本研究对 CHS 蛋白亚细胞定位的预测结果却表明, 兔眼蓝莓红色突变株中 CHS 蛋白定位于细胞质, 但尚有待试验的进一步确认。

FERRER 等^[9]和 JEZ 等^[8]采用三维结构及定点突变分析研究查尔酮合成酶的空间结构, 提出查尔酮合成酶催化中心由 4 个高度保守的残基(Cys164, His303, Asn336, Phe215)组成, 是查尔酮合成酶的作用中心。生物信息学分析软件对兔眼蓝莓红色突变株 CHS 蛋白的功能域搜寻发现其含有 CHS-like 域, 其 CHS 蛋白序列的第 164 位是半胱氨酸(Cys, C), 215 位是苯丙氨酸(Phe, F), 303 位是组氨酸(His, H), 336 位是天冬酰胺(Asn, N), 与先前研究结果类似, 这也说明 *CHS* 基因在高等植物中是高度保守的; 兔眼蓝莓红色突变株 CHS 蛋白中的 CHS-like 域, 也有可能是 CHS 酶的作用中心。

本研究获得的 *CHS* 基因及相关的生物学信息为今后的转基因及相关利用奠定了一定的基础。

4 参考文献

- [1] KREUZALER F, RAGG H, FAUTZ E, *et al.* UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(9): 2591 – 2593.

- [2] AL-TAMEMI S, AL-ZADJALI S, AL-GHAFRI F, *et al.* Chediak-higashi syndrome: novel mutation of the CHS1/LYS T gene in 3 Omani patients [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014, **36**(4): 248 – 250.
- [3] WARD D M, SHIFLETT S L, HUYNH D, *et al.* Use of expression constructs to dissect the functional domains of the CHS/beige protein: identification of multiple phenotypes [J]. *Traffic*, 2003, **4**(6): 403 – 415.
- [4] JEONG S T, GOTO-YAMAMOTO N, HASHIZUME K, *et al.* Expression of multi-copy flavonoid pathway genes coincides with anthocyanin, flavonol and flavan-3-ol accumulation of grapevine [J]. *Vitis*, 2008, **47**(3): 135 – 140.
- [5] GOTO-YAMAMOTO N, WAN G H, MASAKI K, *et al.* Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*) [J]. *Plant Sci*, 2002, **162**(6): 867 – 872.
- [6] MORIGUCHI T, KITA M, TOMONO Y, *et al.* One type of chalcone synthase gene expressed during embryogenesis regulates the flavonoid accumulation in citrus cell cultures [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, **40**(6): 651 – 655.
- [7] LU Xu, ZHOU Wei, GAO Feng. Cloning, characterization and localization of CHS gene from blood orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Ruby [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, **36**(7): 1983 – 1990.
- [8] FERRER J L, JEZ J M, BOWMAN M E, *et al.* Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, **6**(8): 775 – 784.
- [9] JEZ J M, NOEL J P. Mechanism of chalcone synthase: pKa of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase [J]. *J Biol Chem*, 2001, **275**(50): 39640 – 39646.
- [10] ELOMAA P, HONKANEN J, PUSKA R, *et al.* Agrobacterium-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation [J]. *Nat Biotechnol*, 1993, **11**(4): 508 – 511.
- [11] KAMIISHI Y, OTANI M, TAKAGI H, *et al.* Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene [J]. *Mol Breed*, 2012, **30**(2): 671 – 680.
- [12] MORITA Y, SAITO R, BAN Y, *et al.* Tandemly arranged chalcone synthase a genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrid* [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2012, **70**(5): 739 – 749.
- [13] HONDA C, KOTODA N, WADA M, *et al.* Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, **40**(11): 955 – 962.
- [14] WANG Yong, LI Jing, XIA Renxue. Expression of chalcone synthase and chalcone isomerase genes and accumulation of corresponding flavonoids during fruit maturation of Guoqing No. 4 satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow) [J]. *Sci Hortic*, 2010, **125**(2): 110 – 116.
- [15] BERNARDI J, LICCIARDELLO C, RUSSO M P, *et al.* Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening [J]. *J Plant Physiol*, 2010, **167**(4): 301 – 310.
- [16] ZHANG Xiaodong, ALLAN A C, YI Qiong, *et al.* Differential gene expression analysis of Yunnan red pear, *Pyrus pyrifolia*, during fruit skin coloration [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, **29**(2): 305 – 314.
- [17] FENG Shouqian, WANG Yanling, YANG Song, *et al.* Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a R2R3-MYB transcription factor *PyMYB10* [J]. *Planta*, 2010, **232**(1): 245 – 255.
- [18] CRIFÒ T, PUGLISI I, PETRONE G, *et al.* Expression analysis in response to low temperature stress in blood oranges: implication of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Gene*, 2011, **476**(1/2): 1 – 9.
- [19] 杨丽, 刘雅莉, 王跃进, 等. 百合查尔酮合成酶(CHS)基因的克隆与分析[J]. 西北植物学报, 2006, **26**(5): 933 – 936.
- YANG Li, LIU Yali, WANG Yuejin, *et al.* Cloning and analysis of chalcone synthase genes in *Lilium* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2006, **26**(5): 933 – 936.
- [20] KATIYAR A, SMITA S, LENKA S K, *et al.* Genomewide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis* [J]. *BMC Genom*, 2012, **13**(1): 544. doi: 10.1186/1471-2164-13-544.