

花青素合成转录因子 PAP2 植物表达载体构建及其遗传转化

段真珍^{1,2}, 黄振^{2,3}, 周宇明², 李慧雪^{2,3}, 涂万富³, 张木清^{1,3}, 姚伟^{1,2,3*}

(1. 亚热带农业生物资源保护与利用国家

重点实验室, 广西南宁 530004; 2. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 3. 广西甘蔗生物学重点实验室, 广西南宁 530004)

摘要 *AtPAP2* 基因是拟南芥花青素生物合成途径中的重要调控基因, 为了实现该基因在烟草中的高效表达, 从拟南芥中分离克隆出了 *AtPAP2* 基因并构建了植物表达载体, 利用农杆菌介导的侵染方法, 将该基因成功转入到烟草受体材料中, 并获得了紫色的转基因烟草植株, 相对于野生型烟草, 该烟草在根、茎、叶等组织上均表现出不同程度的紫色。进一步的 qRT-PCR 分析结果表明, 在花青素生物合成途径中, *AtPAP2* 基因的表达可以上调从 4-香豆酰 CoA 到最终合成花青素过程中的相关基因, 促进了合成反应的进行, 对花青素的合成具有重要的作用。该研究对于揭示 *AtPAP2* 基因的作用以及烟草花青素合成途径相关基因的调节机理具有重要的意义。

关键词 烟草; 花青素; 转录因子; 转基因

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)13-0106-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.13.029



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Plant Expression Vector Construction and Genetic Transformation of Anthocyanin Synthesis Transcription Factor PAP2DUAN Zhen-zhen^{1,2}, HUANG Zheng^{2,3}, ZHOU Yu-ming² et al (1. State Key Lab of Conservation and Utilization of Agric-Biological Resources, Nanning, Guangxi 530004; 2. Department of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 3. Guangxi Key Lab of Sugarcane Biology, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract The *AtPAP2* gene is a regulatory gene in the anthocyanin synthesis pathway of *Arabidopsis thaliana*, in order to express this gene in tobacco, we successfully cloned the *AtPAP2* gene from *A. thaliana* and constructed into a plant expression vector. We successfully transferred this gene into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, and achieved the purple phenotype transgenic tobacco plants. Compared with the wild type tobacco plant, the transgenic tobacco plants showed different degree of purple color in root, stem and leaf. qRT-PCR analysis showed that the expression of *AtPAP2* gene in tobacco significantly up-regulated the related genes from 4-coumaroyl-CoA to anthocyanins, and promoted the synthesis of anthocyanins. This research is of great significance to reveal the role of *AtPAP2* gene and reveals the regulation mechanism of anthocyanin biosynthesis pathway-related genes in tobacco.

Key words Tobacco; Anthocyanin; Transcription factor; Transgenic plant

花青素是一类在植物中广泛存在的次级代谢产物, 属于黄酮类物质^[1-2]。在自然界中花青素赋予了花草、树木五彩缤纷的颜色, 有助于其吸引各种昆虫媒介进行授粉、种子传播^[3], 同时, 花青素在植物抵抗各种逆境胁迫等方面也具有较为重要的作用。现代医学研究表明, 花青素在治疗心脏病和癌症, 清除自由基、抗氧化、抗衰老等方面具有重要疗效^[4], 因而关于花青素的研究也越来越受人们的重视。

目前, 花青素生物合成途径已经在模式植物中研究得较为清楚, 苯丙氨酸是花青素合成的直接前体物质^[1], 在不同基因的调控下, 经过一系列的酶促反应最终合成各式各样的花青素。花青素在植物体内的合成主要受到两类基因的调控, 一类是结构基因, 可以编码合成各种酶类, 另一类是调节因子, 调控结构基因的合成^[5]。目前, 花青素合成相关的主要的酶及其编码基因在一些植物中已被成功分离和鉴定, 如拟南芥、玉米、金鱼草、苹果、矮牵牛等。调控结构基因转录的调节因子在很多植物中也被成功分离和鉴定^[6], 这些调节因子主要包含 3 个基因家族, R2R3 MYB 家族、bHLH 家族和 WD40 家族^[7-8]。这些调节因子主要是调节结构基因在特定

时间和空间的表达, 调节各类次级代谢产物的发生, 对植物生理生长具有重要的意义。

异位表达是研究花青素调节因子在植物花青素合成过程中所行使的具体功能的一个方法。烟草是一种常用的模式生物, 在烟草中转入相应的花青素合成的调节因子进行异位表达, 可提高叶、花或种子中花青素的含量, 获得可视的植物表型。*AtPAP2* 基因^[9]是 R2R3 MYB 家族中的一员, 最早发现于拟南芥中, 该基因具有一个完整的开放阅读框, 可编码 249 个氨基酸。该研究拟从拟南芥中分离克隆 *AtPAP2* 基因并构建高效的植物表达载体, 通过农杆菌介导法将 *AtPAP2* 基因转入到烟草中, 培养获得紫色的烟草, 并利用 qRT-PCR 检测转 *AtPAP2* 基因烟草中花青素合成相关基因的表达量变化, 初步解析 *AtPAP2* 基因在花青素合成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 试验所用野生型烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. xanthine) 无菌苗、野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Col-0) 幼苗、大肠杆菌菌株 (DH5 α) 和农杆菌菌株 (EHA105) 均由亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室保存, 植物表达载体 pGNP 由美国康涅狄格大学植物学系惠赠。

RNAprep Pure Plant Kit 和植物基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 Qiagen 生物公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 和 2 \times Taq PCR Mix 均购自美国 Roche 生物公司; pMD18-T simple 载体和 SYBR Premix Ex TaqTM 购自大连宝生物公司; 质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 胶回收纯化试剂盒购自美国 Qiagen 生物公司; T₄ DNA 连接酶购自美国 Promega

基金项目 国家自然科学基金项目 (31760413); 广西科技重大专项基金项目 (桂科 AA17202042-8, 桂科 AA18118046-4); 广西自然科学基金项目 (2018JJA130113)。

作者简介 段真珍 (1981—), 女, 河南济源人, 硕士, 从事作物遗传育种研究。黄振 (1994—), 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向: 植物生物技术。段真珍和黄振为共同第一作者。* 通信作者, 副教授, 硕士生导师, 从事作物遗传育种研究。

收稿日期 2020-03-16

公司;Murashige & Skoog (MS) Basal Medium w/ Vitamins 购自 PhytoTechnology 公司;其他试验所用试剂均为进口或国产分析纯。基因序列测定和相关引物合成均由南京金斯瑞生物公司完成。

烟草遗传转化所采用的预培养培养基: MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L; 分化培养基(含抗生素): MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + Kan 75 mg/L + Timentin 150 mg/L; 生根培养基: MS 基本培养基; 悬浮培养基: 液体 MS 培养基; 以上培养基均含有蔗糖 30 g/L, 琼脂 0.7 g/L (悬浮培养基除外), pH 5.8~6.0, 培养温度为(25±1)℃, 除暗培养步骤外, 烟草遗传转化过程中其他步骤均在光照下(12 h/d)培养, 光照强度 1 000~2 000 lx。

1.2 拟南芥叶片总 RNA 提取和 *AtPAP2* 基因的克隆 根据 GenBank 公布的拟南芥 *AtPAP2* 基因(登录号为 AF325124)序列信息, 在开放阅读框两侧设计一对特异性扩增引物, 命名为 pPAP2-F/R, 用以扩增目的基因片段(表 1)。

表 1 试验所用引物
Table 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer name	碱基序列(5'—3') Base sequence (5'—3')	引物用途 Primer application
pPAP2-F	ATGGAGGGTTCGTCCAAG	克隆 <i>AtPAP2</i> 基因
pPAP2-R	CAAGTTCAACAGTCTCTCC	
M13-F	TGTAAAACGACGGCCAGT	载体测序通用引物
M13-R	CAGGAACAGCTATGAC	
NiPAL-F	ATTGAGGTCATCCGTCTTCG	qRT-PCR 检测
NiPAL-R	ACCGTGTAAACGCTTGTTC	
Ni4CL-F	TCATTGACGAGGATGACGAG	qRT-PCR 检测
Ni4CL-R	TGGGATGCTTGAGAAGAAG	
NiCHS-F	TGTTCGAGCTTGTCTCTGC	qRT-PCR 检测
NiCHS-R	AGCCCAGGAACATCTTTGAG	
NiCHI-F	GTCAGGCCATTGAAAAGCTC	qRT-PCR 检测
NiCHI-R	CTAATCGTCAATGCCCAAC	
NiF3H-F	CAAGGCATGTGTGGATATGG	qRT-PCR 检测
NiF3H-R	TGTGTCTTTCAGTCCAAGG	
NiDFR-F	AACCAACAGTCAGGGAATG	qRT-PCR 检测
NiDFR-R	TTGGACATCGACAGTCCAG	
NiANS-F	TGGCGTTGAAGCTCATACTG	qRT-PCR 检测
NiANS-R	GGAATTAGGCACACACTTTGC	
EF-1 α -F	TGAGATGCACCACGAAGCTC	qRT-PCR 内参基因
EF-1 α -R	CCAACATTGTCACCAGGAAGTC	

参照美国 Qiagen 生物公司的 RNA 提取试剂盒说明书, 提取长势良好的拟南芥叶片组织的总 RNA, 用 NanoDrop 2000 测定 RNA 的浓度与纯度。取 1 μ g RNA 为模板, 采用美国 Roche 生物公司的反转录试剂盒进行反转录合成第一链 cDNA。以拟南芥 cDNA 为模板, 利用 pPAP2-F/R 引物进行 PCR 扩增获取目的基因。PCR 反应体系为 cDNA 1.0 μ L、dNTP 2.0 μ L、 $2\times Taq$ PCR Mix 10.0 μ L、pPAP2-F (10 mmol/L) 0.5 μ L、pPAP2-R (10 mmol/L) 0.5 μ L, 用 ddH₂O 补足至 20 μ L。反应条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 15 s, 56℃

退火 15 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后取 1.0 μ L 产物用 1% 琼脂糖凝胶检测。同时, 利用 DNA 胶回收试剂盒切胶回收并纯化目的条带, 连接至 pMD18-T 载体中, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布到含有氨苄青霉素的 LB 平板上培养, 获得单克隆进行 PCR 检测, 将阳性克隆送去南京金斯瑞生物公司进行测序验证, 命名为 pMD18-PAP2。

1.3 植物表达载体的构建及其遗传转化农杆菌 参考美国 Qiagen 生物公司的质粒 DNA 提取试剂盒说明提取 pMD18-PAP2 和植物表达载体 pGNP 的质粒 DNA, 用限制性内切酶 *Bst*XI 和 *Kpn*I 进行双酶切反应。利用胶回收纯化试剂盒分别纯化相应的质粒酶切产物, 并在 T₄ DNA 连接酶作用下进行连接反应后, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布至 100 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上, 置于 37℃ 培养箱中培养 12 h。挑取单克隆并利用菌液 PCR 进行验证后, 将阳性转化子送南京金斯瑞生物公司进行测序。选择经测序验证序列正确的菌液保存并提取重组质粒 DNA, 命名为 pGNP-PAP2, 利用液氮冻融法将该质粒转入到农杆菌 EHA105 感受态细胞, 随机挑取单克隆利用 PCR 进行验证, 扩增引物 pPAP2-F 和 pPAP2-R 序列见表 1。

1.4 烟草遗传转化及转基因植株的筛选鉴定 剪取数十片无菌烟草组培苗叶片, 用刀片切成 0.5 cm×0.5 cm 小叶片, 置于预培养基上暗培养 3 d。取含有 pGNP-PAP2 的 EHA105 农杆菌划线接种至 LB 固体培养基(Kan 100 mg/L), 28℃ 培养过夜后挑取单菌落并接种到 50 mL 的 LB 液体培养基中(Kan 100 mg/L), 28℃ 下振荡培养 12~16 h 至 OD₆₀₀ 约为 0.5, 经扩大培养 4~6 h 至 OD₆₀₀ 约为 0.6 后低速离心弃上清, 用等体积的悬浮培养基重悬菌体。将预培养的叶片置于重悬菌液 10~15 min 后取出, 接种至分化培养基上进行培养, 直至长出愈伤并分化出丛生芽, 将丛生芽剪下转接至生根培养基上继续培养, 直至长成完整的植株。利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取转基因烟草小苗叶片总 DNA, 以 pPAP2-F 和 pPAP2-R 为引物进行 PCR 检测, 验证 *AtPAP2* 基因是否整合到烟草基因组 DNA 上。

1.5 qRT-PCR 分析花青素合成相关基因的表达差异 烟草的花青素是以苯丙氨酸为前体物质, 经过一系列酶促反应而合成的, 其间受到编码各类酶合成结构基因的调控(图 1)^[10]。该试验从中选取 7 个基因, 设计合成 qRT-PCR 的引物(表 1), 内参基因选取 *Elongation factor 1 α* (*EF-1 α*), GenBank 序列号为 AF120093。参照“1.2”中植物叶片总 RNA 提取方法, 分别提取紫色转基因烟草和野生型烟草的 RNA, 反转录合成得到 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 通过与野生型烟草比较, 分析转 *AtPAP2* 基因紫色烟草中 7 个基因表达量的变化情况。

2 结果与分析

2.1 拟南芥叶片总 RNA 提取和 *AtPAP2* 基因的克隆 利用 RNA 提取试剂盒从拟南芥的叶片中提取总 RNA(图 2A), 以表 1 中 pPAP2-F 和 pPAP2-R 为特异性引物, 拟南芥总 RNA

反转录获得的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增获得了 *AtPAP2* 基因,1%琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,获得的目的基因条带约为 750 bp,与预期 *AtPAP2* 基因大小一致(图 2B)。将目的条带进行切胶回收纯化后,连接至 T/A 克隆载体 pMD18-T,然后转化至大肠杆菌 DH5 α 。随机挑取单克隆进行菌落 PCR 验证后,对阳性克隆继续测序验证,将测序结果通过 SnapGene Viewer 生物学软件进行分析,结果表明克隆的目的片段大小为 750 bp,与 GenBank 中 *AtPAP2* 基因序列完全一致,含有 *AtPAP2* 完整的编码序列,命名为 pMD18T-PAP2,可用于下一步的植物表达载体构建。

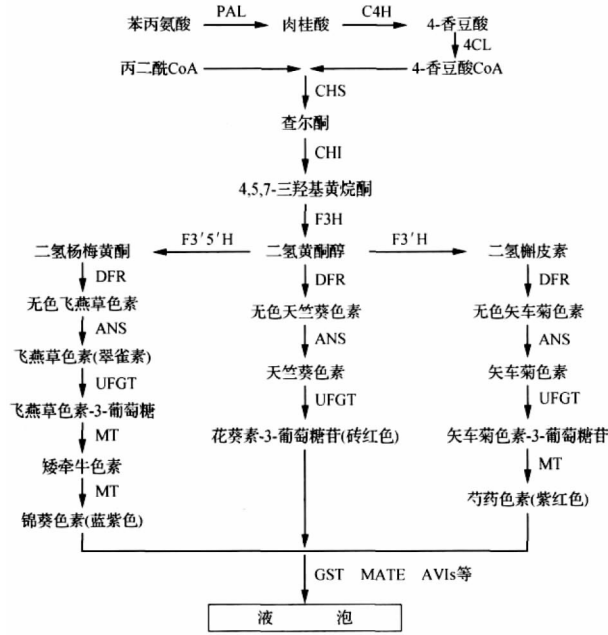
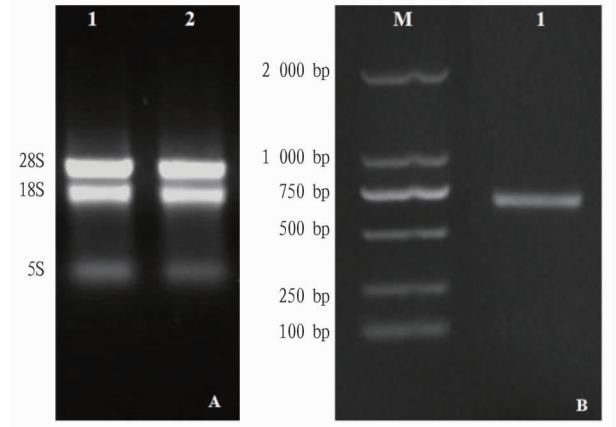


图 1 花青素生物合成途径

Fig.1 Biosynthetic pathways of anthocyanins



注:A. 拟南芥叶片总 RNA,1~2. 提取的拟南芥叶片总 RNA;B. 拟南芥 *AtPAP2* 基因的克隆,M. DNA Marker DL2000,1. *AtPAP2* 基因 PCR 产物

Note:A. Total RNA isoalted from *A. thaliana* leaves,1-2. Total RNA isoalted from *A. thaliana* leaves;B. The cloning of *AtPAP2* gene, M. DNA Marker DL2000,1. PCR product of *AtPAP2*

图 2 拟南芥叶片总 RNA 提取和 *AtPAP2* 基因克隆

Fig.2 Total RNA of *A. thaliana* leaves and the cloning of *AtPAP2*

2.2 植物表达载体的构建及其转化至农杆菌 根据图 3 所示的植物表达载体图谱进行载体构建。先提取 pMD18T-PAP2 菌液的质粒 DNA,与植物表达载体 pGNP 的质粒 DNA 同时用限制性内切酶 *Bst*XI 和 *Kpn*I 进行酶切,用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测并分别切胶纯化回收 *AtPAP2* 目的片段和 pGNP 载体的大片段(图 4)。利用 T_4 DNA 连接酶进行连接并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布至含有卡那霉素抗性的筛选培养基上培养。



图 3 植物表达载体 pGNP-PAP2 的构建图谱

Fig.3 Construction of plant expression vector pGNP-PAP2

随机挑取单菌落进行菌落 PCR 验证,筛选出的阳性克隆命名为 pGNP-PAP2。利用液氮冻融法将该质粒转化到农杆菌 EHA105 感受态细胞中,挑取单菌落进行菌落 PCR 检测(图 5),将检测为阳性的菌液送往公司测序,结果表明 *AtPAP2* 基因已经完整构建至植物表达载体,并成功转化至农杆菌 EHA105 中,可以用于下一步植物受体材料的遗传转化。

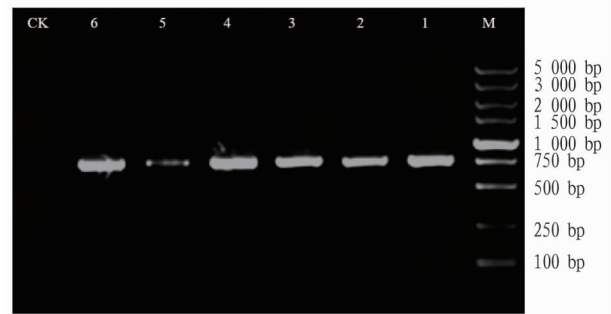
2.3 转基因烟草植株的获得及其表型观察 用含有 pGNP-PAP2 的农杆菌 EHA105 侵染烟草叶片,置于含有抗生素的培养基上培养约 15 d,可以看到叶片周围有紫色的抗性愈伤组织出现,继续培养 10~15 d 即可分化出紫色的丛生芽。待紫色抗性丛生芽长出叶片,将其接种至含抗生素的生根培养

基上继续培养,5~7 d 开始生根,继续培养 20 d 左右烟草幼苗可长至 5~10 cm 高,可将其移栽至土壤中。提取紫色抗性转基因烟草植株的基因组 DNA,利用表 1 中特异性引物 pPAP2-F 和 pPAP2-R 对其进行 PCR 检测,结果显示表现为紫色的抗性烟草苗均能够扩增出 750 bp 的 *AtPAP2* 基因序列(图 6),证实了该外源基因已经整合进入烟草基因组。

通过培养观察发现,相对于野生型烟草,紫色的转基因烟草仅在植株叶片、茎和根等器官的颜色上存在差异,在其生长速度、生长状态及开花结实特性等方面均表现为完全一致,进一步表明 *AtPAP2* 基因在转基因烟草中可以过量表达,从而使转基因烟草呈现出紫色(图 7 A~G)。

2.4 *AtPAP2* 对烟草花青素合成相关基因的影响 作为植

物类黄酮合成途径的一个分支途径,花青素的生物合成已经在模式植物中进行了较多研究。研究表明花青素合成的前体物质是苯丙氨酸,在一系列基因的调控下,苯丙氨酸经过一系列酶促反应最终形成花青素。为了研究拟南芥 *AtPAP2* 基因在烟草植株中的表达情况,该研究提取了转基因烟草叶片的总 RNA,利用实时荧光定量 PCR 方法,对选取的花青素合成通路上的 7 个基因进行检测,用于分析转基因烟草植株中 *AtPAP2* 基因的表达对花青素合成通路的影响^[11]。qRT-PCR 结果表明,在花青素合成的前期,即从苯丙氨酸到 4-香豆酰 CoA 的过程中,*AtPAP2* 基因影响作用并不明显,只是有限上调了 *NtPAL* 基因和有限下调了 *Nt4CL* 基因的表达。但是在从 4-香豆酰 CoA 到花青素合成的过程中,转 *AtPAP2* 基因植株中的 *NtCHS*、*NtCHI*、*NtF3H*、*NtDFR*、*NtANS* 基因表现出了明显的上调表达,与野生型的表达量差异达到数十



注: M. DNA Marker DL5000; 1~5. 5 个紫色的抗性烟草植株 DNA 的 PCR 结果; 6. 阴性对照

Note: M. DNA Marker DL5000; 1~5. PCR products of DNA from five purple resistant tobacco plants; 6. Negative control

图 6 转基因烟草株系的 PCR 检测

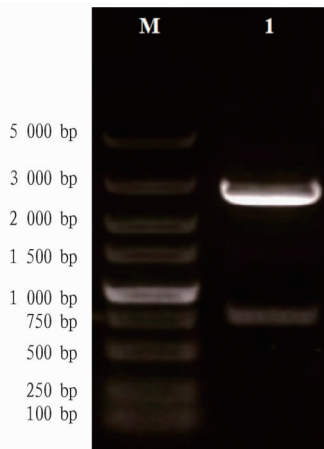
Fig. 6 PCR detection of transgenic tobacco plants

倍,极大地促进了该过程一系列的酶促反应,大大提高了植株中花青素的表达量(图 8)。

3 讨论

花青素因其良好的医疗保健功效而受到越来越多人的青睐,但是目前食品工业所用的色素多为工业合成,具有不同程度的毒性,长期食用反而有害健康,因此研究开发和利用天然色素已经成为一种趋势。*AtPAP2* 基因在烟草中的过量表达能够显著提高从 4-香豆酰 CoA 到花青素生物合成过程中相关基因的表达,可以大大提高花青素的含量且不影响植株的正常生长。由于烟草易于种植且生物量大,转 *AtPAP2* 基因的紫色烟草不失为一种提取天然色素的好材料。

近年来,越来越多的花青素合成调节基因被克隆出来,并被证明能在其他物种中诱导花青素的合成^[12]。王霜等^[15]通过分析苦荞花期转录组数据,筛选克隆了一个黄酮代谢相关的 MYB 类转录因子 FtMYB23。转基因过表达的拟南芥种皮颜色均呈现出比野生型更深的褐色;杨捷等^[14]从东方百合中克隆花青素生物合成转录因子 Lhsor MYB12 基因。基因表达分析结果表明该基因在花蕾发育过程中表达量逐渐增高,并在花蕾盛开时达到最大值;连文力等^[15]通过烟草腺毛特意表达启动子,构建 *AtPAP1* 表达载体,获得了腺毛的腺头呈红色的烟草;Zou 等^[16]从玫瑰中克隆获得了花青素合成的转录因子 RrMYB6,研究分析表明该基因在雄蕊中表达最高,在花瓣中表达最低;Nakatsuka 等^[17]在烟草中过表达龙胆根 *MYB1R* 转录因子,减少了烟草花朵中花青素的积累。Huang 等^[4]将杨梅中与花青素合成相关的 *MrMYB1* 基因分别导入到烟草和拟南芥中,提高了拟南芥各个组织中花青素的含量,也提高了烟草除叶片外其他组织中花青素的含量。该研究通过在烟草中异位表达 *AtPAP2* 基因,也同样获得了紫色表型的转基因烟草,并且经过初步观察表明,相对于正常的烟草,紫色烟草在生长速度、生长状况和开花结实等特性方面均没有明显差异。该研究还证实了可以通过在植物中导入外源花青素合成调节基因,调节体内花青素生物合成相关基因的表达,从而影响花青素积累,改变植物颜色,为培育新的色彩各异观赏植物提供了一种新思路。

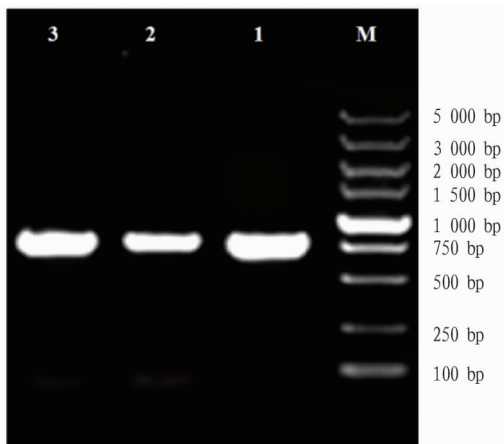


注: M. DNA Marker DL5000; 1. 质粒 DNA pMD18T-PAP2 酶切产物

Note: M. DNA Marker DL5000; 1. Enzyme digestion product of pMD18T-PAP2

图 4 载体 pMD18-*AtPAP2* 双酶切产物

Fig. 4 The products of pMD18T-PAP2 vector by restriction enzyme digestion

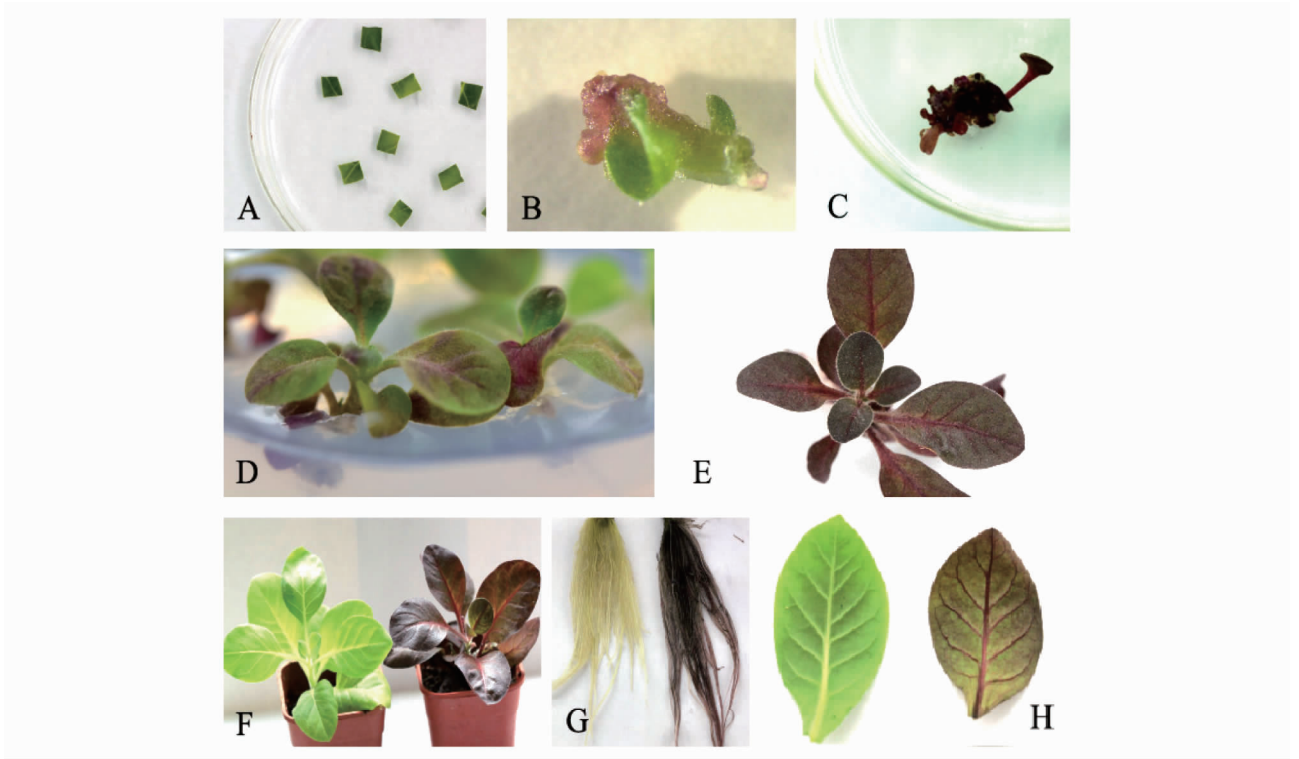


注: M. DNA Marker DL5000; 1~3. 3 个农杆菌转化子的 PCR 检测

Note: M. DNA Marker DL5000; 1~3. PCR products of three *Agrobacterium* transformants

图 5 农杆菌 EHA105 转化子的单克隆菌液 PCR 产物

Fig. 5 PCR detection of *Agrobacterium* EHA105 transformants



注:A.农杆菌感染后的烟草叶片;B.紫色抗性愈伤组织;C.愈伤组织分化出丛生芽;D~E.诱导生根的紫色抗性烟草小苗;F~H.转基因烟草(右)和未转基因烟草(左)整株、根部和叶片的比较

Note: A. The transformed tobacco leaves; B. The induced callus with purple pigments; C. The differentiation of plantlets; D-E. The root induced tobacco plantlets; F-H. The comparison of whole plant, the roots and the leaves between transgenic(right) and non-transgenic tobacco(left)

图7 转 *AtPAP2* 基因烟草植株表型观察

Fig. 7 Phenotype of *AtPAP2* transgenic tobacco plants

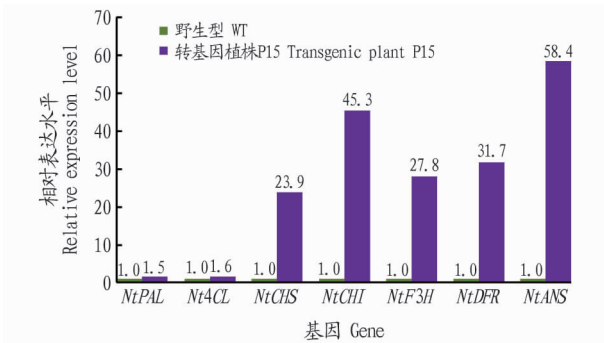


图8 转基因烟草中7个花青素合成相关基因的相对表达情况

Fig. 8 Relative expression of 7 genes related to anthocyanin synthesis in transgenic tobacco plants

参考文献

- [1] 贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 等. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控[J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1496-1506.
- [2] 宋雪薇, 魏解冰, 狄少康, 等. 花青素转录因子调控机制及代谢工程研究进展[J]. 植物学报, 2019, 54(1): 133-156.
- [3] 梁立军, 杨祎辰, 王二欢, 等. 植物花青素生物合成与调控研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(21): 18-24.
- [4] HUANG Y J, SONG S, ALLAN A C, et al. Differential activation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* and tobacco over-expressing an R2R3 MYB from Chinese bayberry[J]. Plant cell tissue and organ culture, 2013, 113(3): 491-499.
- [5] 田爱梅, 张恩慧, 许忠民, 等. 白苜 MYB 类转录因子 *PAP1* 基因的克隆与表达分析[J]. 西北农业学报, 2014, 23(3): 123-127.
- [6] PATTANAIK S, KONG Q, ZAITLIN D, et al. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco

- [J]. Planta, 2010, 231(5): 1061-1076.
- [7] PÉREZ-DÍAZ J R, PÉREZ-DÍAZ J, MADRID-ESPINOZA J, et al. New member of the R2R3-MYB transcription factors family in grapevine suppresses the anthocyanin accumulation in the flowers of transgenic tobacco[J]. Plant molecular biology, 2016, 90(1/2): 63-76.
- [8] OUTCHKOUROV N S, KARLOVA R, HÖLSCHER M, et al. Transcription factor-mediated control of anthocyanin biosynthesis in vegetative tissues[J]. Plant physiology, 2018, 176(2): 1862-1878.
- [9] BOREVITZ J O, XIA Y J, BLOUNT J, et al. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. Plant cell, 2000, 12(12): 2383-2393.
- [10] 石少川, 高亦珂, 张秀海, 等. 植物花青素生物合成相关基因的研究及应用[J]. 植物研究, 2011, 31(5): 633-640.
- [11] SCHMIDT G W, DELANEY S K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress[J]. Molecular genetics and genomics, 2010, 283(3): 233-241.
- [12] MENG X, YIN B, FENG H L, et al. Overexpression of R2R3-MYB gene leads to accumulation of anthocyanin and enhanced resistance to chilling and oxidative stress[J]. Biologia plantarum, 2014, 58(1): 121-130.
- [13] 王霜, 熊晓鹏, 姚英俊, 等. 苦荞 R2R3-MYB 转录因子调控原花青素生物合成的研究[J]. 西北植物学报, 2019, 39(11): 1911-1918.
- [14] 杨捷, 张星, 彭梦笛, 等. 百合转录因子 MYB12 的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 2018, 36(6): 812-816.
- [15] 连文力, 张松涛, 李艳华, 等. *AtPAP1* 基因在烟草中的表达[J]. 烟草科技, 2016, 49(7): 1-7.
- [16] ZOU K, WANG Y, ZHAO M Y, et al. Cloning and expression of anthocyanin biosynthesis related gene RrMYB6 in *Rosa rugosa*[J]. Agricultural sciences, 2018, 9(3): 374-383.
- [17] NAKATSUKA T, YAMADA E, SAITO M, et al. Heterologous expression of gentian MYB1R transcription factors suppresses anthocyanin pigmentation in tobacco flowers[J]. Plant cell reports, 2013, 32(12): 1925-1937.