

# 红花查尔酮异构酶基因的克隆及表达分析

任超翔<sup>1,2</sup>, 唐小慧<sup>1,2</sup>, 何雯<sup>1</sup>, 陈江<sup>1,2\*</sup>, 裴瑾<sup>1,2</sup>, 吴清华<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院; <sup>2</sup>中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 成都 611137

**摘要:**实验通过下载已报道查尔酮异构酶基因序列,设计简并引物,利用 RACE 克隆红花查尔酮异构酶基因全长,克隆了两个红花查尔酮异构酶基因,分别命名为 *CtCHI1* 和 *CtCHI2*, NCBI 登录号分别为 MF996507 和 MF996508。用在线软件对序列进行分析,并用 MEGA 进行进化树分析, *CtCHI1* 全长 967 bp, *CtCHI2* 全长 997 bp, 属查尔酮异构酶家族基因。定量 PCR 分析红花查尔酮异构酶基因表达得出, *CtCHI1* 在花中且在时期 2 表达量较高,而在叶、茎及根中不表达, *CtCHI2* 仅在茎中有少量表达。实验还发现, MeJA 显著促进 *CtCHI1* 基因的表达,而对 *CtCHI2* 无调控作用,推测 *CtCHI1* 参与红花花中类黄酮的生物合成。实验成功克隆了两个查尔酮异构酶基因并对其进行表达分析,为红花类黄酮的生物合成及调控机理研究奠定基础。

**关键词:**红花;查尔酮异构酶基因;RACE;表达分析;类黄酮

中图分类号:R932;R284.3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.008

## Cloning and Expression Analysis of Chalcone Isomerase Gene in Safflower

REN Chao-xiang<sup>1,2</sup>, TANG Xiao-hui<sup>1,2</sup>, HE Wen<sup>1</sup>, CHEN Jiang<sup>1,2\*</sup>, PEI Jin<sup>1,2</sup>, WU Qing-hua<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; <sup>2</sup>State Key Laboratory Breeding

Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

**Abstract:** The reported chalcone isomerase genes were downloaded from database online, and the degenerate primers were designed. The full length of safflower chalcone isomerase genes was cloned by RACE, named as *CtCHI1* and *CtCHI2*, and NCBI accession numbers were MF996507 and MF996508, respectively. The sequence was analyzed by software online and the evolutionary tree was constructed by MEGA. Sequence analysis showed that *CtCHI1* was 967 bp and *CtCHI2* was 997 bp, and belonged to chalcone isomerase family. The expression pattern of chalcone isomerase gene was analyzed by quantitative RT-PCR. Expression analysis showed that *CtCHI1* was mainly expressed in flower with highly expression in the second-developmental stages of flower, not expressed in leaves, stems and roots, *CtCHI2* was mainly expressed in stem. At the same time, it was found that MeJA could significantly promote the expression of *CtCHI1*, but had no effect on the expression of *CtCHI2*. Two chalcone isomerase genes *CtCHI1* and *CtCHI2* were successfully cloned by RACE, and it was proposed that *CtCHI1* was involved in the biosynthesis of flavonoids in safflower.

**Key words:** safflower; chalcone isomerase gene; RACE; expression analysis; flavonoids

红花是菊科一年生草本植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,具有活血通经,祛瘀止痛的功效,为活血化瘀常用的中药。红花黄酮类成分,特别是羟基红花黄色素 A、山萘酚等化合物,是红花中的主要活性成分<sup>[1]</sup>。越来越多的研究发现,类黄酮化合物具有广泛的生物和药理作用,如脑血管和心血管保护活性<sup>[2,3]</sup>。其含量高低直接影响了红花的品质。红花类黄酮成分合成功能基因的研究,不仅为

解析红花类黄酮生物合成分子机制、阐明红花有效成分的积累规律具有重要理论价值,同时对应用生物技术提高红花品质、培育优质红花品种具有重要意义。

类黄酮的生物合成及代谢过程一直是多年来研究的热点<sup>[4-6]</sup>。目前,类黄酮生物合成的基本代谢途径较为明确,特别是在拟南芥中<sup>[7]</sup>。查耳酮异构酶是类黄酮生物合成途径中的关键酶之一,催化将查尔酮转化为柚皮素。虽然这一步可以自发发生,但查耳酮异构酶更有效地催化了其 10<sup>7</sup> 倍<sup>[8]</sup>。查耳酮异构酶可以分为两种类型的同功酶:一种作用于 6'-羟基查耳酮和 6'-脱氧查尔酮,并且可能参与豆类特

收稿日期:2017-12-05 接受日期:2018-03-06

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81573544);四川省科技厅项目(2014SZ0156);四川省教育厅项目(17ZB0150);成都中医药大学校基金(ZRYY1610,ZRQN1647)

\*通信作者 Tel:86-28-61800231;E-mail:janshen1986@163.com

异性 5-脱氧黄酮通路;另外一种是仅作用于 5'-羟基查尔酮,通常存在于非豆类中<sup>[9]</sup>。目前,查耳酮异构酶基因已经在多种植物中进行了克隆,如水稻、大麦<sup>[10]</sup>,中华堇<sup>[11]</sup>,苜蓿<sup>[12]</sup>,雪莲<sup>[13]</sup>,矮牵牛<sup>[14]</sup>等。

随着对红花类黄酮药用成分的关注,关于类黄酮的生物合成研究也得到重视,红花中查耳酮异构酶基因克隆也有相关报道。Huang 等<sup>[15]</sup>基于二代测序技术对查耳酮异构酶基因进行克隆,刘秀明等也基于二代测序技术对查耳酮异构酶基因进行了克隆<sup>[16]</sup>。课题组前期利用在线二代测序数据也成功克隆了查耳酮异构酶基因<sup>[17]</sup>。虽然克隆了部分查耳酮异构酶基因,但是已报道的查耳酮异构酶基因克隆多基于二代转录组测序数据。

查耳酮异构酶是一个多基因家族<sup>[18]</sup>,存在多个查耳酮异构酶基因,本研究从 NCBI 数据库中下载已报道查耳酮异构酶基因,基于序列比对,设计简并引物,利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 对红花查耳酮异构酶基因进行克隆,实验从红花中成功克隆了两个查耳酮异构酶基因,分别命名为 *Ct-CHI1* 和 *CtCHI2*。实验对克隆的查耳酮异构酶基因进行了序列分析,同时对其基因表达进行了分析。此外,还分析了茉莉酸甲酯 (MeJA) 对其基因表达的影响。研究结果为进一步分析红花类黄酮合成调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

红花种子采自新疆塔城县地方老品种,经成都中医药大学药学院裴瑾教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L.,2016 年在成都中医药大学温江校区药用植物园种植。取红花根、茎、叶及不同发育阶段的花。其中,时期 1 对应红花开花第 1 天,时期 2 对应红花开花第 3 天,时期 3 对应开花第 5 天。田间取样后立即将样品在液氮中冷冻,储存于 -80 °C 冰箱备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

将冷冻的红花材料液氮研磨后,用 TRIzol (Tiangen, Beijing, China) 进行裂解,利用 TRIzol 伴侣试剂盒 (Tiandz, Beijing, China) 进行 RNA 提取,具体实验方法见商品使用说明书。提取的 RNA 通过用凝胶电泳进行完整度检测,通过 NanoDrop™ 分光光

度计 ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Victoria, Australia) 检测浓度。利用试剂盒 RR047A (Takara, Dalian, China) 在 PCR 仪 (Bio-Rad, CA, USA) 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。

#### 1.2.2 查耳酮异构酶核心序列的克隆

使用红花各组织部位混样的 cDNA 作为克隆模板,从 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库中下载了 15 个已报道查耳酮异构酶基因,包括拟南芥、玉米、葡萄及草莓等的查耳酮异构酶基因,通过对已报道的查耳酮异构酶进行序列分析,设计简并引物 (F: YYTNYTNGGNGGNGCNGGNGT; R: ACYTTNGGNSWRTAYTGY) 进行 PCR 反应,克隆核心序列。反应程序如下:94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 42 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C 7 min。产生具有预期大小的 DNA 片段,利用胶回收试剂盒回收片段,克隆到载体 *pMD19-T* (Takara, Dalian, China), 挑取单克隆并送擎科测序 (Tsingke, Beijing, China)。

#### 1.2.3 RACE 技术克隆全长

使用 SMART 快速扩增法 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 系统 (BD-Clontech, CA, USA) 对核心序列 5' 和 3' 端进行扩增。首先用 5'-RACE CDS Primer 和 3'-RACE CDS Primer 分别反转录用于 5' 和 3' 端的扩增的 cDNA。其次,利用试剂盒自带的 UPM 为引物,同时设计核心序列特异引物,分别以反转录的 5' 和 3' 端扩增用 cDNA 为模版,克隆 5' 和 3' 端的侧翼序列。得到 5' 和 3' 端的侧翼序列后,对序列进行拼接,得到全长序列。

根据全长序列,设计全长克隆引物,对全长进行克隆,实验克隆全长引物见表 1。克隆的 PCR 片段经胶回收后,克隆到载体 *pMD19-T* (Takara, Dalian, China) 中,挑取单克隆送擎科 (Tsingke, Beijing, China) 测序。

#### 1.2.4 序列分析

使用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对序列开发阅读框及氨基酸进行预测,使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>) 对蛋白质进行分子量、等电点、平均疏水性进行分析。使用在线软件 <http://pfam.xfam.org/> 预测蛋白结构。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 MEGA 4.0 软件进行进化树分析。实验中克隆的两个基因分别为命名为 *CtCHI1* 与 *CtCHI2*。

### 1.2.5 定量 PCR 实验

设计扩增约 200 bp 左右 PCR 产物的定量 PCR 特异性引物,两个基因定量引物见表 1,红花 60S 编码区的部分用作内参基因<sup>[19]</sup>。通过琼脂糖凝胶电泳测试所有引物的特异性。使用 SYBR PrimeScript RT-PCR 试剂盒 (Takara, Beijing, China) 进行 RT-PCR,重复三次,并根据手册设置循环条件。Bio-Rad CFX 96 实时 PCR 检测系统 (Hercules, CA, USA) 用于我们的实验。

### 1.2.6 激素处理分析

激素处理主要参考 Guo DD 等进行<sup>[20]</sup>,有部分修改。选择开花 3 天的红花,100  $\mu$ M MeJA (Sigma-Aldrich) 的溶液喷洒在花冠上,在对照组中,喷施未加 MeJA 溶液。经处理的花被透明的塑料袋包围,以防止挥发性植物激素的发射,并使诱发剂溶液更大程度地被吸收。为了最大程度地减少由个体植物之间差异引起的错误,喷洒五朵花进行分析。处理 6 h 后,取出塑料袋,分别收集鲜花样品,立即在液氮中冷冻,并储存在 -80  $^{\circ}$ C 的冷冻箱中。每个样品的 RNA 提取如前所述。定量 PCR 方法参见上面办法。

表 1 实验用引物信息

Table 1 Information of primers

名称 Name	引物序列 (F; forward; R; Reverse) Sequences of primers
<i>CtCHI1</i> 全长克隆引物 Primers for the full-length of <i>CtCHI1</i>	F: AACTGCTACTGGCTCACCAC R: ATTAATCCATAAGTCTCTTA
<i>CtCHI2</i> 全长克隆引物 Primers for the full-length of <i>CtCHI2</i>	F: AGTAAAATTGGTCAACACCC R: AAAGTTTAAACTCATTAGATA
核心序列简并引物 Degenerate primers for the core sequence	F: YYTNYTNGGNGGNGCNGGNGT R: ACYTTNGGNSWRTAYTGY
<i>CtCHI1</i> 定量引物 The RT-PCR primers for <i>CtCHI1</i>	F: AAAGCAACTGCAAAATGTC R: CCTTAAATGGCCTTATTC
<i>CtCHI2</i> 定量引物 The RT-PCR primers for <i>CtCHI2</i>	F: AACAACGCCGATGGATT R: TTCGTTCCAGGAGAAACACC
内参基因 <i>Ct60S</i> Reference gene <i>Ct60S</i>	CATCCATTATCCAACAATC AAGAGTAATCAGTCTCCA

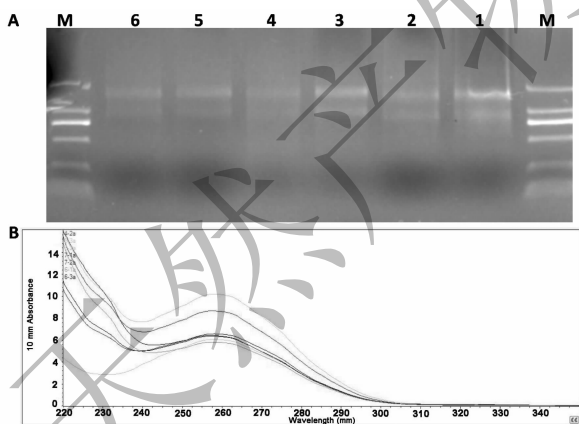


图 1 红花 RNA 提取

Fig. 1 RNA extraction of safflower

注: A. RNA 电泳图, 1~6 分别表示叶、根、茎、开花时期 1、开花时期 2 及开花时期 3, M 为 2 000 bp DNA marker B. Nanodrop 峰图, 6 条不同染色线分别代表提取 6 个样品 RNA 检测峰图。

Note: A. RNA electrophoresis figure, 1-6 was leaf, root, stem, flowering period 1, flowering period 2 and period 3, M was DNA maker with 2000bp B. figure of Nanodrop, six different lines represent the RNA detection extracted from 6 samples.

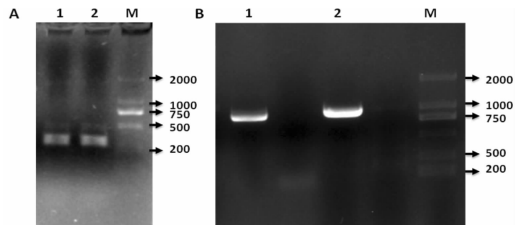


图 2 红花查尔酮异构酶基因核心序列及全长克隆

Fig. 2 Cloning of *CtCHI* core sequence and full length

注: A. 红花 *CHI* 核心序列克隆, 1 和 2 表示克隆的两个重复, M 表示 2000bp DNA marker B. 克隆的两个红花查尔酮异构酶基因, 其中 1 表示 *CtCHI1*, 2 表示 *CtCHI2*。

Note: A. cloning of *CtCHI* core sequence, 1 and 2 were two repeated, M was DNA marker with 2000bp B. cloning of two *CtCHI*, 1 was *CtCHI1*, and 2 was *CtCHI2*.

## 2 结果

### 2.1 红花查尔酮异构酶基因全长的克隆

为了尽可能得到红花查尔酮异构酶基因全长, 实验首先提取了高质量的 RNA (图 1): 电泳条带清晰, RNA 在 260 nm 处峰值单一。实验下载了 15 个

已报道查尔酮异构酶基因,包括拟南芥、玉米、葡萄及草莓等查尔酮异构酶基因,进行了多序列比对及保守序列分析。根据保守序列,设计简并引物克隆了查尔酮异构酶基因核心序列(图 2A)。经第二轮菌液 PCR 检测送测序后,实验得到了两个核心片段,利用 RACE 分别对两核心序列的 3'端和 5'端进行克隆,再对基因全长进行克隆。实验成功克隆了两个全长基因(图 2B),分别命名为 *CtCHI1* 和 *CtCHI2*。

## 2.2 红花查尔酮异构酶基因序列分析

克隆的两个查尔酮异构酶基因 *CtCHI1* 和 *CtCHI2* 序列已上传至 NCBI,登录号分别为 MF996507 和 MF996508。其中,*CtCHI1* 全长 967 bp,*CtCHI2* 全

长 997 bp。利用生物信息学网站及软件,对克隆的查尔酮异构酶基因序列进行分析(表 2)。克隆查尔酮异构酶基因编码蛋白质分子量分别为 24 900.51 Da 和 23 135.92 Da,注释结果显示两个查尔酮异构酶都具有 Chalcone-flavanone isomerase 结构域,属查尔酮异构酶类。

实验将克隆的两个查尔酮异构酶进行了进化分析(图 3)。结果表明,红花 *CtCHI2*、中华堇 *CcCHI*、雪莲 *SmCHI* 及红花 *CtCHI1* 归为一类,其中红花 *CtCHI1* 同雪莲 *SmCHI1* 关系较近,而红花 *CtCHI2* 同中华堇 *CcCHI*、雪莲 *SmCHI* 及红花 *CtCHI1* 关系较远。

表 2 红花查尔酮异构酶基因序列信息

Table 2 Sequence information of *CtCHI*

基因名 Gene name	全长 Full-length (bp)	开放阅读框 Open reading frame (bp)	氨基酸 Amino acid	分子量 Molecular weight	等电点 Isoelectric point	平均疏水性 Grand average of hydropathicity	Pfam 注释 Pfam annotation
<i>CtCHI1</i>	967	699	232	24900.51	5.71	0.030	Chalcone-flavanone isomerase
<i>CtCHI2</i>	997	654	217	23135.92	5.67	0.171	Chalcone-flavanone isomerase

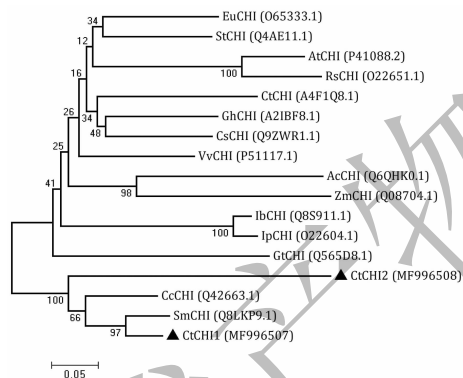


图 3 红花查尔酮异构酶进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *CtCHI*

注:Eu 为榆树缩写,St 为草莓,At 为拟南芥,Rs 为萝卜,Ct 为红花,Vv 为葡萄,Ac 为韭菜,Ib 为番薯,Gt 为龙胆草,Cc 为中华堇,Sm 为雪莲

Note:Eu was elm,St was strawberry,Rs was radish,Ct was safflower,Vv was grape,Ac was leek,Ib was sweet potato,Gt was radix gentiana,Cc was Chinese Viola,Sm was Snow lotus

## 2.3 红花查尔酮异构酶基因表达分析

实验分析了 *CtCHI1* 和 *CtCHI2* 在不同组织及发育时期基因表达情况。提取红花不同组织部位(叶、茎、根)及花不同发育时期(开花第 1 天、第 3 天、第 5 天)的 RNA,采用定量 PCR 分析了 *CtCHI1* 和 *CtCHI2* 的表达情况。结果表明,*CtCHI1* 在花中

表达,而在叶、茎及根中不表达,*CtCHI2* 则在茎中有少量表达(图 4A)。*CtCHI1* 在花的三个发育期都有表达,且在开花第 3 天表达量较高(图 4B)。

由于有研究报道茉莉酸甲酯(MeJA)可以促进红花类黄酮的生物合成<sup>[20]</sup>。查尔酮异构酶基因类黄酮合成途径中关键基因,本实验也分析了红花查尔酮异

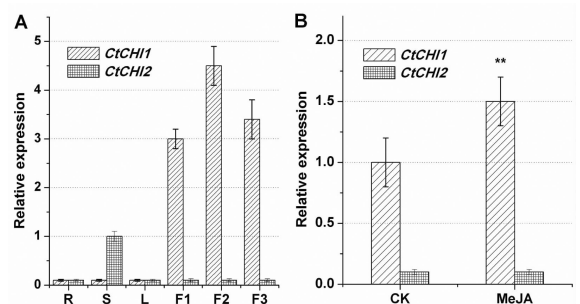


图 4 红花查尔酮异构酶基因表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *CtCHI*

注:A.不同组织及花发育时期 *CtCHI1* 和 *CtCHI2* 表达情况,R 表示根,S 表示茎,L 表示叶,F1-F3 表示花发育的三个时期 B. *CtCHI1* 和 *CtCHI2* 受 MeJA 处理表达情况,\*\* 表示显著差异(0.1% 水平)。

Note:A. expression of *CtCHI1* and *CtCHI2* in different tissues and flowering development period,R was root,S was stem,L was leaf,F1-F3 were 3 periods in flower development B. expression of *CtCHI1* and *CtCHI2* disposed by MeJA,“\*\*” represent significant difference (0.1% level).

构酶基因受 MeJA 影响情况。结果表明, MeJA 显著促进 *CtCHI1* 基因的表达, 而对 *CtCHI2* 无调控作用。

### 3 讨论

查尔酮异构酶是一个多基因家族<sup>[18]</sup>, 本研究基于序列比对, 利用 RACE 技术成功克隆的两个查尔酮异构酶全长基因 *CtCHI1* 和 *CtCHI2*。通过构建系统进化树, 将克隆得到的两个查尔酮异构酶基因同之前报道查尔酮异构酶基因相比较, 发现克隆得到的 *CtCHI2* 是新克隆的查尔酮异构酶基因, 而 *CtCHI1* 同刘飞<sup>[19]</sup> 报道序列一致。在刘飞研究中, 仅仅将对查尔酮基因进行了克隆, 未对其进行表达分析。本实验除了对其全长克隆外, 还对 *CtCHI1* 基因表达进行了分析。

组织表达分析表明, *CtCHI1* 主要在花中表达而在其他部位表达较少, 而 *CtCHI2* 在茎中有一定表达, 在其他组织中表达都较少。红花中类黄酮成分主要在花中积累, 从这方面讲 *CtCHI1* 更可能参与了花中类黄酮的合成。研究报道 MeJA 能促进类黄酮的合成<sup>[20]</sup>。本研究利用 MeJA 进行处理, 发现 *CtCHI1* 受到 MeJA 显著上调, 因而实验推测 *CtCHI1* 更可能参与了花中类黄酮的生物合成。

此外, 本课题在前期研究中, 基于转录组数据克隆了一个查尔酮异构酶基因 *CHI*<sup>[17]</sup>, 表达分析发现该基因在花中也有较高表达, 本实验克隆得到的 *CtCHI1* 在花中也有较高表达, 两个基因均在花中有较高表达。类黄酮成分众多, 代谢中存在很多分支途径, 从 KEGG 代谢通路上看, 多条代谢途径均有查尔酮异构酶的参与。因此我们推测有多个查尔酮异构酶基因参与了红花中类黄酮的生物合成。具体哪个查尔酮异构酶基因影响红花药效成分的生物合成, 后期将通过酶活性分析等进行深入研究。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China Vol I (中华人民共和国药典: 第一卷) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015; 151.
- 2 Jiang H (姜华). Protective effect and mechanism of hydroxysafflor yellow A on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin Med Mat* (中药材), 2013, 36: 462-464.
- 3 Zang BX (臧宝霞), Jin M (金鸣), Si N (司南), et al. Antagonistic effect of hydroxysafflor yellow A on the platelet activating factor receptor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37: 696-699.

- 4 Dixon RA, Steele CL. Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering [J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 394-400.
- 5 Tian L, Pang Y, Dixon RA. Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso) flavonoids [J]. *Phytochem Rev*, 2008, 7: 445-465.
- 6 Wang Y, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2011, 91: 949-955.
- 7 Routaboul JM, Kerhoas L, Debeaujon I, et al. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2006, 224: 96-107.
- 8 Bednar RA, Hadcock JR. Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 9582-9588.
- 9 Shimada N, Ayabe SI. A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy (iso) flavonoids in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 941-946.
- 10 Druka A, Kudrna D, Rostoks N, et al. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping [J]. *Gene*, 2003, 302: 171-178.
- 11 Kuhn B, Forkmann G, Seyffert W. Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in *Callistephus chinensis* [J]. *Planta*, 1978, 138: 199-203.
- 12 Mckhann HI, Hirsch AM. Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 767-773.
- 13 Li F, Jin Z, Qu W, et al. Cloning of a cDNA encoding the *Saussureamedusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2006, 44: 455-461.
- 14 van Tunen AJ, Koes RE, Spelt CE, et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes [J]. *Embo J*, 1988, 7: 1257-1263.
- 15 Hung LL, 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.
- 16 Liu XM (刘秀明), Yang WT (杨文婷), Zhang XM (张雪萌), et al. Cloning and expression of *Chalcone isomerase* cDNA of *Carthamus tinctorius* [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci* (西北农林科技大学学报: 自科版), 2015, 43: 201-206.