

龙眼花色素苷生物合成相关基因 *DICH9* 的序列与功能分析

李艳红², 蔡 芹², 沈 薇², 杜丽娜², 陈 哲¹, 谭 芳², 赖 彪², 胡福初^{1*}

1. 海南省农业科学院热带果树研究所/农业农村部热带果蔬遗传资源评价利用重点实验室(部省共建)/海南省热带果树生物学重点实验室/农业农村部海口热带果树科学观测实验站, 海南海口 571100; 2. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100

摘 要:查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是植物类黄酮化合物合成途径的第一个关键酶。前期在龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)中鉴定了与花色素苷合成密切相关的 *DICH9*, 发现与红皮龙眼相比, 其在石硌龙眼果皮中的表达水平较低。为了进一步探究 *DICH9* 的生物学功能, 本研究分别克隆石硌龙眼 *DICH9-SX* 和红皮龙眼 *DICH9-HP* 基因, 氨基酸序列比对分析发现, 二者仅在第 328 位氨基酸位点有差异, 但该位点并不是关键酶活性位点。进一步构建植物表达载体, 并采用农杆菌介导的叶盘法将 *DICH9-SX* 转入烟草。结果表明, 转基因烟草花瓣更红, 花色素苷含量更高, 说明 *DICH9-SX* 超表达能促进烟草花瓣花色素苷的积累。分析 *DICH9* 的启动子序列表明, 相似度为 96.2%, 与 *DICH9-HP* 的启动子相比, *DICH9-SX* 的启动子有 32 个 SNP、14 个碱基插入和 12 个碱基删除, 多 1 个脱落酸响应元件(ABRE), 少 1 个光反应元件(Box4)、1 个低温响应元件(LTR)和 1 个 MYC 转录因子结合元件。综上所述, *DICH9-SX* 是石硌龙眼花色素苷合成的关键结构基因之一, 而其启动子序列与红皮龙眼差异较大, 可能是其在石硌果皮中表达较低的重要原因之一。

关键词: 龙眼; *DICH9*; 烟草; 花色素苷

中图分类号: S667.2 文献标志码: A

Sequence and Function Analysis of *DICH9* Related to Anthocyanin Biosynthesis in Longan

LI Yanhong², CAI Qin², SHEN Wei², DU Lina², CHEN Zhe¹, TAN Fang², LAI Biao², HU Fuchu^{1*}

1. Institute of Tropical Fruit Trees, Hainan Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Genetic Resources Evaluation and Utilization of Tropical Fruits and Vegetables (Co-construction by Ministry and Province and Ministry of Agriculture and Rural Affairs) / Key Laboratory of Tropical Fruit Tree Biology of Hainan Province / Haikou Scientific Observation and Experimental Station for Tropical Fruit Trees, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571100, China; 2. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China

Abstract: Chalcone synthase is a crucial enzyme in the initial stage of the flavonoid biosynthetic pathway. To explore the biological functions of our previously identified chalcone synthase coding gene *DICH9* from longan, which is associated with anthocyanin accumulation, *DICH9-SX* and *DICH9-HP* from Shixia and Hongpi longan, were cloned respectively. Amino acid sequences of *DICH9-SX* and *DICH9-HP* were compared and found to differ only at position 328, which was not a key active site. Subsequently, an expression vector was created, and the Agrobacterium-mediated leaf disc method was used to introduce *DICH9-SX* into wild tobacco. The anthocyanin content in the petals of transgenic tobacco was notably higher than that in the wild type, suggesting that the *DICH9-SX* gene enhances anthocyanin accumulation in tobacco petals. The promoter sequences of the two *DICH9* genes revealed a similarity of 96.2%. Compared to the promoter of *DICH9-HP*, the promoter of *DICH9-SX* had 32 SNPs, 14 base insertions, and

收稿日期 2024-05-27; 修回日期 2024-06-05

基金项目 海南省热带果树生物学重点实验室开放课题项目(No. HAAS2022PT0109); 重庆市现代农业产业技术体系项目(No. COMAITS202305); 重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJQN202101442)。

作者简介 李艳红(2003—), 女, 本科生, 研究方向: 生物工程。*通信作者(Corresponding author): 胡福初(HU Fuchu), E-mail: hufuchu@hnaas.org.cn。

12 base deletions. Specifically, the *DICH9-SX* promoter contained an additional abscisic acid responsive element (ABRE), one fewer light-responsive element (Box4), one less low temperature-responsive element (LTR), and one less MYC transcription factor binding site. In conclusion, *DICH9-SX* plays a pivotal role as a structural gene in longan anthocyanin biosynthesis. The differences in the *DICH9* promoter in *Shixia longan* may contribute to its lower expression level.

Keywords: *Dimocarpus longan* Lour; *DICH9*; tobacco; anthocyanin

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.007

果实颜色是决定果实品质和影响商品价值的重要因素之一。丰富多样的果实颜色深受消费者的喜爱,也是育种者的重要育种目标。花色素苷是果实重要的呈色黄酮类物质。花色素苷生物合成途径是植物类黄酮代谢途径的一个分支,是通过多个基因参与的苯丙氨酸途径。查尔酮合成酶基因(chalcone synthase, CHS)是该途径核心阶段的第一个关键结构基因,属于花色素苷生物合成的早期合成基因^[1]。在许多物种如萝卜^[2]、鸳鸯茉莉^[3]、小苍兰^[4]等研究均表明 CHS 的表达水平与不同组织花色素苷的积累量密切相关。花色素苷生物合成的结构基因受到 MYB、bHLH 和 WD40 这 3 类转录因子的调控^[5]。研究表明,光在 MYB 转录因子对 CHS 基因调控的过程可能发挥了重要作用^[6]。

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour)是无患子科龙眼属植物,是中国南方地区重要的经济果树作物。我国主栽的龙眼品种果皮通常呈现黄褐色或者黄灰色,色泽单一,限制了果实生物学特征的多样性和市场潜力。而在东南亚地区有一个果皮呈红色的红皮龙眼野生品种,它的发现增加了龙眼果实颜色类型并为龙眼新品种培育提供了候选材料^[7]。YI 等^[8]研究表明红皮龙眼果皮的红色主要因为花色素苷的积累。本研究前期发现龙眼基因组中 *DICH9* 有 8 个成员,其中 *DICH9* 的表达水平与红皮龙眼和石硃龙眼各组织的花色素苷含量呈正相关,且 *DICH9* 在红皮龙眼果皮中的表达水平明显高于石硃龙眼果皮,因此 *DICH9* 是龙眼花色素苷的生物合成的关键基因^[9]。为了进一步探究龙眼 *DICH9* 的生物学功能,本研究以石硃龙眼(SX)和红皮龙眼(HP)为材料,分析 *DICH9* 氨基酸序列差异,进一步转化烟草分析 *DICH9-SX* 功能,并比较二者的启动子序列。本研究为探明普通龙眼果皮不积累花色素苷的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

石硃龙眼、红皮龙眼叶片样品采自重庆市涪陵区长江师范院校内龙眼基地。样品采集后使用液氮迅速冷冻,并置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA、RNA 提取及反转录合成 cDNA 利用 CTAB 法提取石硃龙眼、红皮龙眼和转基因烟草植株叶片 DNA。使用 Magen 公司的 Hipure Plant RNA Mini Kit 试剂盒分别提取石硃龙眼叶片、红皮龙眼叶片、烟草 W38 的 RNA。采用 TaKaRa 的 SuperScript OneStep RT-PCR System 试剂盒进行 RNA 反转录合成第 1 条链 cDNA。

1.2.2 *DICH9* 基因克隆、超表达载体的构建及其启动子的克隆 根据前期获得的转录组序列,设计特异引物 *DICH9-F* 和 *DICH9-R*(表 1),分别以石硃龙眼叶片的 cDNA 和泰国红皮龙眼叶片的 cDNA 为模板进行特异 PCR 扩增,然后将得到的片段通过 Gibson 组装的方法分别重组到 *EcoR* I 和 *Xho* I 线性化的 pSAK277 载体上,将连接产物分别转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,经菌落 PCR 初筛,将阳性质粒送至华大基因进行序列测定。

根据龙眼基因组数据库查找选取 *DICH9* 基因的上游 2000 bp 当作启动子序列,设计特异引物 pro*DICH9-F* 和 pro*DICH9-R*(表 1),分别以石硃龙眼的 DNA 和红皮龙眼的 DNA 为模板进行特异 PCR 扩增,纯化后连接到用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切线性化的 pGreen-0800-luc 载体上。同上述将连接产物分别转化大肠杆菌而后将筛选阳性质粒送至华大基因进行序列测定。

1.2.3 生物信息学分析 使用 Clustal X 软件进行氨基酸序列的比对分析。利用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线预测网站预测启动子上的顺式作用元件。

表 1 本研究使用的引物序列
Tab. 1 Primers sequence used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
DICH9-F	CTAGTGGATCCAAAGATGGCATCAATTGAACAAATCAGG	超表达载体构建
DICH9-R	ACTCTAGAAGTACTCTCAGTGAGCTGCCTGAATTGGG	
proDICH9-F	TAGGGCGAATTGGGTACCGTGTAAGTTACAAGTGTATCG	启动子扩增
proDICH9-R	TATCGATACCGTCGACCGCCATTTTGTGCGTAGTGATC	
NtActin-F	AATGGAAGTGAATGGTCAAGGC	烟草内参基因检测
NtActin-R	TGCCAGATCTTCTCCATGTCATCCCA	
DICH9-SX-F	GCTTTGCTGGTGGGACAG	DICH9-SX 基因半定量检测
DICH9-SX-R	CTCGGAACAGACGACAAGG	

1.2.4 植物表达载体构建及烟草遗传转化 使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对质粒 pSAK277 双酶切获得线性化 pSAK277 载体片段, 通过 Gibson 组装的方法将 PEG 纯化后的 *DICH9-SX* 基因重组到线性化的 pSAK277 载体上获得超表达载体。利用化学农杆菌感受态转化方法转化农杆菌感受态细胞 GV3101。利用农杆菌介导的叶盘法转化野生型烟草^[10]。

1.2.5 花色素苷含量测定 利用 pH 差示法测定烟草花瓣中花色素苷的含量, 参照 WEI 等^[11]的方法进行测定, 具体步骤为: 分别取 3 个生物学重复花瓣样品于 1 mL 浸提液 (甲醇: 水: 浓盐酸=85: 12: 3) 中, 室温避光充分浸提。取 0.1 mL 浸提液分别加入 2 支试管中, 分别加入 0.4 mL Buffer 1[0.2 mol/L KCl: 0.2 mol/L HCl (25: 67), pH 1]和 Buffer 2[1 mol/L NaAc: 0.4 mol/L HCl (100: 150), pH 5], 用酶标仪分别测定其在 530 nm 处的吸光值 (OD)。根据公式计算, 花色素苷含量 (mg/g) = $\Delta OD_{530} \times 5 \times 1 \times 445.2 / (29\ 600 \times W)$; 式中, 5 为稀释倍数, 1 为提取液体积 (mL), 445.2 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量, 29 600 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔比吸收系数, W 为样品质量 (g)。

1.3 数据处理

利用 Microsoft Excel 2016 软件计算 W38 和 *DICH9-SX* 转基因植株花瓣花色素苷含量的平均值及标准误差。利用 Sigmaplot 14.0 软件分别对 W38 和 *DICH9-SX* 转基因植株各株系数据点进行 T 测试, 明确是否存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 龙眼 *DICH9* 基因克隆及序列分析

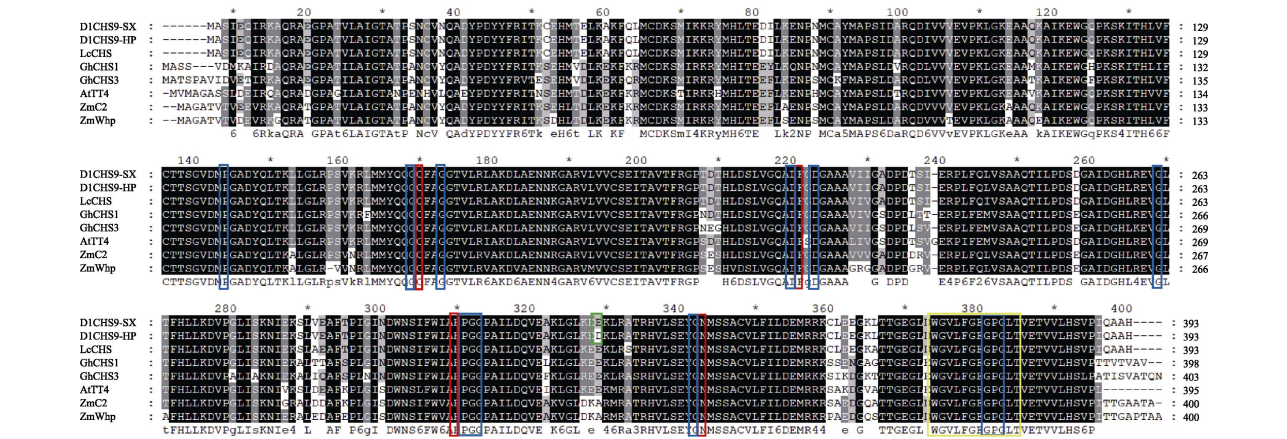
根据前期通过全基因组鉴定到的可能参与龙

眼花色素苷生物合成的关键 *DICH9* 的序列设计特异引物^[9], 分别以石硖和红皮龙眼叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。测序结果分析发现 2 个 *DICH9* 基因的开放阅读框长度均为 1182 bp, 编码了 393 个氨基酸, 分别命名为 *DICH9-SX* 和 *DICH9-HP*, 二者核苷酸序列相似度高达 98.82%, 在 14 个核苷酸位点存在差异。

使用 Clustal X 软件, 将 *DICH9-SX* 和 *DICH9-HP* 推测氨基酸序列与荔枝 (*Litchi chinensis*) 的 LcCHS、非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 的 GhCHS1、GhCHS3、玉米 (*Zea mays*) 的 ZmC2 和 ZmWhp、拟南芥 (*Arabidopsis ihaliana*) 的 AtTT4 的 6 个 CHS 同源基因氨基酸序列进行比对分析, 保守位点预测分析参考蒋雅欣等^[9]的方法, 发现 8 个 CHS 均含有 4 个保守的活性位点氨基酸残基 (红色方框)、典型的 13 个惰性活性位点 (蓝色方框)、CHS 的特征序列 (WGVLF^{FG}FGPGLT) (黄色方框)。而 *DICH9-SX* 和 *DICH9-HP* 氨基酸序列仅在 328 位点上存在差异, *DICH9-SX* 的氨基酸为谷氨酸 (glutamic acid, E), *DICH9-HP* 的 328 位氨基酸为天冬氨酸 (aspartic acid, D) (绿色方框), 而该位点不是关键活性位点 (图 1), 因此, 初步推测 *DICH9-SX* 在该位点氨基酸的差异可能对其基因功能无影响。

2.2 *DICH9-SX* 超表达载体的构建及烟草遗传转化

将利用特异引物扩增得到的 *DICH9-SX* 基因片段通过 Gibson 组装的方法重组到超表达载体 pSAK277 上, 阳性克隆质粒测序分析结果正确, 表明超表达载体已成功构建, 同时利用 SnapGene 软件绘制 pSAK277-*DICH9-SX* 重组质粒图谱 (图 2)。



红色框内为聚酮合成酶的 4 个保守的活性位点；黄色框内为 CHS 的模式序列（WGVLFPGPGLT）；蓝色框内为 13 个塑造活性位点几何结构的氨基酸残基；绿色框内为 *DICH9-SX* 和 *DICH9-SX* 的氨基酸的差异位点。基因登录号：荔枝（*AtTT4*: GU288820.1）、非洲菊（*GhCHS1*: Z38096.1；*GhCHS3*: Z38098.1）、拟南芥（*AtTT4*: AT5G13930）、玉米（*ZmC2*: X60205.1；*ZmWhp*: X60204.1）。

The four conserved active sites of the polyketide synthase are marked in the red box; The pattern sequence (WGVLFPGPGLT) of CHS is highlighted in the yellow box; the amino acid residues that shape the geometry of 13 the active sites are highlighted in the blue box; The differences in amino acid residues between *DICH9-SX* and *DICH9-SX* are highlighted in the green box. GenBank register number: *Litchi chinensis* (*AtTT4*: GU288820.1), *Gerbera hybrida* (*GhCHS1*: Z38096.1; *GhCHS3*: Z38098.1), *Arabidopsis thaliana* (*AtTT4*: AT5G13930), *Zea mays* (*ZmC2*: X60205.1; *ZmWhp*: X60204.1).

图 1 *DICH9* 与其他植物 CHS 蛋白多序列比对分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment of *DICH9* with CHS proteins from other plants

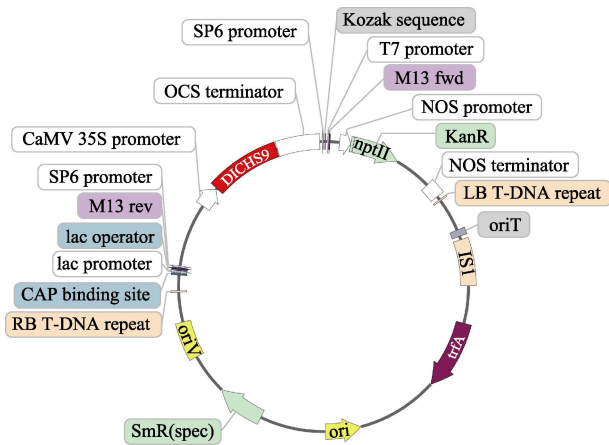
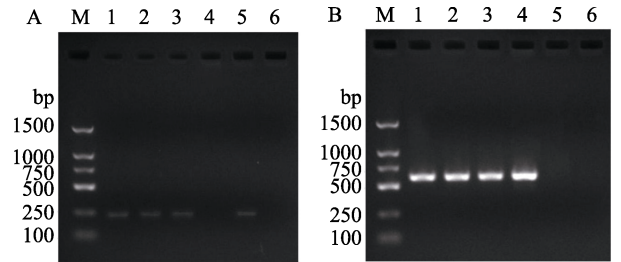


图 2 *DICH9-SX* 超表达载体图谱

Fig. 2 Mapping of overexpression vector for *DICH9-SX*

为进一步验证 *DICH9-SX* 是否参与龙眼花色素苷生物合成，将重组质粒转化农杆菌感受态细胞 GV3101 中，利用农杆菌介导的叶盘法转化野生型烟草共获得 29 株抗性植株，提取转基因烟草植株叶片 DNA 并进行目的基因 PCR 检测，有阳性植株 23 株，阳性率为 79%。选取 3 株阳性植株进一步分析。以转基因烟草花瓣 cDNA 为模板（重组质粒为阳性对照，野生型烟草为阴性对照，无菌水为空白对照）检测烟草内参基因（图 3A）和 *DICH9-SX*（图 3B）是否表达。结果表明 3 株转化植株中的 *DICH9-SX* 基因在花瓣中成功表达。



A: 使用烟草内参基因 *actin* 特异引物的 PCR 扩增结果；B: 使用 *DICH9-SX* 基因特异引物的 PCR 扩增结果；M: DL1500 DNA maker, 1~3: 以 Line 3、Line 10 和 Line 27 株转基因烟草花瓣的 cDNA 为模版；4: 以重组质粒 pSAK277-*DICH9-SX* 为模版；5: 以野生型烟草花瓣 cDNA 为模版；6: 以无菌水为模版。

A: PCR amplification results using the specific primers of tobacco reference gene *actin*; B: PCR amplification results using the specific primers of *DICH9-SX* gene; M: DL1500 DNA maker; 1~3: cDNA templates from transgenic tobacco petals of Line 3, Line 10, and Line 27; 4: Recombinant plasmid pSAK277-*DICH9-SX* as template; 5: cDNA template from wild-type tobacco petals; 6: Sterile water as template.

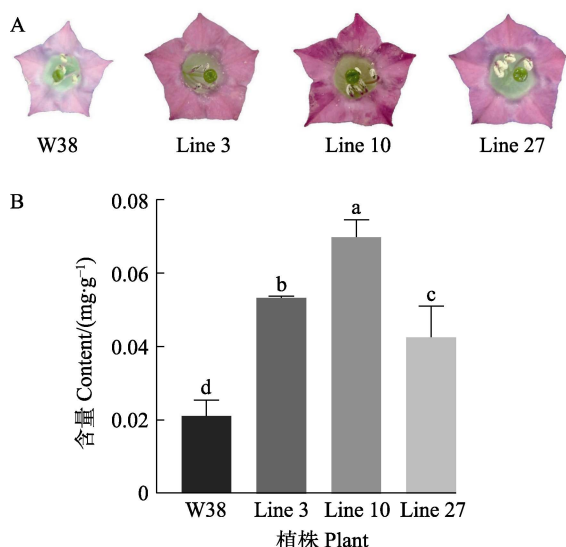
图 3 转 *DICH9-SX* 基因烟草的 PCR 鉴定分析

Fig. 3 PCR identification analysis of the *DICH9-SX* gene in tobacco

2.3 转基因烟草花瓣表型分析

从图 4A 可以看出，转基因的 3 个株系烟草花瓣明显比对照更红。进一步利用 pH 差示法测定了野生型 W38 和转基因烟草花瓣中花色苷的含量。结果显示，3 个转基因株系花瓣花色苷含量均显著高于野生型。其中 10 号株系花瓣的花色素苷含量最高(0.074 mg/g)，为野生型的 4.37 倍；3 号株系花瓣花色苷含量为野生型的 3.17

倍; 27 号株系花瓣花色素苷含量为野生型的 3.08 倍(图 4B)。表明 *DICH9-SX* 基因在烟草中异源表达促进了花瓣花色素苷的积累。



A: *DICH9-SX* 转基因烟草花瓣表型; W38 为野生型烟草花瓣; Line 3、Line 10 和 Line 27 为转基因烟草花瓣。B: *DICH9-SX* 转基因烟草花瓣花色素苷含量分析; 不同小写字母代表差异极显著 ($P < 0.001$)。

A: Phenotypic characteristics of tobacco petals transformed with the *DICH9-SX* gene; W38 represents wild-type tobacco petals; Line 3, Line 10, and Line 27 represent transgenic tobacco petals. B: Analysis of anthocyanin content in tobacco petals transformed with the *DICH9-SX* gene; Different lowercase letters represent extremely significant difference ($P < 0.001$).

图 4 转 *DICH9-SX* 基因烟草花瓣的表型及花色素苷含量
Fig. 4 Phenotypic characteristics and anthocyanin content of tobacco petals transformed with *DICH9-SX* gene

2.4 红皮龙眼和石硖龙眼 *DICH9* 基因启动子分析

进一步分别克隆了石硖 *DICH9-SX* 的启动子序列与红皮龙眼 *DICH9-HP* 的启动子序列, 比对发现它们的相似度高达 96.2%, 与 *DICH9-HP* 的启动子序列相比, *DICH9-SX* 的启动子有 32 个 SNP、14 个碱基插入和 12 个碱基删除(图 5)。利用 PlantCARE 植物启动子在线预测网站对 *DICH9-SX* 的启动子和 *DICH9-HP* 的启动子进行分析, 结果发现, 2 条启动子序列除含有核心启动子元件(TATA-Box、CAAT-Box)之外, 还存在一些其他重要顺式作用元件。这些元件的功能包括参与脱落酸响应(ABRE)、光反应(G-box、ACE、GA-motif、Box 4)、脱氧诱导(ARE)、茉莉酸甲酯(MeJA)响应(CGTC-motif、TGACG-motif)和种子特异性调控(RY-element)等。与 *DICH9-HP* 的启动子相比, *DICH9-SX*

的启动子多 1 个脱落酸响应的顺式作用元件(ABRE)(紫色底纹), 缺少 1 个光照响应(Box 4)(浅绿色底纹)、1 个低温响应(LTR)(绿色底纹)和 1 个 MYC 转录因子结合位点(蓝色底纹)顺式元件, 但均含有与查尔酮合成酶调控功能相关的顺式作用元件, 包括 MYB 转录因子结合位点顺式元件, MYC 转录因子结合位点顺式元件等(图 5)。推测 *DICH9* 基因的启动子序列差异可能是引起石硖 *DICH9* 表达水平低的原因之一。

3 讨论

CHS 负责催化 3 分子的丙二酰-CoA 和 1 分子的对香豆酰-CoA 结合形成查尔酮, 该反应是类黄酮合成途径的关键限速步骤^[12]。*CHS* 基因在植物中通常以多基因家族的形式存在, 但其中只有少数成员与植物花色素苷合成密切相关。非洲菊(*Gerbera hybrida*)中 *GCHS1* 和 *GCHS4* 与花色素苷合成有关, 当沉默 *GCHS1* 时花瓣变为白色^[13]。李文飞等^[14]从红皮香蕉和天宝香蕉中发现了 4 个差异表达的 *MaCHS* 可能是红皮香蕉花色素苷积累的重要原因。本研究前期从龙眼中鉴定到 8 个 *DICHS* 家族成员, 通过基因表达分析筛选出了与花色素苷合成紧密相关的 *DICH9*^[9]。本研究发现石硖龙眼 *DICH9-SX* 和红皮龙眼 *DICH9-HP* 的核苷酸相似度达 98.82%, 仅有 14 个位点存在差异。王志彬等^[15]的研究中也发现 CHS 在不同种质的柑橘中的核苷酸序列高度保守, 相似性达 98% 以上。而氨基酸序列分析发现二者均仅在 328 位氨基酸位点有差异, 且该位点不在关键活性位点。有研究发现 *CHS* 关键位点的差异会导致其功能差异, 例如, 紫罗兰(*Matthiola incana*)白花突变体是由于 CHS 其中一个编码精氨酸的 AGG 变成了编码丝氨酸的 AGT, 从而导致 CHS 失去生理活性而影响花色素的形成^[16]。本研究转 *DICH9-SX* 基因烟草的花冠花色素苷含量明显更高, 颜色更红。可见, 石硖和红皮龙眼中 CHS 单个氨基酸的差异并未影响其诱导花色素苷的积累的功能。

花色素苷生物合成受到转录因子的调控、激素信号(乙烯、赤霉素和脱落酸等)和环境胁迫(光照、温度、水分及机械损伤等)的影响^[17]。作为包含花色素苷在内的类黄酮物质合成的第一个关键酶基因, *CHS* 属于诱导表达型, 其在转录水平也受到转录因子、激素、光等因素的影响^[18]。

- regulation of anthocyanin biosynthesis and flower development[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 176.
- [7] HUANG Y, LIU L, YI D, LU Y, ZHU L, CHEN M, WANG Y, ZHOU J, HU X, WEI Y, SHI S. *DIMYB113* mutation affects anthocyanin accumulation in red pericarp longan (*Dimocarpus longan* Lour.)[J]. Horticulture Advances, 2023, 1: 11.
- [8] YI D, ZHANG H, LAI B, LIU L, PAN X, MA Z, WANG Y, XIE J, SHI S, WEI Y. Integrative analysis of the coloring mechanism of red longan pericarp through metabolome and transcriptome analyses[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(6): 1806-1815.
- [9] 蒋雅欣, 张红娜, 郭平, 胡红春, 李涛, 赖彪, 杜丽娜. 龙眼查尔酮合成酶(CHS)全基因家族鉴定和表达分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(4): 1-19.
- JIANG Y X, ZHANG H N, GUO P, HU H C, LI T, LAI B, DU L N. Longan chalcone synthetase (CHS) whole gene family identification and expression analysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(4): 1-19. (in Chinese)
- [10] GALLOIS P, MARINHO P. Leaf disk transformation using agrobacterium tumefaciens-expression of heterologous genes in tobacco[J]. Methods in Molecular Biology, 1995(49): 39-48
- [11] WEI Y, HU F, HU G, LI X, HUANG X, WANG H, BAXTER I. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi chinensis* Sonn[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19455.
- [12] SHIH C H, CHU H, TANG L K, SAKAMOTO W, MAEKAWA M, CHU I K, WANG M, LO C. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis[J]. Planta, 2008, 228(6): 1043-1054.
- [13] DENG X, BASHANDY H, AIANASOJA M, KONTTURI J, PIETIÄINEN M, LAITINEN R A E, ALBERT V A, VALKONEN J P T, ELOMAA P, TEERI T H. Functional diversification of duplicated chalcone synthase genes in anthocyanin biosynthesis of *Gerbera hybrida*[J]. The New Phytologist, 2014, 201(4): 1469-1483
- [14] 李文飞, 寇萍, 陈春玲, 解鸿磊, 黄玉吉. 红皮香蕉 *CHS* 基因的克隆和表达模式分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(3): 697-707.
- LI W F, KOU P, CHEN C L, XIE H L, HUANG Y J. Cloning and expression pattern analysis of *CHS* gene in red-skinned banana[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(3): 697-707. (in Chinese)
- [15] 王志彬, 申晚霞, 朱世平, 薛杨, 赵晓春. 柑橘 *CHS* 基因序列多态性及表达水平对类黄酮生物合成的影响[J]. 园艺学报, 2015, 42(3): 435-444.
- WANG Z B, SHEN W X, ZHU S P, XUE Y, ZHAO X C. Polymorphism and expression of chalcone synthase gene in citrus related to the flavonoids content[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(3): 435-444. (in Chinese)
- [16] HEMLEBEN V, DRESSEL A, EPPING B, LUKACIN R, MARTENS S, AUSTIN M B. Characterization and structural features of a chalcone synthase mutation in a white-flowering line of *Matthiola incana* R. Br. (Brassicaceae)[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55(3): 455-465
- [17] 陈文龙, 赵昶灵, 支伟特, 陈中坚, 缪康汝, 王文亚, 翁晨. 高等植物花色苷生物合成调控的研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 271-276
- CHEN W L, ZHAO C L, ZHI W T, CHEN Z J, MIAO K R, WANG W Y, WENG C. Progress of regulation of anthocyanin biosynthesis in higher plants[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(33): 271-276. (in Chinese)
- [18] 李琳玲, 程华, 程水源, 许锋, 王燕, 姜德志. 银杏查尔酮合成酶基因启动子(GbCHSP)调控元件及功能分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(12): 1919-1928.
- LI L L, CHENG H, CHENG S Y, XU F, WANG Y, JIANG D Z. Regulatory elements and functional analysis of chalcone synthase gene promoter from *Ginkgo biloba* L.[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(12): 1919-1928. (in Chinese)
- [19] KOES R, VERWEIJ W, QUATTRO F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5): 236-242.
- [20] PATTANAIK S, KONG Q, ZAITLIN D, WERKMAN J R, XIE C H, PATRA B, YUAN L. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco[J]. Planta, 2010, 231(5): 1061-1076.
- [21] YAMAGISHI M, SHIMOYAMADA Y, NAKATSUKA T, MASUDA K. Two *R2R3-MYB* genes, homologs of petunia AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of *Asiatic hybrid* Lily[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(3): 463-474.