剑叶龙血树中查耳酮合酶基因及启动子的克隆与分析

徐鸟娇[1]，孙惠芳[3]，徐裕梅[2]，张　越[2]，宋美芳[2]，杨雯媛[2]，段宝忠[1*]，张忠廉[1, 2*]

1. 大理大学药学院，云南 大理　671000
2. 中国医学科学院药用植物研究所云南分所，云南省南药可持续利用重点实验室，云南 景洪　666100
3. 曲靖师范学院，云南 曲靖　655011

摘　要：目的　克隆剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* 中 3 个查耳酮合酶（chalcone synthase，*CHS*）基因及其启动子，并解析其序列特征与胁迫表达模式，为黄酮类生物合成调控研究提供基因资源。**方法**　基于转录组数据克隆 *DcoCHS1*、*DcoCHS2* 和 *DcoCHS3* 3 个基因的编码区并开展生物信息学分析；采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应（Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction，RT-qPCR）检测机械胁迫下木质部中的表达动态；构建原核表达载体，利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）验证重组蛋白表达；通过染色体步移技术获取启动子并预测顺式元件。**结果**　3 个基因编码区长度分别为 1 179、1 188 和 1 173 bp，均含 CHS 保守结构域及 8 个保守基序，预测蛋白定位于细胞质。系统进化显示 DcoCHS2 与 DcoCHS3 亲缘较近，*DcoCHS1* 独立成支。机械胁迫处理后 3 个基因均随处理时间呈上调表达模式，重组蛋白均可在大肠杆菌中成功表达。获得启动子序列长度为 1 096～1 239 bp，顺式元件组成存在显著差异：*DcoCHS1* 启动子富含脱落酸响应元件，*DcoCHS3* 启动子含水杨酸和茉莉酸甲酯响应元件，*DcoCHS2* 启动子则以通用型基础元件为主。**结论**　3 个 *DcoCHS* 基因在进化关系、启动子调控特征及胁迫响应模式上呈现明显功能分化，提示其在龙血竭黄酮合成过程中发挥不同作用，可为后续解析龙血竭合成调控网络和代谢工程改良提供基因资源。

关键词：剑叶龙血树；查耳酮合酶；原核表达；启动子克隆；生物信息学分析

中图分类号：R282.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)21 - 8676 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.21.023

Cloning and analysis of three CHS genes and their promoters from *Dracaena cochinchinensis*

XU Niaojiao[1], SUN Huifang[3], XU Yumei[2], ZHANG Yue[2], SONG Meifang[2], YANG Wenyuan[2], DUAN Baozhong[1], ZHANG Zhonglian[1, 2]

1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China
2. Yunnan Key Laboratory of Southern Medicine Utilization, Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China
3. Qujing Normal University, Qujing 655011, China

Abstract: Objective　To clone three chalcone synthase (*CHS*) genes and their promoters from *Dracaena cochinchinensis*, characterize their sequence features and stress-responsive expression patterns, and provide genetic resources for studying the regulation of flavonoid biosynthesis. **Methods**　The coding sequences of *DcoCHS1*, *DcoCHS2*, and *DcoCHS3* were cloned based on transcriptomic data and subjected to bioinformatics analysis. Real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to examine their expression dynamics in xylem under mechanical stress. Prokaryotic expression vectors were constructed, and recombinant protein expression was verified via sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Promoters were isolated using genome walking

收稿日期：2026-02-03

基金项目：云南省“兴滇英才支持计划”青年人才专项；云南省职工创新项目补助资金项目：龙血竭可持续环剥诱导技术研究；云南省高层次科技人才及创新团队选拔专项：云南省傣药南药资源保护与利用创新团队（202405AS350020）

作者简介：徐鸟娇（1999—），硕士研究生，研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: 2837600144@qq.com

***通信作者：**张忠廉，研究员，研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: zzl0605@163.com

段宝忠，教授，研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: bzduan@126.com

and analyzed for cis-acting regulatory elements. **Results** The coding regions of the three genes were 1 179, 1 188, and 1 173 bp in length, respectively. All deduced proteins contained the conserved CHS domain and eight conserved motifs, and were predicted to localize in the cytoplasm. Phylogenetic analysis revealed that DcoCHS2 and DcoCHS3 clustered together, whereas *DcoCHS1* formed a separate clade. All three genes were upregulated over time in response to mechanical stress, and the recombinant proteins were successfully expressed in Escherichia coli. The promoter lengths ranged from 1 096 to 1 239 bp, with distinct cis-element compositions: the *DcoCHS1* promoter was enriched in abscisic acid-responsive elements, the *DcoCHS3* promoter contained salicylic acid- and methyl jasmonate-responsive elements, and the *DcoCHS2* promoter was predominantly composed of general basal elements. **Conclusion** The three *DcoCHS* genes exhibited marked functional divergence in phylogenetic relationships, promoter regulatory logic, and stress-responsive patterns, suggesting that they play differentiated roles in flavonoid biosynthesis in dragon's blood. These findings provide candidate genetic resources for further dissection of the regulatory network and for metabolic engineering applications.

Key words: *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen; chalcone synthase; prokaryotic expression; promoter cloning; bioinformatics analysis

剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 为天门冬科龙血树属植物，主要分布于老挝、柬埔寨、越南及中国云南、广西等地[1]，是国家 II 级重点保护植物。其植株在受到外界胁迫后分泌的红色树脂即为龙血竭[2]，在《本草纲目》中被誉为“活血圣药”[3-4]，具有活血散瘀、定痛止血、敛疮生肌等传统功效[5]。现代药理学研究表明，龙血竭还具有降血糖、调血脂、抗癌、抗动脉粥样硬化以及免疫调节等生物活性[6-8]，是我国传统名贵中药材。

虽然巴豆属 *Croton* L.、龙血树属 *Dracaena* Vand. ex L.、黄藤属 *Daemonorops* Blume 和紫檀属 *Pterocarpus* Jacq.等多个属的植物均可产生龙血竭类树脂[9]，但龙血竭产业发展仍面临两大瓶颈。一方面，长期过度采伐、原生境破坏以及传统“毁树取脂”的采收方式，导致剑叶龙血树野生资源濒临枯竭，种质资源保育形势严峻[4, 6,10]；另一方面，龙血竭属于典型的胁迫特异性次生代谢产物，健康植株无法自主合成积累，仅在机械损伤、生物胁迫等外界刺激下才能启动合成途径[11]，而现有人工诱导产脂技术效率低、有效成分积累量少，使得国内龙血竭原料长期依赖进口[4]，严重制约产业可持续发展。因此，深入解析龙血竭生物合成的分子调控机制，开发高效绿色的人工诱导技术，是解决资源短缺、推动产业健康发展的关键。

龙血竭化学成分复杂，其中黄酮类化合物为核心药效成分，占总化学成分的 50%～80%[12-13]，其抗氧化、抗炎、镇痛、抗菌、神经保护及抗肿瘤等活性是龙血竭发挥药用功效的物质基础[14]。同时，黄酮类化合物也是剑叶龙血树抵御外界胁迫的重要防御物质[14-17]，也因其显著的生物活性而成为药物研发的重点[18]。在黄酮生物合成途径中，查耳酮合酶（chalcone synthase，CHS）是第一个关键限速酶[19-20]，其表达水平与酶活性直接决定黄酮类化合物的合成效率[21-25]。然而，与黄酮类化合物的胁迫特异性积累特征相对应的是，剑叶龙血树中的 CHS 基因可能不仅仅是黄酮骨架合成的催化酶，更可能作为胁迫信号转导的关键节点，将外界机械损伤信号转化为黄酮类防御物质的合成指令。已有研究表明，龙血树中黄酮类化合物的大量积累具有高度胁迫依赖性[11, 26-27]，因此，*CHS* 基因的表达调控极有可能是连接胁迫信号与黄酮积累的核心环节。*CHS* 基因已在多种植物中被克隆验证，且通常以功能分化的多基因家族形式存在[21, 28-39]。但龙血树属 *CHS* 基因研究仍十分薄弱，目前仅见海南龙血树单个 *CHS* 基因克隆的报道[40]，其家族成员组成、胁迫响应模式及启动子调控机制均未得到系统解析。这种研究空白与龙血竭重要的药用价值及其胁迫特异性积累特性之间的矛盾，使得在剑叶龙血树中系统开展 *CHS* 基因家族研究具有特殊的科学意义—它不仅是解析龙血竭黄酮合成调控机制的关键突破口，也可能揭示植物次生代谢产物胁迫响应调控的新模式。已有研究证实，龙血竭的形成是胁迫诱导下木质部黄酮类化合物大量积累的结果[26-27]，而 *CHS* 基因的表达模式主要受其启动子区顺式作用元件调控[41-44]。因此，克隆与分析剑叶龙血树 *CHS* 基因家族及其启动子，对于阐明龙血竭形成的分子机制具有重要意义。

综上，本研究以剑叶龙血树为实验材料，成功克隆获得 3 条 *CHS* 家族基因，分别命名为 *DcoCHS1*、*DcoCHS2* 和 *DcoCHS3*，其编码区长度依次为 1 179、1 188、1 173 bp，并通过染色体步移技术克隆得到 3 个基因的启动子序列。通过生物信息学分析明确基因序列特征、系统进化关系及启动子顺式作用元件；采用 RT-qPCR 分析 3 个基因在不

同胁迫诱导条件下的表达模式；构建原核表达载体实现目的蛋白的体外诱导表达。本研究旨为揭示剑叶龙血树黄酮类化合物生物合成的分子调控机制提供理论依据，也为后续通过基因工程技术定向提高龙血竭产量、实现资源可持续利用奠定基础。

1　材料与仪器

1.1　材料

本研究以 10 年生健康剑叶龙血树为实验材料，该龄期植株次生代谢系统已趋于成熟，且个体间一致性较高，适于开展胁迫相关研究，本课题组前期研究亦采用同龄期材料开展相关实验[11, 15]。所有样品均采集自中国医学科学院药用植物研究所云南分所龙血树种质资源圃。经中国医学科学院药用植物研究所云南分所张忠廉研究员鉴定为剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen。样品于主干上手动切割大小基本一致的伤口（长约 3 cm、宽约 2 cm、深约 1 cm），各伤口间距大于 5 cm，并于各时间点采集适量样本，液氮速冻保存。

1.2　试剂

大肠杆菌 DH5α 感受态细胞、大肠杆菌蛋白表达菌株 BL21 DE3、原核表达载体 pET28a 均由本实验室保存。T 载体 pMD19-T、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR 高保真酶、限制性核酸内切酶、TB Green Premix、反转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司；植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司；植物总 RNA 提取试剂盒购自北京华越洋生物科技有限公司。测序及引物合成服务均委托生工生物工程（上海）股份有限公司完成。

2　方法

2.1　DNA、RNA 的提取以及 cDNA 的合成

首先，采用天根生化科技（北京）有限公司的快速通用 Plant Genomic DNA Kit 试剂盒提取剑叶龙血树基因组 DNA。随后，采用北京华越洋公司的快速通用植物 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，通过 1%琼脂糖凝胶电泳与核酸定量仪检测 RNA 完整性及纯度。最后，使用 PrimeSript^{TM}RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒，按照说明书将总 RNA 反转录为 cDNA。

2.2　*DcoCHS* 基因的克隆

根据课题组前期对剑叶龙血树二代和三代全长转录组测序结果分析得到的 3 个 *CHS* 基因（*DcoCHS1*、*DcoCHS2*、*DcoCHS3*），分别设计特异性扩增引物（表 1），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。以剑叶龙血树 cDNA 为模板，采用

表 1　所用引物

Table 1　Primers used in this study

基因	引物名称	引物序列 (5’→3’)
引物基因	*DcoCHS1*-R	TGAAAGCTTTTAGTTAATGGCCACGCTGC
	DcoCHS2-F	CCAGAATTCATGGCCAAGAATGTCGCGGA
	DcoCHS2-R	TGAAAGCTTTCAGTTCACGAGCGGCACG
	DcoCHS3-F	CCAGAATTCATGGTGGCCATCGATGAGATCC
	DcoCHS3-R	TGAAAGCTTCAGTTAGTAGCCACACTGCGCAGC
DcoCHS 启动子	*CHS1*_SP1	AAGATGAGGTGGGTGATGTGGGACTTG
	*CHS1*_SP2	AGGGGGCCATATAGGCGCAGATATTG
	*CHS1*_SP3	TCCTTGAGGTCGGTCATGTGCTCACT
	*CHS2*_SP1	ATGTCGACACCGCTCGTCGTGCA
	*CHS2*_SP2	AAGACCACGACCATGTTTTGTCGTGCG
	*CHS2*_SP3	GATTTCTCGCTTGCACATGCGCCT
	*CHS3*_SP1	GACGACCAGGTGGGTGATCTTTGACT
	*CHS3*_SP2	ACGGAGCCATGAAGGCGCAAACATTC
	*CHS3*_SP3	AACCTTGTCCTCGCTGTTGGTAACACG
DcoCHS 荧光定量	RT_*DcoCHS1*F	GCCTGACCTTCCACCTTCTC
	RT_*DcoCHS1*R	CTTGTTGCCCTCATCTTCTCCT
	RT_*DcoCHS2*F	ACCGCTACGCCGAAGAACT
	RT_*DcoCHS2*R	ACCTCCACCACCACGATGT
	RT_*DcoCHS3*F	CCCAGGTGGAGGCTAAGTTGAG
	RT_*DcoCHS3*R	CCCGAACCCGAACAAGACTC
	RT-ACT-F(actin)	ACCGAGAGAGGGTACTCATT
	RT-ACT-R(actin)	CCAGCTCCTGCTCGTAATC

PrimeSTAR 高保真酶进行 PCR 扩增，扩增程序与体系参照该酶说明书。产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测确定条带位置后，进行胶回收纯化后连接至 pMD19-T 克隆载体。通过 42 ℃热激法转化至大肠杆菌 DH5α，过夜培养后挑取单克隆进行 PCR 阳性鉴定，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测确定条带位置后，选取阳性克隆进行摇菌培养，送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

2.3 *DcoCHS* 基因的原核表达载体的构建及蛋白诱导

选择 pET-28a 载体的 *Hind* III和 *EcoR* I酶切位点设计 *DcoCHS* 基因特异性扩增引物，扩增产物与经 *Hind* III和 *EcoR* I双酶切线性化的 pET-28a 载体，在 T4 DNA 连接酶作用下连接，构建 pET-28a-DcoCHS 重组表达载体。重组载体通过热激法转化至 DH5α 感受态细胞，涂布于含卡那霉素的 LB 平板进行筛选。挑取单克隆进行振荡培养后，通过菌液 PCR 验证阳性克隆，并将其送至生工测序。随后，将测序正确的重组表达载体转化至 DE3 表达感受态细胞，挑取单克隆接种于相应抗性的 LB 液体培养基，37 ℃、200 r/min 过夜培养。为进行蛋白诱导，将过夜培养物按 1∶50 比例转接至新鲜同抗性 LB 培养基，37 ℃、200 r/min 培养至 A_{600}≈0.6，取 200 μL 菌液作为未诱导对照后，于剩余菌液加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导，17 ℃、150 r/min 培养 12 h。之后，离心收集菌体，用 PBS 重悬。取重悬菌液，与 5×蛋白上样缓冲液按 4∶1 混合，沸水浴变性 10 min，取 10 μL 上述变性样品进行 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色后检测重组蛋白表达情况。

2.4 RT-qPCR 分析候选 *DcoCHS* 基因的表达水平

利用 RT-qPCR 技术分析 3 个 *CHS* 基因在剑叶龙血树伤害胁迫后不同时间点（0、5、10、20、30、48、72、120、240 h）的相对表达量，胁迫处理与样品采集方法参照已报道的操作流程执行[40]。按照“2.1”项所述方法提取各时间点样品总 RNA，经检测合格后反转录合成第一链 cDNA。分别设计特异性荧光定量引物（表 1），以各时间点 cDNA 为模板，剑叶龙血树肌动蛋白（Actin）基因作为内参基因[15, 45]，使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒（TaKaRa）参照说明书配置反应体系并进行 RT-qPCR 扩增。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *DcoCHS1*、*DcoCHS2* 和 *DcoCHS3* 的相对表达量，以 Actin 为内参基因进行归一化处理，以 0 h 未处理组作为对照。每个时间点设置 3 次生物学重复,每个样本设置 3 个技术重复，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 10 软件进行统计分析，对原始数据经归一化处理后进行单因素方差分析（One-way ANOVA），组间两两比较采用 Dunnett 多重比较检验，以各处理组分别与 0 h 对照组进行比较。

2.5 *DcoCHS* 基因生物信息学分析

使用 DNAMAN 9.0 软件将核酸序列翻译为氨基酸序列并进行同源比对；MEME（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）结合 TBtools 2.0 进行保守基序分析；MEGA 12 构建系统进化树；ProtParam（https://www.expasy.org/resources/protparam）分析蛋白质理化性质；SOPMA（https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html）预测蛋白质二级结构，Swiss-Model（https://swissmodel.expasy.org/）预测三级结构，TMHMM 2.0（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0）分析跨膜区域，WoLF PSORT（https://wolfpsort.hgc.jp/）分析蛋白质的亚细胞定位。

2.6 *DcoCHS* 基因的启动子克隆及生信分析

为克隆 *DcoCHS* 基因上游的启动子区域，本研究采用基于染色体步移原理的巢式 PCR 方法。以剑叶龙血树基因组 DNA 为模板，参照 TaKaRa 公司 Genome Walking Kit 说明书，针对每个 *DcoCHS* 基因分别设计 3 条特异性引物（SP1、SP2、SP3）（表 1）。首先，以剑叶龙血树基因组 DNA 为模板，使用试剂盒提供的 4 种简并引物（AP1～AP4）分别与各基因的 SP1 引物进行第 1 轮 PCR。随后，取第一轮产物为模板，以对应的简并引物与 SP2 引物进行第 2 轮 PCR。最后，以第 2 轮产物为模板，以对应的简并引物与 SP3 引物进行第 3 轮 PCR。对最终的特异性扩增产物进行测序，通过序列拼接获得各基因的启动子序列。利用 Plant-CARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/ html）在线分析工具分析 *DcoCHS* 基因启动子区潜在的顺式作用元件种类、数量及位置。

3 结果与分析

3.1 *DcoCHS* 基因的克隆

本研究成功克隆了剑叶龙血树的 3 个 *DcoCHS* 基因（*DcoCHS1*、*DcoCHS2*、*DcoCHS3*）

的全长编码序列。具体而言，实验以剑叶龙血树 cDNA 为模板，分别使用设计的 *DcoCHS* 基因特异性引物进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测结果显示，扩增片段大小与预期一致（图 1-A）。为验证序列准确性，将扩增产物经 TA 克隆至 pMD19-T 载体并进行测序。测序结果表明，获得了 3 个 *DcoCHS* 基因的完整编码区，分别命名为 *DcoCHS1*（1 179 bp）、*DcoCHS2*（1 188 bp）和 *DcoCHS3*（1 173 bp）。

3.2　原核表达载体的构建及蛋白诱导

本研究成功构建了 3 个 *DcoCHS* 基因的原核表达载体，并诱导表达出与预测相对分子质量一致的重组蛋白。具体来说，结合全长转录组测序注释结果与 TA 克隆测序验证的编码区序列信息，首先将 3 个 *DcoCHS* 基因的全长 CDS 序列分别插入 pET-28a 原核表达载体中以构建重组质粒；接着，分别将重组质粒 pET-28a-*DcoCHS* 转化至大肠杆菌 DE3 感受态细胞中；最后，经 IPTG 诱导表达后，使用 SDS-PAGE 电泳检测结果。结果显示（图 1-B），检测到的 3 个重组蛋白条带大小与预测相对分子质量基本一致，即 DcoCHS1 为 42 800，DcoCHS2 为 43 100，DcoCHS3 为 42 700，表明重组蛋白诱导表达成功。

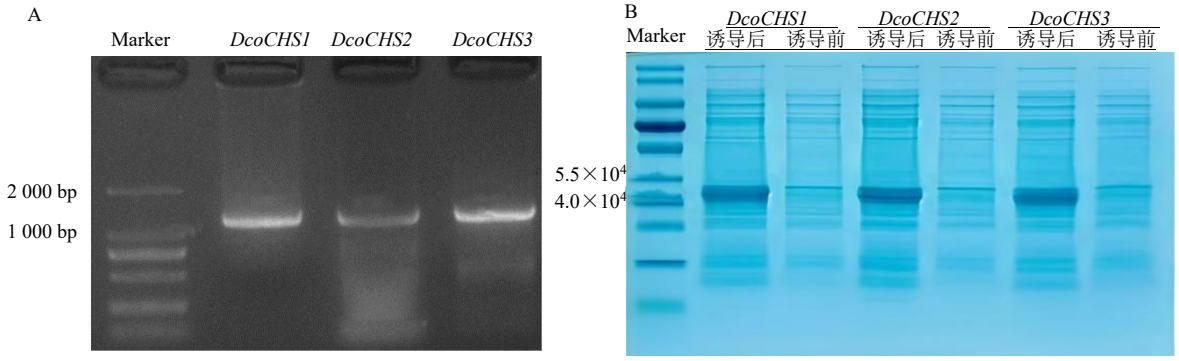


图 1　*DcoCHS1*、*DcoCHS2*、*DcoCHS3* 基因扩增 (A) 和原核诱导表达 (B)

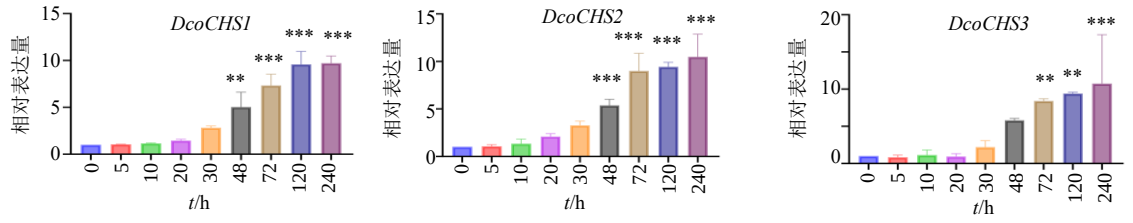
Fig. 1　Amplification (A) and prokaryotic induced expression (B) of *DcoCHS1*, *DcoCHS2*, and *DcoCHS3* genes

3.3　不同时间点 *DcoCHS* 基因的表达水平分析

RT-qPCR 分析表明，机械伤害胁迫诱导对 3 个 *DcoCHS* 基因的相对表达量有显著影响，其表达水平随胁迫时间延长呈持续上升趋势。本研究以机械伤害胁迫诱导后 9 个时间点的剑叶龙血树 cDNA 样品为材料进行 RT-qPCR 分析，结果如图 2 所示，3 个基因的表达水平均呈现时间相关性上调趋势。在 5～20 h 的早期阶段，三者的表达量均维持在较低水平；自 30 h 起开始逐步上升，48～72 h 进入快速上调期，其中 *DcoCHS1* 和 *DcoCHS2* 在 48 h 出现显著水平，而 *DcoCHS3* 至 72 h 才出现显著差异；120 h 后表达趋于平台期，240 h 时 *DcoCHS1*、*DcoCHS2* 和 *DcoCHS3* 的最高表达量分别达到约 9.7、10.5 和 10.7。

3.4　*DcoCHS* 基因的生物信息学分析

3.4.1　蛋白进化分析　为明确剑叶龙血树 3 个 DcoCHS 蛋白的序列特征与进化关系，本研究进行了多序列比对、系统发育树构建及保守基序分析。首先，通过多序列比对分析 DcoCHS1、DcoCHS2 和 DcoCHS3 的氨基酸序列（图 3-A）。结果显示，三



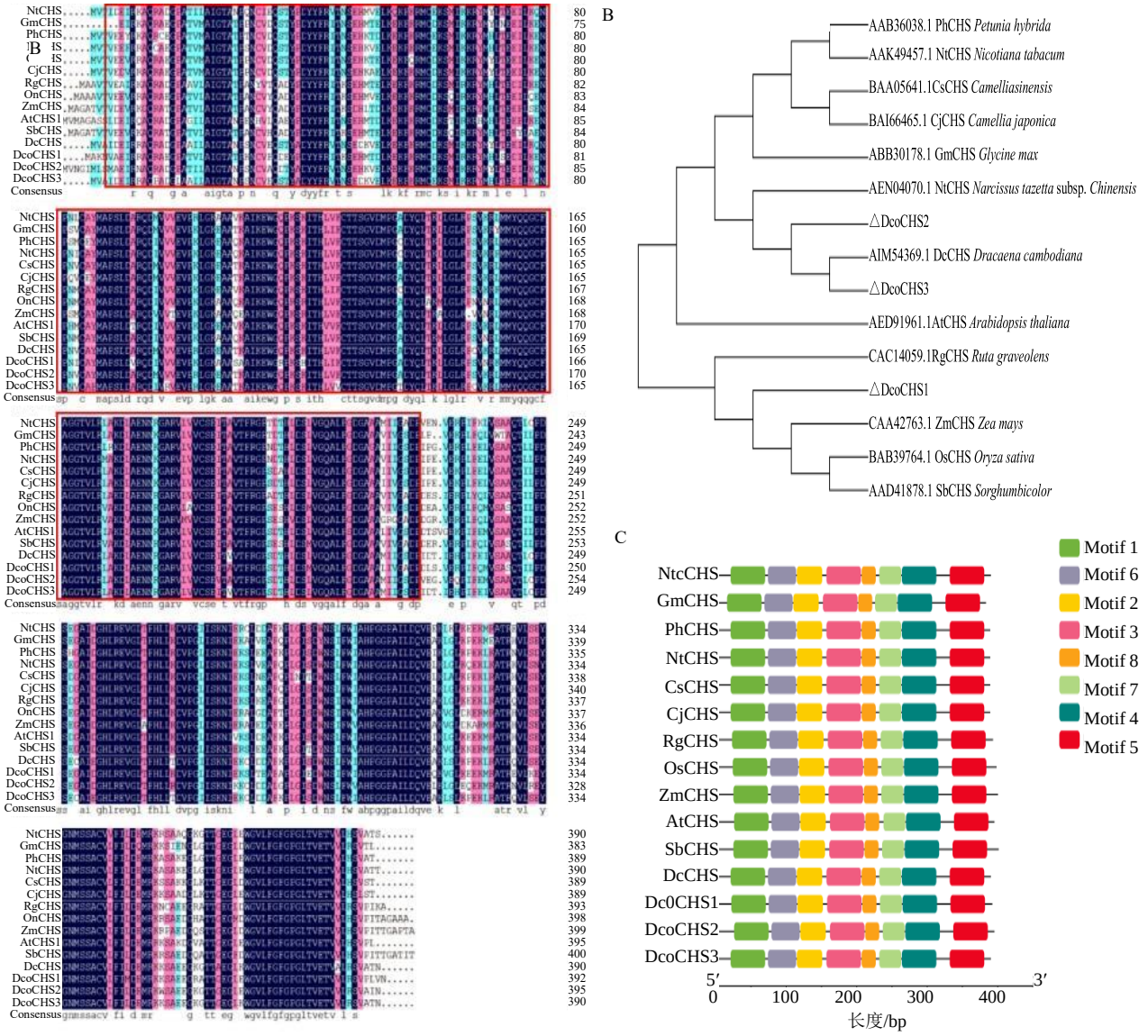
以 0 h 作为对照组；误差棒代表生物学重复的标准误；与 0 h 比较：$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$。

The 0 h time point served as the control group; Error bars represent the standard error of biological replicates; $^{**}P < 0.01$　$^{***}P < 0.001$ *vs* 0 h group.

图 2　机械伤害胁迫下 *DcoCHS1*、*DcoCHS2*、*DcoCHS3* 基因的表达模式

Fig. 2　Expression patterns of *DcoCHS1*, *DcoCHS2*, and *DcoCHS3* genes under mechanical injury stress

者均包含完整的 Chal_sti_synt_N 保守结构域，该结构域为 CHS 酶的特征性功能域，也是查耳酮合成酶发挥催化活性的核心区域。其次，基于全长氨基酸序列构建了邻接法（neighbor-joining，NJ）系统发育树（图 3-B）。进化分析表明，这 3 个蛋白在 CHS 家族中分属 2 个不同的进化分支。DcoCHS2 和 DcoCHS3 聚于同一子支，二者序列一致性较高，提示它们可能源于近期的一次基因复制事件。而 DcoCHS1 则单独形成了另一个进化分支，与芸香 RgCHS、玉米 ZmCHS 等亲缘关系较近，表明其在进化上与 DcoCHS2 与 DcoCHS3 发生了较早的分化。最后，对包括 3 个 DcoCHS 在内的 15 个 CHS 蛋白进行了保守基序（Motif）预测，共鉴定出 8 个保守基序（图 3-C）。DcoCHS1、DcoCHS2 和 DcoCHS3 均包含 8 个基序，其排列顺序（Motif 1-Motif 6-Motif 2-Motif 3-Motif 8-Motif 7-Motif 4-Motif 5）与其他物种（如拟南芥 AtCHS、矮牵牛 PhCHS、玉米 ZmCHS）的 CHS 蛋白高度一致。综上所述，尽管在进化上分属不同分支，DcoCHS1、DcoCHS2 和 DcoCHS3 均保留了完整的 CHS 家族



A-DcoCHS 蛋白与其他作物基因组同源基因多序列比对，红框为保守结构域；B-DcoCHS 蛋白的进化树分析；C-DcoCHS 蛋白与其他作物的 Motif 分析。

A-multiple sequence alignment of DcoCHS with homologous genes from other crop genomes; Conserved domains are marked with red boxes; B-phylogenetic tree analysis of DcoCHS proteins; C-motif analysis of DcoCHS and other crops.

图 3　3 个 DcoCHS 蛋白进化分析

Fig. 3　Evolutionary analysis of three DcoCHS proteins

保守结构域与基序组成，具备作为功能型查耳酮合酶的分子基础。

3.4.2　3 个 DcoCHS 蛋白特征分析　对 DcoCHS1、DcoCHS2 和 DcoCHS3 编码的蛋白进行了系统的蛋白特征分析，包括理化性质、跨膜结构、二级与三级结构及亚细胞定位预测。3 个基因分别编码 392、395 和 390 个氨基酸，其理论理化性质如表 2 所示；跨膜结构域预测显示，三者均不存在跨膜区域，说明该蛋白不是膜受体蛋白，与细胞信号转导无关。蛋白质二级结构预测（SOPMA）表明（图 4-A），DcoCHS1、DcoCHS2 和 DcoCHS3 均以无规则卷曲和 α-螺旋为主要结构元件。其中，无规则卷曲占比最高（DcoCHS1：46.43%，DcoCHS2：45.82%，DcoCHS3：46.92%），其次为 α-螺旋（DcoCHS1：39.29%，DcoCHS2：39.75%，DcoCHS3：37.44%）。利用 Swiss-Model 对三者进行了同源建模，获得了其蛋白质三级结构模型（图 4-B）。亚细胞定位预测（PSORT）结果一致表明，这 3 个 DcoCHS 蛋白均定位于细胞质中。

表 2　*DcoCHS* 理化性质分析

Table 2　Physicochemical properties analysis of three *DcoCHS* proteins

蛋白	相对分子质量	理论等电点	分子式	不稳定系数	总平均亲水性	半衰期/h
DcoCHS1	43.105 81	6.28	$C_{1911}H_{3060}N_{524}O_{564}S_{22}$	41.01	−0.100	30
DcoCHS2	43.177 92	5.97	$C_{1906}H_{3060}N_{522}O_{568}S_{25}$	35.57	−0.059	30
DcoCHS3	42.659 38	6.22	$C_{1888}H_{3046}N_{514}O_{563}S_{22}$	39.66	−0.051	30

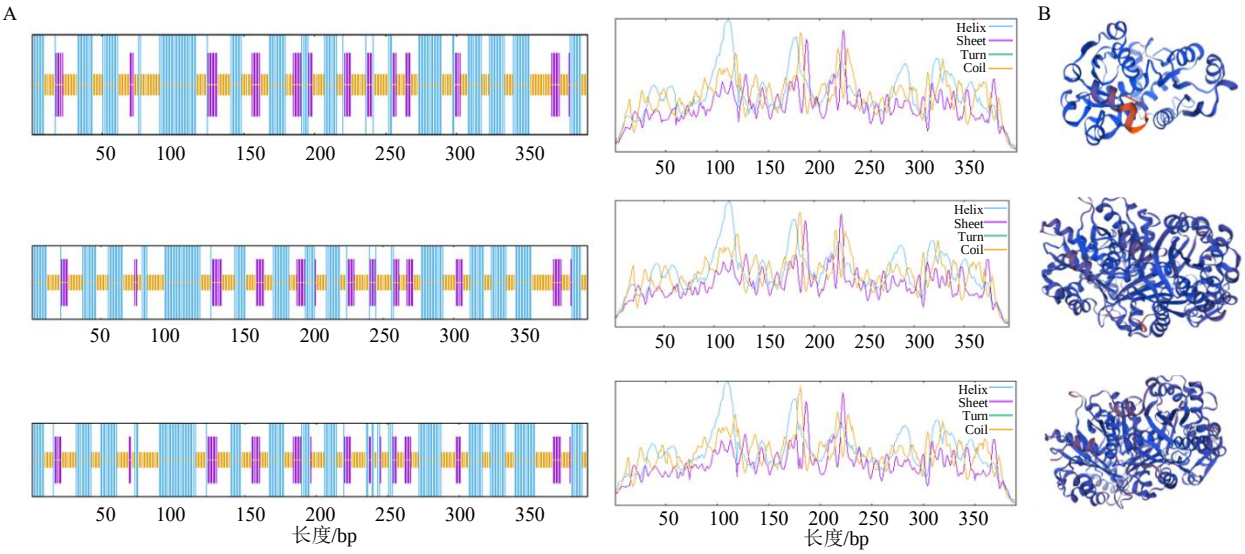


图 4　3 个 DcoCHS 二 (A)、三级 (B) 蛋白结构预测

Fig. 4　Prediction of secondary (A) and tertiary (B) structures of three DcoCHS proteins

3.4.3　启动子克隆及生信分析　本研究利用染色体步移法原理，通过已知 *DcoCHS* 基因序列设计 3 条特异性引物与已知的简并引物进行巢式 PCR 扩增得到 3 个启动子序列（*DcoCHS1*、*DcoCHS2*、*DcoCHS3*）。经过 3 轮巢式 PCR 扩增，并对第 2 轮和第 3 轮产物进行胶回收与测序，最终比对获得 3 个 *DcoCHS* 基因的启动子序列，长度分别为 *DcoCHS1*（1 860 bp）、*DcoCHS2*（1 743 bp）、*DcoCHS3*（1 698 bp）。将其与课题组已知基因组序列进行比对后，分别得到上游启动子序列为 *DcoCHS1*（1 096 bp）、*DcoCHS2*（1 152 bp）、*DcoCHS3*（1 239 bp）。

通过在线软件 PlantCARE 分析 3 个 *DcoCHS* 启动子序列，结果显示三者在顺式元件的种类、数量及功能分布上存在明显差异（表 3）。*DcoCHS1*、*DcoCHS2* 和 *DcoCHS3* 分别预测到 23 种（77 个）、16 种（203 个）和 28 种（82 个）顺式作用元件。3 个启动子均含有 TATA-box 和 CAAT-box 等基础转录相关核心保守元件，其中 *DcoCHS2* 的 TATA-box（110 个）及 AT～TATA-box（48 个）数量显著偏高，合计占该启动子总元件数的 77.8%，提示其启动子序列中存在 AT 富集重复区域。关于激素应答元件，*DcoCHS1* 富含 ABRE（6 个）、ABRE4（1 个）及 ABRE3a（1 个）等脱落酸响应元件，提示其可能受脱落酸（abscisic acid，ABA）信号强烈诱导；

表 3 启动子顺式作用元件分析

Table 3 Analysis of cis-acting elements in three promoters

功能分类	元件	数量/个		
		DcoCHS1	*DcoCHS2*	*DcoCHS3*
核心启动子元件	CAAT-box	26	22	25
	TATA-box	23	110	21
	AT～TATA-box	1	48	2
	CCAAT-box	0	0	1
ABA 信号与胁迫响应元件	ABRE	6	0	2
	ABRE4	1	0	0
	ABRE3a	1	0	0
	MYC	2	2	2
	MYB	1	2	1
	MBS	1	0	1
	DRE1	1	0	0
	STRE	2	4	2
	WRE3	1	0	0
其他激素响应元件	TCA-element	0	0	1
	TGACG-motif	0	0	1
	CGTCA-motif	0	0	1
	as-1	0	0	1
	GARE-motif	0	1	1
	G-box	1	0	1
	Box 4	1	2	4
其他激素响应元件	ATC-motif	0	1	0
	MRE	1	0	0
	I-box	0	0	1
	GATA-motif	0	0	1
	TCT-motif	0	1	1
光响应元件	TCCC-motif	0	1	0
	Gap-box	1	0	0
	A-box	1	0	0
发育特异性元件	AAGAA-motif	1	1	3
	GCN4_motif	1	0	0
	O2-site	0	0	1
	CCGTCC-box	1	0	0
	CCGTCC motif	1	0	0
防御与其他胁迫元件	W box	1	1	0
	TC-rich repeats	1	3	0
	ARE	0	3	0
	Myb-binding site	0	1	1
	MYB recognition site	0	0	1
	MYB-like sequence	0	0	1
其他元件	AC-I	0	0	1
	CTAG-motif	0	0	1
	TGA-box	0	0	1

DcoCHS3 的激素响应元件种类最为丰富，涵盖 ABRE、TCA-element、TGACG-motif、CGTCA-motif、as-1 及 GARE-motif，分别参与脱落酸、水杨酸、茉莉酸和赤霉素等多种激素信号调控；而 *DcoCHS2* 仅鉴定出 1 个 GARE-motif，激素响应元件极为匮乏。与非生物胁迫响应相关的元件分析显示，*DcoCHS1* 含有 DRE1、STRE、MBS 及 WRE3，可响应干旱、渗透胁迫及创伤等逆境；*DcoCHS2* 含有 STRE、ARE 及 TC-rich repeats，可能参与渗透胁迫和厌氧胁迫应答；*DcoCHS3* 中仅检出 STRE，胁迫响应能力相对较弱。此外，*DcoCHS3* 还富集了 Box 4、G-box、I-box 等多种光响应元件，并含有 AAGAA-motif 和 O2-site 等胚乳特异性表达元件，元件类型在三者中最为多样（28 种）。综上，基于顺式作用元件的分析，3 个 *DcoCHS* 基因启动子可能具有不同的调控功能：*DcoCHS1* 可能受 ABA 介导的干旱胁迫信号调控，*DcoCHS2* 可能以组成型表达为主，而 *DcoCHS3* 可能受多种激素、光信号及发育信号的协同调控。

4 讨论

本研究从剑叶龙血树中克隆获得 3 个 *DcoCHS* 基因，通过系统的生物信息学分析，从蛋白结构、进化特征与启动子顺式作用元件等层面解析其序列保守性与家族功能分化趋势，为后续基因功能解析提供序列资源和转录调控线索。

CHS 基因家族在植物中进化保守，蛋白保守结构域与特征基序是维持其蛋白功能的结构基础。本研究生物信息学分析表明，3 个 DcoCHS 蛋白均含有完整 CHS 家族保守结构域与特征基序，亚细胞定位预测均定位于细胞质基质，与红毛丹、杜仲等物种 CHS 蛋白预测定位结果一致[46-50]，提示 3 个 DcoCHS 具备 CHS 家族蛋白的基本结构特征。需要说明的是，亚细胞定位、蛋白稳定性均为基于序列的软件预测结果，蛋白真实亚细胞分布与胞内蛋白稳态特征仍有待体内外实验进一步验证。

基因家族在进化过程中常发生序列变异，进而造成家族成员表达模式与生物学功能分化。本研究结果显示，3 个 DcoCHS 在蛋白稳定性预测、系统进化聚类关系上均存在分化特征。系统发育树中 DcoCHS2 与 DcoCHS3 亲缘关系更近，DcoCHS1 单独聚于另一分支，提示该家族内部已出现潜在功能分化；蛋白稳定性预测结果的差异，提示三者胞内

蛋白稳态调控模式可能不同，但该预测结果不能直接反映植物体内真实的蛋白积累水平。机械胁迫下 RT-qPCR 结果表明，3 个 *DcoCHS* 基因转录水平均表现显著时间相关性上调，且表达变化模式高度同步，推测其受到共同上游因子协同调控，参与剑叶龙血树应对机械损伤的防御性次生代谢响应。本研究仅检测基因转录水平变化，尚未测定黄酮类代谢物含量，因此尚不能证实 *DcoCHS* 直接介导黄酮物质积累与龙血竭合成，仅能够说明机械损伤能够诱导该家族基因转录激活[51]。

启动子顺式作用元件的变异是植物基因家族实现表达分化的重要转录调控方式[52-55]。本研究通过染色体步移获得 3 个 *DcoCHS* 基因启动子序列，经 PlantCARE 预测发现三者顺式元件的类型、数量存在明显区别，提示不同 *DcoCHS* 成员可能受到不同信号通路的转录调控。*DcoCHS1* 启动子富集 ABA 及干旱相关胁迫响应元件，结合系统进化与胁迫表达结果，推测其更倾向于参与胁迫应答，这与单子叶药用植物铁皮石斛逆境响应 *CHS* 成员的启动子特征相类似[56]；*DcoCHS3* 启动子包含多种激素及光响应元件，推测其可接收多条信号通路调控，与葡萄、柑橘 *CHS* 家族调控模式具有相似性[57-58]；而 *DcoCHS2* 启动子中特异性胁迫与激素响应元件较少，推测其更倾向于组成型表达模式，主要维持植株基础黄酮合成与次生代谢稳态[59]。值得注意的是，*DcoCHS2* 启动子区域存在大量 AT 串联重复序列，会造成数据库对 TATA box 数量预测虚高，说明生物信息学预测存在一定局限性，不能仅凭元件数量直接判定其转录活性。综上，本研究推测 3 个 *DcoCHS* 家族成员在转录调控层面已经形成分化，为理解该家族基因的表达差异提供初步依据。

总体来看，本研究完成剑叶龙血树 3 个 *DcoCHS* 基因克隆、蛋白序列分析、启动子分离和顺式元件预测，并分析其在机械胁迫条件下的转录响应特征，从基因序列与转录调控角度为认识剑叶龙血树 *CHS* 家族提供基础数据。但本研究仍存在一定局限性：第一，蛋白结构特征、亚细胞定位、蛋白稳定性均仅为生物信息学软件预测，尚未开展体内外实验予以验证；第二，启动子功能分析仅依赖顺式元件预测，未开展启动子活性验证实验，无法证实各顺式元件真实调控功能；第三，仅检测胁迫条件下基因转录水平，缺少蛋白丰度、酶活性及代谢产物数据，尚不能建立 *DcoCHS* 与黄酮代谢、龙血竭形成的直接因果关系；第四，调控 *DcoCHS* 的上游转录因子及其调控网络尚不明确。

针对上述不足，后续可从以下方面开展深入研究：第一，开展亚细胞定位、蛋白稳定性检测及体外酶活测定，验证 3 个 *DcoCHS* 的亚细胞位置、蛋白稳定性和催化功能；第二，构建启动子截短载体，结合 GUS 瞬时表达体系验证各 *DcoCHS* 启动子转录活性，定位响应机械损伤、激素信号的核心调控区段，降低生物信息学预测带来的偏差；第三，是利用酵母单杂交、EMSA、双荧光素酶等技术筛选并验证能够结合 *DcoCHS* 启动子的上游转录因子，解析其转录调控网络[60-61]；第四，利用异源表达或者基因编辑技术，在植物体内进一步阐明基因生物学功能。上述研究将有助于完整揭示 *DcoCHS* 在剑叶龙血树中的生物学作用。

5 结论

本研究从剑叶龙血树中克隆并鉴定了 3 个 *CHS* 基因家族成员：*DcoCHS1*、*DcoCHS2* 和 *DcoCHS3*，其编码区长度分别为 1 179 bp、1 188 bp 和 1 173 bp。序列与进化分析表明，三者均具备典型的 CHS 催化结构域，但系统发育关系揭示其进化路径存在分化：DcoCHS2 与 DcoCHS3 聚为一支，而 DcoCHS1 则单独成支，提示三者可能具有不同的功能演化方向。RT-qPCR 分析证实，3 个基因在非生物胁迫下均呈上调表达，说明其均参与了胁迫响应过程。原核表达实验成功实现了 3 个重组 DcoCHS 蛋白的表达，为后续开展体外酶学功能研究奠定了蛋白材料基础。

为探究这种进化分化对应的转录调控基础，本研究对 3 个基因的启动子进行了分析。结果表明，其顺式作用元件组成存在显著功能分化：*DcoCHS1* 启动子富含 ABA 响应元件，*DcoCHS3* 启动子独有水杨酸和茉莉酸甲酯响应元件，而 *DcoCHS2* 启动子则以通用型基础元件为主，激素与胁迫特异性响应元件较为匮乏。这从顺式调控层面提示，3 个 *DcoCHS* 基因可能分别响应不同的上游信号通路，从而在龙血竭形成过程中扮演差异化的调控角色。

综上所述，本研究克隆并初步分析了剑叶龙血树 3 个 *CHS* 基因的序列特征、进化关系、启动子元件组成及表达模式，为后续深入解析黄酮类化合物在龙血竭形成中的分子调控机制提供了基础数据与候选基因资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张忠廉. 不同基原龙血竭的分子鉴定及化学成分特征研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.

[2] 颜晓睿, 赵相轩. 龙血竭化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药学前沿, 2025, 28(9): 1593-1604.

[3] 李枫, 张蓓蕾. 活血圣药: 血竭研究综述 [J]. 上海医药, 1998, 19(8): 33-34.

[4] 蔡希陶, 许再富. 国产血竭植物资源的研究 [J]. 云南植物研究, 1979, 1(2): 1-10.

[5] 曾佳怡, 梁爽. 民族药物龙血竭的研究进展 [J]. 壮瑶药研究, 2023(3): 44-47.

[6] 马文静, 张玉秀, 吴海莹, 等. 龙血竭中黄酮类化合物及其代谢调控的进展 [J]. 中国现代中药, 2026, 28(5): 1039-1052.

[7] 付梅红, 方婧, 王祝举, 等. 血竭药理研究与临床应用概述 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1498-1500.

[8] Namjoyan F, Kiashi F, Moosavi Z B, *et al*. Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *J Tradit Complementary Med*, 2016, 6(1): 37-40.

[9] Fan J Y, Yi T, Sze-To C M, *et al*. A systematic review of the botanical, phytochemical and pharmacological profile of *Dracaena cochinchinensis*, a plant source of the ethnomedicine "dragon's blood" [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 10650-10669.

[10] 王兰珍, 王继永, 张燕, 等. 血竭植物资源开发利用现状 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 1017-1019.

[11] 孙惠芳, 宋美芳, 张越, 等. 剑叶龙血树 4CL 基因的克隆及其功能预测 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(3): 513-522.

[12] 张兴锋, 朱功俊, 龚韦凡, 等. 龙血竭黄酮类成分研究 [J]. 广州化工, 2020, 48(9): 92-95.

[13] 林忆龙, 文亦磊, 黄洪, 等. 龙血竭化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(6): 50-55.

[14] 陈品秋, 班玮康, 王文艳, 等. 龙血竭及其主要活性成分对脑缺血的药理作用与机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 6172-6184.

[15] Sun H F, Song M F, Zhang Y, *et al*. Transcriptome profiling reveals candidate flavonoid-related genes during formation of dragon's blood from *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen under conditions of wounding stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 113987.

[16] Liu Y, Zhao X S, Yao R Y, *et al*. Dragon's blood from *Dracaena* worldwide: Species, traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(6): 1315-1367.

[17] Murata K, Kitano T, Yoshimoto R, *et al*. Natural variation in the expression and catalytic activity of a naringenin 7-*O*-methyltransferase influences antifungal defenses in diverse rice cultivars [J]. *Plant J*, 2020, 101(5): 1103-1117.

[18] 孙晓润, 陈苹苹, 林悦, 等. 天然黄酮类化合物抗肿瘤作用靶点研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 218-228.

[19] 王若彤, 杜瑞豪, 沈晓凤, 等. 大齿牛果藤中 CHS 基因家族鉴定与分析 [J]. 生物资源, 2026, 48(2): 167-178.

[20] Zhang X B, Abrahan C, Colquhoun T A, *et al*. A proteolytic regulator controlling *Chalcone* synthase stability and flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(5): 1157-1174.

[21] 潘萍萍, 徐志浩, 张怡雯, 等. 多花黄精查耳酮合酶 PcCHS 的原核表达、亚细胞定位及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(5): 280-289.

[22] Lewis J A, Jacobo E P, Palmer N, *et al*. Structural and interactional analysis of the flavonoid pathway proteins: *Chalcone* synthase, *Chalcone* isomerase and *Chalcone* isomerase-like protein [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5651.

[23] 黄虹. 桑树 MYB12 和 MYB308 基因调控黄酮类化合物合成的功能解析及应用研究 [D]. 济南: 山东农业大学, 2022.

[24] Liu W X, Feng Y, Yu S H, *et al*. The flavonoid biosynthesis network in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12824.

[25] Heller W, Hahlbrock K. Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin *Chalcone* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1980, 200(2): 617-619.

[26] 刘杨. 伤害诱导龙血树防御反应形成树脂的机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.

[27] 薛宇, 宋美芳, 张越, 等. 基于伤害诱导的龙血竭形成过程中信号分子变化规律研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 642-648.

[28] 敖志杰, 张惊宇, 曾娟, 等. 灰毡毛忍冬 CHS1 基因克隆及功能分析 [J]. 中草药, 2025, 56(17): 6334-6345.

[29] 邱海玲, 王方明, 米芯雨, 等. 管花肉苁蓉花中查耳酮合酶的基因克隆、功能鉴定与表达分析 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7797-7805.

[30] Guo D D, Gao Y, Liu F, *et al*. Integrating molecular characterization and metabolites profile revealed CtCHI1's significant role in *Carthamus tinctorius* L [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 376.

[31] Liu X J, Chuang Y N, Chiou C Y, *et al*. Methylation effect on *Chalcone* synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium orchid* cultivars [J]. *Planta*, 2012, 236(2): 401-409.

[32] Feinbaum R L, Ausubel F M. Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana Chalcone* synthase gene [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(5): 1985-1992.

[33] Dare A P, Tomes S, Jones M, *et al*. Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of *Chalcone* synthase in apple (*Malus* × *domestica*) [J]. *Plant J*, 2013, 74(3): 398-410.

[34] Wang S, Ma L Y, Xu Z G, *et al*. Molecular mechanism underlying regulation of *Chalcone* synthase by *Chalcone* isomerase-like protein [J]. *Nat Commun*, 2026, 17(1): 3992.

[35] 何莹莹, 罗威, 龚朋朋, 等. 桫椤查耳酮合成酶 CHS 基因家族鉴定及分析 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2025, 4(5): 1-27.

[36] Xie Z W, Yang L, Fan M, *et al*. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the *Chalcone* synthase gene family in Chinese cabbage [J]. *BMC Genom*, 2025, 26(1): 168.

[37] Guo D M, Wang H Y, Zhang S M, *et al*. The type III polyketide synthase supergene family in plants: Complex evolutionary history and functional divergence [J]. *Plant J*, 2022, 112(2): 414-428.

[38] 郭婷, 黄赛, 吴茹茜, 等. 栾树查耳酮合酶基因克隆与表达分析 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(3): 27-35.

[39] 何贝轩, 薛英茹, 涂燕华, 等. CtCHS4 响应茉莉酸甲酯诱导促进了红花醌式查耳酮类化合物的积累 [J]. 药学学报, 2018, 53(4): 636-645.

[40] 王佳媛. 海南龙血树查耳酮合酶基因（DcCHS）的克隆及其启动子功能分析 [D]. 海口: 海南大学, 2014.

[41] 宋想, 王璐瑶, 富博晓, 等. 高等植物启动子元件鉴定与合成研究进展 [J]. 植物学报, 2024, 59(5): 691-708.

[42] 张鑫, 刘鹏. 植物顺式调控元件研究进展 [J]. 浙江农业学报, 2024, 36(8): 1945-1956.

[43] 赵学荣, 杨燕, 雒晓鹏, 等. 苦荞查耳酮合酶基因 FtCHS1 启动子的克隆及分析 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(4): 543-550.

[44] 李琳玲, 程华, 程水源, 等. 银杏查耳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.

[45] Gao S X, Peng J X, Rong M, *et al*. Screening and validation of reference genes in *Dracaena cochinchinensis* using quantitative real-time PCR [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 6165.

[46] Dao T T H, Linthorst H J M, Verpoorte R. *Chalcone* synthase and its functions in plant resistance [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10(3): 397-412.

[47] 安江红, 王力伟, 斯钦巴特尔, 等. 燕麦 AsCHS 基因克隆和表达分析 [J]. 华北农学报, 2025, 40(4): 41-48.

[48] 李萃玲, 杨成坤, 刘嘉铭, 等. 红毛丹 CHS 家族的鉴定及其在果实中的表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2025, 33(11): 2378-2390.

[49] Liu Y, Ma X F, Mao F Y, *et al*. HMGR and CHS gene cloning, characterizations and tissue-specific expressions in *Polygala tenuifolia* Willd [J]. *PLoS One*, 2024, 19(3): e0300895.

[50] Hou Q D, Li S, Shang C Q, *et al*. Genome-wide characterization of *Chalcone* synthase genes in sweet cherry and functional characterization of CpCHS1 under drought stress [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 989959.

[51] Chen M J, Cui Y F, Su J H, *et al*. Integrative metabolomics and molecular networking reveal the progressive metabolic continuum of resin formation in *Dracaena cochinchinensis* wood [J]. *Front Mol Biosci*, 2026, 13: 1795393.

[52] 王淼. 基于机器学习的基因启动子预测方法研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2022.

[53] 张晓东, 李彩霞, 赵青蓉, 等. 滇龙胆环烯醚萜氧化酶基因及启动子的克隆与生物信息学分析 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4386-4392.

[54] 曾晓玲, 赵昶灵, 文国松, 等. 启动子结构、功能预测和验证方法的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(12): 3915-3925.

[55] Dreos R, Ambrosini G, Périer R C, *et al*. The Eukaryotic Promoter Database: Expansion of EPDnew and new promoter analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D92-D96.

[56] Ting Y, Zhang T, Li Y, *et al*. Genome-wide identification and expression analysis of the Chalcone synthase (CHS) gene family in *Dendrobium catenatum* [J]. *Agronomy*, 2023, 13(6): 1488.

[57] 成永娟, 张明月, 曹雪璟, 等. 葡萄 CHS 基因家族鉴定与表达分析 [J]. 果树学报, 2023, 40(5): 861-874.

[58] 俞狄虎, 张迟, 柯甫志, 等. ‘无子瓯柑’CHS 基因家族的克隆和表达分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(5): 943-949.

[59] Wu X X, Zhang S M, Liu X H, *et al*. *Chalcone* synthase (CHS) family members analysis from eggplant (*Solanum melongena* L.) in the flavonoid biosynthetic pathway and expression patterns in response to heat stress [J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0226537.

[60] 韩浩章, 张丽华, 赵荣, 等. 猴樟 *CbCHS* 基因上游调控蛋白筛选及验证 [J]. 东北林业大学学报, 2026, 54(1): 17-26.

[61] 王磊, 樊璐, 李亚奇, 等. 红瓤核桃 JrbHLHA2 转录因子靶向查耳酮合成酶基因 JrCHS4 调控种皮花青苷合成的功能研究 [J]. 果树学报, 2024, 41(10): 2002-2013.

[责任编辑 时圣明]