

## • 药材与资源 •

## 掌叶覆盆子查耳酮合成酶基因家族鉴定及表达分析

应宇鑫<sup>1,2</sup>, 许张婷<sup>1</sup>, 陈俊宇<sup>1</sup>, 郑飞雄<sup>1</sup>, 邹小维<sup>1</sup>, 沈晓霞<sup>1\*</sup>, 俞振明<sup>1,3\*</sup>

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

2. 浙江农林大学食品与健康学院, 浙江 杭州 311300

3. 三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室, 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120

**摘要:** 目的 查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是类黄酮物质合成的首个关键酶, 在植物类黄酮物质积累及逆境应答过程中起着重要作用。旨在鉴定掌叶覆盆子 CHS 基因家族成员, 明确其不同组织器官中及果实成熟中的表达模式。

**方法** 通过生物信息学方法鉴定掌叶覆盆子 CHS 家族成员, 分析了它们的理化性质、染色体定位、系统进化树、保守基序、基因结构和顺式作用元件等, 同时通过荧光定量 PCR 检测它们在果实不同发育时期及不同组织中的表达量。**结果** 掌叶覆盆子有 15 个 CHS 家族成员, 分为 7 个亚族, 不均匀地分布在 4 条染色体上。这些 RcCHS 蛋白的长度蛋白数介于 361~541, 都定位于细胞质, 且存在 1 对串联复制基因。同一亚族成员基因结构、保守基序和蛋白质二级结构相类似。RcCHS 家族基因的启动子区域存在大量生长发育、激素和环境胁迫应答相关的调控元件。RcCHS 家族基因在掌叶覆盆子不同组织中均有表达, 并具有明显的组织特异性, 此外在掌叶覆盆子果实不同成熟阶段和 100  $\mu\text{mol/L}$  茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理下的表达量均存在显著差异。发现 *RcCHS11* 在果实中高丰度表达, 并受到 MeJA 强烈诱导, 与类黄酮物质在掌叶覆盆子果实中的积累规律相一致, 推测是类黄酮成分合成途径上的关键酶。**结论** 在全基因组上鉴别出 15 个掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员, 它们的表达呈现器官特异性, 并在果实不同时期呈现差异表达, *RcCHS11* 与果实中类黄酮积累呈现正向响应。

**关键词:** 掌叶覆盆子; 查耳酮合成酶; 表达分析; 类黄酮; 茉莉酸甲酯

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)22-7799-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.022

Identification and expression profiles of chalcone synthase gene family in *Rubus chingii*

YING Yuxin<sup>1,2</sup>, XU Zhangting<sup>1</sup>, CHEN Junyu<sup>1</sup>, ZHENG Feixiong<sup>1</sup>, ZOU Xiaowei<sup>1</sup>, SHEN Xiaoxia<sup>1</sup>, YU Zhenming<sup>1,3</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

2. College of Food and Health, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China

3. Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China

**Abstract: Objective** Chalcone synthase (CHS) is the first key enzyme for flavonoids biosynthesis, and plays an important role in the accumulation of flavonoids and stress response. To identify the members of CHS gene family in Zhangye Fupenzi (*Rubus chingii*), and define their expression patterns in different tissues (roots, stems, leaves, flowers, and fruits) and at different growth stages of fruits of *R. chingii*. **Methods** Multiple bioinformatics methods were employed to identify the CHS family members in *R. chingii* genome. Their physicochemical properties, chromosomal localization, phylogenetic tree, conserved motifs, gene structure, and cis-acting elements were analyzed. Simultaneously, their expression profiles in different tissues (roots, stems, leaves, flowers, and fruits) and during different stages (green fruits, green to yellow fruits, yellow fruits, and red fruits) of fruit development were detected using the real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Results** A total of 15 *R. chingii* CHS family members were

收稿日期: 2024-05-06

基金项目: 浙江省“十四五”育种专项中药材协作组项目 (2021C02074-1); 浙江省基础公益研究计划项目 (LY23H280003); 浙江中医药大学科研项目 (2022JKZKTS15); 三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室开放课题项目 (KFKT2022013)

作者简介: 应宇鑫 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物遗传育种。E-mail: yingyuxin0123@163.com

\*通信作者: 沈晓霞, 教授, 从事中药材种质评价与新品种选育研究。E-mail: shenxiaoxia@zcmu.edu.cn

俞振明, 副研究员, 主要从事中药资源与分子生药学研究。E-mail: yuzhenming@zcmu.edu.cn

identified, which were divided into 7 subfamilies, unevenly located on four chromosomes. They encoded 361—541 proteins, located in the cytoplasm, and harbored one pair of tandem replicated genes. The gene structure, conserved motifs, and secondary structure of RcCHS members within the same subfamily were similar. The promoter region of RcCHS family genes contains a large number of regulatory elements related to growth and development, hormone and environmental stress response. RcCHS family genes were expressed in different tissues (roots, stems, leaves, flowers, and fruits) with obvious tissue specificity. In addition, the expression levels of RcCHS family gene were significantly different at different fruit development stages (green fruits, green to yellow fruits, yellow fruits, and red fruits) and under 100  $\mu\text{mol/L}$  methyl jasmonate (MeJA) treatment. Among them, *RcCHS11* was highly expressed in fruits of *R. chingii*, and induced strongly by MeJA treatment, which was coincided with the accumulation of flavonoids, suggesting that *RcCHS11* might be a critical enzyme involved in the biosynthesis of flavonoids. **Conclusion** A total of 15 members of RcCHS family were systematically identified from *R. chingii* at the genome level. They exhibited tissue specific expression profiles, and possessed different responses at different development stages. *RcCHS11* showed positively response to the flavonoids accumulation in fruit.

**Key words:** *Rubus chingii* Hu; chalcone synthase; expression analysis; flavonoids; methyl jasmonate

掌叶覆盆子 *Rubus chingii* Hu 为蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属的一种多年生藤状灌木, 在民间也叫大号角公、牛奶母。《中国药典》2020 年版将掌叶覆盆子收录称为华东覆盆子, 其未成熟干燥果实具有补肝益肾, 固精缩尿等功效<sup>[1]</sup>。成熟的掌叶覆盆子果实外观、色泽红润鲜亮, 糖分含量高且风味独特, 还具有氨基酸以及维生素等多种已被证实利于人类身体健康的营养成分<sup>[2]</sup>。自古以来掌叶覆盆子具有很高的应用价值, 国家卫计委称其为药食两用中药材, 联合国粮农组织更是将其誉为“世界卫生无公害保健营养水果”, 掌叶覆盆子入选浙江省新“浙八味”中药材培育品种之一。

掌叶覆盆子含有超过 20 余种类黄酮物质<sup>[3-5]</sup>。类黄酮物质能参与植株的花色形成<sup>[6]</sup>、抵抗生物和非生物胁迫<sup>[7-9]</sup>、清除植株因紫外线等胁迫产生的体内氧化自由基<sup>[10]</sup>, 对植物生殖生长也起到了不可或缺的作用。类黄酮物质在植物整个合成过程受到一系列关键酶的调控, 查耳酮合成酶 (chalcone synthetase, CHS) 作为植物类黄酮合成代谢途径的首个关键酶、限速酶, 主要催化 3 个丙二酰辅酶 A (malony-CoA) 和 1 个对香豆酰辅酶 A (4-coumaroyl-CoA) 生成柚皮素查耳酮。随后在查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮-3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)、黄酮-3'-羟化酶 (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) 和二氢黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 等一系列酶的催化作用下, 最终生成诸如花青素、黄酮醇、异黄酮以及黄烷酮等类黄酮物质<sup>[4,11-12]</sup>。目前已在西番莲 *Passiflora caerulea* L.<sup>[13]</sup>、葡萄 *Vitis vinifera* L.<sup>[14]</sup>、茄子 *Solanum melongena* L.<sup>[15]</sup>、谷子 *Setaria italica* (L.) P. Beauv.<sup>[16]</sup>、辣椒 *Capsicum annuum* L.<sup>[17]</sup>、番茄 *Solanum lycopersicum* L.<sup>[18]</sup> 等植物中发掘并报道了

CHS 基因家族, 但对于掌叶覆盆子 CHS 基因家族尚未获得鉴定。

为研究 CHS 基因家族在掌叶覆盆子果实发育及类黄酮物质合成中的生物学功能, 本研究基于染色体级别的掌叶覆盆子基因组<sup>[19]</sup>, 通过生物学信息方法, 对掌叶覆盆子 CHS 基因家族进行了全基因组鉴定, 并对其理化性质、保守基序、进化关系、顺式作用元件、染色体定位, 及在不同组织器官、果实不同发育时期、茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理后的表达水平进行了分析, 为进一步研究掌叶覆盆子 CHS 蛋白的功能提供了理论依据。

## 1 材料与仪器

2022 年 4~6 月在杭州市富阳环山掌叶覆盆子种植基地 (东经 119.95°, 北纬 29.93°) 采收根、茎、叶、花及不同发育时期的果实<sup>[4]</sup>, 经浙江中医药大学沈晓霞教授鉴定为掌叶覆盆子 *R. chingii* Hu, 液氮速冻, 于 -80 °C 低温冰箱保存备用。选取长势一致, 无病虫害的健康幼苗, 通过 100  $\mu\text{mol/L}$  的 MeJA 溶液喷施至一年生掌叶覆盆子叶片的正、反表面, 对照为清水。每处理 3 株, 各处理 3 个重复。每 2 d 喷施 1 次, 共喷 3 次。处理 7 d 后, 取每株掌叶覆盆子相同部位叶片 (每株主茎自上往下的第 2 节叶片), 液氮速冻, 于 -80 °C 低温冰箱保存备用。

NanoDrop2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国马萨诸塞州); R333 型 HiScript III All-In-One RT SuperMix (南京诺唯赞生物科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 掌叶覆盆子 *RcCHS* 基因家族筛选与鉴定

在 TAIR 网站 ([www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/)) 下载已公布的 4 条拟南芥 CHS 蛋白序列作为种子序列, 在掌叶覆盆子基因组<sup>[19]</sup>中通过 BLAST 筛选挖掘 CHS

同源序列。通过 NCBI CD-Search 网站 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) 对上述获取的蛋白序列进行保守结构域完整性的鉴定, 在 Pfam 网站 (<https://pfam.xfam.org>) 下载 CHS 的 C 端和 N 端 HMM 文件 (PF00195 和 PF02797), 筛选 E-value <  $1 \times 10^{-10}$  的序列, 在掌叶覆盆子基因组中鉴定得到 15 个 RcCHS 家族成员, 据其在染色体上的位置依次命名为 *RcCHS1*~*RcCHS15*。

## 2.2 掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员理化性质、亚细胞定位及蛋白质结构分析

利用 ExPASy 网站 (<http://cn.expasy.org/tools>) 分析掌叶覆盆子 *RcCHS1*~*RcCHS15* 的氨基酸长度、相对分子质量、等电点、不稳定系数、脂肪系数和总平均亲水指数等理化性质。通过 BUSCA 在线网站 (<http://busca.biocomp.unibo.it/>) 预测 *RcCHS1*~*RcCHS15* 蛋白的亚细胞定位。利用 SOPMA 在线工具 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 分析 *RcCHS1*~*RcCHS15* 蛋白的二级结构(包括  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、延伸链及无规则卷曲)。

## 2.3 掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员的染色体定位及共线性分析

利用掌叶覆盆子基因组注释文件获取 *RcCHS1*~*RcCHS15* 基因在染色体上的位置信息, 通过 TBtools 生物信息学软件<sup>[20]</sup>将 *RcCHS1*~*RcCHS15* 基因映射到染色体上, 可视化基因在染色体上的定位, 并分析其在物种内的共线性。

在国家基因组学数据中心 NGDC 数据库 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/>) 下载拟南芥和水稻的基因组数据文件, 通过 MCScanX 软件 (<http://chibba.pgml.uga.edu/mcscan2/>) 分析掌叶覆盆子、拟南芥和水稻 CHS 家族成员在物种间的共线性, 并进行可视化。

## 2.4 掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员的系统进化树构建

通过 Phytozome 网站 (<http://www.phytozome.net>) 下载拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、番茄 *Solanum lycopersicum* L.、烟草 *Nicotiana tabacum* L.、茄子 *S. melongena* L.、马铃薯 *Solanum tuberosum* L.、辣椒 *Capsicum annuum* L.、矮牵牛 *Petunia axillaris* (L.) Britton, Sterns & Poggenb.、海岛棉 *Gossypium barbadense* L. 中已报道的 CHS 蛋白序列, 与掌叶覆盆子 *RcCHS* 蛋白序列一并导入 MEGA10 软件 (<https://www.Megasoftware.net/>) 进行多重序列比对分析, 通过邻接法 (neighbor-

joining, NJ) 构建系统发育树, 将 Bootstrap Replications 值设置为 1 000, 其余参数默认。所得进化树通过 iTOL 工具 (<https://itol.embl.de/>) 进行美化。

## 2.5 掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员的保守基序及基因结构

通过 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org>) 分析掌叶覆盆子 *RcCHS* 家族成员的保守基序, motif 数量设置为 10, 其余参数默认, 获得保守基序信息, 并进行可视化。通过掌叶覆盆子基因组的 GFF 注释文件, 获取 *RcCHS* 家族基因外显子和内含子的位置, 采用 TBtools 生物信息学软件<sup>[20]</sup>中的 Gene Structure Shower 模块进行可视化。

## 2.6 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因启动子的顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 网站 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 检索掌叶覆盆子 *RcCHS1*~*RcCHS15* 基因启动子前 2 000 bp 的顺式作用元件, 利用 TBtools 生物信息学软件<sup>[22]</sup>对生长发育、激素响应及逆境响应相关顺式作用元件进行可视化。

## 2.7 掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员的基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析

将掌叶覆盆子 *RcCHS* 序列导入 eggNOG-mapper 网站 (<http://eggno-mapper.embl.de/>) 获得它们的 GO 和 KEGG 功能富集情况, 绘制 GO 和 KEGG 通路图。

## 2.8 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因在不同组织、果实不同发育时期、MeJA 处理后的表达量

采用植物总 RNA 通用型试剂盒 (RC411, 南京诺唯赞生物科技有限公司) 提取掌叶覆盆子不同组织 (根、茎、叶、花和果实)、果实不同发育阶段 (青果、青转黄果、黄果、红果) 及 MeJA 处理后掌叶覆盆子叶片总 RNA<sup>[21]</sup>, 通过 NanoDrop2000 分光光度计检测所得总 RNA 的浓度和质量。采用 HiScript III All-In-One RT SuperMix 进行反转录合成 cDNA, 所得的 cDNA 用于检测 *RcCHS1*~*RcCHS15* 基因的表达水平。

以掌叶覆盆子  $\beta$ -actin 为内参基因, 采用 Primer Premier 5.0 设计 *RcCHS1*~*RcCHS15* 基因的荧光定量 PCR 引物 (表 1, 浙江尚亚生物技术有限公司合成)。将掌叶覆盆子不同组织 (根、茎、叶、花和果实)、果实不同发育阶段 (青果、青转黄果、黄果、

表 1 用于 qRT-PCR 的引物序列  
Table 1 Primer sequence for qRT-PCR

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
<i>β-actin</i>	ATCCACGAGACTACATACTCC	CTGTCTGCAATACCAGGGAAC
<i>RcCHS1</i>	CTCAGACAGAAGAAGGTCCAAATA	GTCGTCTTCTTCTTGGGTAACA
<i>RcCHS2</i>	GTCTTCTTGTCACCCCTTACT	ACACCTGCCTCGTTGTTT
<i>RcCHS3</i>	GTGCCGACTTTCAACTCATAAAG	GTCCTTGGCAATCCGTAGAA
<i>RcCHS4</i>	AGTACAATCTGGTCAGCGTTATC	GGACGGTAACAGGCGTAATC
<i>RcCHS5</i>	ATTCTTGCTCCACGAGTTCTAC	GTTGGTTTGGACTTGCTGTTT
<i>RcCHS6</i>	TAGGCGTCGGGCTAAGTATAA	TTGCCAGTATCATCCATCTCTTG
<i>RcCHS7</i>	GCTTCAGGCAAACCCAAATAA	ACAGTTGGGAACGAGCATAG
<i>RcCHS8</i>	GGAAGGTTGCTGGATGTAAC	CGCTTCTCCAACCGATTCA
<i>RcCHS9</i>	CGATGAGTTGCTGGAGAAGA	ACTACCATGGAGGACAGAGA
<i>RcCHS10</i>	GACACCCACCTTGATAGTCTTG	AAACAAGGGCCTCTCAATCTC
<i>RcCHS11</i>	GAGAGGCCCTTGTTTGAGTT	GTGAGTTCCAGTCCGTGATG
<i>RcCHS12</i>	CCGGTCTTAAACCCAAGGATATAG	TGCTGCGGAGTTTGTACTT
<i>RcCHS13</i>	AGTTCTCGCATTGGGTAAGG	TCTCCTTGATGGCAACATCTG
<i>RcCHS14</i>	TGACATCTGGTGGTAAACTG	GAGGCTGAAGCTCTTGATGT
<i>RcCHS15</i>	CCAAATCTTCAAAGTACGAGCTATTC	GTATTCCGTTGGAGTCTCTTC

红果) 及 MeJA 处理后叶片的 cDNA 质量浓度定量为 50 ng/μL, 按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Q711, 南京诺唯赞生物科技有限公司) 说明书在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国加利福尼亚州) 上进行。其中 10 μL 反应体系: iTaq™ universal SYBR® Green supermix 5 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 50 ng/μL cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 3 μL。荧光定量 PCR 反应程序分两步进行, 首先 95 °C 预变性 30 s; 其次 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次。每样品含 3 个生物学重复, 利用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[22]</sup> 计算 *RcCHS1* ~ *RcCHS15* 的表达水平, 通过 TBtools 生

物信息学软件<sup>[20]</sup>进行 Heatmap 可视化。

### 3 结果与分析

#### 3.1 掌叶覆盆子 *RcCHS* 基因家族鉴定、蛋白的理化性质与结构分析

通过生物信息学方法, 在掌叶覆盆子基因组中共鉴定到 7 个 *RcCHS* 家族成员, 根据它们在染色体上的位置分布, 依次命名为 *RcCHS1* ~ *RcCHS15* (表 2)。理化性质分析结果表明, 掌叶覆盆子 *RcCHS* 的蛋白数介于 361 ~ 541, 平均值 466.13, 最大的为 *RcCHS7*; 蛋白相对分子质量介于 39 550 ~ 61 490, 平均相对分子质量为 51 990; 等电点介于 5.38 ~

表 2 *RcCHS* 基因序列信息

Table 2 *RcCHS* gene sequence information

蛋白名称	氨基酸数	相对分子质量	等电点	不稳定指数	脂肪系数	总平均亲水系数	亚细胞定位
<i>RcCHS1</i>	515	58 030	9.20	40.65	90.87	-0.103	细胞质
<i>RcCHS2</i>	514	57 800	9.04	39.07	91.79	-0.048	细胞质
<i>RcCHS3</i>	396	43 360	6.05	37.80	93.84	-0.036	细胞质
<i>RcCHS4</i>	522	58 210	9.19	37.08	96.51	-0.083	细胞质
<i>RcCHS5</i>	484	54 090	8.96	44.04	92.27	-0.042	细胞质
<i>RcCHS6</i>	456	50 940	9.13	38.09	89.78	-0.098	细胞质
<i>RcCHS7</i>	541	61 490	9.15	44.00	86.30	-0.187	细胞质
<i>RcCHS8</i>	392	42 910	5.38	36.36	93.85	-0.149	细胞质
<i>RcCHS9</i>	527	59 230	9.20	38.37	91.57	-0.058	细胞质
<i>RcCHS10</i>	391	42 770	5.97	37.52	92.05	-0.108	细胞质
<i>RcCHS11</i>	361	39 550	5.87	38.45	91.30	-0.105	细胞质
<i>RcCHS12</i>	498	55 980	9.13	40.59	98.88	0.025	细胞质
<i>RcCHS13</i>	387	42 650	6.92	43.52	94.75	-0.142	细胞质
<i>RcCHS14</i>	513	57 500	9.31	32.87	92.18	-0.048	细胞质
<i>RcCHS15</i>	495	55 330	8.98	47.58	99.07	-0.043	细胞质

9.31, 平均值为 8.10; 脂肪系数介于 86.30~99.07; 不稳定指数介于 32.87~47.58, 9 个成员为稳定蛋白质, 其余均大于 40, 为不稳定蛋白。除 RcCHS12 蛋白的亲水系数大于 0, 为疏水蛋白, 其余 RcCHS 蛋白均为亲水蛋白。RcCHS 蛋白均定位于细胞质, 表明它们分布具有特异性。

通过 SOMPA 软件分析了 RcCHS 蛋白的二级结构 (表 3)。结果显示, RcCHS 家族成员均有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、无规则卷曲和直链延伸 4 种二级结构, 所占比例大小依次为  $\alpha$ -螺旋 (平均 44.56%)、无规则卷曲 (平均 34.22%)、直链延伸 (平均 15.30%) 和  $\beta$ -折叠 (平均 5.92%)。RcCHS12 的  $\alpha$ -螺旋占比 (47.39%) 高于其他成员, 无规则卷曲是所有 RcCHS 蛋白中占比 (32.13%) 最小的, RcCHS7 的直链延伸占比 (17.01%) 明显高于其他成员。

表 3 RcCHS 家族成员的蛋白二级结构分析

Table 3 Secondary structure analysis of RcCHS family members in *R. chingii*

蛋白名称	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	无规则卷曲	直链延伸
RcCHS1	45.24	5.05	34.37	15.34
RcCHS2	45.91	5.25	33.66	15.18
RcCHS3	42.68	6.31	34.85	16.16
RcCHS4	44.44	5.75	33.52	16.28
RcCHS5	44.42	5.99	34.92	14.67
RcCHS6	44.08	5.26	33.99	16.67
RcCHS7	43.25	5.36	34.38	17.01
RcCHS8	42.86	7.40	35.46	14.29
RcCHS9	43.45	4.55	35.67	16.32
RcCHS10	44.25	6.14	34.53	15.09
RcCHS11	46.81	6.93	33.52	12.74
RcCHS12	47.39	5.62	32.13	14.86
RcCHS13	43.41	8.01	33.59	14.99
RcCHS14	47.17	5.26	32.16	15.40
RcCHS15	43.03	5.86	36.57	14.55

### 3.2 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因的染色体定位及基因复制情况

通过掌叶覆盆子基因组注释, 绘制了 RcCHS 家族基因的染色体定位图谱 (图 1-A)。结果显示, 掌叶覆盆子 RcCHS 家族的 15 个成员分布在 Chr1、Chr2、Chr4 和 Chr7 这 4 条染色体上, 分别含有 1、7、4 和 3 个成员, Chr3、Chr5 和 Chr6 无成员分布。物种内共线性分析表明, RcCHS4 和 RcCHS6 之间存在串联复制事件 (图 1-B)。

通过掌叶覆盆子与拟南芥、水稻基因组之间的

共线性分析发现, RcCHS 基因与单子叶植物水稻之间不存在复制事件, 而与双子叶植物拟南芥的共线性关系更密切, 共有 14 对共线性的 CHS 基因, 甚至一个掌叶覆盆子基因与 2~3 个拟南芥基因存在复制事件 (图 2)。

### 3.3 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因系统进化树分析

为了分析 CHS 家族蛋白的系统进化关系, 通过 MEGA 软件绘制了掌叶覆盆子、拟南芥、番茄、茄子、马铃薯、辣椒、矮牵牛、烟草、海岛棉中的 97 条 CHS 蛋白序列的系统发育树 (图 3), 它们被分为 7 个亚组 (Group I~VII), 分别含有 10、12、12、13、19、15、16 个成员。Group I 所含基因数量最少 (10 个), 均由掌叶覆盆子蛋白序列组成, 占所有 RcCHS 的 66.67%, 表明它们与其他 CHS 序列的遗传进化关系较远。RcCHS13 与拟南芥 AtCHS1、AtCHS2 分布在 Group II, RcCHS8 与 AtCHS3 分布在 Group III, RcCHS10、RcCHS11 与 AtCHS4 分布在 Group VI, RcCHS3 分布在 Group IV, 推测同一亚组的成员在功能方面具有相似性, 不同物种在进化过程中部分基因的功能也不同。

### 3.4 掌叶覆盆子 RcCHS 基因家族基因结构、序列比对及保守基序分析

基于掌叶覆盆子基因组, 绘制了 RcCHS 家族成员的基因结构 (图 4-A), 它们具有 1~3 个不等的外显子, 8 个成员 (53.33%) 仅含有 1 个外显子, 5 个成员含有 5 个外显子, 而且 RcCHS7 和 RcCHS11 含有 3 个外显子。掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员中鉴定到 10 个保守基序 (图 4-B), motif 1、motif 3、motif 6 和 motif 7 为 CHS 蛋白 N 端结构域, motif 2、motif 5 和 motif 8 为 CHS 蛋白 C 端结构域。15 个 RcCHS 家族成员含有 3~9 个不等的保守基序, 且都含有 motif 1 和 motif 7。RcCHS3、RcCHS8、RcCHS11、RcCHS10、RcCHS13 除含有 motif 1 和 motif 7 外, 均存在 motif 10, 表明 motif 10 是这 5 个成员特有的保守基序。3 个成员 (RcCHS5、RcCHS6 和 RcCHS15) 含有 8 个保守基序 (motif 1~8), 剩余 7 个成员含有 9 个保守基序 (motif 1~9)。

### 3.5 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因的启动子顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 网站分析了掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因启动子上的顺式作用元件, 获得 30 类顺式作用元件, 按功能可将它们分为植物生长发育、激素响应以及胁迫响应 3 种类型 (图 5)。结果

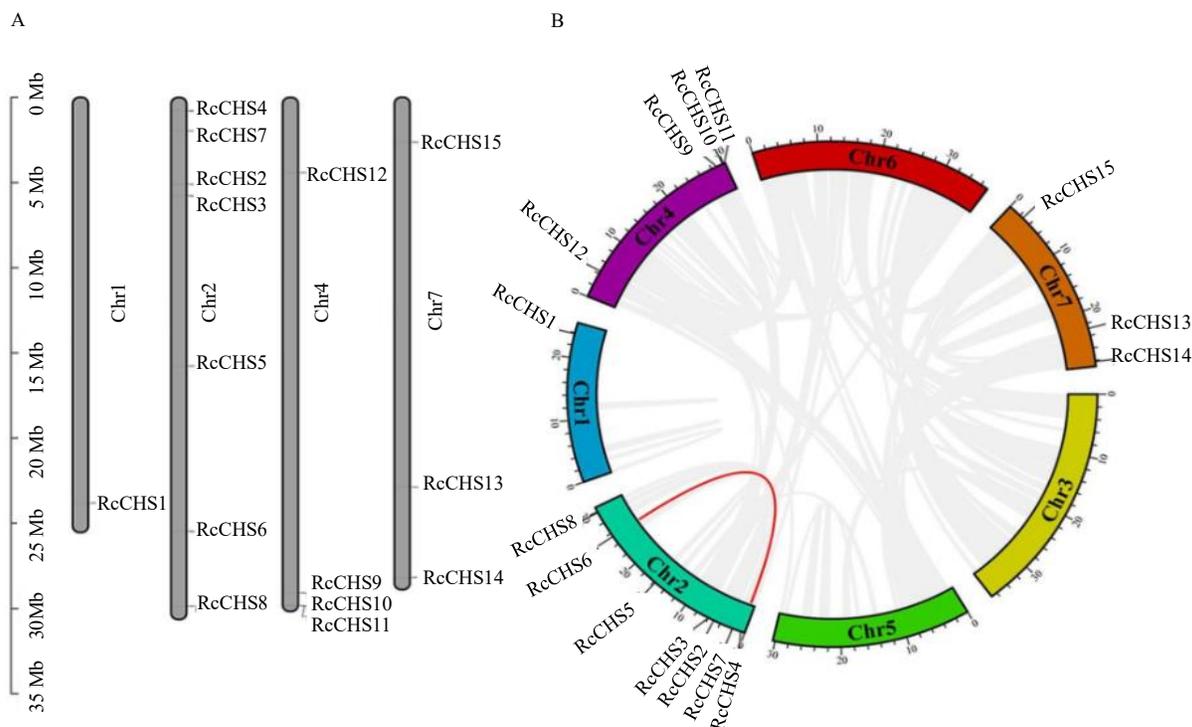


图 1 RcCHS 家族成员的蛋白二级结构分析

Fig. 1 Secondary structure analysis of RcCHS family members in *R. chingii*

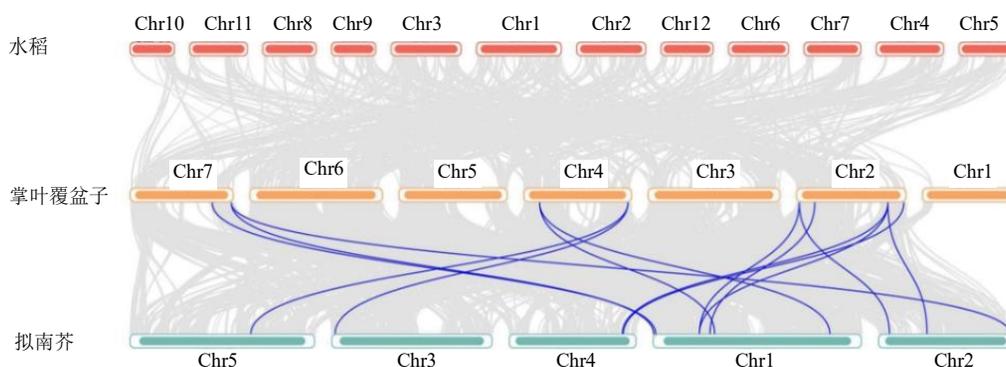


图 2 掌叶覆盆子 RcCHS 与拟南芥、水稻基因组之间的共线性分析

Fig. 2 Collinear analysis of RcCHS among *R. chingii*, *A. thaliana* and *Oryza sativa* genomes

显示, RcCHS 家族成员的基因启动子上有 21~43 个顺式作用元件, 以 *RcCHS11* 基因数量 (占 9.43%) 最多。RcCHS 家族成员启动子上以激素响应类型数量 (占 48.25%) 最多, 特别是茉莉酸响应元件 (MYC, 占 16.01%)、脱落酸响应元件 (ABRE, 占 14.04%), 表明 RcCHS 家族成员可能受植物激素的调控, 影响类黄酮物质的合成。胁迫响应以抗氧化反应元件 (ARE, 占 11.18%) 数量最多, 表明抗氧化反应可能是 RcCHS 家族成员应对逆境胁迫的主要方式之一。此外, RcCHS 家族成员还具有响应光照、低温、乙

烯、水杨酸、干旱等顺式作用元件, 表明 RcCHS 在掌叶覆盆子生长发育、激素响应和应对逆境胁迫过程中发挥着重要作用。

### 3.6 掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员的 GO 和 KEGG 功能富集分析

通过 eggNOG-mapper 注释网站, 获得掌叶覆盆子 RcCHS 家族成员的 GO 和 KEGG 功能富集情况 (图 6)。GO 富集分析显示, RcCHS 成员的功能分为 3 大类: 分子功能、细胞组分和生物过程, 其中生物过程主要富集冷应答、光照、温度、非生

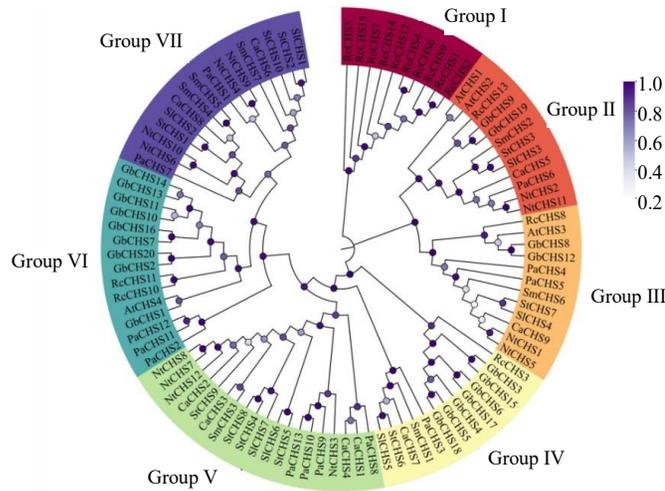


图 3 CHS 家族的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of CHS family

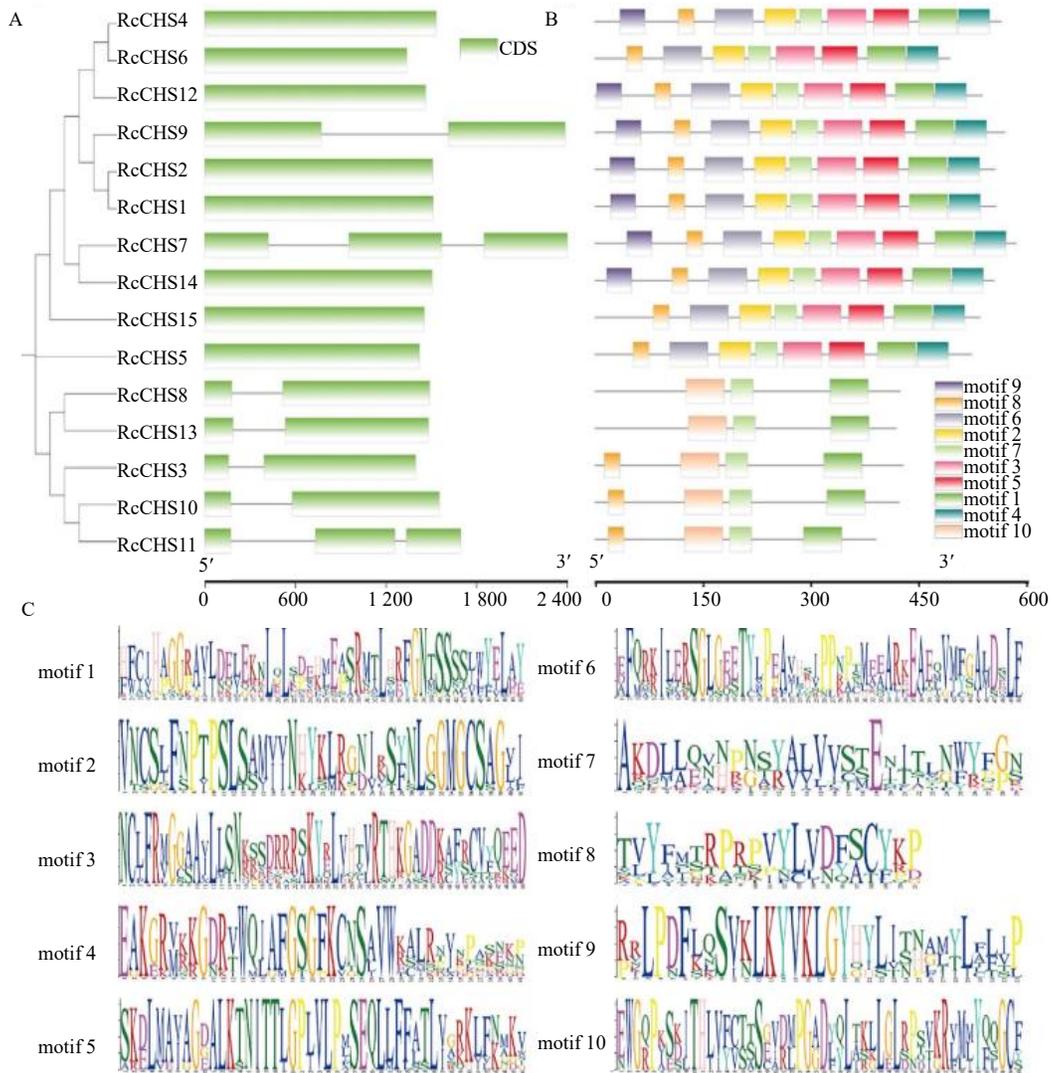
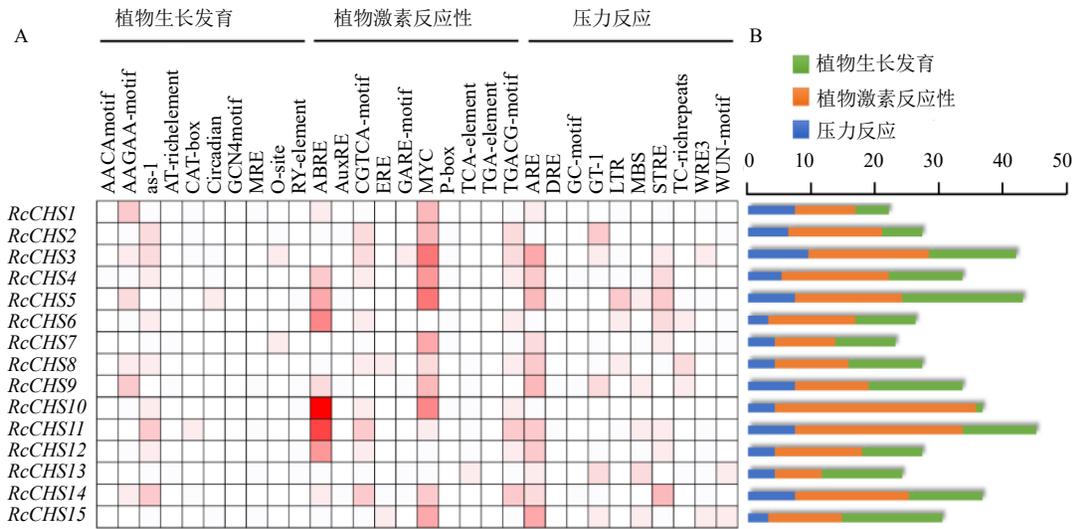


图 4 掌叶覆盆子 RcCHS 基因结构、保守基序和蛋白序列比对分析

Fig. 4 Comparative analysis of RcCHS gene structure, conserved motifs, and protein sequence in *R. chingii*



红色表示 *RcCHS1* ~ *RcCHS15* 基因启动子上顺式作用元件数量。  
red indicates *cis*-acting element numbers on promoter of *RcCHS1*—*RcCHS15*.

图 5 *RcCHS* 基因家族的顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis of *cis*-acting elements of *RcCHS* gene family

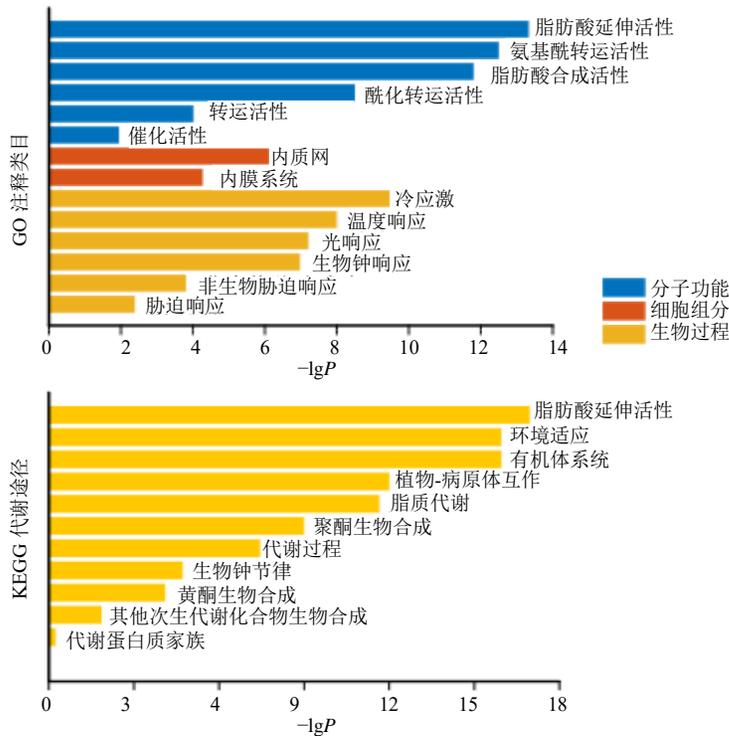


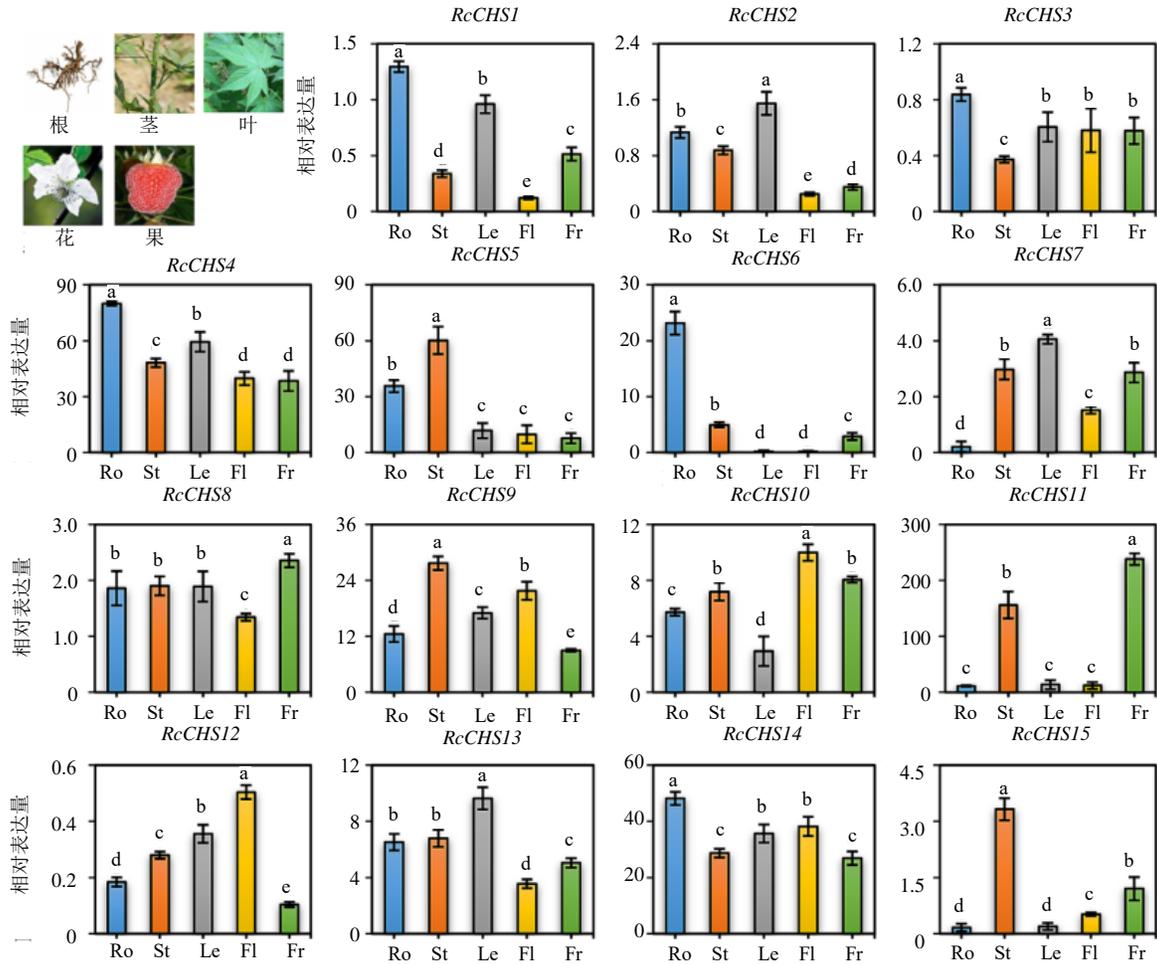
图 6 *RcCHS* 家族成员的 GO 和 KEGG 功能富集分析

Fig. 6 GO and KEGG functional enrichment analysis of *RcCHS* family members

物刺激等响应过程。KEGG 富集分析显示, *RcCHS* 成员参与到 12 条 KEGG 通路类型, 包括脂肪酸延长途径、环境应答、代谢途径和聚酮生物合成等途径, 其中部分 *RcCHS* 成员 (*RcCHS3*、*RcCHS10* 和 *RcCHS11*) 被注释到黄酮生物合成中。

### 3.7 掌叶覆盆子 *RcCHS* 家族基因在不同组织中的表达模式分析

为了研究 *RcCHS* 家族基因在不同组织上的潜在功能, 通过 qRT-PCR 技术分析 *RcCHS* 家族成员在各组织中的表达模式 (图 7)。结果显示, 15 个



Ro-根; St-茎; Le-叶; Fl-花; Fr-果实。不同字母表示不同组织在  $P < 0.01$  水平差异显著。

Ro-root; St-stem; Le-leaf; Fl-flower; Fr-fruit. Different letters indicate significant difference among different tissues at  $P < 0.01$ .

图 7 RcCHS 家族基因的组织特异性表达分析

Fig. 7 Tissue specific expression analysis of RcCHS family gene in *R. chingii*

RcCHS 家族基因在根、茎、叶、花、果实中均表达，但具有组织表达特异性且各成员间的表达水平存在差异。3 个成员 (*RcCHS5*、*RcCHS9* 和 *RcCHS15*) 在茎中高表达，5 个成员 (*RcCHS1*、*RcCHS3*、*RcCHS4*、*RcCHS6* 和 *RcCHS14*) 在根中高表达，3 个成员 (*RcCHS2*、*RcCHS7* 和 *RcCHS13*) 在叶中高表达，2 个成员 (*RcCHS10* 和 *RcCHS12*) 在花中高表达，2 个成员 (*RcCHS8* 和 *RcCHS11*) 在果实中高表达，掌叶覆盆子果实是其入药部位，推测 *RcCHS8* 和 *RcCHS11* 可能与果实类黄酮的积累有关。

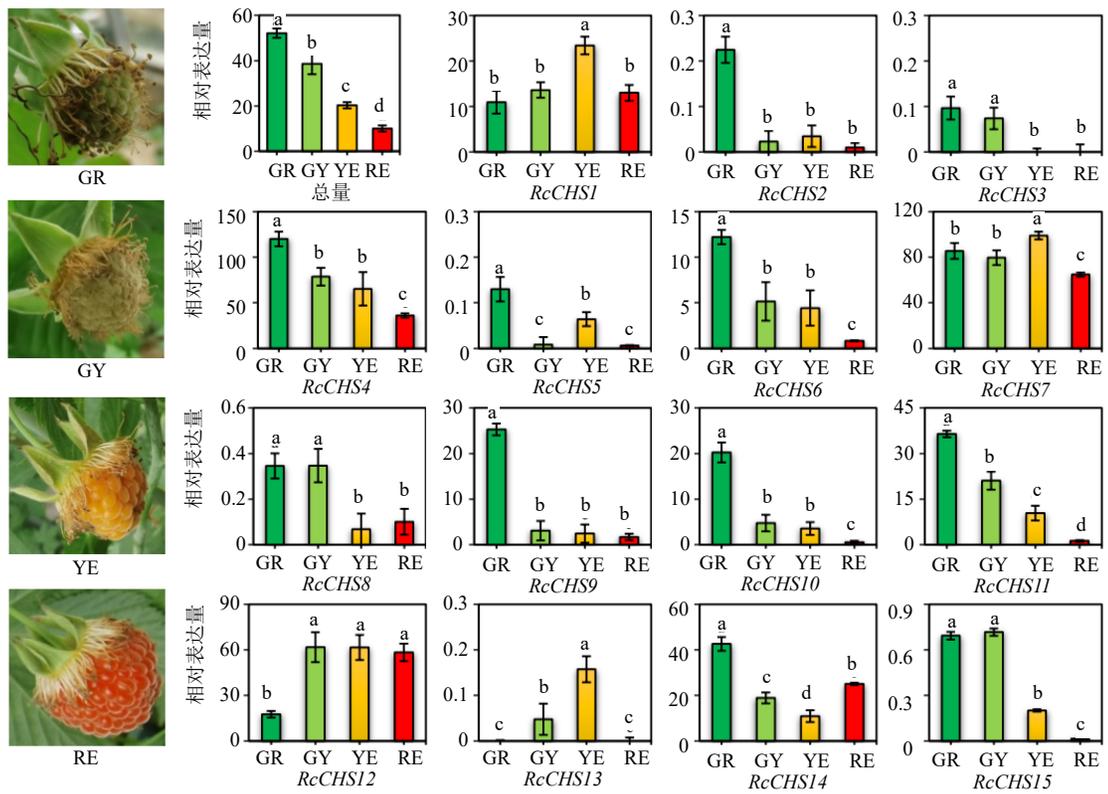
### 3.8 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因在果实成熟阶段中的表达模式分析

进一步分析了 RcCHS 家族基因在掌叶覆盆子果实不同发育阶段 (青果、青转黄果、黄果、红果) 的表达模式 (图 8)。结果显示，15 个 RcCHS 家族成员在果实成熟的各个阶段均有表达，但表达量存在差

异。*RcCHS4* 和 *RcCHS7* 在不同发育阶段的掌叶覆盆子果实中整体表达量较高，而 *RcCHS2*、*RcCHS3*、*RcCHS5* 和 *RcCHS13* 在不同发育阶段的果实中整体表达量较低。*RcCHS1* 和 *RcCHS13* 在果实成熟过程中呈现先增加后减少的变化趋势。*RcCHS4*、*RcCHS6* 和 *RcCHS11* 在掌叶覆盆子果实成熟过程中呈现逐渐减少的变化趋势，与掌叶覆盆子果实中类黄酮含量变化趋势相一致 (从青果期的 52.12 mg/g 逐渐减少到红果期的 10.02 mg/g)，*RcCHS11* 可能是参与掌叶覆盆子类黄酮物质生物合成的关键酶。

### 3.9 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因在 MeJA 诱导下的表达模式分析

基于大多数 RcCHS 家族成员的启动子上含有 MeJA 响应元件 (图 5)，分析了掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因在 MeJA 诱导处理下的表达水平 (图 9)，结果显示，共呈现 3 类表达模式：3 个基因 (*RcCHS1*、

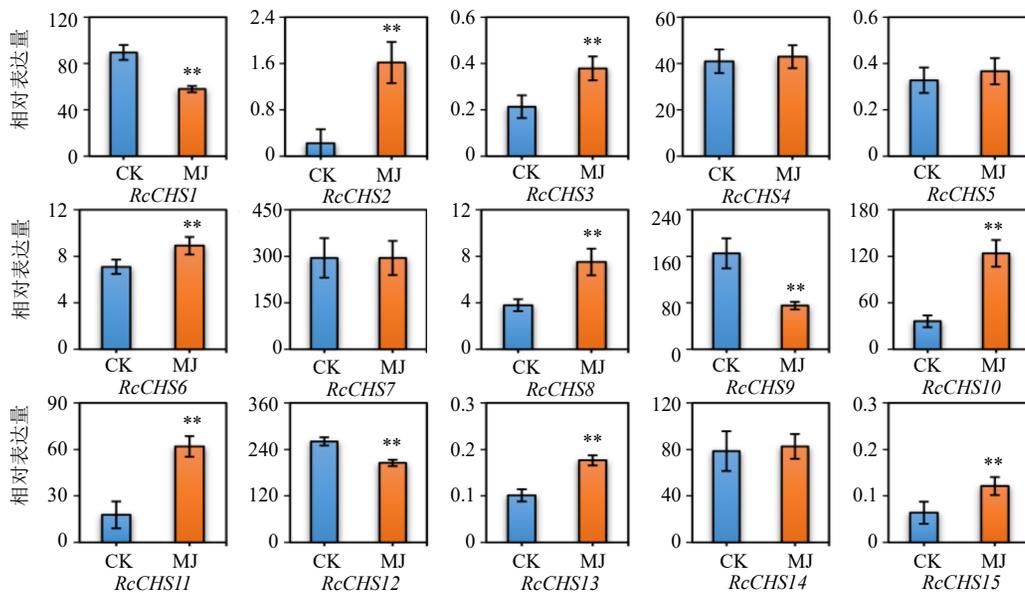


GR-青果; GY-青转黄果; YE-黄果; RE-红果; 不同字母表示不同时期在  $P < 0.01$  水平差异显著。

GR-green fruit; GY- green to yellow fruit; YE-yellow fruit; RE-red fruit; Different letters indicate significant difference during different stages at  $P < 0.01$ .

图 8 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因在果实不同发育阶段的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of RcCHS family gene at fruit developmental stages in *R. chingii*



CK-对照组; MJ-茉莉酸甲酯处理组。与 CK 组比较: \*\* $P < 0.01$  水平差异显著。

CK-control group; MJ-treatment of methyl jasmonate. \*\* $P < 0.01$  vs CK group.

图 9 掌叶覆盆子 RcCHS 家族基因在 MeJA 诱导处理下的表达水平

Fig. 9 Expression levels of RcCHS family gene under MeJA induction treatment in *R. chingii*

*RcCHS9* 和 *RcCHS12*) 在 MeJA 诱导处理后呈现明显下调表达; 8 个基因(*RcCHS2*、*RcCHS3*、*RcCHS6*、*RcCHS8*、*RcCHS10*、*RcCHS11*、*RcCHS13* 和 *RcCHS15*) 在 MeJA 诱导处理后呈现显著上调表达; 其余 4 个基因在 MeJA 诱导前后无显著性差异。在表达量增长倍数中, 以 *RcCHS2* 最高, 其次是 *RcCHS10* 和 *RcCHS11*。

#### 4 讨论

CHS 是类黄酮生物合成途径中至关重要的限速酶, 也是该途径中上游的首个关键酶, 它连接着苯丙氨酸合成途径以及类黄酮合成途径, 参与植物类黄酮基本碳架结构的生成<sup>[8-9,23]</sup>。掌叶覆盆子作为《中国药典》2020 年版收录的药食同源植物, 富含黄酮、萜类和多糖等次生代谢产物<sup>[19]</sup>, 它们既可以调节植物生长, 也受到植物体内关键酶基因的调控作用。本研究从高质量掌叶覆盆子基因组中鉴定出 15 个 RcCHS 蛋白, 相对于双子叶植物拟南芥中的 4 个<sup>[24]</sup>, 茄子中的 7 个<sup>[15]</sup>, 番茄中的 7 个<sup>[18]</sup>, 辣椒中的 9 个<sup>[17]</sup>, 烟草中的 12 个<sup>[24]</sup>, 掌叶覆盆子中的 RcCHS 成员数量 (15 个) 较多, 但少于海岛棉中的 20 个<sup>[24]</sup>, 水稻中的 27 个<sup>[24]</sup>, 表明掌叶覆盆子中的 CHS 成员有所增加, 这可能与掌叶覆盆子普遍适应低温、干旱、强光照等逆境的需求相关。此外, RcCHS 成员不均匀定位在 4 条染色体上, 各条染色体上包含 1~7 个成员, 并存在 1 对串联复制基因具有同源进化关系, 表明掌叶覆盆子 *RcCHS* 基因家族的扩增可能是由基因复制事件造成的<sup>[14]</sup>。RcCHS 数量的增加可能与类黄酮物质大量合成的需求相关, 不同的 RcCHS 对于不同的类黄酮物质前体可能具有选择性。

分析基因结构特征能为遗传进化树构建提供参考的依据。RcCHS 家族成员含有 1~3 个外显子, 且成员间的差异较小, 与番茄<sup>[18]</sup>、辣椒<sup>[17]</sup>中的结果相似, 比香蕉<sup>[25]</sup>中的外显子数量 (4~5 个) 略少。蛋白二级结构分布为  $\alpha$ -螺旋 > 无规卷曲 > 直链延伸 >  $\beta$ -折叠, 且均定位于细胞质中, 推测 RcCHS 蛋白主要在细胞质中行使功能。保守基序分析发现, 所有 RcCHS 蛋白均含有 motif 1、motif 7, 含有 CHS 蛋白的关键催化部位、底物特异性残基与丙二酰辅酶 A 结合位点等与 CHS 蛋白酶功能关联的序列<sup>[16]</sup>, 便于后续研究掌叶覆盆子 RcCHS 蛋白催化机制和酶活性质。以掌叶覆盆子与拟南芥、番茄、茄子、马铃薯、辣椒、矮牵牛、烟草、海岛棉中 CHS

家族蛋白构建系统进化树, 15 个 RcCHS 蛋白明显分为 3 组 (Group I, Group II、III 和 IV, Group VI), 与毛竹、甘草、茄子中 CHS 家族成员的进化分类一致<sup>[15]</sup>。

启动子上的顺式作用元件可能是转录因子结合的区域, 促进启动该基因的转录, 并激活基因的表达调控。非生物 (高盐、低温、干旱) 逆境及激素能诱导 CHS 基因的表达, 其启动子上游的顺式元件对其表达量起着至关重要影响<sup>[13]</sup>。*RcCHS* 启动子上的顺式作用元件分析显示, 大部分 *RcCHS* 响应茉莉酸、脱落酸等激素信号。100  $\mu\text{mol/L}$  的 MeJA 处理掌叶覆盆子叶片促进 8 个 RcCHS 家族基因上调表达了 1.26~7.37 倍。甜橙 *Citrus sinensis* L. 中的 *CitCHS2* 基因在 200  $\mu\text{mol/L}$  的 MeJA 处理下表达量提高了近 500 倍<sup>[26]</sup>。功能基因的表达显著受到上游转录因子的调控, CHS 的表达受上游激素信号途径中相关转录因子 MYB、MYC、WRKY、AP2/ERF 等激活<sup>[6,11,27]</sup>。例如, 茄子中的转录因子 *SmMYB5* 受 200  $\mu\text{mol/L}$  的 MeJA 诱导, 在转基因株系中显著促进了 *SmCHS*、*SmF3H*、*SmDFR* 和 *SmANS* 基因的表达<sup>[6]</sup>。除了激素信号以外, *RcCHS* 的启动子上也具有许多逆境相关的顺式作用元件, 如抗氧化反应元件、应激反应元件等。在甜樱桃 *Prunus avium* L. 中, 光照显著促进花青素等类黄酮物质的积累, 靶基因 *PaCHS*、*PaCHI*、*PaF3'H*、*PaANS*、*PaDFR* 和 *PaUFGT* 显著上调, 并响应光照和脱落酸诱导<sup>[28]</sup>。以上结果表明 RcCHS 蛋白在掌叶覆盆子抵御逆境中可能发挥作用, 在受到环境胁迫时上调表达, 合成类黄酮物质以增强植物的生存能力。

CHS 催化中药材类黄酮和花色素合成途径的第一步反应, 是植物类黄酮物质生物合成途径中的限速酶, 调节 CHS 基因表达能够影响类黄酮的含量<sup>[24-25]</sup>, 在中药层面上影响着药材的品质。为探究掌叶覆盆子 CHS 与类黄酮合成的关系, 通过 qRT-PCR 分析了 *RcCHS* 在掌叶覆盆子的时空表达特征, *RcCHS1*~*RcCHS15* 在根、茎、叶、花、果实中均有表达, 且具有组织表达特异性, *RcCHS8* 和 *RcCHS11* 在入药部位果实中的表达量显著高于其他组织, 推测其可能主要在果实中发挥作用。进一步在果实成熟的过程中 (青果-青转黄果-黄果-红果), 类黄酮物质含量呈现逐渐下降的趋势<sup>[4]</sup>, *RcCHS4*、*RcCHS6* 和 *RcCHS11* 的表达量也呈现一致的变化趋势, 仅 *RcCHS11* 在果实中特异性高表达, 推测

*RcCHS11* 是促进类黄酮生物合成的关键酶。MeJA 是植物次生代谢的重要调控激素之一，在人参、连翘、黄芩等天然药用植物中促进药效成分类黄酮的生物合成<sup>[29]</sup>，在红花 *Carthamus tinctorius* L. 中，MeJA 显著促进芦丁、羟基红花黄色素 A、红花红色素等类黄酮物质的积累与关键基因 *CtCHS4* 的高丰度表达密切相关<sup>[30]</sup>。*RcCHS* 家族基因显著受到 MeJA 的诱导，既有促进也有抑制，以 *RcCHS2*、*RcCHS10* 和 *RcCHS11* 增长倍数 (3.43~7.37) 较高，然而目前尚未见 MeJA 对掌叶覆盆子代谢产物的报道，有关 *RcCHS* 介导 JA 信号途径对类黄酮物质合成的研究有待深入。综上所述，*RcCHS* 在掌叶覆盆子生长的各个阶段、各个组织中均有特异性表达，它们可能分担着不同的生物学功能，可能是由于 CHS 在进化过程中蛋白发生突变并导致功能分化和多样性。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Sheng J Y, Wang S Q, Liu K H, et al. *Rubus chingii* Hu: An overview of botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(6): 401-416.
- [2] 孙乙铭, 许寿增, 俞春英, 等. 覆盆子成熟过程颜色表征及其与品质指标消长的相关性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(6): 1379-1385.
- [3] Yu G H, Luo Z Q, Wang W B, et al. *Rubus chingii* Hu: A review of the phytochemistry and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 799.
- [4] Li X B, Jiang J Y, Chen Z, et al. Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of flavonoid biosynthesis during fruit maturation in *Rubus chingii* Hu [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 706667.
- [5] 沈瑶, 黄思红, 刘依茹, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析覆盆子不同部位的化学成分及其 9 种成分含量的快速测定 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 4789-4803.
- [6] Li S H, Dong Y X, Li D L, et al. Eggplant transcription factor SmMYB5 integrates jasmonate and light signaling during anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2024, 194(2): 1139-1165.
- [7] Davies K M, Landi M, van Klink J W, et al. Evolution and function of red pigmentation in land plants [J]. *Ann Bot*, 2022, 130(5): 613-636.
- [8] Dong N Q, Lin H X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions [J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(1): 180-209.
- [9] Shen N, Wang T F, Gan Q, et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2022, 383: 132531.
- [10] Chen Z R, Dong Y, Huang X. Plant responses to UV-B radiation: Signaling, acclimation and stress tolerance [J]. *Stress Biol*, 2022, 2(1): 51.
- [11] Ma D W, Constabel C P. MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(3): 275-289.
- [12] Yu Z M, Dong W, Teixeira da Silva J A, et al. Ectopic expression of DoFLS1 from *Dendrobium officinale* enhances flavonol accumulation and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Protoplasma*, 2021, 258(4): 803-815.
- [13] 何锐杰, 方庭, 余伟军, 等. 西番莲查耳酮合成酶 (CHS) 基因家族全基因组鉴定及表达模式 [J]. *应用与环境生物学报*, 2022, 28(4): 1066-1075.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 孙卓楠, 付振鑫, 孙玉荣, 等. 谷子 CHs 家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. *山西农业科学*, 2022, 50(3): 281-288.
- [17] 徐婉莉, 裴徐梨, 荆赞革, 等. 辣椒查耳酮合成酶基因家族全基因组鉴定及表达特征分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(8): 1747-1752.
- [18] 阮美颖, 万红建, 叶青静, 等. 番茄查耳酮合成酶基因的鉴定及生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2013, 11(3): 379-384.
- [19] Wang L J, Lei T, Han G M, et al. The chromosome-scale reference genome of *Rubus chingii* Hu provides insight into the biosynthetic pathway of hydrolyzable tannins [J]. *Plant J*, 2021, 107(5): 1466-1477.
- [20] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [21] 郑飞雄, 陈俊宇, 江林琪, 等. 掌叶覆盆子 4CL 基因家族鉴定及表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(2): 311-321.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Hwang H G, Milito A, Yang J S, et al. Riboswitch-guided chalcone synthase engineering and metabolic flux

- optimization for enhanced production of flavonoids [J]. *Metab Eng*, 2023, 75: 143-152.
- [24] 包颖, 郭昌锋, 陈少华, 等. 植物查耳酮合成酶超基因家族的分子进化 [J]. *植物学报*, 2015, 50(1): 55-71.
- [25] 胡会刚, 胡玉林, 庞振才, 等. 香蕉查耳酮合酶基因家族生物信息学分析 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(7): 6931-6937.
- [26] Wang Z B, Yu Q B, Shen W X, *et al.* Functional study of *CHS* gene family members in citrus revealed a novel *CHS* gene affecting the production of flavonoids [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 189.
- [27] Zhang G H, Yu Z M, Yao B, *et al.* SsMYB113, a *Schima superba* MYB transcription factor, regulates the accumulation of flavonoids and functions in drought stress tolerance by modulating ROS generation [J]. *Plant Soil*, 2022, 478(1): 427-444.
- [28] Wang Y Y, Xiao Y Q, Sun Y T, *et al.* Two B-box proteins, PavBBX6/9, positively regulate light-induced anthocyanin accumulation in sweet cherry [J]. *Plant Physiol*, 2023, 192(3): 2030-2048.
- [29] Zheng H, Fu X Q, Shao J, *et al.* Transcriptional regulatory network of high-value active ingredients in medicinal plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2023, 28(4): 429-446.
- [30] HE B, XUE Y, TU Y, *et al.* CtCHS4 induces the accumulation of safflower quinone chalcones in response to methyl jasmonate induction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 53(4): 636-645.

[责任编辑 时圣明]