

引用格式: 殷素雅, 周洋丽, 赵梦婧, 等. 换锦花类黄酮糖基转移酶基因 *LsUFGT1* 及其启动子克隆与表达[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(4): 714–724. YIN Suyu, ZHOU Yangli, ZHAO Mengjing, *et al.* Cloning and expression of the gene and promoter of *LsUFGT1* from *Lycoris sprengeri*[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(4): 714–724.

换锦花类黄酮糖基转移酶基因 *LsUFGT1* 及其启动子克隆与表达

殷素雅, 周洋丽, 赵梦婧, 高燕会

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】花色苷是决定植物花色的重要成分, 类黄酮糖基转移酶 (UFGT) 在花色苷生物合成途径下游发挥作用, 将不稳定的花色素转变为稳定的花色苷。通过分析换锦花 *Lycoris sprengeri* *LsUFGT1* 基因功能, 为进一步解析换锦花花瓣呈色的机制提供理论基础。【方法】采用基因克隆、逆转录 PCR、染色体步移法、组织化学染色和双荧光素酶报告实验等多种分子生物学技术, 研究 *LsUFGT1* 基因和其启动子序列的功能。【结果】①获得长 1 632 bp 的 *LsUFGT1* 基因 cDNA 序列, 开放阅读框长 1 398 bp, 编码 465 个氨基酸; *LsUFGT1* 与水仙 *Narcissus natatorium* NtUFGT1 同源性最高, 达 60.57%。② *LsUFGT1* 表达量与总花色苷含量的变化趋势一致, 在小花苞时期表达量最高, 在粉瓣和蓝瓣中表达量差异不显著。③获得的 *LsUFGT1* 启动子序列长 1 184 bp, 含 MYB 结合位点、光响应、激素响应及逆境胁迫响应等顺式作用元件, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* β -葡萄糖苷酶 (GUS) 染色结果表明 *LsUFGT1* 启动子区域具有启动子活性。④双荧光素酶报告实验发现 *LsMYB4* 和 *LsMYB5* 能够显著抑制 *LsUFGT1* 启动子活性 ($P < 0.05$)。【结论】*LsMYB4* 和 *LsMYB5* 直接结合 *LsUFGT1* 启动子反向调控换锦花花色苷的积累。图 9 表 2 参 38

关键词: 换锦花; 类黄酮糖基转移酶 (UFGT); 花色苷; 功能分析

中图分类号: S603 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)04-0714-11

Cloning and expression of the gene and promoter of *LsUFGT1* from *Lycoris sprengeri*

YIN Suyu, ZHOU Yangli, ZHAO Mengjing, GAO Yanhui

(College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Anthocyanins are important components that determine flower color in plants. Flavonoid-3-*O*-glycosyltransferase (UFGT) plays a role in the downstream of anthocyanins biosynthesis, which converts unstable pigments into stable anthocyanins. This study analyzed the function of *LsUFGT1* gene in *Lycoris sprengeri*, which would provide a theoretical basis for further studying the flower coloration mechanism in *L. sprengeri*. [Method] Several molecular biology techniques such as gene cloning, reverse transcription PCR (RT-PCR), genome walking, histological staining, and dual luciferase reporter assay, were used to study the functions of *LsUFGT1* and its promoter. [Result] (1) The cDNA sequence of *LsUFGT1* was obtained with a length of 1 632 bp, with an open reading frame of 1 398 bp, encoding 465 amino acids; the homology between *LsUFGT1* and NtUFGT1 in *Narcissus tazettatorium* was up to 60.57%. (2) The expression of *LsUFGT1* was consistent with the trend of total anthocyanin contents, and was the most highest at blooming period, whereas the difference in expression between the pink and blue petal parts was not significant. (3) The *LsUFGT1* promoter with 1 184 bp length was cloned, which contained cis-acting elements such as MYB binding site,

收稿日期: 2024-08-27; 修回日期: 2024-11-13

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LZ22C160003)

作者简介: 殷素雅 (ORCID: 0009-0007-0557-124X), 从事观赏植物遗传改良和生物技术研究。E-mail: 1696848461@qq.com。通信作者: 高燕会 (ORCID: 0000-0001-8827-9867), 副教授, 博士, 从事观赏植物遗传改良和花色形成机制研究。E-mail: gaoyanhui408@126.com

response to light, hormone and adverse stress. β -glucosidase (GUS) histological staining in *Arabidopsis thaliana* showed that the *LsUFGT1* promoter had promoter activity. (4) Dual luciferase reporter assays revealed that *LsMYB4* and *LsMYB5* were able to significantly inhibit the activity of the *LsUFGT1* promoter ($P < 0.05$). [Conclusion] *LsMYB4* and *LsMYB5* modulated anthocyanin accumulation by directly binding to the *LsUFGT1* promoter in *L. sprengeri*. [Ch, 9 fig. 2 tab. 38 ref.]

Key words: *Lycoris sprengeri*; flavonoid-3-*O*-glucosyltransferase (UFGT); anthocyanin; functional analysis

植物丰富的花色由植物组织和器官的特定细胞色素所呈现, 随类黄酮、类胡萝卜素和甜菜色素等次生代谢产物含量变化而变化^[1-2]。类黄酮包括原花青素、花色素、异黄酮、黄酮醇、黄烷酮五大类^[3-4], 其中花色素生物合成途径^[5]已被研究得较为清晰。花色素生物合成是类黄酮途径的一个分支, 以丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA) 和苯丙氨酸 (phenylalanine) 为底物, 经查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)、黄烷酮 3'-羟化酶 (flavanone 3'-hydroxylase, F3'H)、类黄酮-3', 5'-羟化酶 (flavonoid-3', 5'-hydroxylase, F3'5'H)、二氢黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 等合成酶及不同底物分别形成无色天竺葵色素、矢车菊色素和飞燕草色素; 经花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS) 催化生成有色花色素, 再经花色素酰基转移酶、糖基转移酶和甲基转移酶的转化形成不同颜色的矢车菊色素、天竺葵色素以及飞燕草色素^[6-8], 最后经类黄酮糖基转移酶 (flavonoid-3-*O*-glucosyltransferase, UFGT) 将不稳定的色素转变为稳定的花色苷, 由谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 转运至液泡中储存。

UFGT 是类黄酮生物合成下游途径最后一个关键酶, 可催化 UDP-葡萄糖上的葡萄糖基转移至花色素 C 环 C₃ 羟基上, 主要参与花色素支路和黄酮醇支路的糖基化过程^[9]。近年来, 有关植物 UFGT 的表达与花色苷积累的报道较多, UFGT 可催化花色苷的形成, 正调控花色苷积累。猕猴桃 *Actinidia chinensis* 糖基转移酶基因 *F3G77* 和 *F3GG77* 参与花色苷的合成^[10]; 唐古特白刺 *Nitraria tangutorum* *NtUFGT* 可将不稳定的花色素转变为稳定的花色苷, 积累花色素抵抗逆境胁迫^[11]; *UFGT* 是调控紫山药 *Dioscorea alata* 颜色的关键酶基因^[12]; 杨梅 *Morella rubra* *UGT71A1* 可利用酶促或全细胞生物催化进行糖基化结构修饰^[13]; 四季秋海棠 *Begonia semperflorens* *BsUFGT* 能够促进花色苷的合成和积累^[14]; 紫薇 *Lagerstroemia indica* *LiUFGT* 对紫薇花色基因具有直接调控的作用, 在红色花瓣中表达量最高, 在白色中最低^[15]。大量研究表明 *UFGT* 可能与其他基因共同调控花色苷的积累。葡萄 *Vitis vinifera* *VvMYB1* 通过激活 *VvUFGT* 启动子活性, 调控花色苷合成积累^[16]; 荔枝 *Litchi chinensis* *LcMYB1* 直接结合 *LcDFR* 和 *LcUFGT1* 启动子激活基因表达, 进而调控花色苷的生物合成^[17]; 芒果 *Mangifera indica* *MiMYB1* 可直接结合 *MiUFGT43* 启动子, 激活 *MiUFGT43* 表达, 从而影响采后芒果花青苷的合成^[18]; 石榴 *Punica granatum* 转录因子 *R2R3-PgMYB* 通过调控 *PgUFGT* 表达来调节花色苷合成^[19]。

换锦花 *Lycoris sprengeri* 为石蒜科 Amaryllidaceae 石蒜属 *Lycoris* 多年生球根花卉, 是良好的花园地面覆盖植物, 其花色为特殊的红蓝复合色, 是研究多色花形成的较好材料。近年来, 学者们从花色苷形成相关的关键酶基因 *LsF3'H* 和 *LsANS* 及 *R2R3-MYB* 类调控基因的克隆和表达深入探究换锦花花色的形成机制^[20-24], 基于病毒介导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 的 *LsMYB4* 和 *LsMYB5* 基因沉默后可上调 *LsUFGT* 表达^[23], 这为换锦花花色育种和新品种选育奠定了一定的理论基础。为进一步研究和解析 *LsUFGT1* 对换锦花花瓣呈色的作用, 本研究采用逆转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 和染色体步移 (genome walking) 技术分离换锦花 *LsUFGT1* 基因及启动子序列, 并利用双荧光素酶报告实验分析 *LsMYB4* 和 *LsMYB5* 转录因子对 *LsUFGT1* 基因启动子的激活功能, 以期为进一步解析换锦花花瓣呈色的分子机制提供基础, 为石蒜属植物基因工程花色改良提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2021 年 8—9 月, 于浙江农林大学石蒜属植物种质资源圃, 采集盛花期换锦花新鲜花瓣 (粉色和

蓝色部分) 和花发育不同时期 (小花苞、大花苞、盛花期) 花瓣, 液氮速冻, 于 -80°C 冰箱保存备用; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (抽薹 7 d) 用于 β -葡萄糖苷酶 (GUS) 染色。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 *LsUFGT1* 基因的克隆 使用改良十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)+Trizol 法^[25] 提取换锦花花瓣总 RNA, 用质量浓度为 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量及完整性。参照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Takara) 说明书合成 5'-RACE -Ready cDNA 第 1 链。根据换锦花花瓣转录组的 *LsUFGT1* (GenBank: MT664242.1) 序列信息设计 *LsUFGT1*-5' GSP1 和 *LsUFGT1*-5' GSP2 引物 (表 1), PCR 扩增 *LsUFGT1* 序列 5'端的未知序列, 用质量分数为 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 回收目的片段并连接到 pMD-19T 载体 (Takara) 上, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆送杭州擎科生物技术有限公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of the primers

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
<i>LsUFGT1</i> -5'GSP1	AAGACCATAGAAAGAGGACCCCGC	<i>LsUFGT1</i> 基因 5'端的未知序列扩增
<i>LsUFGT1</i> -5'GSP2	CGCTCGCTTCCAATCCCTCTGCC	
<i>LsUFGT1</i> 全长-F	TAGCCTGTGCCACTTCCCTT	<i>LsUFGT1</i> 基因扩增
<i>LsUFGT1</i> 全长-R	GCTGGAGAGTTTCGCAATACA	
<i>Q-LsUFGT1</i> -F	GGTGGTGAAGGATGAGGAAGGTAGG	实时荧光定量PCR(RT-qPCR)
<i>Q-LsUFGT1</i> -R	GTTGAACCGCTCGAACCGCAATC	
<i>Q-LsACTIN</i> -F	CAGACTTCAATGTGCCCG	
<i>Q-LsACTIN</i> -R	CACCATCACCAGAATCCAGC	
<i>LsUFGT1</i> -R-SP1	CGCTGATTAGACACGTGATCCTCAA	启动子克隆
<i>LsUFGT1</i> -R-SP2	CTCGAAGATCCTGAGGTTGGGT	
<i>LsUFGT1</i> -R-SP3	TGGCGGTGGTGGCAATCTAATC	
<i>LsUFGT1</i> -2-R-SP1	GGGAGGGGAAATATCCAAAATGGAG	
<i>LsUFGT1</i> -2-R-SP2	TTCTGATTGGGCCACGTCGTCGTTT	
<i>LsUFGT1</i> -2-R-SP3	GGTGAAGCTGCTGTTCGGTGACGTGT	<i>LsUFGT1</i> 启动子扩增
<i>LsUFGT1</i> -pro-F	AAATAAAGGAAGGAGGGAGTGG	
<i>LsUFGT1</i> -pro-R	GGCAATCTAATCCCATGGT	pBI121 载体构建
pBI121- <i>LsUFGT1</i> -pro::GUS-F	TGATTACGCCAAGCTTAAATAAAGGAAGGAGGGAGTGG	
pBI121- <i>LsUFGT1</i> -pro::GUS-R	CCGGGGATCCTCTAGATGGCAATCTAATCCCATGGT	双荧光素酶报告实验
pGreen II 62-SK- <i>LsMYB4</i> -F	TGGCGGCCGCTCTAGATGGGTAGGTCTCCATGCTG	
pGreen II 62-SK- <i>LsMYB4</i> -R	CAGCGTACCGAATTGTCAAACACTACTTCTAAAGTCCAAT	
pGreen II 62-SK- <i>LsMYB5</i> -F	TGGCGGCCGCTCTAGATGGGTAGATCTCCATGTTG	
pGreen II 62-SK- <i>LsMYB5</i> -R	CAGCGTACCGAATTGCTATCTAATTACATGTGGATTGAT	
pGreen II 0800- <i>LsUFGT1</i> -pro-LUC-F	CGGTATCGATAAGCTGTGAGTGATATGAAAAGTACTCC	
pGreen II 0800- <i>LsUFGT1</i> -pro-LUC-R	TAGAAGTAGTGGATCGGTGGATGCGCAGGTTAG	

利用 Primer Premier 5.0 设计拼接的 *LsUFGT1* 未知序列扩增引物 (表 1), 以 cDNA 第 1 链为模板 PCR 扩增验证 *LsUFGT1* 序列是否正确。通过在线软件 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找 *LsUFGT1* cDNA 序列开放阅读框 (open reading frame, ORF); 利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索近缘物种的 *UFGT* 序列信息; 利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质理化性质; 利用 NPSA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html) 预测蛋白质二级结构; 通过 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对; 使用 MEGA7.0 构建系统进化树。

1.2.2 换锦花 *LsUFGT1* 表达分析 采用 Prime Script^{RT} reagent Kit Perfect Real Time (TaKaRa) 试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 利用 Primer 5.0 设计实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物 (表 1), 使用 RT-qPCR 技术检测 *LsUFGT1* 在换锦花盛花期花瓣和不同花发育时期花瓣表达模式, 以 *LsActin* 为内参基因^[26], 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计

算各基因的相对表达量。

1.2.3 花色苷提取和测定 将采集的换锦花花瓣避光冻干 7 d 后研磨, 精密称量换锦花花瓣干粉 0.040 0 g, 加入 2 mL 体积分数为 1% 的 CH_3HCl 溶液, 充分摇匀, 密塞, 20 ℃ 超声波提取 30 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液于 -20 ℃ 冰箱保存待用, 每个样本重复 3 次。总花色苷测定方法采用 UltimateR LP-C18 column (4.6 mm×250.0 mm, 5 μm)^[24], 以矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷为标准品, 重复 3 次, SPSS 20.0 处理数据和分析差异显著性, 并利用 GraphPad Prism 8.0 绘图。

1.2.4 *LsUFGT1* 启动子克隆和序列分析 采用染色体步移法分离 *LsUFGT1* 启动子序列。采用 CTAB 法提取换锦花基因组 DNA, 以质量浓度为 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和质量。利用 Primer Premier 5.0 设计 *LsUFGT1* 基因启动子克隆和扩增引物 (表 1), 以换锦花基因组 DNA 为模板, 采用 Genome Walking Kit (Takara) 扩增 *LsUFGT1* 启动子序列, 以质量浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的片段, 连接到 pMD-19T 载体, 转化大肠埃希菌 *DH5 α* 感受态细胞, 挑取阳性克隆检测并测序。通过伯克利果蝇基因组项目 (BDGP) (https://www.fruit-fly.org/seq_tools/promoter.html) 预测启动子转录起始位点, Plant CARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子顺式作用元件。

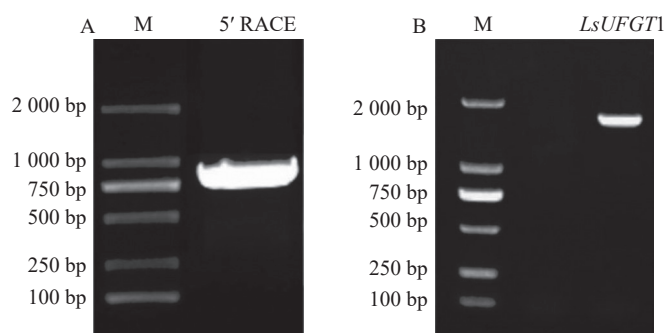
1.2.5 pBI121-*LsUFGT1*-*pro*::GUS 载体构建及农杆菌侵染拟南芥 采用同源重组法构建 pBI121-*LsUFGT1*-*pro*::GUS 表达载体, 将重组质粒转入农杆菌 GV3101 感受态细胞, 采用整染法^[27-28] 瞬时侵染拟南芥植株 48 h 后, 洗净拟南芥植株表面菌液, 用 GUS 染色液 37 ℃ 染色过夜, 将植株于脱色液 (无水乙醇和冰乙酸体积比为 3:1) 中脱色 2~4 h 后, 置于体积分数为 70% 的乙醇保存, 观察 *LsUFGT1* 启动子在拟南芥植株的表达并拍照。

1.2.6 双荧光素酶报告实验 采用无缝克隆技术构建 pGreen II 0800-*LsUFGT1*-*pro*-LUC 和 pGreen II 62-SK-*LsMYB4*、pGreen II 62-SK-*LsMYB5* 表达载体, 使用冻融法将 pGreen II 62-SK、pGreen II 0800-LUC 空载及重组质粒转入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 感受态细胞, 注射烟草叶片暗培养 24 h 后, 正常光照培养 48 h 后用 6 mm 打孔器取样; 液氮研磨, 根据 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒的说明书用 GloMax 20/20 2020 化学发光检测仪 (Promega) 检测萤火虫荧光素酶 (Luc) 和海肾荧光素酶 (Ren) 活性, 并计算 Luc/Ren 比值。

2 结果与分析

2.1 换锦花 *LsUFGT1* 基因的克隆和序列分析

以换锦花花瓣 cDNA 为模板, 采用 RACE 技术克隆 *LsUFGT1* 基因 cDNA 序列 (图 1), *LsUFGT1* 共 1 632 bp, 开放阅读框为 1 398 bp, 编码 465 个氨基酸, GenBank 数据库登录号为 MT664242.1。



A. *LsUFGT1* 的 RACE 5' 扩增产物; B. *LsUFGT1* cDNA PCR 扩增产物。

图 1 *LsUFGT1* 基因 cDNA 序列 PCR 扩增

Figure 1 Results of *LsUFGT1* cDNA cloning

在线分析 *LsUFGT1* 蛋白分子式 $\text{C}_{4822}\text{H}_{8014}\text{N}_{1632}\text{O}_{2030}\text{S}_{439}$, 分子质量约 153.4 kD, 理论等电点为 4.93, 总体亲水性 GRAVY 为 0.745, 不稳定系数为 46.80。可见, *LsUFGT1* 蛋白为疏水性不稳定蛋白。利用 SOPMA 预测 *LsUFGT1* 二级结构, 由 α -螺旋 (38.49%)、 β -折叠 (6.88%)、延伸链 (16.34%) 和无规则卷曲 (38.28%) 构成 (图 2), 表明 *LsUFGT1* 蛋白主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成。

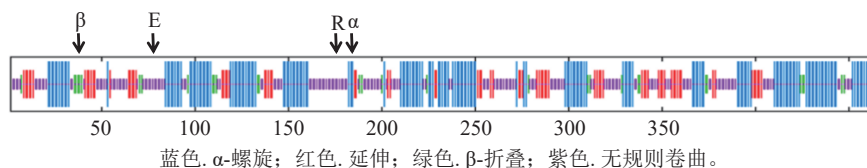


图 2 LsUFGT1 蛋白的二级结构预测图

Figure 2 Predicted secondary structure of LsUFGT1

2.2 换锦花 LsUFGT1 氨基酸序列同源性分析

利用 DNAMAN 对换锦花 LsUFGT1 氨基酸序列同源性进行比对 (图 3), 发现换锦花 LsUFGT1 与水仙 *Narcissus tazetta* KJ879945.1 相似性达 60.57%, 与洋葱 *Allium cepa* KC466029.1、荷兰鸢尾 *Iris × hollandica* AB161175.1、小苍兰 *Fressia hybrida* HM590645.1 和郁金香 *Tulipa × gesneriana* KF792732.1 相似性约 43%, 与杂交百合 *Lilium hybrida* KX781249.1 相似性达 40.27%, 但与拟南芥 At4G01070.1 相似性为 20.13%, 与水稻 *Oryza sativa* Os07g05420.1 相似性为 32.05%, 说明换锦花 *LsUFGTs* 家族与拟南芥、水稻在种属关系以及功能上相关性较小。HMMER 检测到这些物种氨基酸的保守结构区域在 220~426 肽链区间, 含保守结构域 UDPGT, 说明 UFGT 属于 UDPGT 型糖基转移酶超家族的一员, 具有该家族的特征区域。

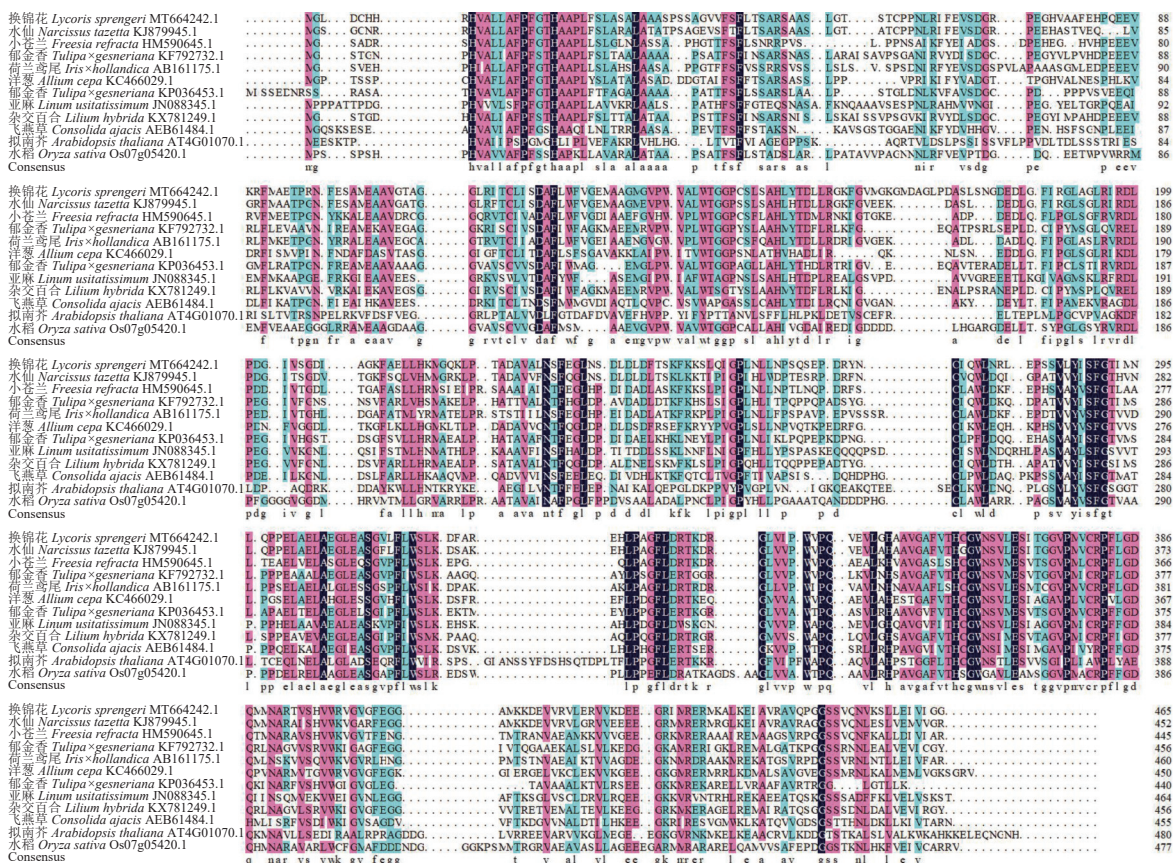


图 3 LsUEGT1 与其他植物的 UEGT 氨基酸多序列比对

Figure 3 Amino acid alignment of LsUFGTs and UFGTs from other species

2.3 换锦花 LsUEGT1 蛋白序列的系统进化分析

对换锦花与其他已知植物的 UFGTs 蛋白进行系统进化分析(图 4)。结果表明: 换锦花 LsUFGT1 与石蒜科的水仙 KJ879945.1、百合科 Liliaceae 洋葱 KC466029.1 聚为一类, 与拟南芥和水稻 UFGTs 同源性低, 亲缘关系较远, 具有明显的种属特性。

2.4 换锦花 *LsUFGT1* 基因的表达分析

RT-qPCR 分析 (图 5) 发现: *LsUFGT1* 基因在不同花发育时期均能表达, 且差异显著 ($P<0.05$), 在小花苞时期表达量最高, 其次是大花苞, 盛花期表达量最低, 而粉瓣和蓝瓣的表达量差异不显著。因此

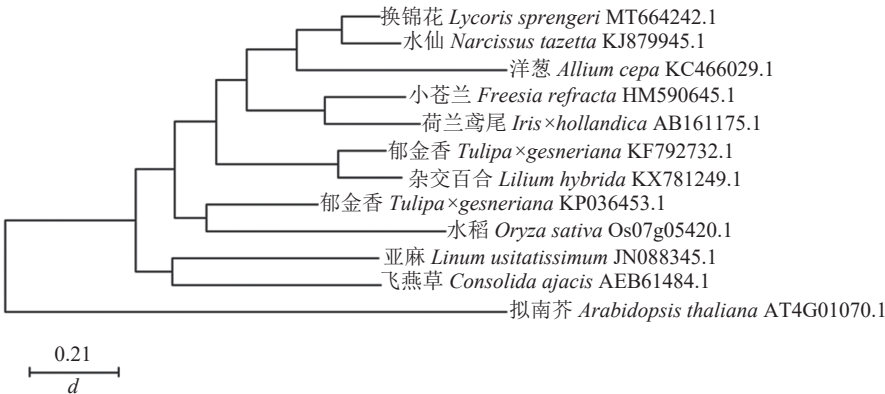
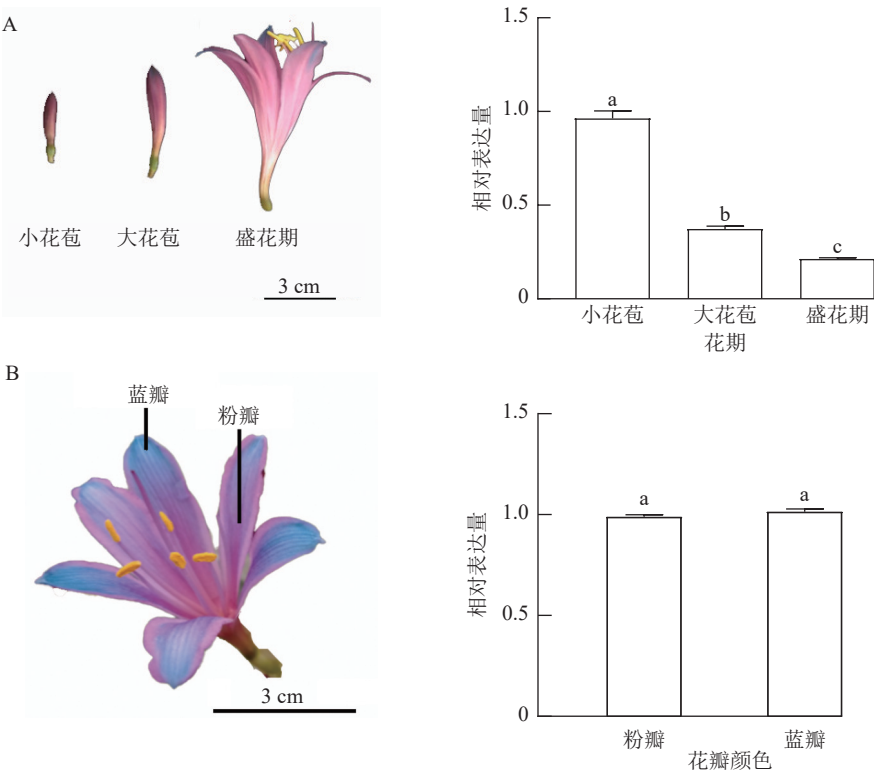


图 4 *LsUFGT1* 与其他植物 UFGTs 蛋白的系统进化树分析

Figure 4 Phylogenetic relationships between *LsUFGT1* and other species UFGTs proteins



A. *LsUFGT1* 基因在换锦花不同花发育时期的表达；B. *LsUFGT1* 基因在换锦花不同花色部分的表达。
数据为平均值+标准误；不同小写字母表示经Duncan法检验差异显著($P<0.05$)。

图 5 *LsUFGT1* 基因的表达模式

Figure 5 Expression models of *LsUFGT1* gene

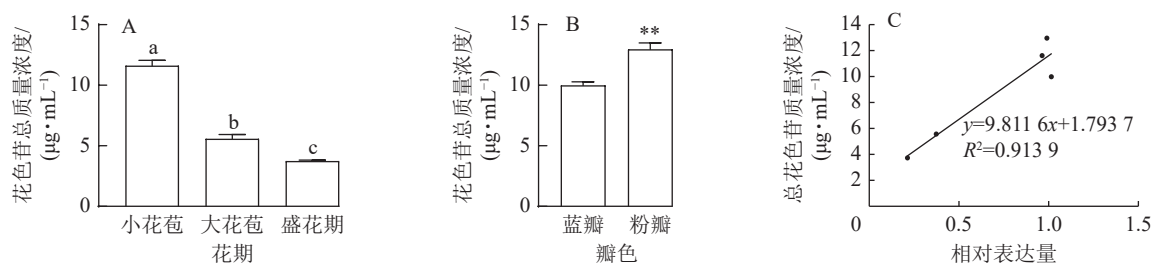
推测 *LsUFGT1* 基因在换锦花发育前期起关键作用，且与花发育前期花色苷的生物合成密切相关，但与粉色和蓝瓣的形成相关性不大。

2.5 换锦花花瓣总花色苷质量浓度与 *LsUFGT1* 基因表达相关性

HPLC 测定的花瓣总花色苷质量浓度随花发育时间呈显著递减趋势 ($P<0.05$ ，图 6A)，与 *LsUFGT1* 基因的表达趋势一致，小花苞期的总花色苷质量浓度最高；换锦花同朵花的粉瓣的总花色苷质量浓度显著高于蓝瓣 ($P<0.05$ ，图 6B)，*LsUFGT1* 相对表达量与花色苷质量浓度呈正相关 (图 6C)，推测 *LsUFGT1* 可能参与换锦花花发育前期花色苷的生物合成，而影响花瓣着色。

2.6 *LsUFGT1* 启动子克隆和顺式作用元件

获得长 1 184 bp 的 *LsUFGT1* 启动子序列 (图 7)，利用 BDGP 预测 *LsUFGT1* 基因的转录起始位点，发现起始位点为 ATG 前 87 个碱基处 A，*LsUFGT1* 启动子有 TATA box 以及 CAAT box 等基本顺式作用元件，还有 Box-4、G-box、GA-box、TCT 光响应元件；ABRE、TGACG-motif、CGTCA-motif、TCA-



A. 不同花发育时期; B. 同花瓣不同部位; C. 花色苷质量浓度与花色苷相关基因表达的相关性。数据为平均值±标准误; 不同小写字母表示经Duncan法检验差异显著($P<0.05$); **, 与蓝瓣相比存在极显著差异($P<0.01$)。

图6 换锦花花瓣总花色苷质量浓度

Figure 6 Total anthocyanin content of petals in *L. sprengeri*

element、TGA-element 激素响应元件和逆境胁迫响应元件 LTR、MBS 等 (表 2), 其中 CCAAT-box、MBS 与 MYB 结合。

2.7 *LsUFGT1* 启动子活性检测

图 8A 显示: 经 GUS 组织化学染色检测, 阴性对照拟南芥植株染色后未检测到 GUS 活性 (图 8C), 而阳性对照 (图 8B) 和 pBI121-*LsUFGT1-pro::GUS* 植株 (图 8D) 在拟南芥叶片和根部呈现蓝色, 表明长为 1 184 bp 的 *LsUFGT1* 基因启动子区域具有启动下游基因的活性。

2.8 *LsMYB4* 和 *LsMYB5* 能够激活 *LsUFGT1* 基因的活性

将 *LsMYB4*、*LsMYB5* 基因和 *LsUFGT1* 启动子序列分别连接到 pGreen II 62-SK 和 pGreen II 0800-LUC 中, 进行双荧光素酶活性检测, 以 pGreen II 0800-*LsUFGT1-pro-LUC*+62-SK-empty 为对照, 发现 *LsUFGT1-pro* 具有启动子活性; 而将 pGreen II 62-SK-*LsMYB4/LsMYB5* 分别和 pGreen II 0800-*LsUFGT1-pro-LUC* 载体共同转化烟草叶片, 发现 *LsMYB4*、*LsMYB5* 转录因子分别能显著 ($P<0.05$) 和极显著 ($P<0.01$) 抑制 *LsUFGT1* 启动子的活性 (图 9), 因此推测 *LsMYB4* 和 *LsMYB5* 均对 *LsUFGT1* 具有反向调节的作用。

3 讨论

花青素是一种重要的植物色素, 作为类黄酮途径的末端产物, 由内质网膜系列酶催化合成, 其中, UFGT 在花青素生物合成途径中催化植物细胞中不稳定的花青素转化成稳定的花色苷^[29]。已有研究发现: 红叶山茶 ‘金华美女’ *Camellia japonica* ‘Jinhua Meinü’ 叶片生长过程中, CjUFGT 持续催化花青素合成, 花青素大量积累, 导致叶片颜色变深^[30]; 四季秋海棠 *BsUFGT* 在烟草 *Nicotiana tabacum* ‘NC89’ 中过表达能够提高花瓣的颜色和花色苷矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷 (cyanidin-3-*O*-rutoside, Cy-3R) 含量^[4]; 黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* *LrUFGT1* 的表达具有组织特异性, 且主要在花和紫果中表达, 表达量随花朵的发育先增加后减少, 表明 *LrUFGT1* 可能参与了黑果枸杞花朵的呈色, 影响黑果枸杞果实和花瓣的着色^[31]; 菊花 *Chrysanthemum morifolium* *CmUFGT* 表达与彩斑突变体 CQ17-mu 植株花瓣中紫色条斑呈色有关^[32]; 特异性敲除蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris* *PeUFGT3*, 其花朵中花色苷含量显著降低, 同时花朵颜色变浅^[33]。本研究发现 *LsUFGT1* 与换锦花花瓣花色苷含量呈正相关, 换锦花不同发育期 *LsUFGT1* 表达差异显著, 呈递减趋势。

花色苷生物合成还受转录因子 MYB、bHLH 和 WD40 单独或形成 MBW 复合体协同调控, 转录因子往往直接结合到花色苷形成基因启动子调控花色苷积累^[34]。启动子是基因转录调控的核心组件, 位于基因上游区域, 专门负责激活 RNA 聚合酶, 从而精准调控基因的表达^[35]。常通过瞬时表达法将启动子表

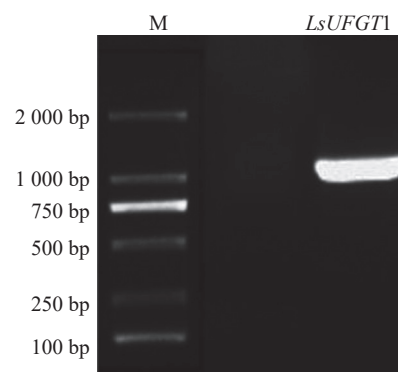


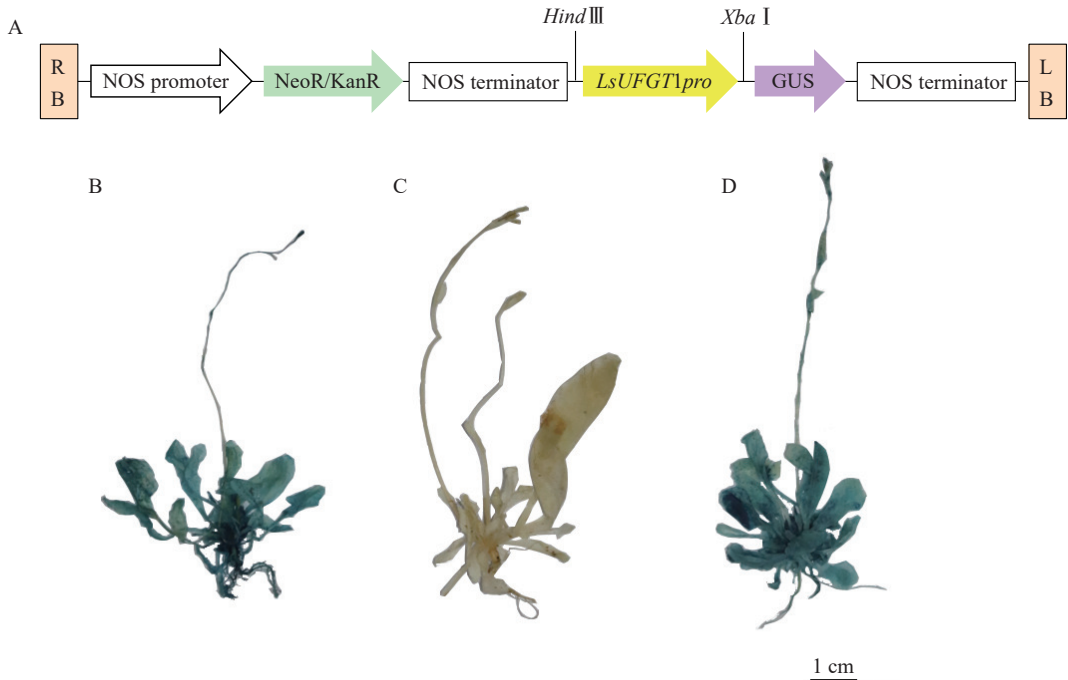
图7 *LsUFGT1* 启动子序列克隆电泳图

Figure 7 Electrophoresis map of promoters clone of *LsUFGT1*

表 2 *LsUFGT1* 启动子元件

Table 2 Elements in <i>LsUFGT1</i> promoter				
元件	植物	基序	数量	功能
ABRE	拟南芥	ACGTG	1	脱落酸响应元件
ARE	玉米	AAACCA	1	厌氧诱导所必需顺式作用元件
Box-4	皱叶欧芹	ATTAAT	2	参与光响应的保守DNA部分
CAAT-box	豌豆、拟南芥	CAAAT、CCAAT	3	启动子和增强子顺式作用元件
CAT-box	拟南芥	GCCACT	1	分生组织表达相关的顺式作用调控元件
CCAAT-box	大麦	CAACGG	1	大麦MYB结合位点
CGTCA-motif	大麦	CGTCA	1	茉莉酸甲酯响应顺式作用元件
G-box	玉米	CACGTC	1	光响应顺式作用元件
GA-motif	拟南芥	ATAGATAA	1	部分光响应元件
GC-motif	玉米	CCCCCG	2	缺氧特异诱导的增强子样元件
GT1-motif	燕麦	GGTTAAT	1	光响应元件
LTR	大麦	CCGAAA	2	低温反应的顺式作用元件
MBS	拟南芥、烟草	CAACAG	1	参与干旱调控MYB结合位点
TATA-box	拟南芥、水稻、欧洲油菜	TACAAAA、ATTATA、TATA、ATATAT	5	转录起始位点上游-30的启动子核心元件
TCA-element	烟草	CCATCTTTTT	1	水杨酸反应的顺式作用元件
TCT-motif	拟南芥	TCTTAC	1	部分光响应元件
TGA-element	甘蓝	AACGAC	1	生长素响应元件

说明：拟南芥. *Arabidopsis thaliana*，玉米. *Zea mays*，豌豆. *Pisum sativum*，水稻. *Oryza sativa*，大麦. *Hordeum vulgare*，燕麦. *Avena sativa*，欧洲油菜. *Brassica napus*，烟草. *Nicotiana tabacum*，甘蓝. *Brassica oleracea*。



A. pBI121-*LsUFGT1-pro*载体构建示意图；B. pBI121染色结果(阳性对照)；C. 未侵染的拟南芥(阴性对照)染色结果；D. pBI121-*LsUFGT1-Pro* GUS染色结果。

图 8 瞬时转化拟南芥 GUS 组织化学染色结果

Figure 8 GUS histochemical staining results of transiently transformed *Arabidopsis thaliana*

达载体导入植物受体，短时间内通过检测报告基因在受体植物中的表达位置和活性，从而研究启动子片段功能。李琴琴等^[36]利用 GUS 组织化学染色发现瞬时转化烟草中卵叶牡丹 *Paeonia qiui* pro*PqDFR* 和 pro*PqANS* 均具有启动子活性；姜宁等^[37]研究发现 pro*VvAGL12* 启动子片段在拟南芥中具有启动活性，

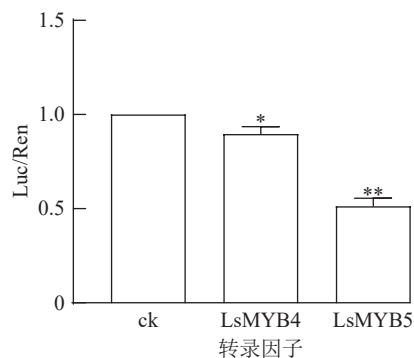
能够激活 *GUS* 在转基因拟南芥植株叶片、茎段、花器官、根和果荚部位的表达；周琳等^[38]经 *GUS* 组织化学染色和酶活性检测，发现牡丹 *PsDFR* 启动子缺失片段都具有启动子活性。本研究克隆的 *LsUFGT1pro* 启动子序列能够启动 *GUS* 在拟南芥植株的表达，说明 *LsUFGT1* 基因起始密码子上游 1 184 bp 序列具有启动下游基因的活性。此外，前期研究发现换锦花 *LsMYB4* 和 *LsMYB5* 基因沉默后会导致换锦花花瓣 *LsUFGT1* 的表达上调^[23]，本研究双荧光素酶报告实验发现 *LsMYB4* 和 *LsMYB5* 能够显著抑制 *LsUFGT1* 启动子活性，这与荔枝 *LcUFGT1* 的启动子受到 *LcMYB1* 的调控而影响花色苷的积累相一致^[17]。

4 结论

本研究克隆到长 1 632 bp 的 *LsUFGT1* 基因 cDNA 和 1 184 bp 启动子序列，*LsUFGT1* 基因在换锦花花发育和不同花色花瓣的基因表达与总花色苷含量的变化相一致，*LsMYB4* 和 *LsMYB5* 转录因子对 *LsUFGT1* 基因的表达起着负调控的作用。本研究结果为进一步研究换锦花花色形成的机制提供了理论依据，对深入研究换锦花花色相关基因调控模式具有重要的基础意义。

5 参考文献

- [1] TANIKAWA N, HONMA K, TATSUZAWA F. Flavonoids of the rose-pink, blue, and white flowers of *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) [J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2019, **257**: 108609 [2024-08-15]. DOI: [10.1016/j.scientia.2019.108609](https://doi.org/10.1016/j.scientia.2019.108609).
- [2] 智雅静, 王文和, 冷平生, 等. 不同花色百合色素种类和含量分析 [J]. 北方园艺, 2017(9): 62–69.
ZHI Yajing, WANG Wenhe, LENG Pingsheng, *et al.* Components and content of flower pigments in the petals of different color *Lilium* species [J]. *Northern Horticulture*, 2017(9): 62–69.
- [3] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
HUI Bodi. *Carotenoid Chemistry and Biochemistry* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005.
- [4] SU Zushang. Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium* L. [J]. *Pharmaceutical Crops*, 2012, **3**: 7–37.
- [5] PETRONI K, TONELLI C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs [J]. *Plant Science*, 2011, **181**(3): 219–229.
- [6] 李崇晖, 尹俊梅. 蓝色花形成的基因工程进展与育种策略 [J]. 生物技术通报, 2019, **35**(11): 160–168.
LI Chonghui, YIN Junmei. Genetic engineering progress and breeding tactics on blue flowers [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, **35**(11): 160–168.
- [7] 孙叶, 包建忠, 刘春贵, 等. 兰花花色基因工程研究进展 [J]. 核农学报, 2015, **29**(9): 1701–1710.
SUN Ye, BAO Jianzhong, LIU Chungui, *et al.* Progresses on genetic engineering in orchid floral color [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, **29**(9): 1701–1710.
- [8] 张恒滨, 黄玲, 胡先梅, 等. 郁金香二氢黄酮醇 4-还原酶基因 *TgDFR1* 和 *TgDFR2* 的克隆与功能鉴定 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2025, **51**(1): 118–127.
ZHANG Hengbin, HUANG Ling, HU Xianmei, *et al.* Cloning and functional identification of the dihydroflavonol 4-reductase genes *TgDFR1* and *TgDFR2* in tulips [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2025, **51**(1): 118–127.
- [9] HALL D, YUAN Xiaoxin, MURATA J, *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of the UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase from concord grape (*Vitis labrusca*) [J]. *Phytochemistry*, 2012, **74**: 90–99.
- [10] MONTEFIORI M, ESPEY R V, STEVENSON D, *et al.* Identification and characterisation of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. *The Plant Journal*, 2011, **65**(1): 106–118.



*、** 分别表示与ck相比差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。

图9 双荧光素酶报告

Figure 9 Dual-luciferase reporter assay

- [11] 高子奇, 王佳, 汤宇晨, 等. 唐古特白刺类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因 (*NtUFGT*) 的克隆与功能分析[J]. *草业学报*, 2020, **29**(5): 159–170.
GAO Ziqi, WANG Jia, TANG Yuchen, *et al.* Cloning and functional analysis of the gene *NtUFGT* in *Nitraria tangutorum* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2020, **29**(5): 159–170.
- [12] 殷剑美, 王立, 张培通, 等. 山药花青素合成关键酶基因的解析[J]. *江西农业学报*, 2018, **30**(7): 1–6.
YIN Jianmei, WANG Li, ZHANG Peitong, *et al.* Analysis of genes involved in key enzymes of anthocyanin biosynthesis in Chinese yam (*Dioscorea alata*) [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2018, **30**(7): 1–6.
- [13] 唐铭袞, 杨燕, 王宇, 等. 杨梅糖基转移酶 *UGT71AN1* 的克隆与功能鉴定[J]. *中国医药生物技术*, 2019, **14**(5): 385–393.
TANG Mingjia, YANG Yan, WANG Yu, *et al.* Identification and characterization of glucosyltransferase *UGT71AN1* from *Myrica rubra* [J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2019, **14**(5): 385–393.
- [14] 陈敏, 刘静, 刘至柔, 等. 四季秋海棠 *BsUFGT* 基因克隆及功能验证[J]. *农业生物技术学报*, 2023, **31**(10): 2087–2097.
CHEN Min, LIU Jing, LIU Zhirou, *et al.* Cloning and functional verification of *BsUFGT* gene in *Begonia semperflorens* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, **31**(10): 2087–2097.
- [15] 李春霞, 乔中全, 邓涪元, 等. 紫薇 *LiUFGT* 基因的克隆与生物信息学分析[J]. *湖南林业科技*, 2023, **50**(1): 24–30.
LI Chunxia, QIAO Zhongquan, DENG Fuyuan, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of *LiUFGT* gene of *Lagerstroemia indica* [J]. *Hunan Forestry Science & Technology*, 2023, **50**(1): 24–30.
- [16] 牛铁泉, 董燕梅, 刘海霞, 等. 葡萄果实 MYBA1 与 *UFGT*、*DFR* 的作用机制[J]. *中国农业科学*, 2018, **51**(12): 2368–2377.
NIU Tiequan, DONG Yanmei, LIU Haixia, *et al.* The regulations of the MYBA1 in *UFGT* and *DFR* from the grape berries [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, **51**(12): 2368–2377.
- [17] 赖彪, 王琪, 罗刚军, 等. *LcMYB1* 激活荔枝花色苷生物合成关键基因 *LcDFR* 和 *LcUFGT1* 的启动子区域分析[J]. *热带作物学报*, 2021, **42**(8): 2151–2157.
LAI Biao, WANG Qi, LUO Gangjun, *et al.* Identification of interaction region between *LcMYB1* and promoters of anthocyanin biosynthetic genes *LcDFR* and *LcUFGT1* in *Litchi chinensis* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, **42**(8): 2151–2157.
- [18] 寇明睿, 窦雅琪, 王莹, 等. 芒果 *MiUFGT43* 启动子和 *MiMYB1* 基因的克隆、序列及互作分析[J]. *分子植物育种*, 2024, **22**(15): 4873–4883.
KOU Mingrui, DOU Yaqi, WANG Ying, *et al.* Cloning, sequence analysis and interaction analysis of *MiUFGT43* promoter and *MiMYB1* genes in Mango fruit [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, **22**(15): 4873–4883.
- [19] KAUR R, KAPOOR N, ASLAM L, *et al.* Molecular characterization of *PgUFGT* gene and R2R3-PgMYB transcription factor involved in flavonoid biosynthesis in four tissues of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) [J/OL]. *Journal of Genetics*, 2019, **98**(4): 94 [2024-08-15]. DOI: [10.1007/s12041-019-1141-y](https://doi.org/10.1007/s12041-019-1141-y).
- [20] 许振渊, 高燕会, 周芬静, 等. 换锦花 *LsMYB4* 基因的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2014, **41**(11): 2281–2290.
XU Zhenyuan, GAO Yanhui, ZHOU Fenjing, *et al.* Cloning and expression analysis of *LsMYB4* gene in *Lycoris sprengeri* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, **41**(11): 2281–2290.
- [21] 许振渊. 换锦花 *F3'H* 和 *MYB4* 同源基因的克隆与表达分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
XU Zhenyuan. *Cloning and Expression Analysis of F3'H and MYB4 Homologous Genes in Lycoris sprengeri* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2014.
- [22] 侯朔, 高燕会, 童再康. 换锦花 *LsMYB5* 基因的克隆与表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2019, **27**(12): 2164–2174.
HOU Shuo, GAO Yanhui, TONG Zaikang. Cloning and expression analysis of *LsMYB5* gene in *Lycoris sprengeri* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, **27**(12): 2164–2174.
- [23] 周洋丽, 侯朔, 郑正权, 等. 基于 VIGS 基因沉默体系的换锦花 *LsMYBs* 基因功能研究[J]. *农业生物技术学报*, 2020, **28**(6): 974–983.
ZHOU Yangli, HOU Shuo, ZHENG Zhengquan, *et al.* Study on *LsMYBs* gene function in *Lycoris sprengeri* based on VIGS gene silencing system [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, **28**(6): 974–983.
- [24] 薛惠敏, 周洋丽, 高燕会. 换锦花花青素合成酶基因 (*LsANS*) 的克隆及启动子功能分析[J]. *农业生物技术学报*, 2022, **30**(8): 1468–1479.
XUE Huimin, ZHOU Yangli, GAO Yanhui. Cloning and promoter function analysis of the anthocyanins synthase gene (*LsANS*) in *Lycoris sprengeri* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, **30**(8): 1468–1479.
- [25] 樊青玲, 周日宝, 刘湘丹, 等. 忽地笑不同器官 RNA 提取方法比较研究[J]. *安徽农业科学*, 2020, **48**(18): 169–172.

- FAN Qingling, ZHOU Ribao, LIU Xiangdan, *et al.* Comparative study on RNA extraction methods in different organs of *Lycoris aurea* herb [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, **48**(18): 169–172.
- [26] 蒋婷婷, 高燕会, 童再康. 石蒜属植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 园艺学报, 2015, **42**(6): 1129–1138.
- JIANG Tingting, GAO Yanhui, TONG Zaikang. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lycoris* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, **42**(6): 1129–1138.
- [27] LABRA M, VANNINI C, GRASSI F, *et al.* Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, **109**(7): 1512–1518.
- [28] 高建强, 梁华, 赵军. 植物遗传转化农杆菌浸花法研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, **26**(16): 22–25.
- GAO Jianqiang, LIANG Hua, ZHAO Jun. Progress on the floral-dip method of agrobacterium-mediated plant transformation [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, **26**(16): 22–25.
- [29] JAAKOLA L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits [J]. *Trends in Plant Science*, 2013, **18**(9): 477–483.
- [30] 应震, 李纪元, 殷恒福, 等. 红叶山茶品种花青素苷相关基因表达水平及代谢产物分析[J]. 林业科学研究, 2017, **30**(6): 1034–1040.
- YING Zhen, LI Jiyuan, YIN Hengfu, *et al.* Analysis of gene expressing and metabolites for synthesising anthocyanins influencing the red color of leaves of *Camellia* cultivar [J]. *Forest Research*, 2017, **30**(6): 1034–1040.
- [31] 聂祝欣, 吕冀堃, 马子乔, 等. 黑果枸杞 3-O-类黄酮糖基转移酶 *LrUGFT1* 的克隆与表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 2023-12-27[2024-08-15]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20231227.1005.006>.
- NIE Zhuxin, LÜ Jikun, MA Ziqiao, *et al.* Cloning and expression analysis of 3-O-flavonoid glucosyltransferase *LrUGFT1* from *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023-12-27[2024-08-15]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20231227.1005.006>.
- [32] 陈新娜, 喻铨, 张利英, 等. 菊花 *CmUGFT* 基因及其启动子的克隆与表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 2022-09-28[2024-08-15]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220927.1231.004.html>.
- CHEN Xinna, YU Xin, ZHANG Liying, *et al.* Cloning and expression analysis of chrysanthemum *CmUGFT* gene and its promoter [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2022-09-28 [2024-08-15]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220927.1231.004.html>.
- [33] CHEN W H, HSU C Y, CHENG Haoyun, *et al.* Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, **30**(6): 1007–1017.
- [34] WANG Yiping, LIU Yongqiang, ZHANG Lianxi, *et al.* A novel R2R3-MYB transcription factor FaMYB10-like promotes light-induced anthocyanin accumulation in cultivated strawberry[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(23): 16561 [2024-08-15]. DOI: [10.3390/ijms242316561](https://doi.org/10.3390/ijms242316561).
- [35] 杨晓娜, 赵昶灵, 李云, 等. 启动子序列克隆和功能分析方法的研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2010, **25**(2): 283–290.
- YANG Xiaona, ZHAO Changling, LI Yun, *et al.* Research advances in the methods of cloning and function-analyzing of promoters [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2010, **25**(2): 283–290.
- [36] 李琴琴, 董山榕, 罗建让, 等. 卵叶牡丹 *PqDFR* 和 *PqANS* 及启动子克隆与功能分析[J]. 园艺学报, 2024, **51**(6): 1256–1272.
- LI Qinqin, DONG Shanrong, LUO Jianrang, *et al.* Cloning and functional analysis of *PqDFR* and *PqANS* genes and its promoters from *Paeonia qiui* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, **51**(6): 1256–1272.
- [37] 姜宁, 王雪婷, 王春楠, 等. 葡萄 *VvAGL12* 基因启动子克隆及表达活性分析[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2024, **52**(5): 31–41.
- JIANG Yu, WANG Xueting, WANG Chunnan, *et al.* Cloning and expression analysis of *VvAGL12* gene promoter in *Vitis vinifera* [J]. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2024, **52**(5): 31–41.
- [38] 周琳, 袁梦, 齐宇, 等. 牡丹花青素苷合成关键基因 *PsDFR* 启动子活性分析[J]. 林业科学研究, 2024, **37**(2): 16–26.
- ZHOU Lin, YUAN Meng, QI Yu, *et al.* Promoter functional analysis of the key gene *PsDFR* involved in *Paeonia suffruticosa* anthocyanin biosynthesis [J]. *Forest Research*, 2024, **37**(2): 16–26.