北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

欧李果肉酵母cDNA文库构建及*PhLDOX*基因上游调控因子筛选

夏举国 王淋 包文泉 敖敦 陈俊兴 康佳琪

Construction of yeast cDNA library of *Prunus humilis* flesh and screening for upstream regulatory factors of *PhLDOX* gene

Xia Juguo, Wang Lin, Bao Wenquan, Ao Dun, Chen Junxing, Kang Jiaqi

引用本文:
夏举国, 王淋, 包文泉, 敖敦, 陈俊兴, 康佳琪. 欧李果肉酵母cDNA文库构建及*PhLDOX*基因上游调控因子筛选[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(3):191–202. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250293
Xia Juguo, Wang Lin, Bao Wenquan, Ao Dun, Chen Junxing, Kang Jiaqi. Construction of yeast cDNA library of *Prunus humilis* flesh and screening for upstream regulatory factors of *PhLDOX* gene[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(3):191–202. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250293

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250293

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

矢车菊不同颜色花瓣酵母cDNA文库的构建
Construction of a yeast cDNA library using *Centaurea cyanus* petals of different colors
北京林业大学学报, 2024, 46(3): 115–122. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230126

芍药种子休眠解除过程的酵母杂交cDNA文库构建
Construction of a yeast hybrid cDNA library during seed dormancy release of *Paeonia lactiflora*
北京林业大学学报, 2023, 45(7): 120–129. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210368

枸杞 *SnRK*基因家族鉴定及表达分析
Identification and expression analysis of *SnRK* gene family in *Lycium barbarum*
北京林业大学学报, 2025, 47(11): 96–108. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250274

MeJA介导的bHLH转录因子家族对板栗果实发育和品质的影响
Effects of MeJA mediated bHLH transcription factor family on development and quality of *Castanea mollissima* fruits
北京林业大学学报, 2025, 47(8): 23–41. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250063

不同花色木棉转录组功能注释与分析
Functional annotation and analysis of transcriptome of *Bombax ceiba* with different flower colors
北京林业大学学报, 2022, 44(3): 1–11. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210250

紫雨桦杂交子代苗期生长及叶色性状的变异
Variation of growth and leaf color traits of *Betula pendula* ‘Purple Rain’ hybrid offsprings at seedling stage
北京林业大学学报, 2022, 44(9): 62–71. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210133

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250293

欧李果肉酵母 cDNA 文库构建及 *PhLDOX* 基因上游调控因子筛选

夏举国[1,2]　王　淋[1]　包文泉[2]　敖　敦[2]　陈俊兴[2]　康佳琪[2]
（1. 中国林业科学研究院经济林研究所，河南 郑州 450003；2. 内蒙古农业大学林学院，内蒙古 呼和浩特 010019）

摘要:【目的】欧李果肉色泽鲜艳，风味独特，经济价值显著，但其果肉呈色的分子调控机制尚不明晰。本研究通过构建欧李果肉酵母 cDNA 文库，利用酵母单杂交技术初步筛选欧李花青素合成关键基因 *PhLDOX* 的上游调控因子，以期为揭示欧李果肉的呈色调控机制奠定前期理论基础，并为欧李后续的分子设计育种提供重要的基因资源。**【方法】**以不同时期红色果肉和黄色果肉欧李种质为研究材料，采用 Gateway 技术经过 BP 及 LR 重组反应构建酵母 cDNA 文库；利用 RT-qPCR 和 PlantCARE 工具分析 *PhLDOX* 基因表达模式和启动子顺式作用元件，克隆该基因启动子序列并构建诱饵载体，利用酵母单杂交技术从文库中初步筛选其上游调控因子，结合不同果肉颜色种质发育时期的转录组数据进一步确定 *PhLDOX* 基因的上游调控因子。**【结果】**(1)文库质量鉴定结果显示：初级文库库容为 1.6×10^7 CFU，文库滴度为 8.0×10^6 CFU/mL；次级文库库容为 1.6×10^7 CFU，文库滴度为 7.8×10^6 CFU/mL，转化效率为 100%，目标基因片段平均长度大于 1 000 bp。(2)表达模式分析发现，*PhLDOX* 基因在红色果肉种质中的表达水平显著高于黄色果肉种质。(3)启动子序列预测发现，*PhLDOX* 基因启动子含有多种光响应、激素信号响应等元件及转录因子结合元件。(4)结合酵母单杂交与表达模式筛选得到 *PhLDOX* 基因上游的 3 个转录因子：ERF/AP2(Ph0214288)和 WD40(Ph0209298、Ph0209443)。**【结论】**本研究成功构建了高质量的欧李果肉酵母 cDNA 文库，并从中筛选获得 3 个可能通过调控欧李花青素合成关键基因 *PhLDOX* 表达的调控因子。研究结果为进一步解析欧李不同颜色果肉呈色的分子调控机制提供了重要理论依据和关键候选基因资源，并对后续开展欧李色泽性状的分子标记辅助育种以及品质改良具有重要的应用价值。

关键词：欧李；果肉；*PhLDOX* 基因；花青素；cDNA 文库；酵母单杂交；转录因子；呈色调控机制；分子育种
中图分类号：S662.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2026)03−0191−12
引文格式：夏举国，王淋，包文泉，等. 欧李果肉酵母 cDNA 文库构建及 *PhLDOX* 基因上游调控因子筛选［J］. 北京林业大学学报，2026，48(3)：191−202. Xia Juguo, Wang Lin, Bao Wenquan, et al. Construction of yeast cDNA library of *Prunus humilis* flesh and screening for upstream regulatory factors of *PhLDOX* gene[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(3): 191−202.

Construction of yeast cDNA library of *Prunus humilis* flesh and screening for upstream regulatory factors of *PhLDOX* gene

Xia Juguo[1,2]　Wang Lin[1]　Bao Wenquan[2]　Ao Dun[2]　Chen Junxing[2]　Kang Jiaqi[2]
(1. Research Institute of Non-Timber Forestry, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China;
2. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, Inner Mongolia, China)

Abstract:［**Objective**］The flesh of *Prunus humilis* has bright color, unique flavor and significant economic value. However, the molecular regulation mechanism of flesh color remains unclear. In this study, the yeast

收稿日期：2025−07−30　**修回日期：**2025−10−22
基金项目：林学一级学科自设科研项目(LX20250625-2)。
第一作者：夏举国。主要研究方向：森林培育学，经济林栽培与利用。Email：2573154906@qq.com　地址：010019 内蒙古自治区呼和浩特市赛罕区学苑东街 275 号内蒙古农业大学林学院。
责任作者：王淋，副研究员。主要研究方向：经济林重要性状形成与调控。Email：wanglin1815@163.com　地址：450003 河南省郑州市金水区纬五路 3 号中国林业科学研究院经济林研究所。
本刊网址：https://j.bjfu.edu.cn；https://journal.bjfu.edu.cn

cDNA libraries of *P. humilis* flesh were constructed, and Y1H method was used to screen upstream regulators of the anthocyanin biosynthesis gene *PhLDOX*, aiming to lay a preliminary theoretical foundation for revealing the color regulation mechanism of *P. humilis* flesh, and provide important gene resources for future molecular breeding of *P. humilis*. [**Method**] Flesh samples from red- and yellow-fleshed *P. humilis* at different developmental stages were used as materials. Yeast cDNA libraries were constructed via Gateway BP and LR recombination reactions. The expression pattern of *PhLDOX* and *cis*-acting elements in its promoter were analyzed using RT-qPCR and PlantCARE. The promoter sequence of *PhLDOX* was cloned and used to construct a bait vector. The regulatory factors were screened from the libraries by YIH and further identified in combination with transcriptome data. [**Result**] The quality identification of the primary library revealed that the library capacity and library titer were 1.6×10^7 CFU and 8.0×10^6 CFU/mL, respectively. The secondary library had a capacity of 1.6×10^7 CFU and a titer of 7.8×10^6 CFU/mL, the recombination rate was 100%, and the average length of insert fragment as more than 1 000 bp. The expression pattern analysis showed that the expression level of *PhLDOX* gene in red flesh was higher than that in yellow flesh. Promoter sequence prediction showed that the *PhLDOX* gene promoter contained various light-responsive elements, hormone-responsive elements, and transcription factor binding elements. Y1H combined with expression pattern analysis demonstrated that three transcription factors, including ERF/AP2 (Ph0214288) and WD40 (Ph0209298, Ph0209443), could bind to the *PhLDOX* gene promoter. [**Conclusion**] In this study, high-quality yeast cDNA libraries of different colors flesh from *P. humilis* with were successfully constructed. Three regulatory factors, which may be involved in anthocyanin synthesis by regulating the expression of *PhLDOX*, were identified. The results provide an important theoretical basis and key candidate gene resources for further analysis of the molecular regulation mechanism of flesh coloration in different colors of *P. humilis*, and have important application value for subsequent molecular breeding and quality improvement of flesh color traits in *P. humilis*.

Key words: *Prunus humilis*; fruit flesh; *PhLDOX* gene; anthocyanin; cDNA library; yeast one-hybrid; transcription factor; coloration regulation mechanism; molecular breeding

欧李(*Prunus humilis*)是蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus*)落叶灌木，为中国特有植物，主要分布在山西、河北、内蒙古、吉林和黑龙江等地，兼具重要生态和经济价值[1]。欧李根系发达，抗旱性强，是干旱地区生态治理的优选树种[2]。欧李果实富含多酚类物质，其总黄酮与总酚含量高于蓝莓(*Vaccinium corymbosum*)、黑莓(*Rubus fruticosus*)等，类黄酮物质含量约为樱桃(*Prunus pseudocerasus*)、草莓(*Fragaria* × *ananassa*)的 3 倍，花青素含量为蓝莓的 4 倍，且钙含量更是高达 0.9 mg/g，是苹果(*Malus pumila*)的 7 ~ 10 倍，被誉为“天然钙库”[3−5]。欧李果实色泽鲜艳，主要有红、黄、紫 3 种颜色，其果实色泽、品质与其花青素含量密切相关，高花青素含量使欧李成为一种高价值功能性水果[6]。

花青素是一类重要的植物次生代谢产物，其合成受 *PAL*、*CHS*、*LDOX* 等基因与转录因子(MYB、bHLH、WD40 等)协同调控[7]。无色花青素双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase，LDOX)，又称花青素合成酶(anthocyanidin synthase，ANS)，属于氧化戊二酸依赖性加氧酶家族，可催化无色花青素转化为有色花青素，直接决定花青素积累与显色[8]。研究[9]表明，*PhLDOX* 基因是合成花青素并使欧李果实显现为红色的关键基因。在棉花(*Gossypium hirsutum*)中，*GhLDOX* 基因突变体植株不含花青素，而超表达 *GhLDOX* 基因的植株花青素含量显著增加，且花青素含量与 *GhLDOX* 基因表达呈正相关[10]；在闽侯野生蕉(*Musa itinerans*)中，*MiLDOX* 基因在果皮转色阶段的表达量随色素积累逐渐升高，表明该基因在果皮花青素积累的过程中发挥关键作用[11]；此外，*LDOX* 基因的表达可受多种转录因子调控。核桃(*Juglans regia*)JrMYB27/113[12]、青蒿(*Artemisia annua*)AaYABBY5[13]、绿豆(*Vigna radiata*)VrNAC92[14]、葡萄(*Vitis vinifera*)VvBZR1[15]、茶树(*Camellia sinensis*)CsAN1[16]等转录因子，通过结合 *LDOX* 基因的启动子区域，促进其表达，进而调控花青素合成。

酵母 cDNA 文库是挖掘功能基因的有效手段，目前，构建 cDNA 文库常用的技术主要有 SMART 和 Gateway 技术[17]。酵母单杂交技术是研究转录调控的常用方法，可用于分析并鉴定靶基因启动子区域与转录因子的特异性结合。目前，通过建立酵母

cDNA 文库结合酵母单杂交技术筛选转录因子的相关研究日益增多。例如，通过构建油桃（*Prunus persica*）花芽 cDNA 文库，利用酵母单杂交技术筛选到了与 *PpABI5* 基因启动子结合的两个转录因子 PpDAM3 和 PpDAM5[18]；通过构建葡萄冬芽 cDNA 文库，利用酵母单杂交技术筛选获得与 *VvFT* 基因启动子结合的转录因子 VvDnaJ10[19]；通过构建甘薯（*Ipomoea batatas*）叶酵母 cDNA 文库，并运用酵母单杂交技术，筛选出能够与 *IbHQT*1 基因启动子特异性结合的上游调控因子 IbMYB11 及 IbTGA2.2[20]；通过构建水稻（*Oryza sativa*）幼苗 cDNA 文库，利用酵母单杂交技术筛选获得与 *LAZY*1 基因启动子结合的正调控因子 OsMBF1[21]。

目前对于欧李 *PhLDOX* 基因上游转录因子的转录调控机制仍属空白。基于此，本研究以欧李不同发育时期的红色与黄色果肉为研究材料，拟采用 Gateway 技术，通过 BP 及 LR 重组反应，分别构建酵母 cDNA 初级文库和次级文库，同时利用 RT-qPCR 分析 *PhLDOX* 基因在欧李红色与黄色果肉不同发育时期中的表达模式，克隆获得 *PhLDOX* 基因的启动子序列，明确其顺式作用元件组成和转录因子结合位点，通过酵母单杂交技术筛选与 *PhLDOX* 基因启动子结合的上游调控因子。研究结果将为深入解析 *PhLDOX* 基因在欧李果肉花青素合成中的功能及其转录调控机制提供理论依据，为后续进一步开展欧李分子设计育种、实现种质精准改良提供科学指导。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验材料为欧李不同种质资源，种植于内蒙古农业大学林学院苗圃，其中红色果肉欧李种质（R-Ph）来自陕西省榆林市，黄色果肉欧李种质（Y-Ph）来自内蒙古自治区呼和浩特市。果实样本采集时间为 2022 年 6 月 13 日—9 月 7 日，每次采样时间间隔 7～14 d，共采集 10 次样，时期依次为开花后 28、42、56、70、77、84、91、98、105 和 112 d。2 个种质各时期果肉颜色状态如图 1 所示。其中，花后 28 d 为幼果期，花后 84 d 为转色期，花后 112 d 为成熟期。

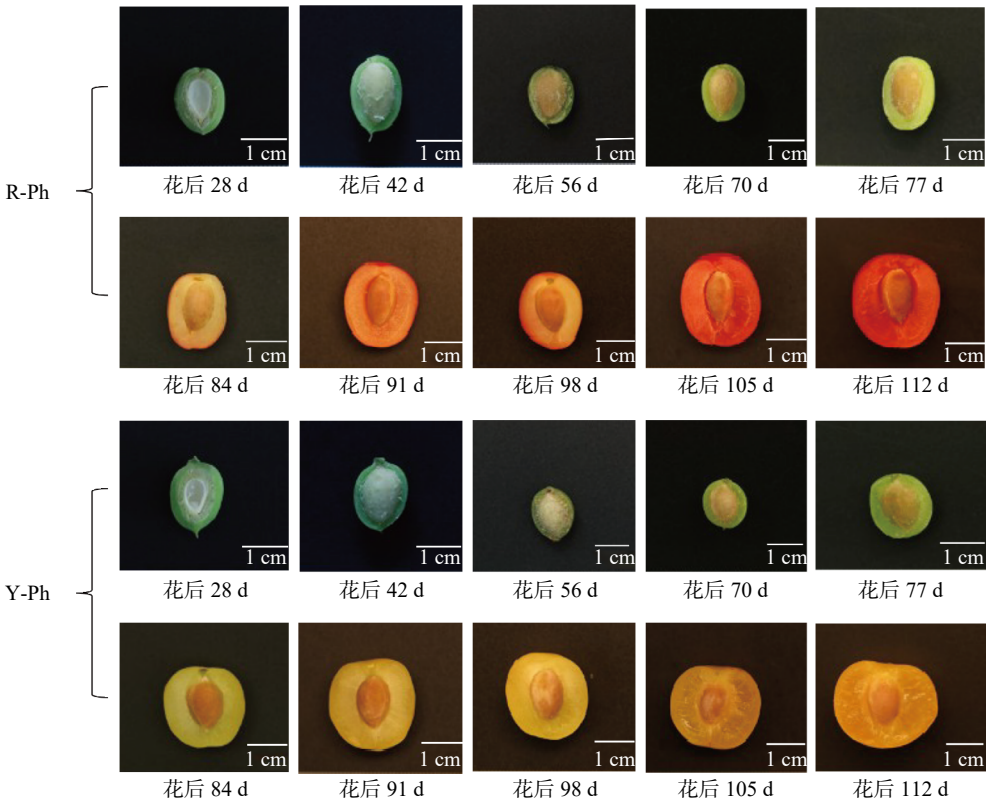
菌株材料为 Electro MAX™ DH10B T1 噬菌体耐受感受态细胞。

1.2　研究方法

1.2.1　cDNA 文库构建与质量检测

1.2.1.1　提取总 RNA 及纯化 mRNA

采用 CTAB 法提取 R-Ph 开花后 56、70、77、91、98 和 105 d 和 R-Ph 开花后 42、56、70、77、91、98、



R-Ph 为红色果肉欧李种质，Y-Ph 为黄色果肉欧李种质。下同。

图 1　不同欧李种质不同时期果肉颜色

Fig. 1　Flesh color of different *P. humilis* germplasms in various developmental stages

105 和 112 d 的果肉总 RNA。通过紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度，并采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带完整性。将各时期 RNA 稀释至 200 ng/μL 后取等量 RNA 充分混匀，参考 Dynabeads™ mRNA 纯化试剂盒说明书对 mRNA 进行分离纯化。

1.2.1.2 构建与检测初级文库

以分离纯化的 mRNA 为模板，参考 CloneMiner 和 Gateway™ BP Clonase™ II 酶说明书，进行 cDNA 第一、二链的合成，获得双链 cDNA 后，通过 BP 重组反应构建酵母初级文库，转化、摇菌后获得菌液。采用单菌落 PCR 进行鉴定，PCR 扩增反应体系和反应程序参照 2 × Phanta Flash Master Mix（Dye Plus）说明书进行，扩增产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。其中，正、反向引物分别为 pDONR222-F(5′-TCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTT-3′)和 pDONR222-R(5′-AGAGCTGCCAGGAAACAGCTATGACCATGTAATACGACTC-3′)。

为对文库质量进行评价，分别计算文库库容、转化效率、文库滴度，计算公式[17]如下

$$C = \left(\frac{N_1}{V_1}\right) A V_2 \tag{1}$$

式中：C 为文库库容(CFU)，N_1 为平板菌落数，V_1 为涂布平板菌液体积(0.05 mL)，A 为稀释倍数(1 000 倍)，V_2 为文库菌液总体积(2 mL)。

$$R = y/Y \times 100\% \tag{2}$$

式中：R 为转化效率(%)，y 为转化成功的菌落数，Y 为检测的总菌落数。

$$T = (N_2/V_3)B \tag{3}$$

式中：T 为文库滴度(CFU/mL)，N_2 为平板菌落数，V_3 为涂布平板菌液体积(0.05 mL)，B 为稀释倍数(1 000 倍)。

当文库目的基因片段 > 500 bp，文库库容、文库滴度 > 1 × 10^6 CFU/mL，转化效率 > 90% 时，视为达到文库质量标准[22]。

1.2.1.3 构建与检测次级文库

以初级文库菌液为模板，参照 Gateway™ LR Clonase™ II 酶说明书进行 LR 重组反应构建酵母次级文库并转化、摇菌后获得菌液。文库质量鉴定方法同 1.2.1.2 初级文库，其中，正、反向引物分别为 T7(5′-TAATACGACTCACTATAGG-3′)和 3AD(5′-AGATGGTGCACGATGCACAG-3′)。

1.2.2 欧李 *PhLDOX* 基因分析

1.2.2.1 *PhLDOX* 基因的表达模式分析

为了明确 *PhLDOX* 基因在欧李花青素合成中的调控作用，采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)对欧李红色果肉和黄色果肉种质不同发育时期中 *PhLDOX* 基因的表达模式进行分析。采用 FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit 提取欧李花后 28 d(幼果期)、84 d(转色期)和 112 d(成熟期)果肉总 RNA，利用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+ gDNA wiper)获得第一链 cDNA。利用在线网站(https://www.biorun.com/tools/)设计 *PhLDOX* 基因引物，正、反向引物分别为 F：5′-GTTCCCACCATTGATTTGAAGG-3′和 R：5′-GCCTCAATG TAATCAGCAGG-3′，以欧李的 *PhAction* 基因[23]为内参对照，正、反向引物分别为 F：5′-GCAGCGACTGAAGACATACAAG-3′和 R：5′-GGTGGCATTAGCAAGTTCCTT-3′，RT-qPCR 反应体系及运行程序参照 SuperStar Universal SYBR Master Mix 说明书，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 测定基因的相对表达量。

1.2.2.2 *PhLDOX* 基因启动子顺式作用元件分析与克隆

根据欧李参考基因组[24]，选取 *PhLDOX* 基因 CDS 上游 1 800 bp 的区域作为启动子序列，在 PlantCARE 在线网站上进行顺式作用元件预测分析。利用 NCBI 网站设计扩增 *PhLDOX* 基因启动子序列引物(F：5′-CAACAGACTTTTCCATCTAACC-3′；R：5′-CATCCACTATGGGCCTGAATTG-3′)。采用 CTAB 法提取 R-Ph 成熟期(开花后 112 d)果肉总 DNA 作为模板，PCR 扩增条件及扩增程序参照 2 × Phanta Flash Mix（Dye Plus）说明书设置。

1.2.3 *PhLDOX* 基因上游转录因子筛选

1.2.3.1 诱饵载体构建

将 1.2.2.2 获得的 *PhLDOX* 基因启动子目的片段 PCR 产物进行胶回收后，通过 *EcoR*I(GAATTC)和 *Sac*I(GAGCTC)限制性内切酶双酶切后定向连接至 pHIS2 载体上，获得诱饵载体(pHIS2-pro*PhLDOX*)，并进行测序。之后将诱饵载体转化 Y187 酵母菌株，涂布于 SD/-Trp 平板上，30 ℃ 培养 3 ~ 5 d，获得可用于后续筛选的诱饵酵母菌株。

1.2.3.2 自激活检测

为避免诱饵载体自身启动报告基因表达而产生假阳性，需确定可抑制诱饵酵母自激活的最佳 3-氨基-1,2,4-三氮唑(3-amino-1,2,4-triazole，3-AT)浓度。将诱饵载体 pHIS2-pro*PhLDOX* 和阳性对照 pHIS2-p53 + pGAD53m 分别转入 Y187 酵母菌株，30 ℃ 培养 3 ~ 5 d 后，选取上述转化生长良好的单菌落(直径 2 ~ 3 mm)重悬于 1 mL 0.9% NaCl 溶液中，调节 OD_{600} 至 0.002 后，吸取 100 μL 菌液分别涂布于含 0、10、20、30、40、50、60、70、80 mmol/L 不同 3-AT 浓度的平板上，其中阳性对照 pHIS2-p53 + pGAD53m

涂布于 SD/-His/-Leu/-Trp 平板，pHIS2-pro*PhLDOX* 涂布于 SD/-His/-Trp 平板，30 ℃ 培养 3 ~ 5 d，观察生长情况。以完全抑制诱饵酵母生长的最低 3-AT 浓度作为最佳抑制浓度，用于后续酵母单杂交筛选。

1.2.3.3　酵母单杂交筛选

通过酵母单杂技术，利用诱饵载体，从上述构建好的 cDNA 文库中初步筛选阳性菌株。分别取 25 μg 次级文库质粒转化至诱饵酵母菌株中，得到 6 mL 悬浮菌液，进行 2 次筛选培养。初次培养将菌液均匀涂布于含有最佳抑制浓度 3-AT 的 SD/-His/-Leu/-Trp 平板上，30 ℃ 培养 3 ~ 5 d。之后将初次培养平板上正常生长的菌落转移至新的 SD/-His/-Leu/-Trp + 3-AT 平板上再次培养验证，获得阳性候选菌落。本研究所用阴性对照为 pHIS2-p53 + pGADT7-empty。

1.2.3.4　阳性菌落测序、比对以及表达模式分析

挑取阳性候选菌落进行单菌落 PCR 鉴定和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，选取插入片段大于 500 bp 的 PCR 产物测序，去除空载体和重复序列，对最终获得的序列利用 BLASTn 与欧李基因组进行比对，获得候选调控因子，并利用欧李转录组数据[25]，分析候选调控因子的表达模式，进一步筛选欧李 *PhLDOX* 基因的上游潜在转录因子。

1.3　数据分析

采用 OriginPro 2025 绘图，IBM SPSS Statistics 27 软件进行数据统计与分析，组间差异比较采用单因素方差分析（ANOVA），以 $p < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的判定标准。

2　结果与分析

2.1　欧李不同颜色果肉 RNA 质量鉴定

紫外分光光度计结果显示：RNA 质量浓度区间为 518 ~ 917 ng/μL，OD_{260}/OD_{280} 值均大于 1.80（表 1）。1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示，RNA 电泳条带清晰，比例正常（图 2）。以上结果综合表明 RNA 无明显降解，纯度较高，可进行后续试验。mRNA 分离纯化结果显示：经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，电泳图谱呈现弥散状条带分布特征，且条带主要集中在 100 ~ 2 000 bp 的片段区间内，这充分表明分离获得的 mRNA 样品质量优良，具备较高的完整性和纯度（图 3）。

2.2　双链 cDNA 合成

以分离纯化的 mRNA 为模板，合成双链 cDNA。1% 琼脂糖凝胶电泳结果（图 4）显示，双链 cDNA 条带呈弥散分布，且 cDNA 长度主要在 750 bp 以上，表明双链 cDNA 合成效果理想。同时，电泳图中未出现明显亮带，进一步说明均一化处理成功。此外，500 bp 条带以下无明显小片段，证实小片段已有效去除，这为后续构建 cDNA 文库质粒奠定了良好基础。

2.3　初级文库的构建

初级文库菌液涂板统计结果显示：平板上菌落数为 399 个（图 5），据公式（1）计算得出欧李初级文库库容为 1.6×10^7 CFU。随机选取 24 个单菌落进行

表 1　欧李不同颜色种质不同时期的果肉总 RNA 质量

Tab. 1　Quality of total RNA in flesh of different colored germplasms of *P. humilis* at different stages

样本名称	质量浓度/(ng·μL^{-1})	总量/μg	OD_{260}/OD_{280}
R-Ph-56	557	55	2.12
R-Ph-70	656	65	1.87
R-Ph-77	716	71	2.08
R-Ph-91	917	91	2.06
R-Ph-98	518	51	2.06
R-Ph-105	608	60	2.16
Y-Ph-42	699	69	1.81
Y-Ph-56	878	87	2.10
Y-Ph-70	671	67	1.85
Y-Ph-77	712	71	2.08
Y-Ph-91	667	66	1.96
Y-Ph-98	866	86	1.85
Y-Ph-105	593	59	1.81
Y-Ph-113	624	62	1.89

注：样本名称中的数字为开花后的取样时间，如56为开花后56 d取样，以此类推。

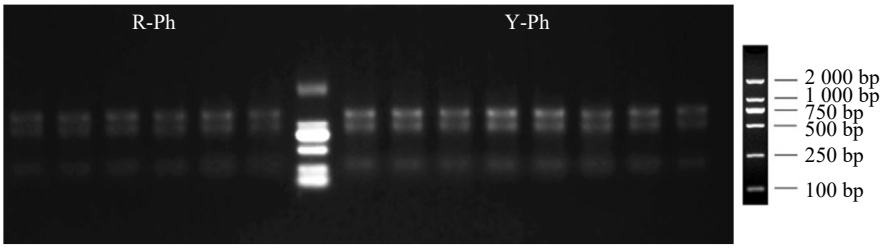


图 2　总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2　Total RNA agarose gel electrophoresis results

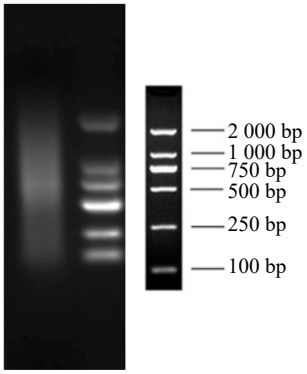


图 3 纯化 mRNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Purified mRNA agarose gel electrophoresis results

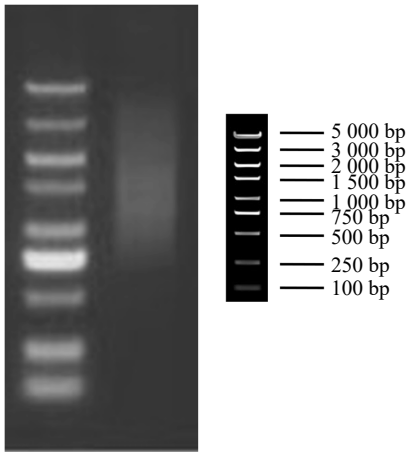


图 4 双链 cDNA 合成电泳结果

Fig. 4 Double-stranded cDNA synthesis electrophoresis result

PCR 鉴定，所有单菌落均扩增出明亮条带，依据公式(2)确定转化效率为 100%，且目标基因片段长度平均超过 1 000 bp(图 6)。最终通过公式(3)计算文库滴度为 8.0×10^6 CFU/mL，符合初级文库质量标准。

2.4 次级文库的构建

次级文库涂板统计结果显示，平板上菌落数为 388 个(图 7)，据公式(1)计算得出欧李次级文库库容为 1.6×10^7 CFU。随机选取 24 个单菌落进行 PCR 鉴定，所有单菌落均扩增出明亮条带，依据公式(2)确定转化效率为 100%，且目标基因片段长度平均超过 1 000 bp(图 8)。最终通过公式(3)计算文库滴度

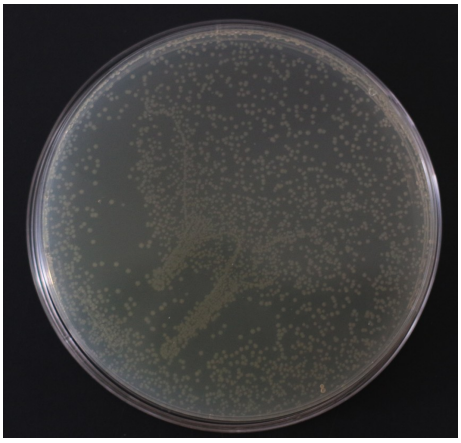


图 5 初级文库菌落生长情况

Fig. 5 Colony growth of primary library

为 7.8×10^6 CFU/mL，符合次级文库质量标准。

2.5 *PhLDOX* 基因在红色和黄色果肉不同发育时期的表达分析

为了明确 *PhLDOX* 基因在欧李花青素合成中的调控作用，检测其在欧李不同颜色果实不同发育期的表达模式。结果(图 9)表明：*PhLDOX* 基因在红色果肉不同发育时期的表达水平均显著高于黄色果肉，且在红色果肉成熟时期表达量最高，在黄色果肉成熟时期表达量最低，说明 *PhLDOX* 基因参与调控欧李红色果肉的形成。

2.6 *PhLDOX* 基因启动子顺式作用元件预测分析

PlantCARE 在线工具预测显示，*PhLDOX* 基因启动子序列中共有 34 种顺式作用元件，主要包括：光响应元件，如 ACE、Box4、G-Box、G-box、GA-motif、LAMP-element、TCT-motif 等；激素响应元件，如 ABRE、ERE、P-box、TCA-element 等；生长发育响应元件，如 CAT-box、CCGTCC-box 等；应激防御响应元件，如 ARE、STRE 等(表 2)。以上结果表明 *PhLDOX* 基因可能参与欧李多个生物学过程，包括光响应、激素信号转导、组织发育及昼夜节律调控等；同时，其启动子区域富含多种转录因子结合元件，暗示该基因的表达可能受到多个转录因子的协同调控，这为后续进一步筛选其上游转录因子奠定了前期

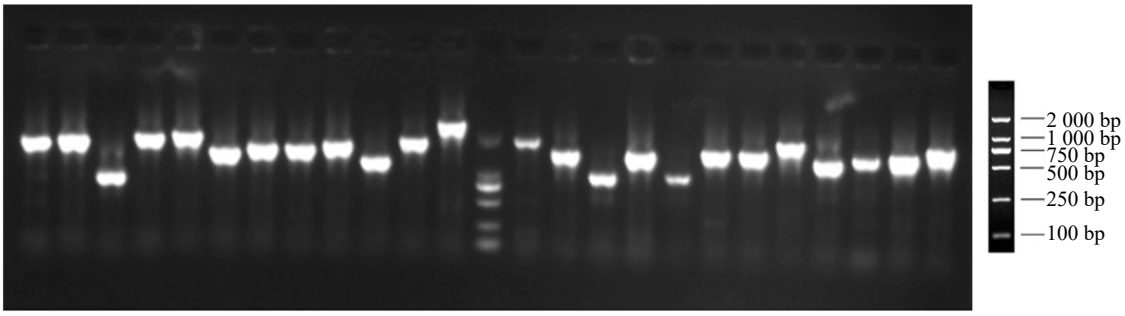


图 6 初级文库单菌落 PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of primary library single colonies by PCR

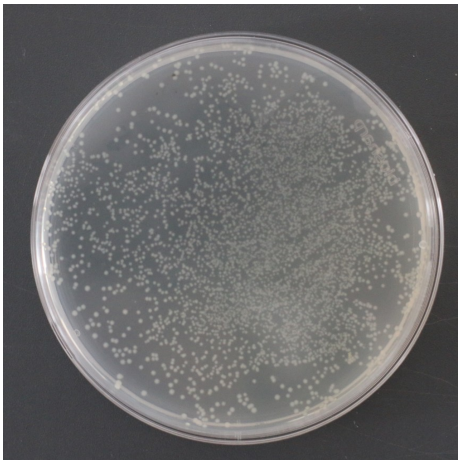


图 7　次级文库菌落生长情况

Fig. 7　Colony growth of secondary library

基础。

2.7　*PhLDOX* 基因启动子诱饵载体的构建以及自激活检测

前期研究[26−28]表明，ABRE、Myb-binding site 等顺式作用元件参与调控花青素的生物合成。因此，本研究选取 *PhLDOX* 基因上游包含 ABRE、MYB 及 Myb-binding site 等顺式作用元件的启动子区域进行克隆，并构建诱饵载体。结果(图 10)显示，pro*PhLDOX* 连接至 *Eco*RI 和 *Sac*I 酶切位点之间，表明诱饵载体 pHIS2-pro*PhLDOX* 构建成功。自激活检测结果(图 11)显示，在添加 30 mmol/L 3-AT 的平板上无菌落生长，表明此浓度可用于后续酵母单杂交实验筛选工作。

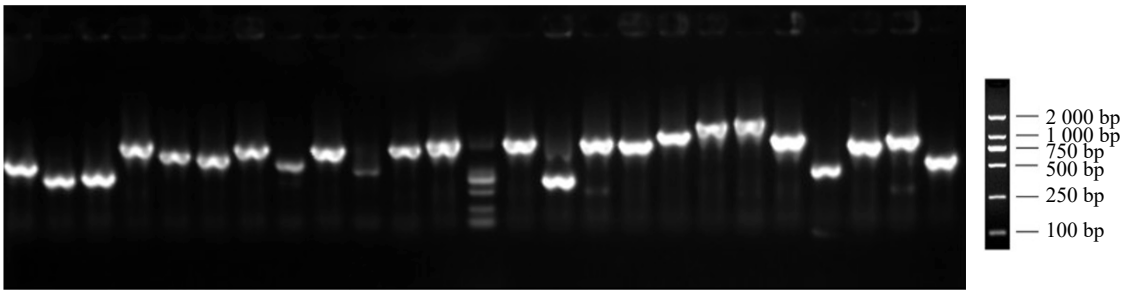
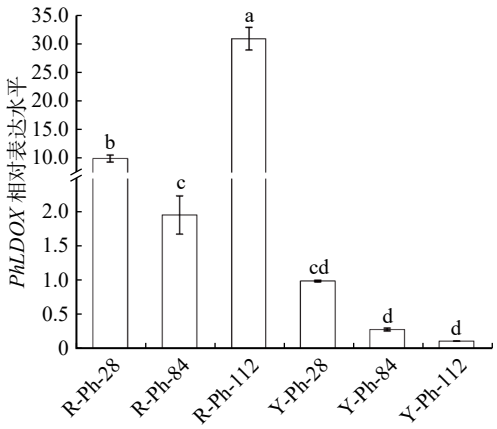


图 8　次级文库单菌落 PCR 鉴定

Fig. 8　Identification of secondary library single colonies by PCR



R-Ph-28、Y-Ph-28 为幼果期；R-Ph-84、Y-Ph-84 为转色期；R-Ph-112、Y-Ph-112 为成熟期。不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图 9　欧李红色与黄色果肉 *PhLDOX* 基因不同时期表达模式分析

Fig. 9　Analysis of expression patterns of *PhLDOX* gene of red and yellow pulp in different periods of *P. humilis*

2.8　*PhLDOX* 基因上游调控因子筛选

将构建好的文库质粒转化到 pHIS2-pro*PhLDOX* 诱饵载体酵母菌中，经过初次筛选培养，观察到平板上可见少量单菌落(图 12A)；二次筛选培养后，平板长出多个单菌落(图 12B)。选取二次培养中正常生长的菌落进行 PCR 验证，结果显示阳性菌落扩增片段大小均在 500 bp 以上，多数菌落呈现单一特异性条带(图 12C)，表明文库质粒成功转化至 Y187-Bait 酵母菌株，将单一条带的 PCR 产物送测序。

基于欧李基因组数据，将获得的阳性菌落测序结果进行 BLASTn 比对，初步共筛选到 6 个候选转录因子，主要包括 ERF/AP2(Ph0214288)、bHLH(Ph0221100 和 Ph0220072)和 WD40(Ph0220170、Ph0209298 和 Ph0209443)。分析转录因子在红色与黄色果肉不同发育时期的表达模式发现，WD40(Ph0209298)的表达水平在红色果肉种质(R-Ph)不同时期发育过程中均高于黄色果肉种质(Y-Ph)，而 ERF/AP2(Ph0214288)和 WD40(Ph0209443)的表达水平则在 R-Ph 不同时期发育过程中均低于 Y-Ph(图 13)。结合对 *PhLDOX* 基因启动子序列分析显示，其上游区域含有 ABRE、MYB 及 Myb-binding site 等顺式作用元件。据此推测，WD40(Ph0209298、Ph0209443)与 ERF/AP2(Ph0214288)转录因子可通过结合上述顺式元件，调控 *PhLDOX* 基因的表达，进而参与欧李果肉中花青素的生物合成过程。

3　讨　　论

近年来，如何提升欧李果实的色泽外观与营养品质，已成为欧李产业发展中亟待解决的关键问题。欧李果实色泽与营养品质的形成，不仅受光照、水分、

表 2 *PhLDOX* 基因启动子序列顺式作用元件

Tab. 2 *PhLDOX* gene promoter sequence *cis*-acting elements

顺式作用元件	基序	位置	功能注释	类型
ACE	CTAACGTATT	411 −	光响应	光响应元件
Box 4	ATTAAT	50 +	光响应	
G-Box	CACGTT	557 −	光响应	
G-box	CACGAC	777 +	光响应	
GA-motif	ATAGATAA	1 199 +	光响应	
LAMP-element	CTTTATCA	658 −	光响应	
MRE	AACCTAA	711 +	光响应的MYB结合位点	
TCT-motif	TCTTAC	1 789 −	光响应	
ABRE	ACGTG	558 +	脱落酸反应	激素响应元件
ERE	ATTTTAAA	721 −	乙烯响应	
GARE-motif	TCTGTTG	1 705 −	赤霉素响应	
P-box	CCTTTTG	188 −	赤霉素响应	
TCA-element	CCATCTTTTT	210 −	水杨酸反应	
CAT-box	GCCACT	963 −	分生组织表达	生长发育响应元件
GC-motif	CCCCCG	1 252 +	缺氧特异性诱导	
circadian	CAAAGATATC	1 016 +	昼夜节律调控	
A-box	CCGTCC	1 609 −	顺式作用反应元件	
MBS	CAACTG	1 216 +	干旱诱导的MYB结合位点	应激防御响应元件
ARE	AAACCA	1 129 +	厌氧诱导	
STRE	AGGGG	1 435 +	应激反应	
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	537 +	防御和压力反应	
CAAT-box	CAAT	45 +	启动子和增强子区域	启动子序列均有的基本元件
TATA-box	TATA	31 +	核心启动子元件	
AT ~ TATA-box	TATATA	1 268 −	–	
TATA	TATAAAAT	1 270 +	–	
MYB	CAACCA	294 +	MYB识别和结合位点	–
MYC	CATTTG	839 +	MYC识别和结合位点	
Myb	TAACTG	715 +	Myb识别和结合位点	
Myb-binding site	CAACAG	387 +	Myb识别和结合位点	
Myc	TCTCTTA	924 −	Myc识别和结合位点	
CCGTCC motif	CCGTCC	1 609 −	–	–
CCGTCC-box	CCGTCC	1 609 −	–	
Unnamed__4	CTCC	618 +	–	
box S	AGCCACC	1 682 −	–	

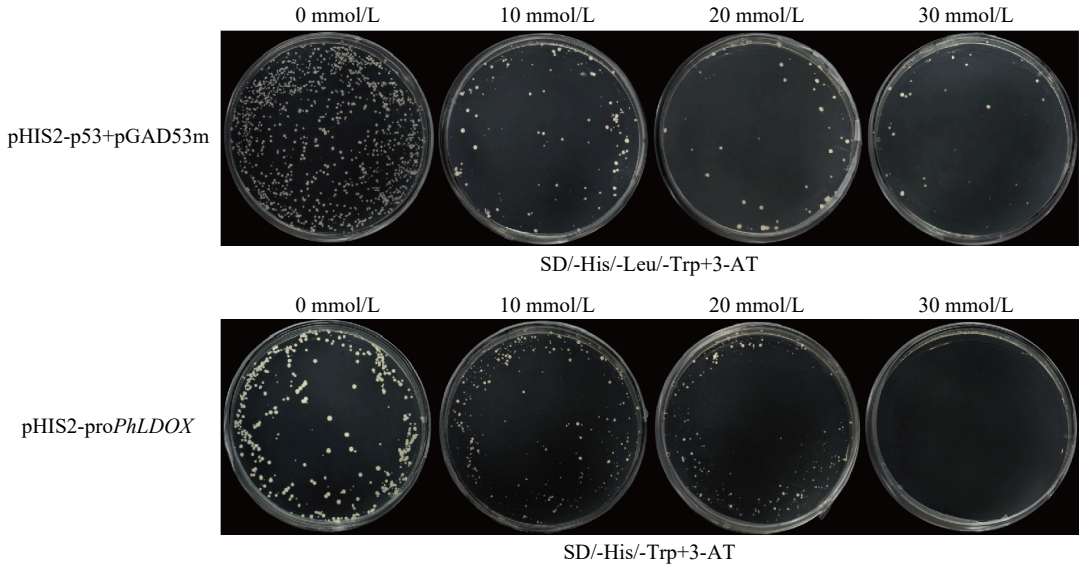
注：位置列中的“+”表示正向序列，“−”表示反向序列；功能注释和类型列中的“–”表示未明确功能或分类。



蓝色序列表示参考基因组中 pro*PhLDOX* 序列。

图 10 诱饵载体 pHIS2-pro*PhLDOX* 测序结果

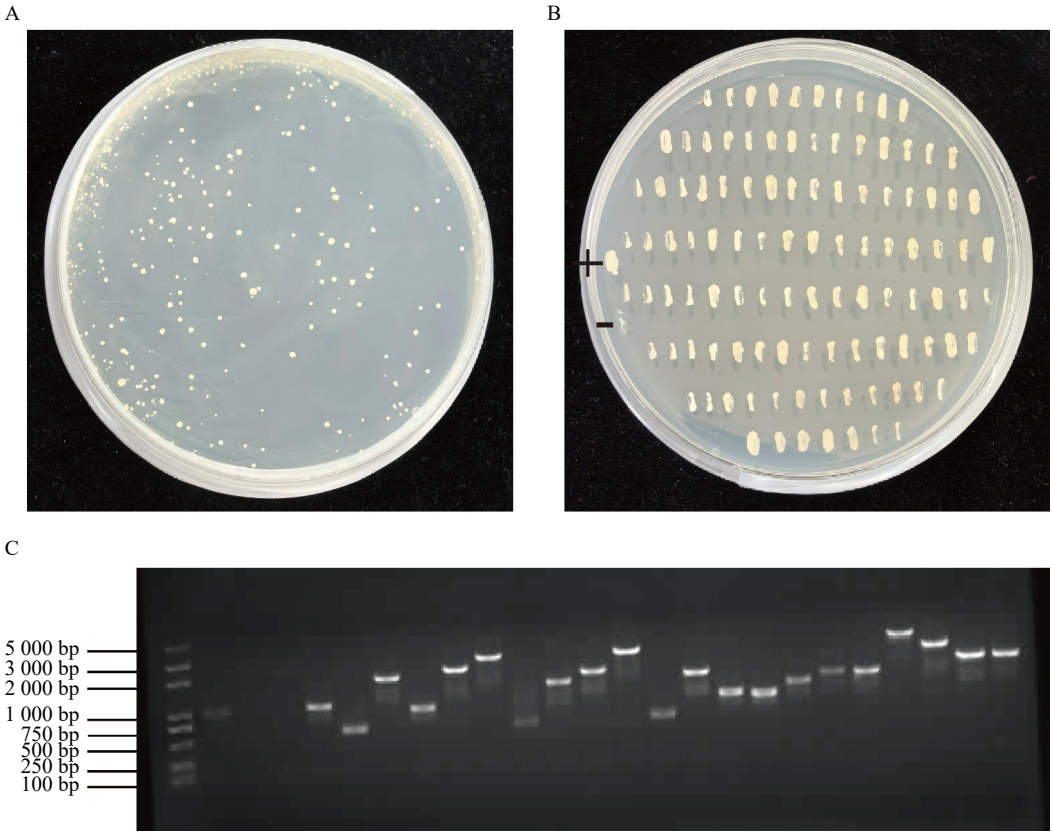
Fig. 10 Sequencing results of bait vector pHIS2-pro*PhLDOX*



pHIS2-pro*PhLDOX* 为实验组，pHIS2-p53+pGAD53m 为阳性对照。

图 11　自激活检测

Fig. 11　Self-activation detection



A. 初次筛选培养单菌落；B. 再次筛选培养单菌落；C. 菌落 PCR验证。“+”表示阳性对照 pHIS2-p53+pGAD53m，“−”表示阴性对照 pHIS2-p53+pGADT7-empty

图 12　酵母单杂交筛选 *PhLDOX* 基因上游调控因子

Fig. 12　Screening of upstream regulatory factors *PhLDOX* gene by yeast one-hybrid

温度等环境因子影响，同时也依赖于相关功能基因的表达调控。*LDOX* 基因是花青素生物合成关键基因，在调控果实花青素积累、果实着色发育等过程中发挥重要作用。已有研究表明，*LiANS* 基因在紫薇（*Lagerstroemia indica*）红色与紫色花瓣中的表达量显著高于白色花瓣[29]；*MdANS* 基因在红肉苹果成熟果实中显著上调，而在白肉苹果中显著下调[30]；*PgLDOX* 基因在石榴（*Punica granatum*）两个红色假种皮品种中的表达水平显著高于白色假种皮品种[31]。本研究发现，*PhLDOX* 基因在红色果肉欧李种质的

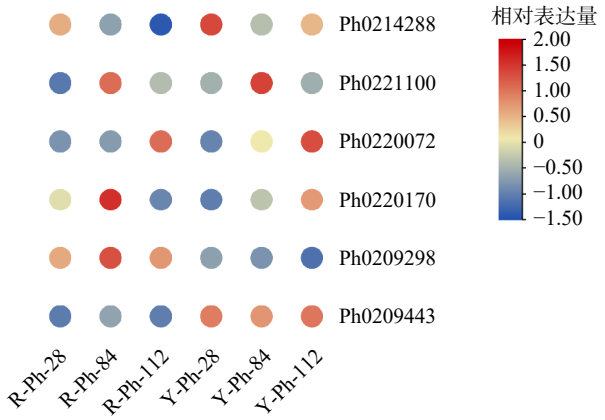


图 13 筛选出的转录因子在欧李不同种质不同时期的表达模式

Fig. 13 Expression patterns of the screened transcription factors in different germplasms and developmental stages of *P. humilis*

不同发育时期均显著高于黄色果肉欧李种质，是调控欧李果肉色泽形成的关键候选基因，这与上述其他物种中的 *LDOX* 基因研究结果一致。

MYB 结合位点、激素响应元件和光响应元件等顺式作用元件与花青素的生物合成密切相关。已有研究[32]报道，甘薯 IbMYB1 转录因子可直接结合 *IbSLC35F1* 基因启动子的 MYB 识别位点（MRS）并激活其转录，进而协同调控 *IbCHS*、*IbDFR*、*IbUFGT*、*IbABC*、*IbGSTF3* 基因表达，最终促进花青素积累。bHLH 转录因子 AaBEE1 可结合 *AaLDOX* 基因启动子的 G-box 元件，通过抑制其表达负调控软枣猕猴桃（*Actinidia arguta*）的花青素合成[33]。NAC 转录因子 MdNAC77L 通过结合 CACG 顺式元件，促进 *MdANS* 基因的表达，显著提升红肉苹果花青素含量[34]。bZIP 转录因子 VvAREB2 能够结合 *VvmiR156b* 启动子区域的 ABRE 元件，并激活其表达，促进葡萄花青素积累[26]。本研究中对 *PhLDOX* 基因启动子顺式作用元件进行预测分析，其启动子序列中含有 MYB 结合位点、激素响应元件等顺式作用元件，进一步在调控元件层面说明 *PhLDOX* 基因参与调控欧李花青素生物合成。

本研究通过酵母单杂交文库筛选，并结合基因表达模式分析，共筛选到 ERF/AP2（Ph0214288）和 WD40（Ph0209298、Ph0209443）3 个转录因子可通过结合 *PhLDOX* 基因启动子区域的 ABRE 或 MYB 顺式作用元件调控其表达。ERF/AP2 家族转录因子在植物中多对花青素合成起负调控作用。例如，百合（*Lilium* spp.）LhERF061 可通过抑制 *LhDFR* 基因的表达，负调控百合花花青素合成[35]。梨（*Pyrus* spp.）PyERF4.1 与 PyERF4.2 过表达则可显著下调花青素合成关键基因 *PyDFR*、*PyANS* 及 *PyUFGT* 的表达，进而降低果皮花青素含量[36]。而 WD40 家族转录因子多在花青素合成途径中发挥正调控作用，例如，水稻中 OsTTG1 可通过激活 *OsANS1* 与 *OsANS2* 基因的表达，进而促进叶片、茎秆、叶鞘等器官花青素积累[37]。辣椒（*Capsicum annuum*）中 CaWD40-91 可与 CaDYT1（bHLH）和 CaAN1（MYB）蛋白相互作用，形成 MBW 复合物（CaAN1-CaDYT1-CaWD40-91）协同调控果实花青素的积累[38]。综上，本研究筛选获得的 ERF/AP2 与 WD40 转录因子可能通过正向或反向调控 *PhLDOX* 基因的转录表达，参与调控欧李果肉花青素合成。

本研究成功构建欧李果肉高质量酵母 cDNA 文库，为后续互作基因筛选和分子调控机制解析奠定了重要材料基础。通过筛选获得 ERF/AP2、WD40 等 3 个转录因子，初步证实其可能通过结合 *PhLDOX* 基因的启动子区域参与调控欧李果肉花青素合成，这为欧李分子育种提供了理论参考。但是，本研究仅分析了候选基因的表达模式，尚未开展功能验证以明确其具体功能。未来将进一步开展基因功能验证，构建 ERF/AP2/WD40-*PhLDOX* 欧李果肉花青素合成的分子调控模块，以期为其果实品质改良与分子育种提供更坚实的理论支撑。

4 结 论

本研究针对欧李果肉呈色的分子调控机制尚不明晰，花青素合成关键基因 *PhLDOX* 的上游调控因子未明确的研究空白，系统开展了欧李果肉酵母 cDNA 文库构建及 *PhLDOX* 基因上游调控因子筛选研究，研究得到以下结论。

（1）成功构建了高质量的欧李不同种质果肉酵母 cDNA 文库，其文库质量高、库容量达标、插入片段完整性好。

（2）*PhLDOX* 基因在红色果肉中的表达量显著高于黄色果肉，明确该基因是调控欧李花青素合成的关键候选基因。

（3）通过酵母单杂交筛选获得 ERF/AP2、WD40 等 3 个转录因子，该类转录因子可通过调控 *PhLDOX* 基因的表达，参与欧李果肉花青素合成的调控过程。

本研究结果将为揭示 *PhLDOX* 基因调控欧李果肉呈色的分子机制奠定核心基础，也为欧李精准分子育种提供关键候选基因资源；未来可重点围绕 ERF/AP2、WD40 转录因子以及 *PhLDOX* 基因，深入揭示其调控欧李果肉颜色的分子机制，构建以“ERF/AP2/WD40-*PhLDOX*”为核心的欧李果肉呈色调控分子网络。

参 考 文 献

[1] 刘一超. 欧李优良单株重要农艺性状的遗传多样性分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.

Liu Y C. Genetic diversity analysis of important agronomic traits in superior individual plant of the *Prunus humilis*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural, 2024.

[2] 田英. 宁夏荒漠草原撂荒地欧李栽培的饲用价值及对土壤质量影响研究 [D]. 银川: 宁夏大学, 2021.
Tian Y. Study on feeding value and effect on soil quality of *Cerasus humilis* cultivated at abandoned land in the Desert Steppe of Ningxia[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021.

[3] 邵郅胜, 张薇, 孙聪, 等. 欧李种质资源果实酚类物质分析及种质评价 [J]. 西北植物学报, 2023, 43(8): 1405−1414.
Shao Z S, Zhang W, Sun C, et al. Fruit phenolic content analysis and germplasm evaluation of *Cerasus humilis* germplasm resources [J]. Acta Boreali-Occidentalia Sinica, 2023, 43(8): 1405−1414.

[4] 覃志茂. 张莉. 邵郅胜. 等. 欧李果实黄酮组分及其抗氧化能力的研究 [J]. 中国果树, 2025(1): 35−41.
Tan Z M, Zhang L, Shao Z S, et al. Studies on the flavonoid fractions and antioxidant capacity in the fruits of *Cerasus humilis* [J]. China Fruits, 2025(1): 35−41.

[5] 吴春燕, 韩潇怡, 吴俊英, 等. 欧李营养价值及开发利用研究进展 [J]. 中国果树, 2024(2): 1−5,25.
Wu C Y, Han X Y, Wu J Y, et al. Research progress on nutritional value and development and utilization of *Cerasus humilis* (Bge.) Sok [J]. China Fruits, 2024(2): 1−5,25.

[6] 笈小龙. ChMYB1 调控欧李花青素合成的分子机制 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023.
Ji X L. Molecular mechanism of ChMYB1 regulating *Cerasus humilis* anthocyanin synthesis[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2023.

[7] 胡彦如, 黄兴连, 叶静文. 植物花青素合成及其调控因素研究进展 [J]. 生命科学研究, 2024, 28(6): 493−502.
Hu Y R, Huang X L, Ye J W. Research progress of anthocyanin synthesis and regulatory factors in plants [J]. Life Science Research, 2024, 28(6): 493−502.

[8] 张晓旭. 欧李再生体系的优化与 *LDOX* 基因转化初探 [D]. 太原: 山西农业大学, 2022.
Zhang X X, Optimization of Chinese dwarf cherry regeneration system and preliminary study on *LDOX* gene transformation[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2022.

[9] 付鸿博. 欧李果实类黄酮组分特征及 *CHS* 和 *LDOX* 基因克隆和功能验证 [D]. 太原: 山西农业大学, 2020.
Fu H B. Flavonoid component characteristics and functional identification of metabolism-related genes *CHS* and *LDOX* in Chinese dwarf cherry [*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.] fruit[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2020.

[10] Al-ariqi A S A M. 陆地棉基因 *GhLDOX* 和 *Gh*4*CL*3 的功能解析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Al-ariqi A S A M. Functional studies of *GhLDOX* & *Gh*4*CL*3 genes in upland cotton *Gossypium hirsutum*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.

[11] 车婧如, 孙雪丽, 王少娟, 等. 闽侯野生蕉 *LDOX* 基因的克隆及表达特性 [J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(2): 246−254.
Che J R, Sun X L, Wang S J, et al. Cloning and expression characteristics of the *LDOX* gene in *Musa itinerans* [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2020, 26(2): 246−254.

[12] Xu H F, Wang G F, Ji X Y, et al. JrATHB-12 mediates JrMYB113 and JrMYB27 to control the anthocyanin levels in different types of red walnut [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2024, 23(8): 2649−2661.

[13] Kayani S I, Shen Q, Rahman S U, et al. Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in *Artemisia annua* by AaYABBY5 [J]. Horticulture Research, 2021, 8: 257.

[14] 张德瑞. VrNAC92 和 VrNAC25 调控绿豆芽下胚轴花青苷合成的机理研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
Zhang D R. Mechanism study of VrNAC92 and VrNAC25 regulating anthocyanin biosynthesis in hypocotyls of mung bean sprouts[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.

[15] 周亚丽. VvBZR1 与 VvHY5 互作调控酿酒葡萄果皮花色苷合成的分子机制研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.
Zhou Y L. Molecular mechanism of VvBZR1 and VvHY5 regulating anthocyanin biosynthesis in grape berry skins[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2019.

[16] 孙彬妹. 茶树 MYB 转录因子 CsAN1 调控花青素的作用机制研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
Sun B M. Purple foliage coloration in tea (*Camellia sinensis* L.) arises from activation of an R2R3-MYB transcription factor CsAN1[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.

[17] 邓成燕, 王佳颖, 戴思兰. 矢车菊不同颜色花瓣酵母 cDNA 文库的构建 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(3): 115−122.
Deng C Y, Wang J Y, Dai S L. Construction of a yeast cDNA library using *Centaurea cyanus* petals of different colors [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(3): 115−122.

[18] 郇蕾, 王旭旭, 陈修淼, 等. 桃 ABA 信号关键基因 PpABI5 酵母单杂交文库构建及其上游转录因子的筛选 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(7): 1259−1266.
Huan L, Wang X X, Chen X M, et al. Constructing yeast one-hybrid library and screening the potential regulator of PpABI5 in peach (*Prunus persica*) [J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(7): 1259−1266.

[19] 黄桂媛, 张瑛, 林玲, 等. 酵母单杂交文库构建及巨峰葡萄 VvFT 基因启动子上游调控因子筛选 [J]. 南方农业学报, 2020, 51(12): 2875−2883.
Huang G Y, Zhang Y, Lin L, et al. Yeast one-hybrid library construction and screening of upstream regulators of VvFT promoter in kyoho grape [J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(12): 2875−2883.

[20] 徐靖, 朱红林, 林延慧, 等. 甘薯 IbHQT1 启动子的克隆及上游调控因子的鉴定 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(8): 213−219.
Xu J, Zhu H L, Lin Y H, et al. Cloning of IbHQT1 promoter and identification of upstream regulatory factors in sweet potato [J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(8): 213−219.

[21] 黄小龙, 孙贵连, 马丹丹, 等. 水稻幼苗酵母单杂文库构建及

LAZY1 上游调控因子筛选 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(9): 126−135.
Huang X L, Sun G L, Ma D D, et al. Construction of yeast one-hybrid library and screening of factors regulating LAZY1 expression in rice [J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(9): 126−135.

[22] 陈俊兴, 包文泉, 敖敦, 等. 西伯利亚杏花芽酵母 cDNA 文库构建及质量评价 [J]. 中南林业科技大学学报, 2025, 45(2): 131−138.
Chen J X, Bao W Q, Ao D, et al. Construction and quality evaluation of cDNA library of flower bud yeast from *Prunus sibirica* [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2025, 45(2): 131−138.

[23] 侯文赫. 欧李果实原花青素合成关键基因的挖掘及表达特性分析 [D]. 太原: 山西农业大学, 2022.
Hou W H. Identification and expression analysis of key genes involved in biosynthesis of proanthocyanidin *Cerasus humilis*[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2022.

[24] Wang Y, Xie J, Zhang H N, et al. The genome of *Prunus humilis* provides new insights to drought adaption and population diversity [J]. DNA Research, 2022, 29(4): dsac021.

[25] 张雅茜. 欧李果实颜色性状形成的关键调控基因挖掘 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
Zhang Y Q. Key regulatory genes mining for the formation of color traits of *Prunus humilis*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural, 2024.

[26] Guo S H, Zhang M, Feng M X, et al. *miR*156*b*-targeted VvSBP8/13 functions downstream of the abscisic acid signal to regulate anthocyanins biosynthesis in grapevine fruit under drought [J]. Horticulture Research, 2024, 11(2): uhad293.

[27] Li W N, Li Q Q, Che J H, et al. A key R2R3-MYB transcription factor activates anthocyanin biosynthesis and leads to leaf reddening in poplar mutants [J]. Plant, Cell & Environment, 2025, 48(3): 2067−2082.

[28] Deng Y R, Yang J W, Wei J J, et al. stu-miR159a negatively regulates anthocyanin-specific MYB transcription factor to mediate drought stress tolerance in potato [J]. Horticultural Plant Journal, 2025, 11(5): 1917−1929.

[29] Gao Z L, Chen Z M, Wang J F, et al. Integrated transcriptome and metabolome analysis revealed mechanism underlying anthocyanin biosynthesis during flower color formation in *Lagerstroemia indica* [J]. Horticulturae, 2024, 10: 1229.

[30] Keller-Przybylkowicz S, Oskier M, Liu X Q, et al. Transcriptome analysis of white- and red-fleshed apple fruits uncovered novel genes related to the regulation of anthocyanin biosynthesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(3): 1778.

[31] Khademi O, Zarei A, Naji A. Molecular basis of aril paleness disorder in pomegranate fruit: insights from anthocyanin biosynthesis genes [J]. Tropical Plant Biology, 2025, 18: 70.

[32] Lan M J, Kou M, Li C, et al. Sweetpotato solute carrier family 35 member F1 (IbSLC35F1), a nucleotide sugar transporter transcriptionally activated by IbMYB1, modulates anthocyanin accumulation in storage roots [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2026, 339(2): 150076.

[33] Li Y K, Song Z, Zhan X, et al. Chromosome-level genome assembly assisting for dissecting mechanism of anthocyanin regulation in kiwifruit (*Actinidia arguta*) [J]. Molecular Horticulture, 2025, 5: 18.

[34] Shi M Y, Zhang Y, Zhang T, et al. The NAC activator, MdNAC77L, regulates anthocyanin accumulation in red flesh apple [J]. Horticultural Plant Journal, 2024, 11(6): 2009−2023.

[35] Yang Y, Bi M M, Luo K, et al. Lily (*Lilium* spp.) LhERF061 suppresses anthocyanin biosynthesis by inhibiting LhMYBSPLATTER and *LhDFR* expression and interacting with LhMYBSPLATTER [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 219: 109325.

[36] Sun H Y, Hu K D, Wei S W, et al. ETHYLENE RESPONSE FACTORS 4.1/4.2 with an EAR motif repress anthocyanin biosynthesis in red-skinned pears [J]. Plant Physiology, 2023, 192(3): 1892−1912.

[37] Zhu C L, Yang X H, Chen W W, et al. WD40 protein OsTTG1 promotes anthocyanin accumulation and CBF transcription factor-dependent pathways for rice cold tolerance [J]. Plant Physiology, 2025, 197(1): 604.

[38] Tang P, Huang J, Wang J, Wang M, Huang Q, Pan L, Liu F. Genome-wide identification of CaWD40 proteins reveals the involvement of a novel complex (CaAN1-CaDYT1-CaWD40-91) in anthocyanin biosynthesis and genic male sterility in *Capsicum annuum* [J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 851.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 戴思兰）