果 树 学 报 2026,43(10):2714-2726
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20260018

JrbZIP44和JrABI5调控红瓤核桃RW-1花青苷生物合成的分子机制

李亚奇[1],陈俊儒[1#],郭熳垚[1],铁素素[1],张海朋[1,2],连晓东[1,2],
王小贝[1,2],侯 楠[1,2],冯建灿[1,2],王 磊[1,2*],谭 彬[1,2*]

([1]河南农业大学园艺学院,郑州 450046;[2]河南省果树瓜类生物学重点实验室,郑州 450046)

摘 要:【目的】筛选调控红瓤核桃RW-1花青苷合成相关bZIPs转录因子,探究bZIPs转录因子调控花青苷合成关键基因*JrUFGT5*表达的分子机制,为RW-1的分子育种及品种改良提供理论依据。**【方法】**以RW-1和普通核桃中林1号不同发育期的种皮为材料,筛选获得2个显著差异表达的bZIP转录因子基因*JrbZIP44*和*JrABI5*。通过PCR扩增技术获得其基因序列,并对其基因序列和相应的蛋白理化性质进行分析;通过qRT-PCR确定其在种皮不同发育期的表达模式及对外源ABA处理的响应;通过瞬时转化烟草叶片确定其亚细胞定位;通过转化酵母菌株Y2HGold确定其转录激活活性;通过酵母单杂交(Y1H)和双荧光素酶检测试验验证bZIP转录因子对下游花青苷合成关键结构基因*JrUFGT5*启动子的调控作用。**【结果】***JrbZIP44*在RW-1不同发育期的种皮中表达量均显著高于中林1号,而*JrABI5*则在RW-1种皮中始终低表达;外源ABA处理后,*JrbZIP44*和*JrABI5*均上调表达。与参考基因组相比,*JrbZIP44*和*JrABI5*核苷酸序列在RW-1中分别存在1个和4个碱基的差异,*JrbZIP44*基因CDS序列的391 bp处(A-G),导致H(组氨酸)突变为R(精氨酸);*JrABI5*基因CDS序列的111 bp处(G-T)、322 bp处(C-T)、660 bp处(A-C)、分别导致A(丙氨酸)突变为S(丝氨酸)、P(脯氨酸)突变为L(亮氨酸)、T(苏氨酸)突变为P(脯氨酸),在908 bp处(C-T)并没有导致蛋白序列的改变。系统进化树分析表明,JrbZIP44与烟草(*Nicotiana tabacum*)NtbZIP44、番茄(*Solanum lycopersicum*)SlbZIP44亲缘关系较近,JrABI5蛋白与石榴(*Punica granatum*)PgABI5、芒果(*Mangifera indica*)MiABI5亲缘关系较近。JrbZIP44和JrABI5均定位于细胞核和细胞膜中,仅JrbZIP44具有转录激活活性。JrbZIP44能够促进*JrUFGT5*的表达,JrABI5能够抑制*JrUFGT5*的表达。**【结论】**bZIP转录因子JrbZIP44和JrABI5可能是参与调控RW-1种皮花青苷合成的关键转录因子。

关键词:红瓤核桃RW-1;花青苷;bZIPs转录因子;脱落酸

中图分类号:S664.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2026)10-2714-13

Molecular mechanism of bZIP transcription factors JrbZIP44 and JrABI5 regulating anthocyanin biosynthesis in red walnut (*Juglans regia*)

Li Yaqi[1], Chen Junru[1#], Guo Manyao[1], Tie Susu[1], Zhang Haipeng[1, 2], Lian Xiaodong[1, 2], Wang Xiaobei[1, 2], Hou Nan[1, 2], Feng Jiancan[1, 2], Wang Lei[1, 2*], Tan Bin[1, 2*]

([1]College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China; [2]Henan Provincial Key Laboratory of Fruit and Cucurbit Biology, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract:【Objective】Walnut (*Juglans regia* L.), one of the world's four major tree nuts (alongside hazelnuts, cashews, and almonds) has outstanding nutritional and health-promoting value. Its kernels are rich in lipids, protein, vitamins (notably vitamin E and B vitamins), and contain all eight essential amino acids required by the human body. Notably, approximately 86% of the total fat in walnut kernels is composed of unsaturated fatty acids, including oleic acid, linoleic acid, and alpha-linolenic acid. These compounds can effectively reduce serum lipoprotein and cholesterol levels. China is one of the centers

收稿日期:2026-01-09 **接受日期:**2026-03-22

基金项目:国家自然科学基金项目(32301631)

作者简介:李亚奇,男,硕士,研究方向为红瓤核桃花青苷代谢分子机制。E-mail:15516766714@163.com。#为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:btan@henau.edu.cn;E-mail:wanglei2017@henau.edu.cn

of walnut origin and has a long history of walnut cultivation. Supported as a key national initiative, the walnut industry has become a pillar industry in many counties and cities, playing an important role in agricultural restructuring and the implementation of rural revitalization strategies. At present, most of the dominant cultivated walnut varieties in China have green leaves, green peels, and light yellow seed coats. In contrast, our research team previously identified a unique wild germplasm resource, the red walnut RW-1. This genotype accumulates a large amount of anthocyanins, which not only makes its leaves and peels red, but more importantly, also turns its seed coat red. This distinctive trait boosts the visual appeal of the walnut kernel and greatly enhances its nutritional value. Therefore, exploring the molecular and biochemical mechanisms underlying anthocyanin accumulation and kernel coloration in RW-1 is of great significance for breeding new red walnut cultivars and promoting the genetic improvement and overall upgrading of the walnut industry. Abscisic acid (ABA) plays a critical regulatory role in the anthocyanin biosynthesis pathway. Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors are a large, widespread family in eukaryotes and act as key components in ABA signal transduction. Previous studies have shown that ABA can regulate anthocyanin biosynthesis in plants *via* specific bZIP transcription factors. However, whether this pathway that controls anthocyanin accumulation in red walnut has not yet been investigated. In this study, we screened bZIP transcription factors associated with ABA-induced anthocyanin biosynthesis in red walnut RW-1, and then explored the molecular mechanism through which the selected bZIPs regulate the promoter of the *JrUFGT5,* a key structural gene for anthocyanin biosynthesis. These findings would provide a new theoretical basis for the molecular breeding and variety improvement of red walnut.【Methods】Seed coats from different developmental stages of red walnut RW-1 and common walnut Zhonglin 1 were used in this study. Transcriptome analysis of seed coats at different developmental stages identified two significantly differentially expressed bZIP TF genes, the *JrbZIP44* and *JrABI5*.The coding sequences (CDS) of the *JrbZIP44* and *JrABI5* were cloned *via* PCR and analyzed for physicochemical properties. The expression profiles of these genes at different developmental stages and after ABA treatment were analyzed *via* quantitative real-time PCR (qRT-PCR).To explore the molecular mechanism of these genes, we first determined their subcellular localization *via* transient transformation in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) leaves, and then assayed their transcriptional activation activity using the yeast strain Y2HGold. Finally, the regulation of the *JrUFGT5* promoter by these bZIP TFs was verified *via* yeast one-hybrid (Y1H) and dual-luciferase reporter (LUC) assays.【Results】The expression level of *JrbZIP44* in the seed coat of red walnut was significantly higher than that in common walnut, while the expression level of *JrABI5* was relatively lower. Both the *JrbZIP44* and *JrABI5* were up-regulated at the expression level after ABA treatment. Compared with the reference genome, the nucleotide sequences of *JrbZIP44* and *JrABI5* from red walnut RW-1 showed one and four base differences, respectively. In the CDS sequence of *JrbZIP44* gene, an A→G substitution at position 391 bp resulted in an amino acid change from histidine (H) to arginine (R). In the CDS sequence of the *JrABI5* gene, a G→T substitution at position 111 bp caused an amino acid alteration from alanine (A) to serine (S); a C→T substitution at position 322 bp led to a change from proline (P) to leucine (L); and an A→C substitution at position 660 bp resulted in a modification from threonine (T) to proline (P). By contrast, the C→T substitution at position 908 bp did not alter the encoded protein sequence. Phylogenetic tree analysis showed that the JrbZIP44 is closely homologous to the NtbZIP44 from *Nicotiana tabacum* (tobacco) and the *SlbZIP44* from *Solanum lycopersicum* (tomato, while the JrABI5 shares the highest homology with PgABI5 from *Punica granatum* (pomegranate) and MiABI 5 from *Mangifera indica* (mango). Subcellular localization indicated that the JrbZIP44

and JrABI5 accumulated in the nucleus and cytomembrane. The JrbZIP44 has transcriptional activation function in yeast, and it can significantly increase the activity of the *JrUFGT5* promoter. In contrast, the JrABI5 significantly reduces the activity of the *JrUFGT5* promoter.【Conclusion】The bZIP transcription factors *JrbZIP44* and *JrABI5* are predicted to regulate ABA-dependent anthocyanin biosynthesis by directly targeting the glycosyltransferase gene *JrUFGT5*. This proposed mechanism would provide a new theoretical basis for promoting the molecular breeding and cultivar improvement of red walnuts.

Key words: Red walnut RW-1; Anthocyanin; bZIPs transcription factors; ABA

核桃（*Juglans regia* L.）为胡桃科（Juglandaceae）核桃属（*Juglans*）乔木，位居世界四大坚果之首，其种仁含有人体所需的8种必需氨基酸，是人们摄取所需营养物质的天然食品来源。食用核桃种仁可以缓解疲劳、改善睡眠、润肺补肾等，还可以通过调节糖脂代谢机制从而对控制糖尿病、心脑血管疾病、脂肪肝等有一定益处[1]。我国是核桃生产和消费大国，在国际核桃产业中占据主导地位，收获面积和产量均居世界首位[2-3]。目前广泛栽培的核桃品种，其叶片和果皮多为绿色，种皮多为黄色或浅黄色，可选择的外观性状较少，产品同质化严重。本课题组在太行山区域发现了珍稀的红瓤核桃种质RW-1，其种皮、果皮和叶片由于花青苷的积累均呈红色[4]，是极具特色的核桃优异种质资源。

花青苷是一种广泛存在于植物体内的水溶性天然色素，在植物的器官和组织富集而呈现不同的色彩，吸引动物采食以传播花粉和种子[5]，同时参与植物的各种抗逆反应[6]。花青苷通过苯丙烷途径由一系列结构基因编码的酶促反应合成，主要包括查尔酮合成酶（chalcone synthase，CHS）、查尔酮异构酶（chalcone isomerase，CHI）、黄烷酮-3-羟化酶（flavanone 3-hydroxylase，F3H）、二氢黄酮醇-4-还原酶（dihydroflavonol 4-reductase，DFR）、花青素合成酶（anthocyanidin synthase，ANS）、类黄酮-3-*O*-糖基转移酶（UDP-glucose: flavonoid-3-*O*-glucosyltransferase，UFGT）[7]等。花青苷合成相关结构基因的表达能够直接影响花青苷的合成，也受到转录因子的调控，研究较为广泛的转录因子包括MYB转录因子、bHLH转录因子、WD40转录因子、WRKY转录因子、bZIP转录因子、ERF转录因子等[8]。

类黄酮-3-*O*-糖基转移酶UFGT通过糖基化将不稳定的花青素转化为稳定的花青苷，是花青苷合成途径的最后一步[9]。通过对UGT基因家族进行全基因组鉴定，共鉴定出124个含有PSPG（plant secondary product glycosyltransferase）box保守序列的*UGT*基因，在核桃果实发育过程中表现出不同的表达模式[10]。本课题组前期通过重测序和转录组分析发现，*JrUFGT5*的CDS区域有5个SNPs，表达水平与核桃花青苷的含量呈极显著正相关，推测为RW-1花青苷合成的关键结构基因[11]。在其他植物中也有很多报道表明，UFGT能够正调控花青苷的积累。四季秋海棠花中的*BsUFGT*表达量显著高于叶和茎中的表达量，且过表达*BsUFGT*基因能够促进花青苷的合成和积累[12]。*IhUFGT1*基因在荷兰鸢尾紫色突变株紫韵花中表达量显著低于蓝紫色品种展翅，导致花青苷含量降低，花色由蓝紫色转为紫色[13]。紫色猕猴桃果肉*F3GT*表达与总花青苷的积累呈正相关[14]。苹果的果皮在高光照度下产生的花青苷依赖于*MdUFGT*活性[15]。

花青苷的合成不仅受到酶的催化，还会受到外源激素的影响。研究发现，ABA处理能够促进苹果果皮叶绿素降解和花青苷合成[16]。在拟南芥中，外源ABA处理有助于低磷酸盐诱导的花青苷积累[17]。bZIP转录因子在ABA信号转导过程中发挥着关键作用。在苹果中，bZIP转录因子MbbZIP43可通过激活花青苷合成相关结构基因*CHI*和*UFGT*等的表达来促进花青苷的积累[18]。bZIP转录因子MdABI5通过调节苹果中MYB1-bHLH3复合物，在ABA诱导的花青苷生物合成中作为正调控因子发挥作用[19]。但在RW-1中，bZIP转录因子诱导花青苷合成的调控机制尚未明确，需进一步验证分析。

基于此，本研究筛选出2个在RW-1与中林1号种皮不同发育期中差异表达的bZIP转录因子基因*JrbZIP44*和*JrABI5*，并探究其与下游*JrUFGT5*启动子之间的调控关系，以进一步为解析bZIP转录因子调节RW-1花青苷合成的分子机制奠定基础，并为筛选红色核桃资源、深入了解RW-1红色果实品质的形成以及分子改良与育种提供参考。

1　材料和方法

1.1　材料

供试的植物材料为野生资源红瓤核桃（*Juglans regia* L.‘RW-1’，资源编号JUREG4108210002）和普通核桃中林1号（*Juglans regia* L.‘Zhonglin 1’）的种皮，均种植于河南农业大学毛庄科教园区果树试验站。选取生长状态较好且长势一致的植株，在雌花授粉后60、90、120 d分别采集RW-1和中林1号的种皮。采集样品后于液氮中速冻并置于−80 ℃超低温冰箱中保存。选用本氏烟草（*Nicotiana tabacum* L.）作为亚细胞定位和双荧光素酶试验的植物材料，于22 ℃、湿度60%、光照16 h/黑暗8 h的条件下进行培养，培养5~6周后进行试验。

1.2　RNA提取与cDNA合成

采取两种核桃3个时期种皮，经液氮速冻并充分研磨后，称取0.1 g样品，使用FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit植物RNA提取试剂盒（诺唯赞生物科技股份有限公司，南京）对样品进行RNA提取。通过HiScript® Ⅲ RT SuperMix for qPCR（+gDNA wiper）反转录试剂盒（诺唯赞生物科技股份有限公司，南京）对RNA进行反转录合成cDNA。

1.3　*JrbZIP44*和*JrABI5*表达模式与实时荧光定量PCR（qRT-PCR）分析

根据课题组前期的种皮转录组数据[20]，筛选获得两个在RW-1和中林1号两个类型的种皮中差异表达的bZIP转录因子基因*JrbZIP44*（LOC109020519）和*JrABI5*（LOC118343674）。使用TBtools软件对*JrbZIP44*和*JrABI5*的转录组数据进行表达模式分析，通过ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒（诺唯赞生物科技股份有限公司，南京）使用ABI 7500实时PCR系统（Applied Biosystems，Foster City，CA，United States）进行实时荧光定量PCR（qRT-PCR）试验。以*Jr18S*（XM__019004991.1）作为内参基因，基因相对表达水平使用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算[21]，引物序列见表1。

1.4　外源ABA处理RW-1和中林1号种皮后*JrbZIP44*和*JrABI5*实时荧光定量PCR分析

分别选取10个大小相似，颜色相近，没有病虫害和机械损伤的RW-1和中林1号第二时期的果实，去掉果皮和果壳，用清水浸泡清洗2 min后以150 μmol·L^{-1}外源ABA（清水对照）分别浸泡处理RW-1和中林1号的种皮2 min，分别在处理后的0、6、12和24 h采样，测定*JrbZIP44*和*JrABI5*表达量的变化趋势。

1.5　*JrbZIP44*和*JrABI5*基因CDS序列克隆及蛋白系统进化分析

以RW-1种皮cDNA为模板，使用2×Phanta Flash Master Mix（Dye Plus）高保真酶（诺唯赞生物科技股份有限公司，南京）克隆*JrbZIP44*和*JrABI5*基因的CDS序列。使用ProtParam在线软件分析两个JrbZIPs蛋白的理化性质。在NCBI上获得其他物种中JrbZIP44和JrABI5的蛋白序列，通过DNAMAN和MEGA7进行蛋白多序列比对和系统进化分析。

1.6　JrbZIP44和JrABI5亚细胞定位和转录激活活性分析

将从RW-1种皮cDNA中克隆的*JrbZIP44*和*JrABI5*基因CDS序列插入至pCAMBIA2300-GFP载体，构建35S::*JrbZIP44*-GFP、35S::*JrABI5*-GFP重组质粒，并将重组质粒转化至GV3101农杆感受态（北京庄盟国际生物基因科技有限公司），参照俞凯莉等[22]的方法瞬时侵染本氏烟草叶片，暗培养1 d后转至正常光周期下培养2 d，通过激光共聚焦显微镜观察叶片中GFP绿色荧光信号进行亚细胞定位分析。

从RW-1种皮cDNA中克隆*JrbZIP44*和*JrABI5*基因的CDS序列插入至pGBKT7载体，构建BD-*JrbZIP44*、BD-*JrABI5*重组质粒，将其与包含pGADT7-T+pGBKT7-Lam（阴性对照）和pGADT7-T+pGBKT7-p53（阳性对照）的重组质粒转化到Y2HGold酵母感受态（北京庄盟国际生物基因科技有限公司），在含有X-α-gal显色剂的固体SD/-Ade-His-Leu-Trp培养基平板上点斑检测转录激活活性。

1.7　酵母单杂交（Y1H）

将*JrUFGT5*启动子片段插入至pAbAi载体构建*JrUFGT5*$_{pro}$-pAbAi重组质粒，从RW-1种皮cDNA中克隆*JrbZIP44*和*JrABI5*基因CDS序列插入至pGADT7载体构建*JrbZIP44*-AD、*JrABI5*-AD重组质粒。使用经典酵母转化试剂盒（北京酷莱博科技有限公司）进行酵母感受态的制备与转化，以pGADT7为阴性对照，将含有*JrbZIP44*-AD、*JrABI5*-AD重组质粒的Y1HGold（含*JrUFGT5*$_{pro}$-pAbAi重组质粒）菌株点斑至含有350 ng·mL^{-1}金担子素（AbA）的固体SD/-Leu培养基平板上于29 ℃培养箱培养2~4 d后

表1 基因克隆和载体构建引物序列

Table 1 Primer sequences for gene cloning and vector construction

引物名称 Primer name	引物序列（5'−3'） Primer sequence（5'−3'）	用途 Application
qRT-JrbZIP44-F	TTTTTGGGCTTGGGGACAGT	表达分析 Expression analysis
qRT-JrbZIP44-R	ATAGGGAGAGCTCCATGGCT	
qRT-JrABI5-F	GCTCGCTGACTCTACCAAGG	表达分析 Expression analysis
qRT-JrABI5-R	CTCCACCCTGAACCTGAACC	
qRT-18S-F	ATTGGTTGCGGATCAGGACT	核桃内参基因 Constitutive control in walnut
qRT-18S-R	GCTCCAATGCAACATCAAGC	
JrbZIP44-F	ATGGCTTCTTCTAGTACTGGAG	克隆 Gene cloning
JrbZIP44-R	TCAGTACATAAATATATCAGCAGAA	
JrABI5-F	ATGGCGACCAATTTGAACTT	克隆 Gene cloning
JrABI5-R	TCACCAAGGACTAGTCTGTGTTC	
JrbZIP44-2300-F	ACGGGGGACGAGCTCGGTACCATGGCTTCTTCTAGTACTGGAGCT	亚细胞定位 Subcellular localization
JrbZIP44-2300-R	GGTGTCGACTCTAGAGGATCCGTACATAAATATATCAGCAGAAGCCA	
JrABI5-2300-F	ACGGGGGACGAGCTCGGTACCATGGCGACCAATTTGAACTTC	亚细胞定位 Subcellular localization
JrABI5-2300-R	GGTGTCGACTCTAGAGGATCCCCAAGGACTAGTCTGTGTTCGTC	
JrbZIP44-SAK-F	ATCCAAAGAATTCCCCGGTACCATGGCTTCTTCTAGTACTGGAG	过表达载体 Overexpression vector
JrbZIP44-SAK-R	CATGATCTTTGTAATCCTCGAGTCAGTACATAAATATATCAGCAGAA	
JrABI5-SAK-F	ATCCAAAGAATTCCCCGGTACCATGGCGACCAATTTGAACTT	过表达载体 Overexpression vector
JrABI5-SAK-R	CATGATCTTTGTAATCCTCGAGTCACCAAGGACTAGTCTGTGTTC	
JrbZIP44-AD-F	TACGACGTACCAGATTACGCTCATATGATGGCTTCTTCTAGTACTGGAG	酵母单杂交 Yeast one hybrid
JrbZIP44-AD-R	TCTACGATTCATCTGCAGCTCGAGTCAGTACATAAATATATCAGCAGAA	
JrABI5-AD-F	TACGACGTACCAGATTACGCTCATATGATGGCGACCAATTTGAACTT	酵母单杂交 Yeast one hybrid
JrABI5-AD-R	TCTACGATTCATCTGCAGCTCGAGTCACCAAGGACTAGTCTGTGTTC	
JrbZIP44-BD-F	AAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGATGGCTTCTTCTAGTACTGGAG	酵母自激活 Yeast self activation
JrbZIP44-BD-R	TTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGTCAGTACATAAATATATCAGCAGAA	
JrABI5-BD-F	AAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGATGGCGACCAATTTGAACTT	酵母自激活 Yeast self activation
JrABI5-BD-R	TTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGTCACCAAGGACTAGTCTGTGTTC	
JrUFGT5$_{pro}$-pAbAi-F	AAGCTTGAATTCGAGCTCCGCAGTCTTCGATCTACCGTCG	酵母单杂交 Yeast one hybrid
JrUFGT5$_{pro}$-pAbAi-R	AGCACATGCCTCGAGGTCGACGTATAGGGGATCAAAGAGACGAGAG	
JrUFGT5$_{pro}$-LUC-F	GGGCCCCCCCTCGAGGTCGACCGCAGTCTTCGATCTACCGTCG	双荧光素酶 Dual luciferase assay
JrUFGT5$_{pro}$-LUC-R	TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGGTATAGGGGATCAAAGAGACGAGAG	

观察结合情况。

1.8 双荧光素酶报告基因检测（LUC）

将*JrUFGT5*启动子片段插入至pGreenII 0800-LUC载体构建*JrUFGT5$_{pro}$*-LUC重组质粒，将*JrbZIP44*和*JrABI5*基因CDS序列插入至pSAK277载体构建*JrbZIP44*-SAK、*JrABI5*-SAK重组质粒。将重组质粒的农杆菌菌液重悬并按1∶9的体积比混合（1 *JrUFGT5$_{pro}$*-LUC∶9 *JrbZIP44*-SAK、*JrABI5*-SAK），静置3 h后注射至本氏烟草叶片，暗培养1 d正常培养2 d后，使用Dual-Luciferase® Reporter Assay System试剂盒（Promega，北京）测定萤火虫荧光素酶LUC和海肾萤光素酶REN活性，计算LUC/REN比值[21]。

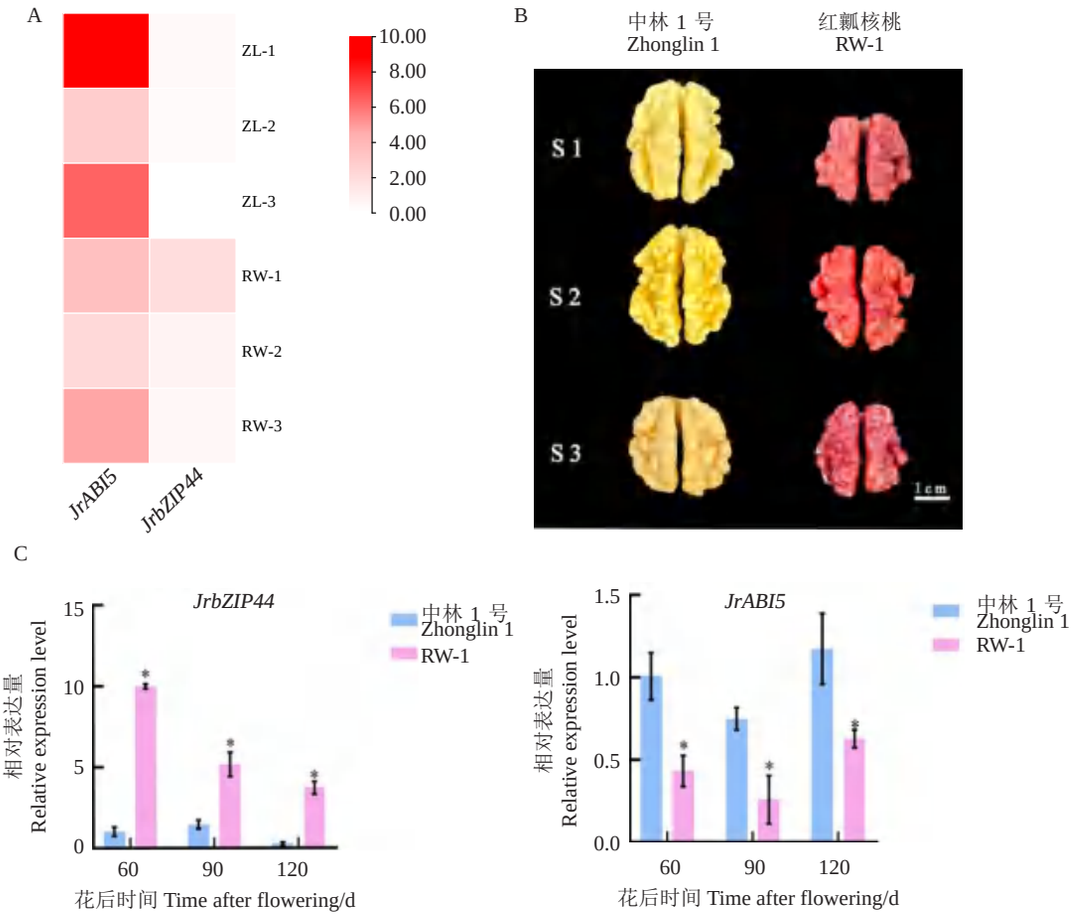
1.9 数据分析

采用Microsoft Excel 2016软件进行试验数据整理；采用SPSS 23.0软件进行试验数据的显著性分析（$P<0.05$）；采用GraphPad Prism 8软件绘图；采用TBtools软件绘制表达模式图。

2 结果与分析

2.1 *JrbZIPs*表达模式与实时荧光定量PCR（qRT-PCR）分析

利用课题组RW-1和中林1号种皮的转录组数据[23]，筛选出2个差异表达的bZIPs转录因子，通过功能注释将其命名为*JrbZIP44*和*JrABI5*。根据转录组数据（图1-A），发现*JrbZIP44*基因在RW-1种皮



A. *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 基因转录组数据热图分析；B. 中林 1 号和 RW-1 不同发育时期种皮表型观察；C. *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 基因 qRT-PCR 表达分析。ZL. 中林 1 号核桃种皮；RW. RW-1 种皮。红色表示高表达，白色表示低表达。*表示两个不同样本间的差异显著性（$P<0.05$）。下同。

A. Heat map analysis of transcriptome data for *JrbZIP44* and *JrABI5* genes; B. Observation of seed coat phenotypes at different development stages of common walnuts and red walnuts; C. qRT-PCR expression analysis of *JrbZIP44* and *JrABI5* genes. ZL. Normal walnut seed coat; RW. Red walnut seed coat. Red indicates high expression, white indicates low expression. * indicates the significant difference between two different samples ($P<0.05$). The same below.

图 1　*JrbZIP44* 和 *JrABI5* 基因表达模式分析与核桃种皮表型观察

Fig. 1　Analysis of gene expression patterns of *JrbZIP44* and *JrABI5* genes and observation of walnut seed coat phenotype

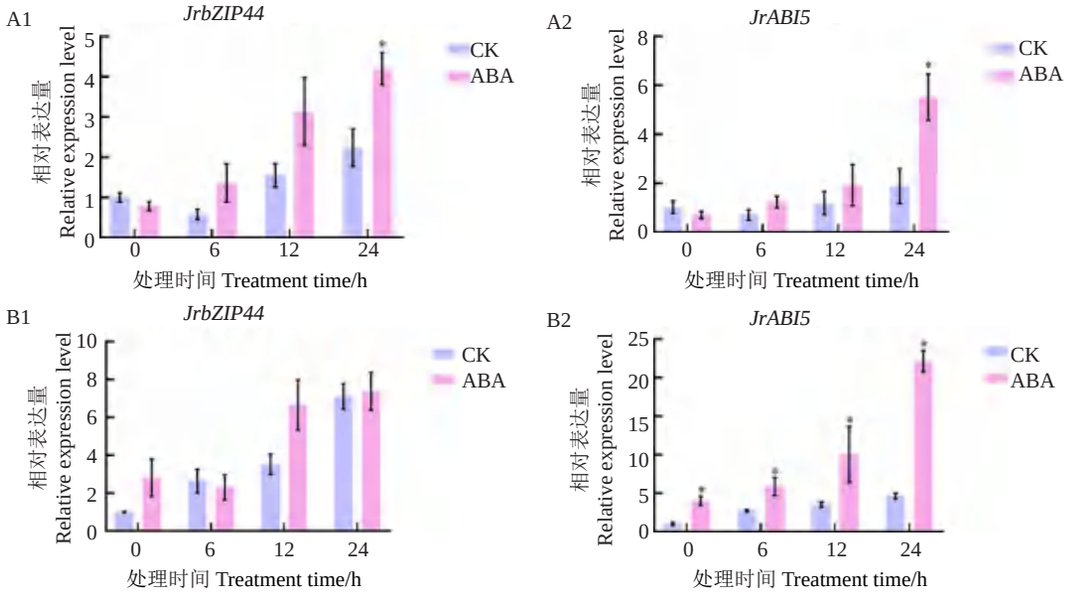
发育的各个时期的表达量均显著高于中林 1 号，这与 RW-1 各发育期的种皮均呈现红色而中林 1 号种皮呈现黄色的表型一致（图 1-B）[24]。而 *JrABI5* 基因在 RW-1 种皮发育的各个时期的表达量均显著低于中林 1 号，与花青苷在两种类型核桃种皮中花青苷积累情况相反。qRT-PCR 分析的结果与转录组数据一致（图 1-C），表明 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 可能与 RW-1 花青苷合成相关。

2.2　外源 ABA 处理对 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 表达量的影响

bZIPs 转录因子是参与 ABA 转导途径的关键转录因子，其表达量受到 ABA 的影响[25-27]。为了验证 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 是否能够响应外源 ABA 处理，对 RW-1 以及中林 1 号的种仁进行外源 ABA 处理，并对 ABA 处理之后不同时间的 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 表达量进行测定。结果（图 2）显示，外源 ABA 处理 RW-1 和中林 1 号种皮后，与对照组相比，*JrbZIP44* 在 RW-1 种皮中的表达量在处理后 24 h 显著高于对照，而在中林 1 号中则没有显著差异；*JrABI5* 在 RW-1 种皮中仅在处理后 24 h 显著高于对照，而在中林 1 号中则始终显著高于对照，表明 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 能够响应外源 ABA 信号。

2.3　*JrbZIP44* 和 *JrABI5* 基因的克隆和蛋白序列分析

以 RW-1 种皮 cDNA 为模板，通过同源克隆获得



A. 外源 ABA 处理 RW-1 种皮后，*JrbZIP44* 和 *JrABI5* 基因 qRT-PCR 表达分析；B. 外源 ABA 处理中林 1 号核桃种皮后，*JrbZIP44* 和 *JrABI5* 基因 qRT-PCR 表达分析。

A. qRT-PCR expression analysis of *JrbZIP44* and *JrABI5* genes after exogenous ABA treatment of the seed coat of red walnut; B. qRT-PCR expression analysis of JrbZIP44 and JrABI5 genes after exogenous ABA treatment of the seed coat of Zhonglin 1 walnut.

图 2 外源 ABA 处理后 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 基因 qRT-PCR 分析

Fig. 2 qRT-PCR analysis of *JrbZIP44* and *JrABI5* genes after exogenous ABA treatment

JrbZIP44 和 *JrABI5* 的 CDS 序列，并与核桃参考基因组的序列进行比对。结果表明，*JrbZIP44* 的 CDS 序列长度为 474 bp，与参考基因组序列相比有一个碱基的突变（图 3-A），即 391 bp 处的 A 突变为 G，导致蛋白序列发生变化：H（组氨酸）突变为 R（精氨酸）（图 3-B）。而 *JrABI5* 的 CDS 序列为 1275 bp，有 4 个碱基的突变（图 3-C），即在 111 bp 处 G 碱基突变为 T 碱基，导致 A（丙氨酸）突变为 S（丝氨酸），322 bp 处 C 碱基突变为 T 碱基，导致 P（脯氨酸）突变为 L（亮氨酸），660 bp 处 A 碱基突变为 C 碱基，导致 T（苏氨酸）突变为 P（脯氨酸），908 bp 处 C 碱基突变为 T 碱基，并没有导致蛋白序列的改变（图 3-D）。

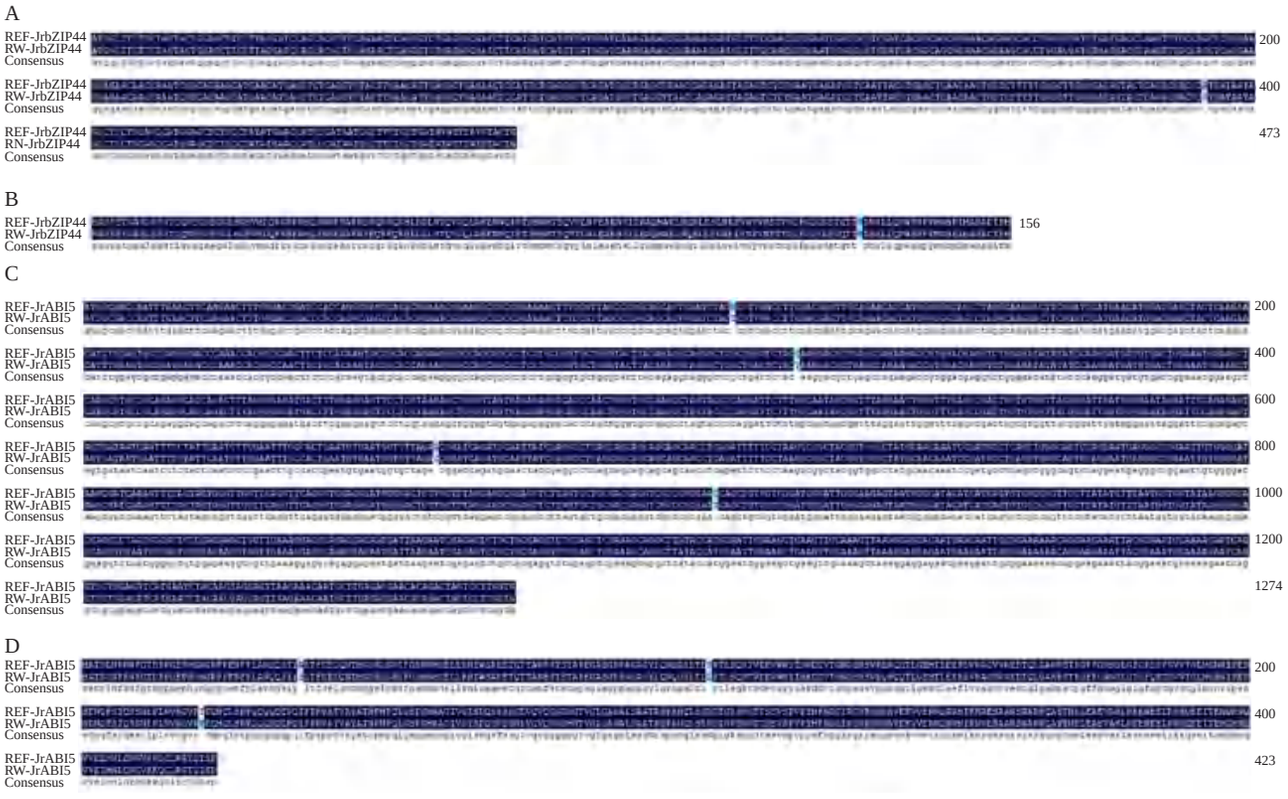
通过 ProtParam tool 在线工具对 JrbZIP44 和 JrABI5 蛋白序列进行分析。结果（表 2）显示，JrbZIP44 蛋白由 157 个氨基酸组成，化学分子式为 $C_{744}H_{1212}N_{232}O_{250}S_{11}$，相对分子质量为 17 759.87 Da，理论等电点 PI 为 7.93，所含最丰富的氨基酸为 Ser 丝氨酸，带负电荷氨基酸总数为 16，带正电荷氨基酸总数为 17，不稳定指数为 52.38，脂肪族指数为 69.62。JrABI5 蛋白由 424 个氨基酸组成，化学分子式为 $C_{1971}H_{3174}N_{592}O_{639}S_{16}$，相对分子质量为 45 901.43，理论等电点 PI 为 9.33，所含最丰富的氨基酸为 Gly 甘氨酸，带负电荷氨基酸总数为 40，带正电荷氨基酸总数为 46，不稳定指数为 48.54，脂肪族指数为 64.62。JrbZIP44 蛋白和 JrABI5 蛋白的总平均失水指数（GRAVY）均为负数，为亲水性蛋白。

2.4 JrbZIP44 和 JrABI5 蛋白系统进化分析

对 JrbZIP44 和 JrABI5 进行蛋白结构域分析显示，JrbZIP44 转录因子的 N 端含有典型的 bZIP 结构域，而 JrABI5 的 C 端含有 bZIP 结构域（图 4-A~B）。通过与其他物种 bZIP44 和 ABI5 进行蛋白的系统发育分析，结果表明 JrbZIP44 蛋白与烟草 NtbZIP44、番茄 Sl-bZIP44 亲缘关系较近，JrABI5 蛋白与石榴 PgABI5、芒果 MiABI5 亲缘关系较近（图 4-C）。

2.5 JrbZIP44 和 JrABI5 亚细胞定位和转录激活活性分析

为探究 JrbZIP44 和 JrABI5 在细胞中发挥功能的场所，将 35S::*JrbZIP44*-GFP、35S::*JrABI5*-GFP 重组质粒通过农杆菌介导法转化本氏烟草叶片，以 35S::GFP 为对照，通过 DAPI 进行核定位标记。结果显示，空载 35S::GFP 在细胞核和细胞膜中均能检测到强烈的绿色荧光信号，在含有 35S::*JrbZIP44*-GFP、35S::*JrABI5*-GFP 质粒的细胞中，在细胞核和细胞膜中均能检测到



A. *JrbZIP44* 基因 CDS 序列比对；B. *JrABI5* 基因 *CDS* 序列比对；C. JrbZIP44 蛋白序列比对；D. JrABI5 蛋白序列比对。REF. 参考基因组序列，RW. RW-1 序列。

A. *JrbZIP44* gene CDS sequence alignment; B. *JrABI5* gene CDS sequence alignment; C. JrbZIP44 protein sequence alignment; D. JrABI5 protein sequence alignment. REF. Reference genome sequence; RW. Red walnut sequence.

图 3　RW-1 和参考基因组中 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 转录因子序列比对

Fig. 3　Sequence alignment of *JrbZIP44* and *JrABI5* transcription factors in red walnut and reference genomes

表 2　JrbZIP44 和 JrABI5 蛋白理化性质分析

Table 2　Physicochemical analysis of JrbZIP44 and JrABI5 properties

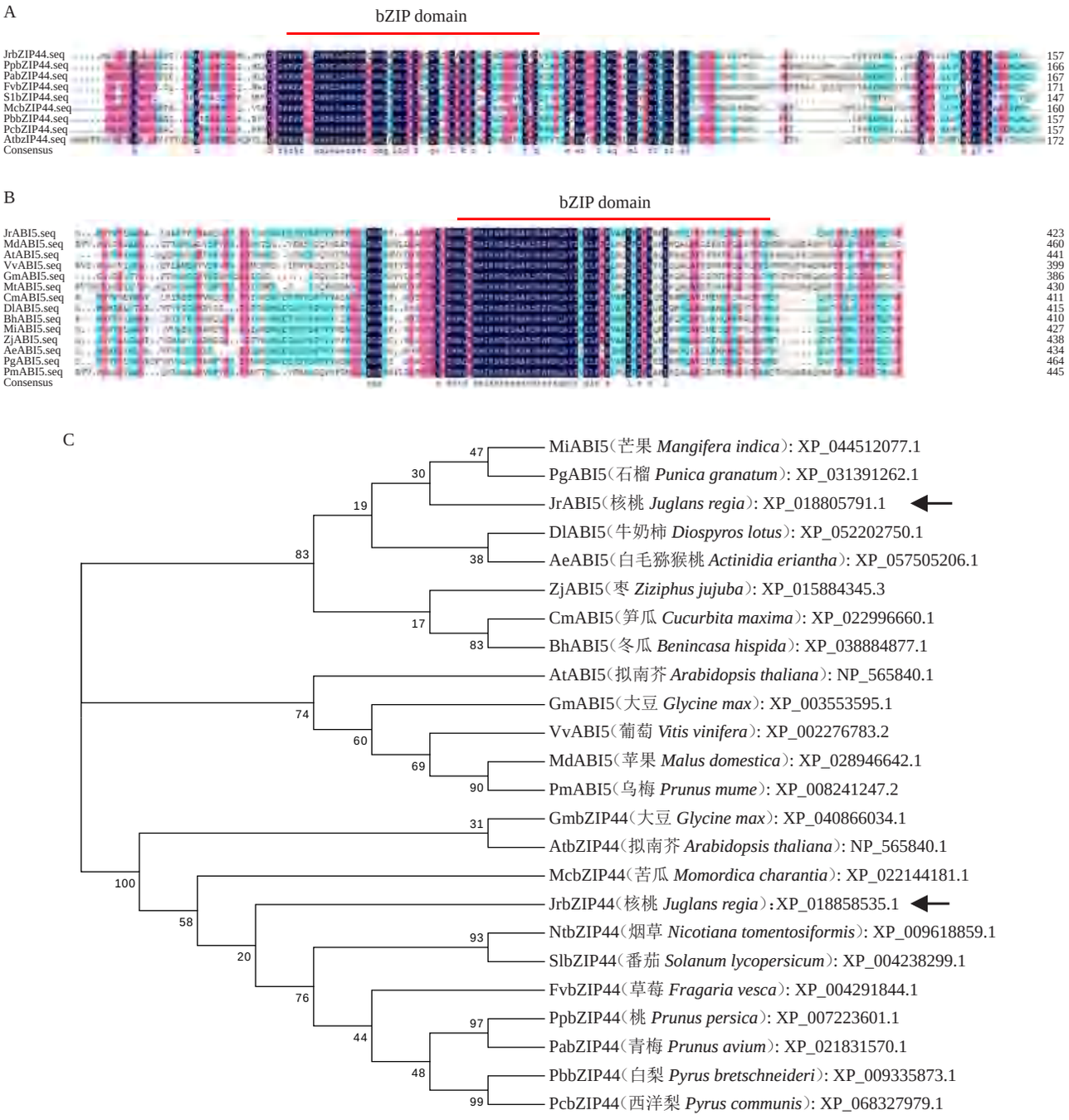
蛋白名称 Protein name	分子式 Molecular formula	氨基酸数量 Number of amino acids/aa	相对分子质量 Relative molecular mass/Da	理论等电点 pI Theoretical isoelectric point	含量最丰富的氨基酸 The most abundant amino acid content	带负电荷氨基酸总数 Total negatively charged amino acids	带正电荷氨基酸总数 Total positively charged amino acids	不稳定指数 Instability index	脂肪族指数 Aliphatic index	总平均疏水指数（GRAVY） Total average hydrophilic index
JrbZIP44	$C_{744}H_{1212}N_{232}O_{250}S_{11}$	157	17 759.87	7.93	Ser	16	17	52.38	69.62	−0.734
JrABI5	$C_{1971}H_{3174}N_{592}O_{639}S_{16}$	424	45 901.43	9.33	Gly	40	46	48.54	64.62	−0.645

绿色荧光信号（图 5-A），表明 JrbZIP44 和 JrABI5 定位于细胞膜和细胞核上。

为了探究 JrbZIP44 和 JrABI5 转录因子的转录激活活性，将 BD-*JrbZIP44*、BD-*JrABI5* 重组质粒和 pGADT7（AD）共转至酵母菌株 Y2H，在含有 X-α-gal 显色剂的固体 SD/-Ade-His-Leu-Trp 培养基平板上点斑，培养 3 d 后，转化 BD-*JrbZIP44*+AD 的培养基上有蓝色菌斑生长，转化 BD-*JrABI5*+AD 的培养基上没有菌斑生长（图 5-B），表明 JrbZIP44 具有转录激活活性，而 JrABI5 没有转录激活活性。

2.6　JrbZIP44 和 JrABI5 转录因子对下游基因 *JrUFGT5* 启动子调控关系验证

为了进一步验证 JrbZIP44 和 JrABI5 转录因子是否调控花青苷合成关键结构基因 *JrUFGT5* 的表达，进行了酵母单杂交试验。结果表明，在 ABA 浓度为 350 ng·mL^{-1} 的筛选培养基中，*JrbZIP44*-AD+*JrUFGT5*$_{pro}$ 和 *JrABI5*-AD+*JrUFGT5*$_{pro}$ 可正常生长，表明转录因子 JrbZIP44 和 JrABI5 能够结合在 *JrUF-*



A. JrbZIP44 与其他物种 bZIP44 蛋白序列比对；B. JrABI5 与其他物种 ABI5 蛋白序列比对；C. JrbZIP44 和 JrABI5 蛋白进化树。

A. Comparison of bZIP44 protein sequences between red walnut JrbZIP44 and other species; B. Comparison of ABI5 protein sequences between red walnut JrABI5 and other species; C. The protein evolutionary tree of red walnut JrbZIP44 and JrABI5.

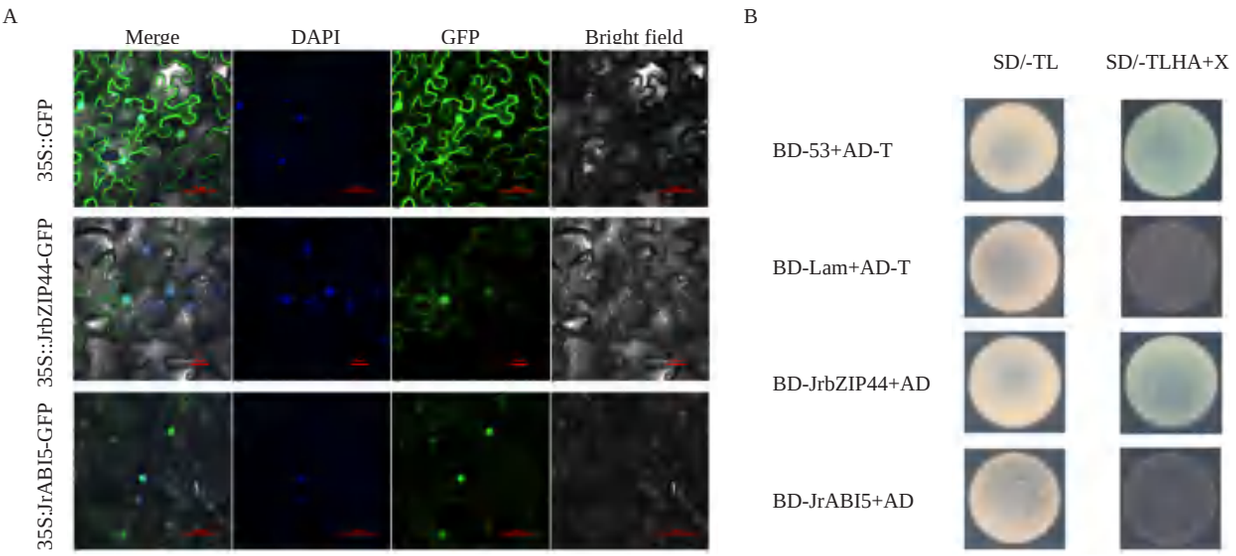
图 4 JrbZIP44 和 JrABI5 蛋白与其他物种蛋白序列比对及进化树分析

Fig. 4 Sequence alignment and phylogenetic tree analysis of JrbZIP44 and JrABI5 proteins in red walnut with proteins from other species

GT5 基因的启动子上（图6-A）。双荧光素酶试验进一步验证 JrbZIP44 能够显著提高 *JrUFGT5* 启动子的活性，JrABI5 能够显著降低 *JrUFGT5* 启动子的活性（图6-B）。

3 讨 论

花青苷是一种天然的抗氧化剂，在清除人体自由基、改善血糖平衡、预防心脑血管疾病等方面具有

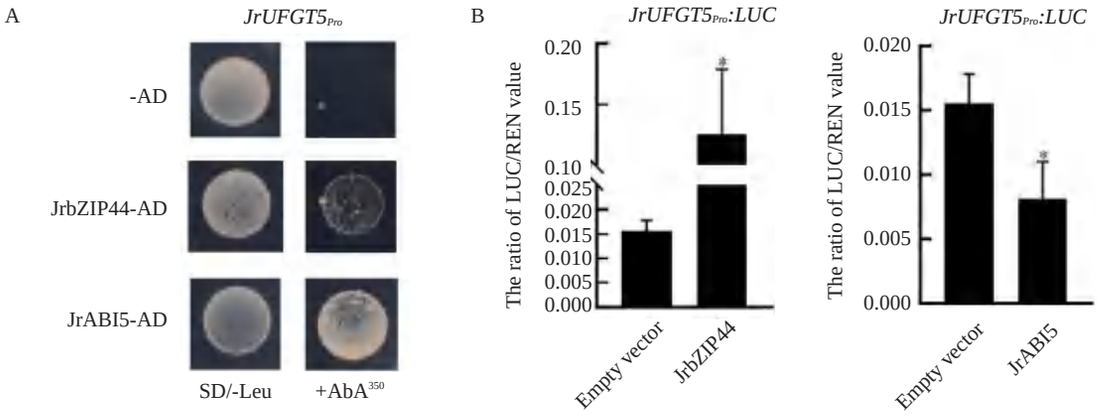


A. JrbZIP44 和 JrABI5 亚细胞定位；B. JrbZIP44 和 JrABI5 转录激活活性分析。

A. JrbZIP44 and JrABI5 subcellular localization; B. Transcriptional activation activity analysis of JrbZIP44 and JrABI5.

图 5　JrbZIP44 和 JrABI5 亚细胞定位和转录激活活性分析

Fig. 5　Subcellular localization and transcriptional activation activity analysis of JrbZIP44 and JrABI5



A. JrbZIP44 和 JrABI5 对 *JrUFGT5* 启动子调控作用的 Y1H 分析；B. JrbZIP44 和 JrABI5 对 *JrUFGT5* 启动子调控作用的 LUC 验证。

A. Y1H assay of the regulatory effect of JrbZIP44 and JrABI5 on *JrUFGT5* promoter; B. LUC verification of the regulatory effect of JrbZIP44 and JrABI5 on *JrUFGT5* promoter.

图 6　JrbZIP44 和 JrABI5 对 *JrUFGT5* 启动子的调控作用分析

Fig. 6　Analysis of the regulatory effect of JrbZIP44 and JrABI5 on *JrUFGT5* promoter

积极作用[28]。花青苷的合成受到植物激素的调节作用，许多研究表明，外源 ABA 处理能够促进植物体内花青苷的合成。在枸杞中，*LbNCED1* 能够增强植物激素 ABA 的积累，从而刺激 MYB-bHLH-WD40 转录因子复合物的转录，上调类黄酮生物合成途径中结构基因的表达，从而促进花青苷的产生和果实着色[29]。外源 ABA 处理显著提高了葡萄果皮中的酚类物质含量（主要是花青苷和黄酮醇）[30]。但是由 ABA 诱导的 RW-1 花青苷的分子机制尚不清楚，限制了 RW-1 的品质改良，因此初步验证 JrbZIPs 转录因子调节 ABA 诱导的花青苷生物合成的分子机制，对深入了解 RW-1 红色果实品质的形成及核桃的分子改良与育种具有重要意义。

笔者通过课题组前期的转录组数据分析，从 RW-1 和中林 1 号的种皮中筛选到两个差异表达的 bZIPs 转录因子 *JrbZIP44* 和 *JrABI5*。对 *JrbZIP44* 和 *JrABI5* 的序列进行分析，与参考基因组序列相比，*JrbZIP44* 有一个碱基的突变，而 *JrABI5* 有 4 个碱基

的突变。与对照组相比，外源ABA处理后*JrbZIP44*和*JrABI5*在RW-1种皮中的表达量明显升高，表明*JrbZIP44*和*JrABI5*能够响应脱落酸信号，可能是RW-1种皮花青苷合成相关的转录因子。

通过对JrbZIP44和JrABI5进行亚细胞定位分析和转录激活活性分析，结果显示，JrbZIP44和JrABI5定位于细胞膜和细胞核上，JrbZIP44具有转录激活活性，而JrABI5没有转录激活活性，这与蓖麻RcbZIP44定位在细胞核上[31]、欧李ChABI5定位在细胞核上且具有转录激活活性[32]的研究结果并不相同，表明JrbZIP44和JrABI5在功能上可能有其特殊性。

课题组前期研究表明，*JrUFGT5*的CDS序列具有5个SNP位点，是RW-1花青苷合成的关键结构基因[11]，为了研究JrbZIP44和JrABI5是否通过调节*JrUFGT5*的表达参与花青苷的积累，本研究通过酵母单杂交和双荧光素酶试验，JrbZIP44和JrABI5能够结合*JrUFGT5*基因的启动子上，并且JrbZIP44能够显著提高*JrUFGT5*基因启动子的活性，JrABI5能够显著降低*JrUFGT5*基因启动子的活性。上述结果表明，JrbZIP44和JrABI5能够通过调节*JrUFGT5*基因的表达从而调控花青苷的合成。在苹果中，bZIP转录因子MdbZIP44能够和MdMYB1互作形成复合物共同促进花青苷的合成[33]，MdABI5通过调节MdbHLH3-MdMYB1复合物进而促进花青苷的合成[19]，在欧李中，ChABI5能与ChMYB1互作抑制花青苷的合成[34]。也有很多其他bZIP转录因子通过调节MYB转录因子来调节花青苷的合成，而本试验所筛选出的两个bZIP转录因子能调节结构基因*JrUFGT5*的活性，与其他物种bZIP44和ABI5的作用机制不同。此外，在JrABI5的进化树分析中，JrABI5与苹果MdABI5的亲缘关系较远，这可能是JrABI5与苹果MdABI5作用机制不同的原因。

花青苷的生物合成涉及结构基因与转录因子的协同作用。围绕着特异的核桃种质资源红瓤核桃RW-1，转录因子bHLH基因（*JrbHLHA1*、*JrbHLHA2*、*JrEGL1b*和*JrEGL1a*）[20]、结构基因*JrUFGT5*[11]、*JrCHSs*[35-36]等被鉴定为RW-1呈色的关键基因。本研究探究了除MBW复合体之外的bZIP转录因子JrbZIP44和JrABI5通过调控花青苷合成结构基因*JrUFGT5*的表达参与RW-1花青苷的合成，丰富了RW-1花青苷合成的机制。

4 结 论

*JrbZIP44*在RW-1种皮发育过程中持续高表达，能够直接结合到*JrUFGT5*启动子，并促进其上调表达；*JrABI5*在RW-1种皮发育过程中始终低表达，通过结合*JrUFGT5*启动子抑制其表达，表明JrbZIP44和JrABI5在RW-1种皮花青苷合成中发挥重要作用。本研究结果为进一步解析bZIP转录因子调节RW-1花青苷合成的分子机制奠定了基础，并为深入了解RW-1红色果实品质的形成机制及分子改良提供了参考。

参考文献 References：

[1] 许欢欢，何爱民，吉洋洋，李娜，白瑞鹏，牟德华 . 核桃的营养价值、保健功能及开发前景[J]. 食品工业，2023，44(5)：342-346.
Xu Huanhuan，He Aimin，Ji Yangyang，Li Na，Bai Ruipeng，Mou Dehua. The nutritional，health function and application prospect of walnuts[J]. The Food Industry，2023，44(5)：342-346.

[2] 刘警，于秋香，李扬，李义红，张家齐，白仲奎 . 我国核桃生产的现状、问题及发展对策[J]. 北方果树，2020(6)：38-41.
Liu Jing，Yu Qiuxiang，Li Yang，Li Yihong，Zhang Jiaqi，Bai Zhongkui. The current situation，problems and development countermeasures of walnut production in China[J]. Northern Fruits，2020(6)：38-41.

[3] 孟佳，方晓璞，史宣明，张煜，刘建 . 我国核桃产业发展现状、问题与建议[J]. 中国油脂，2023，48(1)：84-86.
Meng Jia，Fang Xiaopu，Shi Xuanming，Zhang Yu，Liu Jian. Situation，problems and suggestions on the development of walnut industry in China[J]. China Oils and Fats，2023，48(1)：84-86.

[4] 李永洲 . 基于转录组测序探讨红瓤核桃中花青苷合成的相关调控基因[D]. 郑州：河南农业大学，2018.
Li Yongzhou. Exploring regulatory genes of red walnut (*Juglans regia* L.) anthocyanin biosynthesis based on transcriptome analysis[D]. Zhengzhou：Henan Agricultural University，2018.

[5] Castañeda-Ovando A，De Lourdes Pacheco-Hernández M，Páez-Hernández M E，Rodríguez J A，Galán-Vidal C A. Chemical studies of anthocyanins：A review[J]. Food Chemistry，2009，113(4)：859-871.

[6] Chen X J，Wang P J，Gu M Y，Hou B H，Zhang C R，Zheng Y C，Sun Y，Jin S，Ye N X. Identification of *PAL* genes related to anthocyanin synthesis in tea plants and its correlation with anthocyanin content[J]. Horticultural Plant Journal，2022，8(3)：381-394.

[7] Li P，Li Y J，Zhang F J，Zhang G Z，Jiang X Y，Yu H M，Hou B K. The Arabidopsis UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3，contribute to cold，salt and drought stress tolerance *via* modulating anthocyanin accumulation[J]. The Plant Journal，2017，89(1)：85-103.

[8] 杨慧勤，王佳丽，李思蕤，牛义，汤青林，魏大勇，王永清，王志敏 . 茄科蔬菜花青素苷分子调控研究进展[J]. 生物工程学报，2022，38(5)：1738-1752.
Yang Huiqin，Wang Jiali，Li Sirui，Niu Yi，Tang Qinglin，Wei Dayong，Wang Yongqing，Wang Zhimin. Advances in the molecular regulation of anthocyanins in solanaceous vegetables[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2022，38(5)：1738-1752.

[9] Srivastava P，Garg A，Misra R C，Chanotiya C S，Ghosh S. UGT86C11 is a novel plant UDP-glycosyltransferase involved in labdane diterpene biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry，2021，297(3)：101045.

[10] Shi D H，Yang J Y，Li G Y，Zhou Y T，Yao P，Shi Y Y，Tian J Y，Zhang X J，Liu Q L. Genome-wide identification of *UGT* genes and analysis of their expression profiles during fruit development in walnut (*Juglans regia* L.)[J]. Horticulturae，2024，10(11)：1130.

[11] Zhao W，Fan L，Wu W J，Li Y Q，Meng H J，Wang G X，Dong Z B，Wang L，Wu G L. Re-sequencing and transcriptomic analysis reveal differential expression patterns and sequence variation in glucosyltransferase gene related to anthocyanin biosynthesis in walnut (*Juglans regia* L.)[J]. Scientia Horticulturae，2023，317：112077.

[12] 陈敏，刘静，刘至柔，张艳文，李逸菲，李永华，张开明 . 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，Zhang Yanwen，Li Yifei，Li Yonghua，Zhang Kaiming. Cloning and functional verification of *BsUFGT* gene in *Begonia semperflorens*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology，2023，31(10)：2087-2097.

[13] 林兵，陈艺荃，方能炎，钟淮钦，叶秀仙，樊荣辉 . 荷兰鸢尾突变株‘紫韵’的花色突变相关机理分析[J]. 西北植物学报，2021，41(9)：1509-1515.
Lin Bing，Chen Yiquan，Fang Nengyan，Zhong Huaiqin，Ye Xiuxian，Fan Ronghui. Analysis of related genes about flower color mutation in‘Ziyun’of *Iris hollandica*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，2021，41(9)：1509-1515.

[14] Peng Y Y，Wang K L，Cooney J M，Wang T C，Espley R V，Allan A C. Differential regulation of the anthocyanin profile in purple kiwifruit (*Actinidia* species)[J]. Horticulture Research，2019，6：3.

[15] Chen W F，Zhang M X，Zhang G J，Li P M，Ma F W. Differential regulation of anthocyanin synthesis in apple peel under different sunlight intensities[J]. International Journal of Molecular Sciences，2019，20(23)：6060.

[16] 李明，郝建军，于洋，付淑杰，李云鹏，吴建丽 . 脱落酸(ABA)对苹果果实着色相关物质变化的影响[J]. 沈阳农业大学学报，2005，36(2)：189-193.
Li Ming，Hao Jianjun，Yu Yang，Fu Shujie，Li Yunpeng，Wu Jianli. Effects of abscisic acid on the color of Hanguang apple fruit[J]. Journal of Shenyang Agricultural University，2005，36(2)：189-193.

[17] Song R F，Hu X Y，Liu W C，Yuan H M. ABA functions in low phosphate-induced anthocyanin accumulation through the transcription factor ABI5 in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports，2024，43(2)：55.

[18] 杨艳，胡洋，刘霓如，殷璐，杨锐，王鹏飞，穆霄鹏，张帅，程春振，张建成 . ‘红满堂’苹果 *MbbZIP43* 基因的克隆与功能研究[J]. 生物技术通报，2024，40(2)：146-159.
Yang Yan，Hu Yang，Liu Niru，Yin Lu，Yang Rui，Wang Pengfei，Mu Xiaopeng，Zhang Shuai，Cheng Chunzhen，Zhang Jiancheng. Cloning and functional analysis of *MbbZIP43* gene in‘Hongmantang’red-flesh apple[J]. Biotechnology Bulletin，2024，40(2)：146-159.

[19] An J P，Zhang X W，Liu Y J，Wang X F，You C X，Hao Y J. ABI5 regulates ABA-induced anthocyanin biosynthesis by modulating the MYB1-bHLH3 complex in apple[J]. Journal of Experimental Botany，2021，72(4)：1460-1472.

[20] Zhao W，Liu Y H，Li L，Meng H J，Yang Y，Dong Z B，Wang L，Wu G L. Genome-wide identification and characterization of bHLH transcription factors related to anthocyanin biosynthesis in red walnut (*Juglans regia* L.)[J]. Frontiers in Genetics，2021，12：632509.

[21] Livak K J，Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods，2001，25(4)：402-408.

[22] 俞凯莉，赵志常，高爱平，罗睿雄，黄建峰，张梦云，李茂富 . 杧果脱镁叶绿素酶基因 *MiPPH* 的克隆及植物表达载体构建[J]. 分子植物育种，2023，21(11)：3628-3635.
Yu Kaili，Zhao Zhichang，Gao Aiping，Luo Ruixiong，Huang Jianfeng，Zhang Mengyun，Li Maofu. Cloning of *MiPPH* gene and construction of plant expression vector from mango (*Mangifera indica*)[J]. Molecular Plant Breeding，2023，21(11)：3628-3635.

[23] Alabd A，Ahmad M，Zhang X，Gao Y H，Peng L，Zhang L，Ni J B，Bai S L，Teng Y W. Light-responsive transcription factor PpWRKY44 induces anthocyanin accumulation by regulating *PpMYB10* expression in pear[J]. Horticulture Research，2022，9：uhac199.

[24] 李琳，张港港，张燕，吴文江，赵伟，李文战，王磊，吴国良 . 红瓤核桃遗传和生物学特性观察及种仁品质分析[J]. 河南农业大学学报，2022，56(4)：611-621.
Li Lin，Zhang Ganggang，Zhang Yan，Wu Wenjiang，Zhao Wei，Li Wenzhan，Wang Lei，Wu Guoliang. Analysis of genetic and biological characteristics and fruit quality of red walnut[J]. Journal of Henan Agricultural University，2022，56(4)：611-621.

[25] 王清，武立伟，范潘慧，徐志超，罗红梅，孙伟，王瑀，郑司浩，宋经元，姚辉 . 响应 ABA 的甘草 bZIP 转录因子的基因表达及调控研究[J]. 中国现代中药，2023，25(6)：1207-1217.
Wang Qing，Wu Liwei，Fan Panhui，Xu Zhichao，Luo Hongmei，Sun Wei，Wang Yu，Zheng Sihao，Song Jingyuan，Yao Hui. Gene expression and regulation of bZIP transcription factors in re-

sponse to ABA in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.[J]. Modern Chinese Medicine，2023，25(6)：1207-1217.

[26] 杨勇，张俊红，韩潇，张毓婷，杨琪，童再康 . 闽楠 bZIP 基因家族鉴定和脱落酸处理下的表达分析[J]. 浙江农林大学学报，2024，41(2)：275-285.
Yang Yong，Zhang Junhong，Han Xiao，Zhang Yuting，Yang Qi，Tong Zaikang. Identification and expression analysis of bZIP gene family under ABA treatment in *Phoebe bournei*[J]. Journal of Zhejiang A & F University，2024，41(2)：275-285.

[27] Gai S L，Du B Y，Xiao Y Q，Zhang X，Turupu M，Yao Q S，Wang X Y，Yan Y Z，Li T H. bZIP transcription factor PavbZIP6 regulates anthocyanin accumulation by increasing abscisic acid in sweet cherry[J]. International Journal of Molecular Sciences，2024，25(18)：10207.

[28] Krga I，Milenkovic D. Anthocyanins：From sources and bioavailability to cardiovascular-health benefits and molecular mechanisms of action[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2019，67(7)：1771-1783.

[29] Li G，Zhao J H，Qin B B，Yin Y，An W，Mu Z X，Cao Y L. ABA mediates development-dependent anthocyanin biosynthesis and fruit coloration in *Lycium* plants[J]. BMC Plant Biology，2019，19(1)：317.

[30] Zhu L，Zhang Y L，Zhang W，Lu J. Effects of exogenous abscisic acid on phenolic characteristics of red *Vitis vinifera* grapes and wines[J]. Food Science and Biotechnology，2016，25(2)：361-370.

[31] 徐兴源，李艳肖，朱梦洋，朱贵爽，刘鹏，向殿军 . 蓖麻 *RcbZIP44* 基因克隆及表达特性[J]. 南方农业学报，2024，55(7)：2069-2079.
Xu Xingyuan，Li Yanxiao，Zhu Mengyang，Zhu Guishuang，Liu Peng，Xiang Dianjun. Cloning and expression characteristics of *RcbZIP44* gene in *Castor*[J]. Journal of Southern Agriculture，2024，55(7)：2069-2079.

[32] 李哲 . 欧李 bZIP 转录因子家族分析及 ChABI5 的功能研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学，2023.
Li Zhe. Analysis of bZIP transcription factor family in *Cerasus humilis* and functional study of ChABI5[D]. Harbin：Northeast Forestry University，2023.

[33] An J P，Yao J F，Xu R R，You C X，Wang X F，Hao Y J. Apple bZIP transcription factor MdbZIP44 regulates abscisic acid-promoted anthocyanin accumulation[J]. Plant，Cell & Environment，2018，41(11)：2678-2692.

[34] Ji X L，Li Z，Zhang M Y，Lang S Y，Song X S. ChMYB1-ChbHLH42-ChTTG1 module regulates abscisic acid-induced anthocyanin biosynthesis in *Cerasus humilis*[J]. Horticultural Plant Journal，2024，10(1)：51-65.

[35] 赵伟，李琳，刘永辉，章露露，杨莹，孟海军，王磊，吴国良 . 红仁核桃自然杂交后代不同表型叶片差异表达 *CHS* 基因的鉴定及生物信息学分析[J]. 果树学报，2021，38(2)：179-191.
Zhao Wei，Li Lin，Liu Yonghui，Zhang Lulu，Yang Ying，Meng Haijun，Wang Lei，Wu Guoliang. Identification and bioinformatics analysis of *CHS* genes in different phenotypic leaves of natural hybrid progenies of red-kernel walnut[J]. Journal of Fruit Science，2021，38(2)：179-191.

[36] 王磊，樊璐，李亚奇，陈俊儒，孟海军，吴国良 . 红瓤核桃 JrbHLHA2 转录因子靶向查尔酮合成酶基因 *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.
Wang Lei，Fan Lu，Li Yaqi，Chen Junru，Meng Haijun，Wu Guoliang. Functional research on JrbHLHA2 transcription factor targeting chal-cone synthase gene *JrCHS4* regulating anthocyanin biosynthesis in red walnut[J]. Journal of Fruit Science，2024，41(10)：2002-2013.