

黄果枸杞 *LbaPDS* 基因及其启动子的克隆与表达分析

马云妮¹, 高 寒², 曹晓宇³, 米 佳³, 安 巍³, 尹 跃^{3*}, 郑 蕊^{2*}

1. 宁夏大学食品科学与工程学院, 宁夏 银川 750021

2. 宁夏大学生命科学学院, 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 林木资源高效生产全国重点实验室, 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 宁夏 银川 750021

3. 宁夏农林科学院 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 751002

摘 要: 目的 为解析黄果枸杞 *Lycium barbarum* var. *L. auranticarpum* 类胡萝卜素转录调控机制, 克隆了枸杞 *LbaPDS* 基因及其启动子, 并进行了表达分析。方法 以宁夏产黄果枸杞为研究材料, 克隆 *LbaPDS* 基因及其启动子, 采用 RT-qPCR 技术分析 *LbaPDS* 基因在根、茎、叶、花、和果实不同发育期, 以及高温、低温、干旱、盐等非生物胁迫下的表达模式, 通过构建 *LbaPDS*-GFP 载体, 确定 *LbaPDS* 蛋白的亚细胞定位, 利用 PlantCare 数据库预测启动子顺式作用元件, 构建该启动子与 GUS 融合表达载体, 并异源转化拟南芥, 通过 GUS 组织化学染色初步确定转基因拟南芥中 *LbaPDS* 启动子的表达强度及表达特异性。结果 枸杞 *LbaPDS* 基因全长 1 749 bp, 编码 582 个氨基酸。*LbaPDS* 基因在果实成熟期高表达, 在根和茎中低表达。在高温、低温、干旱以及盐等非生物胁迫下, *LbaPDS* 基因的表达发生显著性变化。*LbaPDS* 蛋白定位在叶绿体中。*LbaPDS* 启动子序列中存在厌氧诱导、激素响应、生长发育响应等多种顺式作用元件。GUS 组织化学染色结果表明, *LbaPDS* 启动子在果荚中高表达, 在根中低表达。结论 成功克隆了 *LbaPDS* 基因及其启动子; *LbaPDS* 基因在果实成熟期高表达, 高温、低温、干旱、盐等非生物胁迫显著影响 *LbaPDS* 基因的表达, 其启动子主要在拟南芥果荚高表达; *LbaPDS* 蛋白定位在叶绿体。为深入探究 *LbaPDS* 基因及其启动子的功能及枸杞类胡萝卜素转录调控机制研究提供了研究基础及参考依据。

关键词: 黄果枸杞; *LbaPDS*; 启动子; 表达分析; GUS 染色

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)23-8723-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.23.022

Cloning and expression analysis of *LbaPDS* gene and its promoter of *Lycium barbarum* var. *auranticarpum*

MA Yunni¹, GAO Han², CAO Xiaoyu³, MI Jia³, AN Wei³, YIN Yue³, ZHENG Rui²

1. College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2. College of Life Science, Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, National Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

3. National Wolfberry Engineering Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 751002, China

Abstract: Objective To analyze the mechanism of transcriptional regulation of carotenoid in Huangguogouqi (*Lycium barbarum* var. *auranticarpum*), the *LbaPDS* gene and its promoter were cloned and functionally analyzed. **Methods** *L. barbarum* L. var. *auranticarpum* from Ningxia was used as the study material. The *LbaPDS* gene and promoter were cloned, and their expression patterns of *LbaPDS* gene in roots, stems, leaves, flowers, and fruits, as well as under abiotic stresses such as high temperature, low temperature, drought, and salinity were analyzed by qRT-PCR. The subcellular localization of the *LbaPDS* protein was determined by constructing

收稿日期: 2025-08-02

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2022BBF02008, 2025BBF02004); 宁夏自然科学基金优秀青年基金项目 (2023AAC05049); 国家自然科学基金项目 (32460098)

作者简介: 马云妮, 女, 硕士研究生, 研究方向为植物基食品资源开发与利用。E-mail: yunnima0513@163.com

*通信作者: 郑 蕊, 女, 博士生导师, 研究方向为植物调控重要性状的功能基因组学研究。E-mail: xlzheng@126.com

尹 跃, 男, 副研究员, 研究方向为枸杞遗传育种研究。E-mail: yueyin0112@aliyun.com

LbaPDS-GFP fusion expression vector. The PlantCare database was used to predict the cis-acting elements of the promoter. A fusion expression vector of this promoter and GUS was constructed, and *Arabidopsis thaliana* was heterologously transformed. The expression intensity and specificity of *LbaPDS* in transgenic *A. thaliana* were preliminarily determined by GUS histochemical staining. **Results** The *LbaPDS* gene obtained in this study was 1 749 bp in length and encoded 582 amino acids. The *LbaPDS* gene was highly expressed during the maturation period, and minimally expressed in roots and stems. The expression of *LbaPDS* gene underwent significant changes under abiotic stresses such as high and low temperatures, drought, and salt stress. The LbaPDS protein was localized in chloroplasts. PlantCare analysis revealed multiple cis-acting elements in the *LbaPDS* promoter sequence, including anaerobic-inducible, light-responsive, hormone-responsive, and growth and development responsive elements. To further analyze the function of the *LbaPDS* promoter, a GUS fusion expression vector was constructed. The expression sites were mainly high concentrated in fruit pods by GUS histochemical staining. Expression of this gene was low detected in roots. **Conclusion** The *LbaPDS* gene and its promoter have been successfully cloned. The *LbaPDS* gene has been observed to exhibit elevated levels of expression during the maturation stage of fruit development. Temperature, drought, salt, and other abiotic stresses have been demonstrated to significantly affect the expression of the *LbaPDS* gene, whose promoter is predominantly expressed in pods. The LbaPDS protein was localized in chloroplasts. This study establishes a foundational framework and serves as a reference point for subsequent investigations into the functional roles of the *LbaPDS* gene and its promoter, as well as the transcriptional regulatory mechanisms of carotenoids in *L. barbarum*.

Key words: *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K. F. Ching; *LbaPDS*; promoter; expression pattern; GUS staining

黄果枸杞 *Lycium barbarum* L. var. *auranticarpum* K. F. Ching 隶属于茄科(Solanaceae)枸杞属 *Lycium barbarum* L., 多年生落叶灌木植物, 重要药食同源型植物资源, 其果实富含丰富药效功能成分, 如枸杞果糖、类黄酮、甜菜碱、亚精胺和类胡萝卜素等, 这些活性成分在抗氧化、保肝明目、增强免疫力等方面发挥着重要作用^[1-3]。类胡萝卜素作为枸杞果实品质性状重要指标, 其含量高低影响枸杞外观品质。前期研究发现, 玉米黄素双棕榈酸酯是成熟宁夏枸杞果实类胡萝卜素的主要组分, 含量占总类胡萝卜素含量的 75%以上^[4]。当前, 枸杞果实类胡萝卜素的研究多聚焦于组分鉴定与含量测定等领域研究。近年来, 虽已借助枸杞基因组数据库和多组联合分析等手段, 挖掘获得调控枸杞果实类胡萝卜素代谢候选基因, 但其转录调控机制仍不清楚^[4]。

植物类胡萝卜素作为重要的脂溶性色素, 在光合作用、抗氧化及激素调控等方面发挥多重作用, 其代谢和基因功能得到了广泛深入的研究^[5-6]。八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase, PDS)是类胡萝卜素生物合成途径中的关键限速酶之一, 通过催化八氢番茄红素生成 ζ -胡萝卜素, 为后续合成提供核心前体物质^[7-8]。在芥蓝、黄肉桃及番茄等多种植物已完成克隆及表达分析, 发现 *PDS* 基因在芥蓝果荚中低表达, 在黄肉桃、番茄果实中高表达, 且与类胡萝卜素含量呈显著正相关^[9-11]。过表达 *PDS* 基因, 可显著提高八氢番茄红素脱氢酶活性, 促使 β -胡罗

素、玉米黄质等组分的含量显著增加^[12-13]。在拟南芥中, 过表达 *AtPDS* 基因使 *DXS* 和 *PSY1* 基因显著上调表达, 导致过表达株系中叶黄素、玉米黄质和 β -隐黄质含量显著增加^[14]; 在枸杞中, 过表达 *LcPDS* 基因, 使 *NtGGPS*、*NtPSY*、*Nt β -LCY*、*Nt β -CHY*、*NtZEP*、*NtVDE* 和 *NtNSY* 的表达量显著上调, 从而促进类胡萝卜素生物合成^[15]。此外, *PDS* 作为理想的病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)标记基因, 为难稳定转化植物的基因功能研究提供了有效手段^[16-17]。在枸杞中, 沉默 *PDS* 基因, 导致 *PDS* 基因的表达被显著抑制^[18]; 在丝瓜中, 成功诱导 *PDS* 基因沉默, 致使叶片出现明显的漂白表型^[19]; 在石蒜中, 沉默 *PDS* 基因, 导致八氢番茄红素去饱和酶被抑制表达, 且叶片表现出黄化表型^[20]。这些研究进一步揭示了 *PDS* 基因在类胡萝卜素代谢途径中的功能多样性及植物生长发育中的重要作用。目前, 关于枸杞 *PDS* 基因的表达特性、启动子特征及其在转录调控等相关研究未见报道。

本研究, 以宁夏产黄果枸杞为研究材料, 基于枸杞基因组数据库^[21], 克隆获得 *PDS* 基因及其启动子序列, 采用 qRT-PCR 分析该基因组织表达模式, 并对其编码蛋白进行了亚细胞定位研究。同时, 将该基因启动子序列与 *GUS* 报告基因连接并转化拟南芥, 初步分析了转基因拟南芥 *GUS* 基因的表达特性, 本研究为深入枸杞 *PDS* 基因功能奠定基础。

1 材料

供试枸杞材料经宁夏大学郑蕊教授鉴定为宁夏产黄果枸杞 *L. barbarum* L. var. *auranticarpum* K. F. Ching, 于 2024 年 6 月采自宁夏农林科学院国家枸杞工程技术研究中心枸杞种质资源圃 (106°09'10" E, 38°38'49" N), 采用对角线取样法, 选择 3 株长势一致的 12 年生枸杞树, 分别采摘根、茎、叶、花及开花后 12 d (S1)、19 d (S2)、25 d (S3)、30 d (S4)、37 d (S5) 的果实。所有样品采集后立即置于液氮中带回, 随后于 -80 °C 冰箱保存备用, 每个样品设 3 次生物学重复。

2 方法

2.1 样品处理

非生物胁迫试验材料为宁夏产黄果枸杞苗, 将枸杞种子置于宁波东南仪器有限公司的 RDN 型人工气候箱进行培养, 设定条件为温度 26 °C, 相对湿度 65%, 光照/黑暗时间 16 h/8 h。培养 4 周后, 分别采用 42 °C 高温、4 °C 低温、20% PEG6000 溶液 (模拟干旱) 及 300 mmol/L NaCl 溶液 (模拟盐胁迫) 处理枸杞苗, 每个处理设 3 个生物学重复; 各胁迫处理后, 分别于 1、3、6、9、12、24 h 取样, 样品采摘后立即置于液氮中, 随后于 -80 °C 冰箱保存, 用于后续 *LbaPDS* 基因的非生物胁迫表达分析。本实验使用的本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* L. 在光照/黑暗时间 16 h/8 h, 相对湿度 65% 的培养条件下土培 4~5 周, 供瞬时转化实验。Columbia 型拟南芥在光照/黑暗时间 8 h/16 h 的条件下培养, 用于启动子转化实验。

2.2 枸杞组织总 RNA 的提取及 cDNA 的反转录

枸杞不同组织的总 RNA 的提取参照 OMEGA 公司的 E.Z.N.A. Plant RNA Kit 试剂盒说明书进行; cDNA 的合成参照北京全式金生物技术股份有限公司的 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix Kit 试剂盒说明书操作。

2.3 *LbaPDS* 基因的克隆

从枸杞基因组数据库中下载枸杞 *PDS* 基因序列, 从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取枸杞基因组数据 (PRJNA640228), 从拟南芥数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 *PDS* 蛋白序列。首先, 以枸杞蛋白序列构建本地数据库, 以 AtPDS 蛋白序列进行 BLASTP 比对, 筛选 E 值 $< 1 \times 10^{-6}$ 的序列作为候选序列; 进一步通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 验证候选基因的结构域, 最终确定枸杞 *PDS* 基因序列。使用 Primer Premier 5 软件设计 *LbaPDS* 基因扩增特异性引物, 由西安擎科生物公司合成 (表 1), 以黄果枸杞 S5 时期果实的 cDNA 为模板, 采用 Toyobo 公司的 KOD 高保真酶进行 PCR 扩增, 扩增体系与程序参照该酶说明书操作。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定目的条带位置后, 用 OMEGA 公司的胶回收试剂盒纯化回收, 将回收片段与 TSINGKE 公司的 pClone007 载体连接, 连接步骤参照 pClone007 载体试剂盒说明书。通过 42 °C 热激法将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α , 过夜培养后挑取单克隆进行 PCR 阳性鉴定, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证产物条带正确性后, 选取阳性克隆进行摇菌培养, 最终送至西安擎科生物公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
LbaPDS-F	ATGCCCCAAATTGGACTTGTTT	基因克隆
LbaPDS-R	CTAAACTACGCTTGCTTCTGCCA	
qLbabPDS-F	CAAATTGGACTTGTTTCTGCTGTTA	qRT-PCR
qLbabPDS-R	GGTCTTGGATAATCAACGCAAACTA	
LbaActin-F	CAATCGGGTATTTCAAGGTCAAG	
LbaActin-R	GAGCAGTGTTTCCCAGCATTG	
GFP-LbaPDS-F	TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA	亚细胞定位
GFP-LbaPDS-R	TTTGC GGACTCTAGTTCATCTAGAGGATCCCTAAACTACGCTTG	
LbaPDSpro-F	ATCAATTCTATTTTAGTTACCCAGCC	启动子克隆
LbaPDSpro-R	TTTACTGAACAATAGCAGTAAAACCTG	
GUS-LbaPDSpro-F	GGTTGCTCCATTTAGTTATCAATTCTATTTTAGTTACCCAGCCA	GUS表达载体
GUS-LbaPDSpro-R	ACCCTCAGATCTACCATTTTACTGAACAATAGCAGTAAAACCTGC	
LbaPDSpro-check-F	AGAACCAGTCTCTTATGGACTG	转拟南芥阳性植株鉴定
GUS-R	GGTTGGGGTTTCTACAGGAC	

2.4 *LbaPDS* 基因的表达分析

利用 qRT-PCR 技术分析 *LbaPDS* 基因在宁夏产黄果枸杞不同组织、果实不同发育阶段, 及高温、低温、干旱、盐 4 种非生物胁迫下的相对表达量。通过 Primer Premier 5 设计 *LbaPDS* 基因的特异性荧光定量引物 (表 1)。以 TransGen 公司的 Perfext Start™ Green qPCR Super Mix 进行实时荧光定量 PCR 检测, 扩增体系与程序参照试剂盒说明书。内参基因选用 *LbaActin* (GenBank 登录号 XM_06035454), 参照 Livak 等^[22]提出的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据计算, 每个样品设 3 次生物学重复。使用 GraphPad 10.0 做图, 误差棒以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 利用 SPSS 统计软件, 采用 Duncan 的方法进行差异显著性分析, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ ^[23]。

2.5 *LbaPDS* 蛋白的亚细胞定位

基于 *LbaPDS* 的基因序列与 pBinGFP2 载体序列, 通过 Primer Premier 5 设计特异性引物, 在引物 5'端分别引入 Kpn I 和 BamH I 限制性酶切位点, 设计带酶切位点且不含终止密码子的上下游引物 (表 1)。以黄果枸杞 S5 时期果实 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 同时使用 Thermo 公司的 Kpn I 和 BamH I 对 pBinGFP2 载体进行双酶切, 酶切体系参考试剂盒说明书; 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收线性化载体片段。将纯化的目标片段与线性化载体连接, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆摇菌并测序验证。将测序正确的重组质粒转化至农杆菌 GV3101 菌株中, 用于后续烟草叶片瞬时注射实验; 最终通过 Leica 公司的激光共聚焦显微镜观察烟草表皮细胞中 *LbaPDS* 的表达与定位情况。

2.6 *LbaPDS* 启动子克隆

使用 TBtools-II 软件, 结合枸杞基因组数据库和对应注释文件, 提取 *LbaPDS* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的序列, 将其界定为该基因的启动子区域。通过 Primer Premier 5 设计 *LbaPDS* 启动子克隆的特异性引物 (表 1)。以宁夏产黄果枸杞叶片基因组 DNA 为模板, 使用 Toyobo 公司的 KOD 高保真酶进行 PCR 扩增, 扩增体系与程序参考试剂盒说明书; 对扩增产物进行测序验证, 最终获得 *LbaPDS* 启动子的准确序列。

2.7 *LbaPDS* 启动子片段顺式作用元件分析

将获得的 *LbaPDS* 启动子序列提交至 PlantCare 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent>), 通过数据

库在线工具分析其包含的顺式作用元件; 随后使用 TBtools-II 对预测得到的顺式作用元件信息进行可视化处理^[24-25]。

2.8 *proLbaPDS::GUS* 融合表达载体的构建

本实验以宁夏产黄果枸杞的叶片基因组 DNA 为模板, 根据 *LbaPDS* 启动子序列, 通过 Primer Premier5 软件设计 *proLbaPDS::GUS* 融合表达载体引物 (表 1), 并进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切取目标条带纯化回收; 利用 Transgen 公司的 pEASY Basic Seamless Cloning and Assembly Kit, 将纯化的启动子片段与经 Nco I 和 Hind II 双酶切线性化的 pCambia3301 载体进行连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 筛选单克隆后通过 PCR 验证阳性克隆; 选取验证正确的克隆送至西安擎科生物有限公司测序, 从测序结果正确的菌液中提取重组质粒, 采用冻融法将其转化至农杆菌 GV3101 菌株, 最终用于拟南芥遗传转化实验。

2.9 *proLbaPDS::GUS* 融合表达载体转化拟南芥及阳性植株鉴定

采用农杆菌介导的花序侵染法, 将 *proLbaPDS::GUS* 融合表达载体导入拟南芥, 获得 T2 代转基因植株。提取野生型和转基因拟南芥的基因组 DNA, 通过 NanoDrop 仪器检测其浓度与纯度, 同时经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 的质量; 利用特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 鉴定阳性转基因植株。

2.10 GUS 组织化学染色

分别取野生型和 *proLbaPDS::GUS* 转基因拟南芥的叶片、幼苗、根及果荚组织, 置于 GUS 染色液 (含 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 值 7.0, 1 mmol/L 铁氰化钾, 1 mmol/L X-Gluc, 10 mmol/L MEDTANa₂, 0.1% Triton X-100), 室温下静置染色 24 h。染色后用 70% 乙醇脱色以去除样本组织中的叶绿素, 必要时可重复脱色步骤, 以确保叶绿素清除彻底; 将脱色后的样本保存于乙醇中, 在显微镜下观察并拍照, 白色背景上的蓝色区域即为 GUS 表达位点。

3 结果与分析

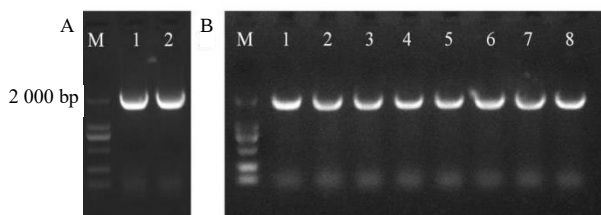
3.1 *LbaPDS* 基因克隆

以宁夏产黄果枸杞 S5 时期果实的 cDNA 为模板, 利用 RT-PCR 技术克隆获得 *LbaPDS* 基因的开放阅读框, 序列全长为 1 749 bp, 编码 582 个氨基

酸(图 1)。利用 GeneDoc 软件将该序列与枸杞基因组参考序列比对,结果显示二者完全一致(图 2)。

3.2 *LbaPDS* 基因的时空表达特征

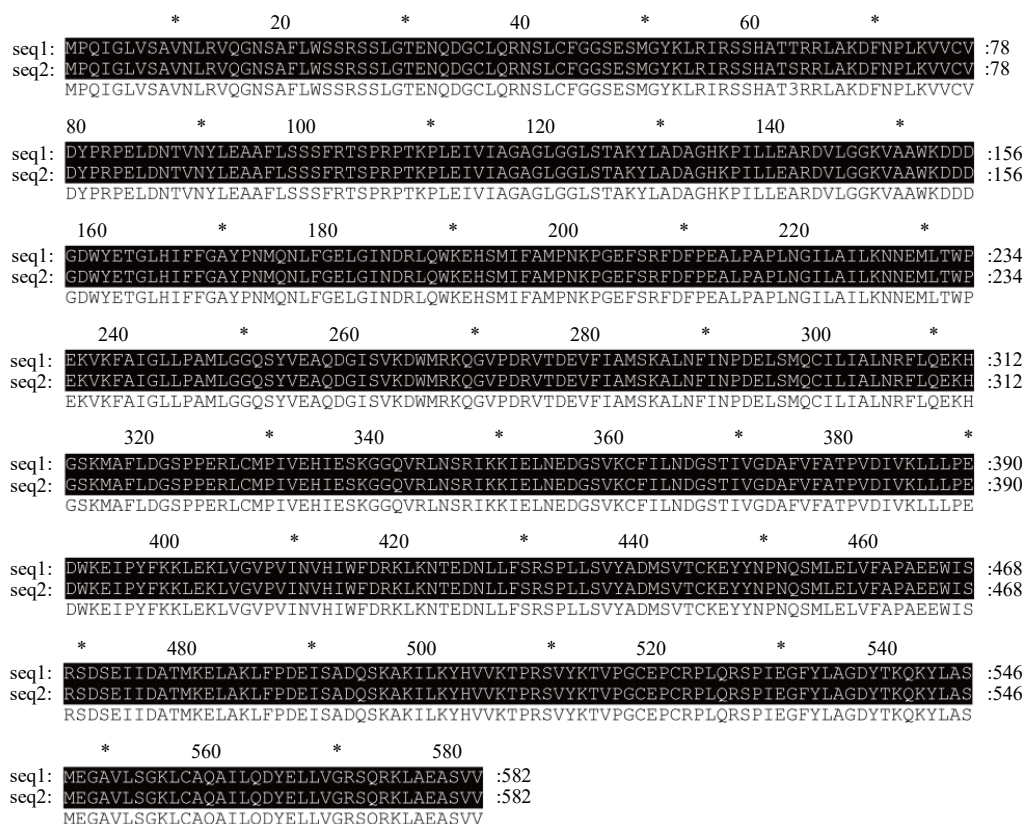
qRT-PCR 分析显示, *LbaPDS* 基因在宁夏产黄果枸杞不同组织及果实发育阶段的表达存在差异,



A-*LbaPDS* 基因 PCR 扩增, 1~2 为 PCR 扩增产物; B-*LbaPDS* 基因大肠杆菌菌液 PCR 鉴定; 1~8 为 PCR 扩增产物; M-maker。
A-PCR amplification of *LbaPDS* gene, PCR amplification products of 1 to 2; B-PCR identification of *LbaPDS* gene in *Escherichia coli*, PCR amplification products of 1 to 8; M-maker.

图 1 *LbaPDS* 基因克隆

Fig. 1 Cloning of *LbaPDS* gene



seq1-*LbaPDS* 基因组参考序列; seq2-宁夏产黄果枸杞 *PDS* 氨基酸序列。

seq1-*LbaPDS* genome reference sequence; seq2-PDS amino acid sequence of *L. barbarum* L. var. *auranticarpum*.

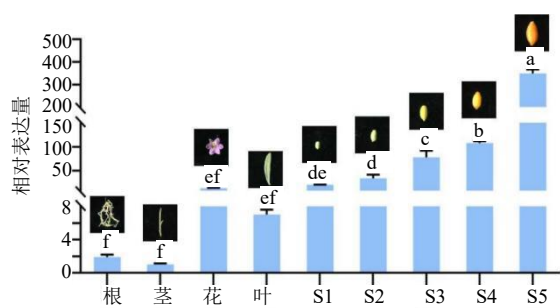
图 2 *LbaPDS* 蛋白氨基酸序列的比对分析

Fig. 2 Sequence alignment of amino acids of *LbaPDS*

在果实成熟期(S5)的相对表达水平显著高于其他组织,在花和叶中的表达量高于根和茎;且该基因的表达量随果实成熟持续上升,至 S5 阶段达到峰值(图 3)。

3.3 *LbaPDS* 基因非生物胁迫表达分析

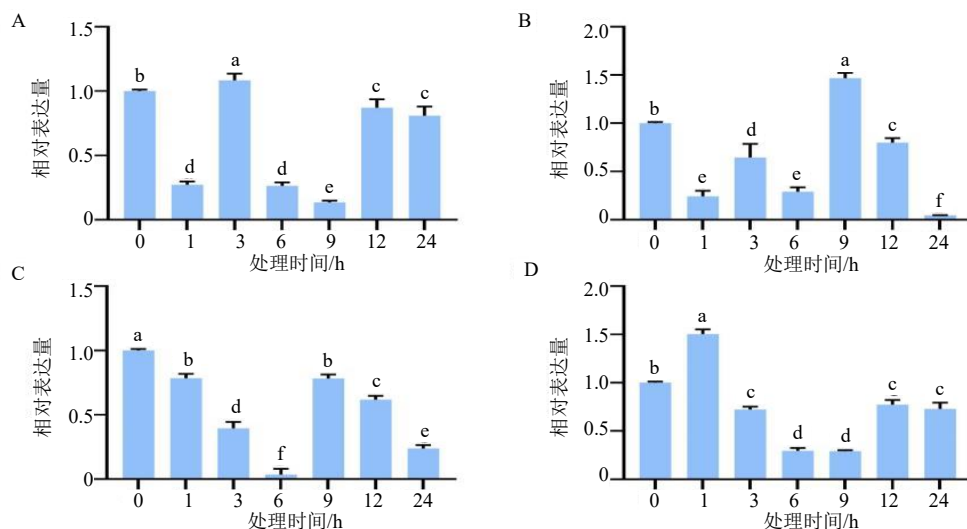
qRT-PCR 分析显示(图 4),宁夏产黄果枸杞 *LbaPDS* 基因在高温、低温、干旱、盐 4 种非生物胁迫下的表达模式存在显著差异。在 42 °C 高温胁迫下, *LbaPDS* 基因表达量在 1~3 h 呈上升趋势, 3~9 h 则持续下调且低于对照组(0 h),其中 9 h 时下调幅度最显著(图 4-A)。在 4 °C 低温胁迫下,该基因在 9 h 时表达量显著上调, 9~24 h 快速下降,至 24 h 时显著低于对照组(图 4-B)。在 20%的 PEG-6000 模拟干旱胁迫下, 0~6 h *LbaPDS* 基因表达量持续下降, 6 h 时显著低于对照组; 6~9 h 急剧回升后, 9 h 后再次持续下降,整体表达水平呈下降趋势(图 4-C)。在 300 mmol/L NaCl 胁迫下,该基因整体表达水平低于对照组,仅在 1 h 时出现显著上调, 9 h 时表达量降至最低(图 4-D)。



S1~S5 为开花后第 12、19、25、30、37 天黄果枸杞果实。
S1—S5 are the fruits of *L. barbarum* var. *auranticarpum* at 12, 19, 25, 30, 37 d after flowering.

图 3 *LbaPDS* 基因的时空表达

Fig. 3 Spatiotemporal expression of *LbaPDS* gene



A-高温处理 (42 °C); B-低温处理 (4 °C); C-干旱处理 (20% PEG-6000 溶液); D-盐处理 (300 mmol/L NaCl 溶液); 不同字母表示 $P < 0.05$ 。
A-high-temperature treatment (42 °C); B-low-temperature treatment (4 °C); C-drought treatment (20% PEG-6000 solution); D-salt treatment (300 mmol/L NaCl solution); Different letters indicate $P < 0.05$.

图 4 *LbaPDS* 基因非生物胁迫的表达

Fig. 4 Expression of *LbaPDS* gene under abiotic stresses

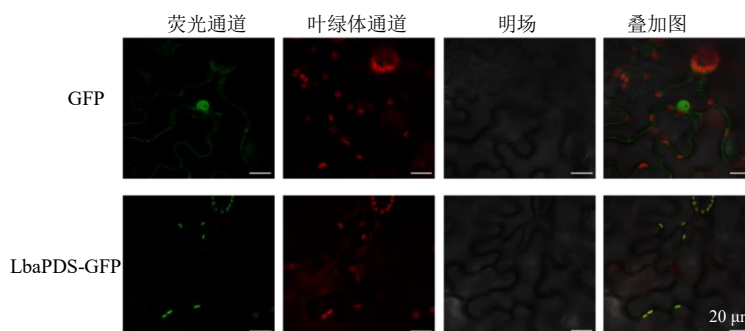


图 5 *LbaPDS* 蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of *LbaPDS* protein

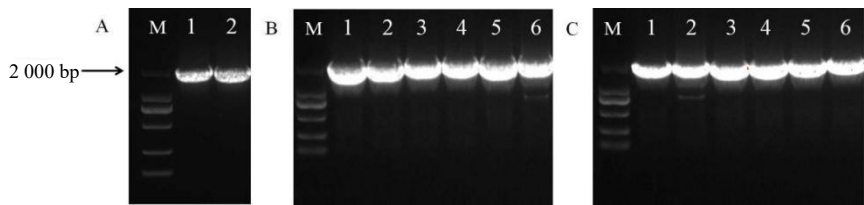
3.4 *LbaPDS* 蛋白亚细胞定位

构建 *LbaPDS* 与绿色荧光蛋白基因 GFP 的融合表达载体, 在烟草表皮细胞中进行瞬时表达。激光共聚焦显微镜观察结果显示, 对照组空载 GFP 的绿色荧光信号在细胞核、细胞质等多个细胞结构中均匀分布; 而在实验组中, *PDS*-GFP 融合蛋白的绿色荧光仅定位于叶绿体, 且与红色荧光完全重叠, 表明 *LbaPDS* 蛋白定位于叶绿体中 (图 5)。

3.5 *LbaPDS* 启动子克隆、表达载体构建

以宁夏产黄果枸杞叶片基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 技术获得 *LbaPDS* 启动子片段, 电泳检测显示产物大小约为 2 000 bp (图 6-A), 与预期长度一致。

利用同源重组法将该启动子序列与 pCambia3301



A-*LbaPDS* 启动子片段的 PCR 扩增, 1~2 为 PCR 扩增产物; B-*proLbaPDS::GUS* 融合表达载体大肠杆菌菌液 PCR 鉴定, 1~6 为 PCR 扩增产物; C-*proLbaPDS::GUS* 融合表达载体农杆菌菌液 PCR 鉴定, 1~6 为 PCR 扩增产物; M-maker。
A-PCR amplification of *LbaPDS* promoter, PCR amplification products of 1 to 2; B-PCR amplification of *proLbaPDS::GUS* in *E. coli*; PCR amplification products of 1 to 6; C-PCR amplification of *proLbaPDS::GUS* in *Agrobacterium*; PCR amplification products of 1 to 6; M-maker.

图 6 *LbaPDS* 启动子克隆和 *proLbaPDS::GUS* 融合表达载体 PCR 鉴定
Fig. 6 Cloning of *LbaPDS* promoter and PCR amplification of *proLbaPDS::GUS*

表达载体连接, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 后挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 成功筛选出阳性克隆 (图 6-B)。测序验证正确的重组质粒转化至农杆菌 GV3101, 在菌液中 PCR 扩增到目的条带 (图 6-C), 表明 *LbaPDS* 启动子已成功构建至 pCambia3301 载体并转入农杆菌 GV3101 中。

3.6 *LbaPDS* 启动子片段顺式作用元件分析

PlantCare 数据库预测结果显示, 宁夏产黄果枸杞 *LbaPDS* 启动子序列中包含多种顺式作用元件, 主要分为厌氧诱导元件、光响应元件、激素相关响应元件、发育相关响应元件及转录因子结合相关元件, 其中光响应元件数量最多。在植物激素响应元件中, 共鉴定出与赤霉素相关的 P-box 元件、与脱落酸相关的 ABRE 元件、与茉莉酸甲酯相关的 TGACG-motif 和 CGTCA-motif 元件; 此外, 该启动子还含有 MYB、bZIP 转录因子的结合位点, 且 bZIP 可识别并结合特定的 G-box 序列元件 (表 2 和图 7)。

3.7 *proLbaPDS::GUS* 融合表达载体转化拟南芥

经冻融法将 *proLbaPDS::GUS* 融合质粒导入农杆菌 GV3101 后侵染拟南芥, 培养至 T2 代后, 提取转基因和野生型拟南芥的基因组 DNA, 利用特异性引物进行 PCR 扩增鉴定 (表 1)。结果显示 (图 8), 成功获得 17 株阳性转基因拟南芥植株。

3.8 转基因阳性植株 GUS 组织化学染色分析

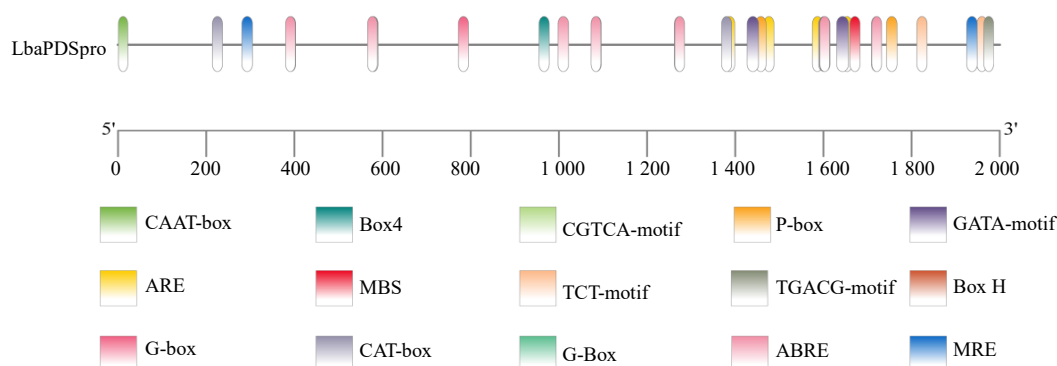
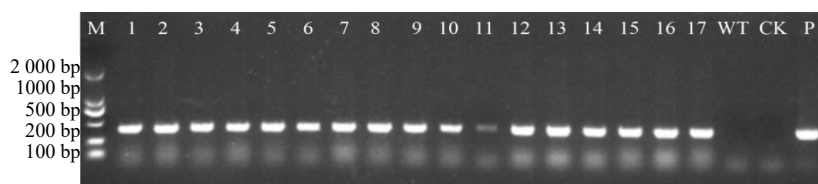
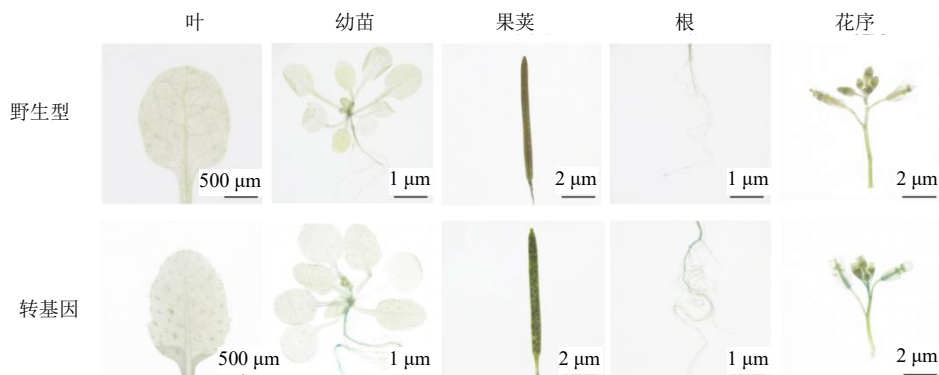
分别采集转基因和野生型拟南芥的叶片、幼苗、果荚、根和花序进行 GUS 染色。结果显示, 转基因拟南芥的叶片、幼苗、花序和果荚均出现不同程度的蓝色斑点, 其中果荚染色较深, 其余部位染色较浅; 而野生型拟南芥的叶片、幼苗、根、花序和果荚均无染色信号 (图 9), 说明 *LbaPDS* 启动子在拟南芥中具有组织表达特异性, 主要在果荚中表达量最高。

4 讨论

PDS 基因不仅是植物类胡萝卜素合成途径中的关键限速酶, 同时在光合作用调控及叶绿体功能

表 2 *LbaPDS* 基因启动子顺式作用元件
Table 2 Cis-acting elements of *LbaPDS* gene promoter

分类	顺式元件	个数	核心序列	功能描述
厌氧诱导	ARE	4	AAACCA	<i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction
	G-box	7	CACGTC	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
光响应	Box 4	1	GCCACT	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
	GATA-motif	2	AAGGATAAGG	part of a light responsive element
	Box II	2	ACACGTTGT	part of a light responsive element
	TCT-motif	2	TCTTAC	part of a light responsive element
	TCT-motif	2	TCTTAC	part of a light responsive element
激素响应	P-box	2	CCTTTTG	gibberellin-responsive element
	CGTCA-motif	2	CGTCA	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
	ABRE	7	ACGTG	<i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
	TGACG-motif	2	TGACG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
生长发育响应	CAT-box	2	GCCACT	<i>cis</i> -acting regulatory element related to meristem expression
转录因子	MRE	2	AACCTAA	MYB binding site involved in light responsiveness
	MBS	1	CAACTG	MYB binding site involved in drought-inducibility

图 7 *LbaPDS* 启动子顺式作用元件预测Fig. 7 Prediction of cis-acting elements in *LbaPDS* gene promoter1~17-转基因拟南芥; M-Marker; P-质粒; WT-野生型拟南芥; CK-ddH₂O。1~17-transgenic *Arabidopsis* plants; M-Marker; P-plasmid; WT-wild type *Arabidopsis*; CK-ddH₂O。图 8 *proLbaPDS::GUS* 转基因拟南芥阳性植株的 PCR 鉴定Fig. 8 PCR identification of *proLbaPDS::GUS* transgenic *A. thaliana* positive plants图 9 *proLbaPDS::GUS* 拟南芥不同组织的 GUS 活性分析Fig. 9 GUS activity analysis in different tissues of *proLbaPDS::GUS A. thaliana* transgenic plants

维持中扮演重要角色^[26]。目前已从羊蹄躑、三角褐指藻、马铃薯等多种植物中成功克隆出 *PDS* 基因，这些 *PDS* 基因的 cDNA 长介于 1 743~2 226 bp，编码 549~588 个氨基酸^[27-29]。本研究对宁夏产黄果枸杞的 *LbaPDS* 基因开展克隆，结果显示，该基因全长 1 749 bp，编码 582 个氨基酸。进一步通过 NCBI 数据库进行多序列比对，发现 *LbaPDS* 与多种植物的 *PDS* 氨基酸序列同源性较高，其中与辣椒

(XP_016562403.2)、烟草 (ABE99707.1) 的序列相似性最高，达 95%，说明它们在进化过程中相对保守，这与钟晓武等研究结果相一致^[30]。

不同物种中 *PDS* 基因表达模式存在显著差异。已有研究表明，柿子中，八氢番茄红素脱氢酶在果实中高表达^[31]；羊蹄躑中，*RmPDS* 基因的表达量在初花期达到最高^[27]；羊草中，*LcPDS* 基因在叶片与根部的表达量显著高于茎部，说明类胡萝卜素主要

在叶和根中积累^[32]。本研究对黄果枸杞不同组织及果实不同发育阶段的 qRT-PCR 分析显示, *LbaPDS* 基因在果实、花、叶中的表达量较高, 在根和茎中的表达水平较低; 且随着枸杞果实发育过程, *LbaPDS* 表达量逐步升高, 这与 Liu 等^[33]的研究结果一致, 发现果实中类胡萝卜素含量随着发育逐渐积累。基于上述结果, 推测 *LbaPDS* 基因在枸杞果实类胡萝卜素的生物合成与积累过程中发挥重要作用。

质体作为植物细胞中特有的细胞器, 是类胡萝卜素生物合成与储存的主要场所。已有研究证实, PDS 蛋白均定位在质体 (叶绿体) 中^[26,32,34]。本研究通过构建 *LbaPDS* 基因与 GFP 融合表达载体, 在烟草表皮细胞上进行瞬时表达, 结果显示 *LbaPDS* 蛋白定位于叶绿体, 这与前人研究结论一致。

本研究同时克隆了 *LbaPDS* 基因上游 2 000 bp 的启动子区域, 并通过 PlantCare 数据库分析, 发现该启动子区域富集 5 类光响应元件 (G-Box 和 TCT-motif 等)、1 类厌氧诱导元件 (ARE)、1 类生长发育相关元件 (CAT-box)、4 类激素调控元件 (P-box、ABRE 和 CGTCA-motif 等) 和 2 类与转录起始相关的顺式作用元件。鉴于 *LbaPDS* 启动子区含有丰富的光响应和激素响应元件, 推出该基因不仅可能受到赤霉素、茉莉酸甲酯及脱落酸等植物激素的调控, 还可能参与植物生长发育过程的调控, 这为进一步解析 *LbaPDS* 基因的表达调控机制提供了参考。

转录因子在类胡萝卜素合成过程中发挥关键调控作用。近年来, 已从不同的物种或组织中鉴定出多种参与类胡萝卜素生物合成的转录调节因子, 其中 WRKY、MYB 和 bZIP 等转录因子的调控功能被广泛报道^[35-37]。在浒苔中, UpMYB44 与 UpPDS 相互作用, 最终诱导总类胡萝卜素、 β -胡萝卜素和叶黄素含量的显著提升^[36]; 在柑橘中, 超量表达 Cs bZIP44 能显著促进类胡萝卜素的积累, 而抑制其表达则会延缓胡萝卜素合成进程^[37]。本研究通过启动子元件分析发现, *LbaPDS* 启动子区域富集 MYB 转录因子结合位点 (MRE 和 MBS) 和 bZIP 转录因子结合位点 (G-Box), 且已有研究证实 G-box 可参与植物发育过程中的基因表达调控^[38], 因此推测 *LbaPDS* 基因可能通过与这些转录因子互作, 从而参与植物生长发育的过程。本研究为后续深入开展枸杞类胡萝卜素合成转录调控的研究奠定了重要

基础。

通过 *LbaPDS* 启动子转化拟南芥发现, 该启动子的表达部位主要集中在叶片、幼苗、花序和果荚, 且在拟南芥果荚中表现出最高的转录活性, 这与孙海丽等^[39]报道的拟南芥启动子 *AtTUF*, 能够驱动 *GUS* 基因在果荚特异性表达的结果一致。值得注意的是, 本研究在根中检测到 *LbaPDS* 启动子的表达信号较弱, 说明 *LbaPDS* 启动子可能具有组织表达特异性。本研究不仅为深入探究枸杞 *LbaPDS* 基因及其启动子的功能提供理论依据与实验参考, 更为解析枸杞类胡萝卜素合成的转录调控机制开拓新的研究思路与视角。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gao Y J, Wei Y F, Wang Y Q, et al. *Lycium barbarum*: A traditional Chinese herb and A promising anti-aging agent [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 778-791.
- [2] 范文强, 刘雪霞, 马小兰, 等. 宁夏枸杞花药转录组分析及花药发育相关基因的筛选 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 827-834.
- [3] Ma R X, Zhang M, Yang X H, et al. Transcriptome analysis reveals genes related to the synthesis and metabolism of cell wall polysaccharides in goji berry (*Lycium barbarum* L.) from various regions [J]. *J Sci Food Agric*, 2023, 103(14): 7050-7060.
- [4] 尹跃, 秦小雅, 米佳, 等. 枸杞 *FBN* 基因家族鉴定及与类胡萝卜素代谢的相关性分析 [J/OL]. *生物技术通报*, [2025-08-01]. <https://link.cnki.net/doi/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-0340>.
- [5] 尹跃. *LbaBCH1* 及其调控因子 *LbaMYB44* 在枸杞和番茄果实类胡萝卜素积累中的功能研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2024.
- [6] 董书琦, 陈达, 秦巧平, 等. 高等植物叶绿素和类胡萝卜素代谢研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2023, 59(5): 793-802.
- [7] Nisar N, Li L, Lu S, et al. Carotenoid metabolism in plants [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 68-82.
- [8] Rodrigo M J, Marcos J F, Zacarias L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(22): 6724-6731.
- [9] 梁敏华, 杨震峰, 苏新国, 等. 黄肉桃果实八氢番茄红素脱氢酶基因的克隆及表达分析 [J]. *福建农业学报*, 2018, 33(6): 608-613.
- [10] 孙勃, 张芬, 夏雪, 等. 芥蓝八氢番茄红素脱氢酶基因 *BaPDS1* 和 *BaPDS2* 的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(11): 2257-2265.
- [11] Fraser P D, Truesdale M R, Bird C R, et al. Carotenoid

- biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression) [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105(1): 405-413.
- [12] Zhang J, Tao N, Xu Q, *et al.* Functional characterization of *Citrus PSY* gene in Hongkong kumquat (*Fortunella hindsii* Swingle) [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(11): 1737-1746.
- [13] 程珍霞, 胡海涛, 杨莉, 等. 超表达牛奶子 *EutPDS* 提高番茄果实番茄红素含量 [J]. 林业科学, 2017, 53(1): 62-69.
- [14] McQuinn R P, Wong B, Giovannoni J J. *AtPDS* overexpression in tomato: Exposing unique patterns of carotenoid self-regulation and an alternative strategy for the enhancement of fruit carotenoid content [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(2): 482-494.
- [15] Li C, Ji J, Wang G, *et al.* Over-expression of *LcPDS*, *LcZDS*, and *LcCRTISO*, genes from wolfberry for carotenoid biosynthesis, enhanced carotenoid accumulation, and salt tolerance in tobacco [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 119.
- [16] Velásquez A C, Chakravarthy S, Martin G B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato [J]. *J Vis Exp*, 2009(28): 1292.
- [17] Naing A H, Kyu S Y, Pe P P W, *et al.* Silencing of the phytoene desaturase (*PDS*) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 110.
- [18] 曲玲, 李彦龙, 焦恩宁, 等. 利用 VIGS 技术在本氏烟中沉默枸杞 *PDS* 同源基因的研究 [J]. 宁夏农林科技, 2021, 62(2): 25-30.
- [19] Qi X Y, Mo Q P, Li J, *et al.* Establishment of virus-induced gene silencing (VIGS) system in *Luffa acutangula* using Phytoene desaturase (*PDS*) and tendrill synthesis related gene (*TEN*) [J]. *Plant Methods*, 2023, 19(1): 94.
- [20] Cheng G H, Shu X C, Wang Z, *et al.* Establishing a virus-induced gene silencing system in *Lycoris chinensis* [J]. *Plants*, 2023, 12(13): 2458.
- [21] Cao Y L, Li Y L, Fan Y F, *et al.* Wolfberry genomes and the evolution of *Lycium* (Solanaceae) [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 671.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] 石晶, 梁新华. 甘草根系分泌物乳酸外源施用对 *GuSQS1* 和 *GubAS* 基因表达及甘草酸含量的影响 [J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2022, 43(1): 73-78.
- [24] Chen C J, Wu Y, Li J W, *et al.* TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Mol Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [25] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, *et al.* The MEME suite [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(w1): W39-W49.
- [26] Zhang D, Wang C X, Zhang Y C, *et al.* Discovery of novel (5-mercapto-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl) methyl phenyl carbamate as a potent phytoene desaturase inhibitor through scaffold hopping and linker modification [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(34): 18898-18908.
- [27] 肖政, 苏家乐, 刘晓青, 等. 羊蹄躑八氢番茄红素脱氢酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中国农学通报, 2021, 37(15): 99-105.
- [28] 吕娇, 龚一富, 章丽, 等. 三角褐指藻八氢番茄红素脱氢酶 1-2 基因启动子克隆和表达分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, 39(6): 870-879.
- [29] 石源睿, 董海涛, 常璐, 等. 马铃薯 *PDS* 和 *ZDS* 基因的克隆与表达特性分析 [J]. 山西农业科学, 2023, 51(4): 347-355.
- [30] 钟晓武, 付强, 邹颖, 等. 普通烟草八氢番茄红素脱氢酶基因的原核表达及表达谱分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(4): 838-843.
- [31] Zhao D Q, Zhou C H, Kong F, *et al.* Cloning of phytoene desaturase and expression analysis of carotenogenic genes in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(6): 3935-3943.
- [32] 王介繁, 李健辉, 张生原, 等. 羊草 *LcPDS* 基因的克隆、表达模式分析及亚细胞定位 [J/OL]. 草地学报, 2025: 1-12. (2025-06-05). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3362.S.20250605.1041.006.html>.
- [33] Liu Y L, Zeng S H, Sun W, *et al.* Comparative analysis of carotenoid accumulation in two goji (*Lycium barbarum* L. and *L. ruthenicum* Murr.) fruits [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 269.
- [34] Sun B, Jiang M, Liang S, *et al.* Functional differences of *BaPDS1* and *BaPDS2* genes in Chinese kale [J]. *R Soc Open Sci*, 2019, 6(7): 190260.
- [35] Chen H Y, Ji H Y, Huang W K, *et al.* Transcription factor CrWRKY42 coregulates chlorophyll degradation and carotenoid biosynthesis in *Citrus* [J]. *Plant Physiol*, 2024, 195(1): 728-744.
- [36] He Y, Li M R, Wang Y H, *et al.* The R2R3-MYB transcription factor MYB44 modulates carotenoid biosynthesis in *Ulva prolifera* [J]. *Algal Res*, 2022, 62: 102578.
- [37] Sun Q, He Z C, Wei R R, *et al.* The transcriptional regulatory module CsHB5-CsbZIP44 positively regulates abscisic acid-mediated carotenoid biosynthesis in *Citrus* (*Citrus* spp.) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2024, 22(3): 722-737.
- [38] Sibéril Y, Doireau P, Gantet P. Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(22): 5655-5666.
- [39] 孙海丽, 梁静, 王文佳, 等. 拟南芥液泡 H⁺-ATP 酶 E1 亚基基因 *AtTUF* 启动子的克隆及表达分析 [J]. 华北农学报, 2022, 37(6): 82-90.

[责任编辑 时圣明]