

枸杞 *LbbHLH94-like* 克隆、表达及在类胡萝卜素合成中的调控功能研究

刘 朔, 刘 璇, 胡 诗, 党佳丽, 余 萍, 宋雅蝶, 岳思君, 郑 蕊*

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, 优势特色作物现代分子育种宁夏重点实验室, 宁夏 银川 750021

摘要: 目的 解析枸杞 *Lycium barbarum* *LbbHLH94-like* 基因的表达特征及其在类胡萝卜素合成中的调控功能, 为揭示枸杞果实品质形成的分子机制提供理论依据。方法 以宁夏枸杞‘宁杞1号’为材料, 采用 PCR、qRT-PCR 等技术克隆并分析 *LbbHLH94-like* 在不同组织、果实发育阶段、非生物胁迫及外源激素处理下的表达模式; 构建过表达载体转化枸杞, 分析转基因植株类胡萝卜素代谢关键基因表达、酶活性及总类胡萝卜素含量。结果 成功克隆 *LbbHLH94-like* 基因, 其开放阅读框全长 888 bp, 编码 296 个氨基酸, 序列与基因组参考序列一致; 该基因具有明显时空表达特异性, 在果实成熟期表达量最高, 并响应高温、低温、盐、干旱胁迫及 6-苄氨基嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA)、吲哚-3-丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA)、赤霉素 (gibberellic acid, GA₃) 诱导, 外源激素整体呈低浓度促进、高浓度抑制模式; 过表达 *LbbHLH94-like* 可显著上调 *PDS* 基因表达、提高 PSY 与 PDS 酶活性, 抑制类胡萝卜素裂解双加氧酶 4 (carotenoid cleavage dioxygenase 4, CCD4) 基因表达及酶活性, 显著提升果实总类胡萝卜素含量。结论 *LbbHLH94-like* 是枸杞类胡萝卜素合成的关键正向调控因子, 同时参与非生物胁迫与激素信号应答, 研究结果为枸杞品质改良与精准分子育种提供重要基因资源。

关键词: 宁夏枸杞; *LbbHLH94-like* 基因; 表达分析; 非生物胁迫; 类胡萝卜素生物合成; 分子调控

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)15-6066-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.15.023

Cloning, expression and carotenoid synthesis-regulating function of *LbbHLH94-like* in *Lycium barbarum*

LIU Shuo, LIU Xuan, HU Shi, DANG Jiali, SHE Ping, SONG Yadie, YUE Sijun, ZHENG Rui

Ningxia University, College of Life Science, Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops, State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Ningxia Key Laboratory of Modern Molecular Breeding of High-Value and Specialty Crops, Yinchuan 750021, China

Abstract: Objective This study aims to clone the *LbbHLH94-like* gene from Gouqi (*Lycium barbarum*), analyze its spatiotemporal expression, stress and hormone response patterns, and clarify its regulatory function in carotenoid biosynthesis, so as to provide a theoretical basis for revealing the molecular mechanism of goji berry fruit quality formation. **Methods** Using *Lycium barbarum* cv. ‘Ningqi 1’ as material, we employed techniques such as PCR and qRT-PCR to clone and analyze the expression patterns of *LbbHLH94-like* in different tissues, fruit developmental stages, abiotic stresses and exogenous hormone treatments. The overexpression vector was constructed and transformed into goji plants, and the expression of key genes, enzyme activities and total carotenoid content in carotenoid metabolism were determined. **Results** The *LbbHLH94-like* gene was successfully cloned, with an 888 bp open reading frame encoding 296 amino acids, and the sequence was identical to the genome reference sequence. This gene showed obvious spatiotemporal specificity, with the highest expression level at fruit ripening stage. It responded to high and low temperature, salt, drought stresses as well as 6-BA, IBA and GA₃ induction, showing a general pattern of promotion at low concentration and inhibition at high concentration. Overexpression of *LbbHLH94-like* significantly up-regulated the expression of *PDS*, enhanced the enzyme activities of PSY and PDS, inhibited the expression and enzyme activity of *CCD4*, and remarkably increased total carotenoid content in fruits. **Conclusion** *LbbHLH94-like* is a key positive regulator of carotenoid biosynthesis in goji berry, and also participates in

收稿日期: 2026-05-07

项目基金: 国家自然科学基金资助项目 (32460098); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2025BBF02004)

作者简介: 刘 朔, 女, 硕士研究生, 研究方向为特色及药用植物资源保护与开发利用。E-mail: 1412954721@qq.com

*通信作者: 郑 蕊, 女, 博士生导师, 研究方向为应用植物基因组学。E-mail: xlzheng@126.com

abiotic stress response and hormone signaling. The results provide important gene resources and theoretical support for quality improvement and precise molecular breeding of *Lycium barbarum*.

Key words: *Lycium barbarum* L.; *LbbHLH94-like* gene; expression analysis; abiotic stress; carotenoid biosynthesis; molecular regulation

宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 是我国西北特色药食同源道地药材, 集药用、营养、保健价值于一体, 其果实富含枸杞多糖、类胡萝卜素、黄酮、生物碱等活性成分, 具有抗氧化、抗衰老、护眼明目、增强免疫力等多重功效^[1-3]。其中, 类胡萝卜素是决定枸杞外观色泽与内在药效的核心指标, 包括玉米黄质、 β -胡萝卜素、叶黄素等, 其积累量直接关联枸杞等级定价与药效品质^[3-4]。已有研究明确, *PSY*、*PDS*、*ZDS*、*CCD4* 等是植物类胡萝卜素代谢的关键结构基因^[5-7], 但这些基因在枸杞中的上游转录调控机制, 目前枸杞中仅 *ERF*、*WRKY* 等少数转录因子参与类胡萝卜素调控有所报道^[2-3], 缺乏系统解析。

bHLH (basic helix-loop-helix) 转录因子是植物中最大、功能最保守的转录因子家族之一, 因其具备碱性 DNA 结合区与螺旋-环-螺旋二聚化结构域, 可精准识别靶基因启动子的 E-box 或 N-box 元件, 广泛参与植物生长发育、次生代谢、非生物胁迫应答及激素信号转导等关键生物学过程^[8-11]。大量研究证实, *bHLH* 家族成员在番茄、甘薯、柑橘、辣椒等作物中可直接调控类胡萝卜素合成关键基因, 如八氢番茄红素合成酶 (phytoene synthase, *PSY*)、八氢番茄红素去饱和酶 (phytoene desaturase, *PDS*)、番茄红素 β -环化酶 (lycopene beta-cyclase, *LCYB*)、类胡萝卜素裂解双加氧酶 4 (carotenoid cleavage dioxygenase 4, *CCD4*) 等的转录水平, 进而决定果实色泽、营养品质与商品价值^[12-14]。在番茄中, *SibHLH95* 可直接结合并激活 *PDS* 转录, 形成类胡萝卜素合成的正向调控模块; 在甘薯中, *IbbHLH25* 与 *IbbHLH66* 形成异源二聚体, 协同激活 *GGPPS*、*LCYB* 等基因, 显著提升块根类胡萝卜素含量^[8,12]。这些研究表明, *bHLH* 转录因子是植物类胡萝卜素代谢通路的核心调控枢纽, 也是作物品质改良的重要靶标基因。

非生物胁迫与植物激素是影响植物生长发育及次生代谢的关键环境信号。高温、低温、干旱、盐胁迫等逆境显著影响枸杞类胡萝卜素积累; 而 6-苄氨基嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA)、吲哚-3-丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA)、赤霉素 (gibberellic acid, GA_3) 等激素可通过信号网络调控

果实发育与色素合成^[15-17]。已有研究表明, *bHLH* 基因可响应高低温、干旱、盐胁迫及多种激素诱导, 参与胁迫应答与发育调控的交叉对话^[18-22]。然而, 宁夏枸杞 *bHLH* 的时空表达是否受逆境与激素信号诱导, 以及 *bHLH* 基因功能的相关研究报道较少。枸杞 *bHLH* 家族的研究仍集中于全基因组鉴定层面, 关键成员的功能验证严重滞后, 极大限制了枸杞品质形成机制的解析与分子育种进程。

课题组在前期枸杞果实转录组研究中发现, *LbbHLH94-like* 基因在枸杞果实过程中差异表达, 且与果实类胡萝卜素含量呈正相关, 据此推测 *LbbHLH94-like* 可能参与枸杞类胡萝卜素的代谢过程。基于此, 本研究以宁夏枸杞主栽品种 ‘宁杞 1 号’ 为材料, 克隆 *LbbHLH94-like* 基因, 系统分析其不同组织、果实发育阶段、非生物胁迫 (高温、低温、干旱、盐) 及外源激素 6-BA、IBA、 GA_3 处理下的表达模式; 进一步构建过表达载体 pNULPG700-*LbbHLH94-like*-GFP, 采用农杆菌介导的遗传转化法转化枸杞, 通过 qRT-PCR、酶活性测定及总类胡萝卜素含量检测, 明确该基因对枸杞类胡萝卜素合成的调控功能。本研究旨在解析 *LbbHLH94-like* 在枸杞果实发育、逆境应答及类胡萝卜素合成中的调控功能, 为优质、抗逆枸杞新品种的分子育种提供关键基因资源与理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

样品经宁夏大学郑蕊教授鉴定为宁夏枸杞 *L. barbarum* L. 主栽品种 ‘宁杞 1 号’, 于 2025 年 7 月在宁夏杞鑫种业有限公司 (105°37'39.936"E, 37°30'12.269"N) 标准化管理的枸杞种植园中采集, 分别采摘根、茎、叶、花和开花后 12 d (S1)、19 d (S2)、25 d (S3)、30 d (S4) 及 37 d (S5) 的枸杞果实, 材料取样后液氮速冻并储存于 -80 °C 超低温冰箱备用。每个样品设 3 个生物学重复。

1.2 仪器

SPX-80 型生化培养箱 (上海跃进有限公司), FRESCO 17 型小型台式冷冻离心机 (Thermo Fisher Scientific), Biometra TOne 96G 型 PCR 仪 (Analytik Jena AG), HH-6A 型

数显恒温水浴锅（常州润华有限公司），ME303E型电子分析天平（上海梅特勒-托利多有限公司），qTOWER³G型实时荧光定量PCR仪（Analytik Jena AG），DYY-8C型双稳定定时电泳仪（北京市六一仪器厂），WSE-5200 WiseUV型凝胶成像系统（ATTO有限公司），NanoDrop 2000型超微量分光光度计（赛默飞世尔科技有限公司），VICTOR Nivo型多功能微孔板检测仪（珀金埃尔默有限公司）。

2 方法

2.1 样品的处理

非生物胁迫试验材料为‘宁杞1号’枸杞，将其于基质-珍珠岩-蛭石为1:1:1比例的营养土中种植，置于温度（25±2）℃、光照培养（2 000~3 000 lx）16 h/d、暗培养8 h/d条件培养。当幼苗长至4周龄时，置于高温（42℃）、低温（4℃）下，分别喷施不同浓度的外源激素[6-BA（100、200、300 mg/L）、IBA（30、45、60 mmol/L）、GA₃（50、100、200 mmol/L）]的溶液各5 mL^[23-26]、20% PEG-6000溶液^[27]和300 mmol/L NaCl溶液^[28]灌根处理20 mL，每种处理均设置3组重复。培养期间观察各生长情况，在0（对照）、3、6、9、12、24、48 h共7个时间点进行取样^[29]，每个时间点设置3组生物学重复，每组选取3株幼苗的功能叶片（第2~3片真叶）作为取样部位，材料取样后液氮速冻并储存于-80℃超低温冰箱备用。

2.2 枸杞组织总RNA的提取及cDNA的反转录

参照OMEGA公司的E.Z.N.A.Plant RNA Kit产品说明书提取枸杞不同组织的总RNA，参照Vazyme

公司的HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)产品说明书合成cDNA。

2.3 *LbbHLH94-like* 基因克隆

从枸杞基因组数据库中下载枸杞 *LbbHLH94-like* 基因序列，使用Primer Premier 5软件设计 *LbbHLH94-like* 基因扩增特异性引物（表1），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，以‘宁杞1号’S5时期果实的cDNA为扩增模板，该时期果实功能物质积累量最高，目标基因表达丰度大，利于高效扩增获得全长基因。使用Toyobo公司的KOD高保真酶进行PCR扩增，扩增体系与程序参照说明书。扩增产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，以确定目的条带大小。利用TIANGEN公司的胶回收试剂盒进行纯化回收，将回收的片段与TSINGKE公司的pClone007载体进行连接，克隆步骤参考pClone007载体试剂盒说明书，通过42℃热激法将其转化至大肠杆菌DH5α并进行过夜培养，挑取正确单克隆进行PCR阳性鉴定，琼脂糖凝胶电泳检测产物条带大小符合预期值，选择阳性克隆摇菌，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

2.4 *LbbHLH94-like* 基因的表达分析

LbbHLH94-like 基因在‘宁杞1号’的时空表达，在高低温、干旱及盐非生物胁迫下以及外源激素诱导的表达均利用qRT-PCR技术分析。通过PrimerPremier 5设计 *LbbHLH94-like*、*LbPSY*、*LbPDS*、*LbCCD4* 等基因的特异性荧光定量引物（表1）。使用TransGen公司的PerfextStartTM Green qPCR Super Mix进行实时荧光定量PCR检测，扩增体系与程序参照

表1 基因引物

Table 1 Primers of genes

基因名称	引物序列（5'-3'）	用途
<i>LbbHLH94-like</i>	F: ATGGTATTAGAGACAGTGG	基因克隆PCR扩增
<i>eGFP</i>	F: AGCTGGACGCGACGTAAA R: CAGGACCATGTGATCGCGCTT	PCR初筛枸杞阳性转基因株系
<i>qLbbHLH94-like</i>	F: CCACGACACGCCAATCAAAG	基因表达分析（qRT-PCR）
<i>LbPSY</i>	F: TATGGGTTGTTTCGCCGAGTTCTG R: AACGTGATCTACGCCCTTTGGTGTC	qRT-PCR
<i>LbPDS</i>	F: CTTCTCCACGCCCAACTAAACCG R: ACCTAGAACATCCCTTGCCCTCCAG	qRT-PCR
<i>LbCCD4</i>	F: CCTGAGGCTGATGAAGATGATGGC R: GCACACGACGAGGCAATTAAACG	qRT-PCR
<i>LbActin</i>	F: CTTCCAGCCATCCATGATCGGTATG R: AGCCACCACTGAGCACAATGTTAC	qRT-PCR

说明书。选取 *LbActin* 为内参 (GenBank 登录号 XM_06035454), 参考 Livak 等^[30]提出的公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据计算处理, 3 次生物学重复。使用 GraphPad 10.0 做图。利用 SPSS 统计软件和 Duncan 的方法进行分析, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ ^[31]。过表达株系中 *LbbHLH94-like* 以及类胡萝卜素代谢相关酶基因的表达分析方法同上。

2.5 *LbbHLH94-like* 基因植物过载体的构建及转化

以‘宁杞 1 号’的 cDNA 为模板, 运用 Primer Premier 5 设计特异性引物 (表 1), 扩增产物经电泳检测后, 对目标条带进行切胶纯化, 采用 *PacI* 和 *KpnI* 双酶切质粒 pNULPG700, 经凝胶电泳分离, 回收大片段, 连接载体。将该载体转化至 DH5 α 大肠杆菌中, 筛选获得单一阳性克隆并进行序列测定。经序列验证后, 选取正确的菌株进行质粒提取, 并通过冻融法将重组质粒导入农杆菌 GV3101 中, 最终用于枸杞的遗传转化实验。

2.6 农杆菌介导的枸杞遗传转化及鉴定

选用枸杞无菌苗下胚轴、子叶为外植体, 经预培养后, 浸入活化的 GV3101 农杆菌侵染液 (含 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮, $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$) 侵染 8~10 min, 吸干菌液后暗培养共培养 2~3 d。外植体转接至含 50 mg/L 的 Kan 抗性分化筛选培养基进行多代抗性筛选, 诱导抗性愈伤与不定芽分化; 抗性幼苗转入生根培养基获得完整再生植株, 炼苗后移栽。采集抗性植株幼嫩叶片, 改良 CTAB 法提取基因组 DNA, 利用载体 *eGFP* 基因特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 结合电泳检测完成分子初步鉴定; 采用 qRT-PCR 检测目的基因转录水平, 最终获得枸杞阳性转基因株系。

2.7 过表达 *LbbHLH94-like* 株系酶活性测定

参照晶美生物科技有限公司的 PSY、PDS、CCD4 酶联免疫分析试剂盒使用说明书测定过表达植株 3 种酶活性。用标准物的浓度与 A 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 A 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

2.8 过表达 *LbbHLH94-like* 株系总类胡萝卜素含量测定

参照北京索莱宝科技有限公司的植物类胡萝卜素含量检测试剂盒说明书测定过表达植株总类胡萝卜素含量。类胡萝卜素含量计算公式如下。

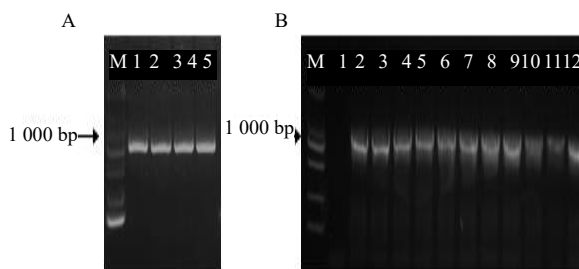
类胡萝卜素含量 = $A_{440} / (\epsilon \times d) \times V_{\text{提取}} \times 1000 / W \times F$
 $V_{\text{提取}}$ 为提取液总体积, ϵ 为类胡萝卜素经验消光系数, d 为

96 孔板光径, F 为稀释倍数, W 为样本质量

3 结果与分析

3.1 *LbbHLH94-like* 基因克隆

本实验以‘宁杞 1 号’S5 时期果实的 cDNA 为模板, 利用 PCR 技术克隆得到‘宁杞 1 号’*LbbHLH94-like* 基因的开放阅读框, 全长为 888 bp, 编码 296 个氨基酸 (图 1)。



A-*LbbHLH94-like* 基因 PCR 扩增, M-Maker, 1~5-PCR 扩增产物; B-*LbbHLH94-like* 基因大肠杆菌菌液 PCR 鉴定, 1~12-PCR 扩增产物。

A-PCR amplification of the *LbbHLH94-like* gene, M-Maker, 1~5 are PCR amplification products; B-PCR identification of the *LbbHLH94-like* gene in *E. coli*, 1~12 are PCR amplification products.

图 1 *LbbHLH94-like* 基因克隆

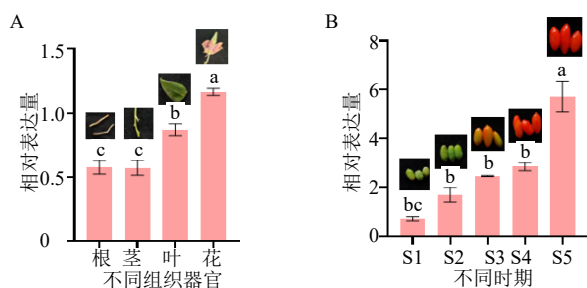
Fig. 1 Cloning of *LbbHLH94-like* genes

3.2 *LbbHLH94-like* 基因的时空表达特征

为探究目标基因在枸杞中的表达模式, 通过 qRT-PCR 分析了该基因在不同组织器官及不同果实发育阶段的表达水平 (图 2)。组织特异性表达分析结果显示, 该基因在枸杞不同组织中均有表达, 但表达量存在显著差异, 其中在花中表达量最高, 显著高于叶、根和茎; 叶中表达量次之, 显著高于根和茎; 而根与茎中的表达量较低且二者之间无显著差异 (图 2-A)。不同果实发育时期的表达分析结果表明, 该基因的表达量随果实成熟进程呈逐渐上调的趋势, 在果实完熟期 (开花后第 37 天, S5) 表达量达到峰值, 显著高于幼果期 (开花后第 12 天, S1)、膨果期 (开花后第 19 天)、转色期 (开花后第 25 天, S3) 和半熟期 (开花后第 30 天, S4); S2、S3、S4 时期的表达水平无显著差异, 整体高于 S1 时期 (图 2-B)。上述结果表明该基因在枸杞花器官及成熟果实中优势表达, 可能参与果实发育与成熟过程。

3.3 *LbbHLH94-like* 基因非生物胁迫表达分析

LbbHLH94-like 基因在高、低温、干旱、盐 4 种非生物胁迫下的 qRT-PCR 分析结果显示 (图 3), 该基因的表达模式在不同胁迫类型呈现出显著差

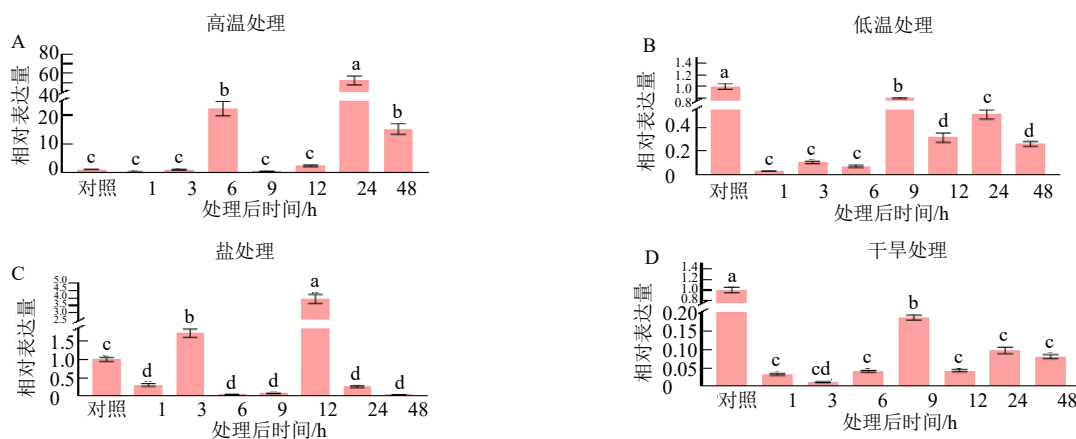


A-*LbbHLH94-like* 基因的组织表达; B-*LbbHLH94-like* 基因在不同发育时期果实中的表达; 不同小写字母表示组间差异具有统计学意义, $P < 0.05$, 下图同。

A-*LbbHLH94-like* gene; B-*LbbHLH94-like* gene in fruits at different developmental stages; Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups $P < 0.05$, same as below.

图2 *LbbHLH94-like* 基因的时空表达

Fig. 2 Spatiotemporal expression pattern of *LbbHLH94-like* gene



A 为高温处理 (42 °C), B 为低温处理 (4 °C), C 为盐处理 (300 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液), D 为干旱处理 (20% PEG-6000 溶液)。

A-high-temperature treatment (42 °C), B-low-temperature treatment (4 °C), C-salt treatment (300 mmol·L⁻¹ NaCl solution), and D represents drought treatment (20% PEG-6000 solution). 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h represent the treatment durations for goji berries under different conditions, respectively.

图3 *LbbHLH94-like* 基因非生物胁迫的表达

Fig. 3 Expression pattern of *LbbHLH94-like* gene at different abiotic stresses

LbbHLH94-like 基因表达量快速回落, 24~48 h 维持在低水平, 与 1 h 的抑制水平一致 (图 3-C)。干旱 (20% PEG-6000 处理) 处理枸杞植株后 1 h, *LbbHLH94-like* 基因表达量从对照组急剧降至极低水平, 且 3~6 h 持续维持在低表达区间, 与对照组差异显著。20%PEG-6000 处理后 9 h, *LbbHLH94-like* 基因表达量显著上调, 形成响应峰值, 虽未达到对照组水平, 但相较于前期已明显激活 (图 3-D)。

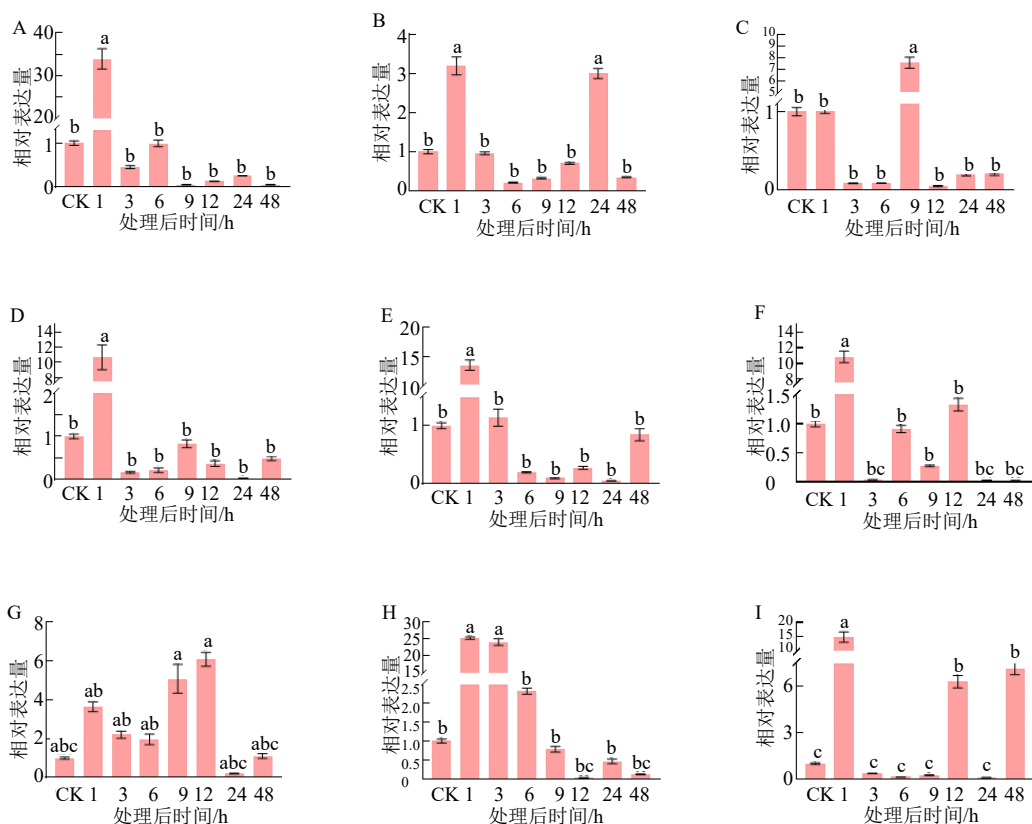
3.4 *LbbHLH94-like* 基因不同激素诱导处理表达分析

LbbHLH94-like 基因在 6-BA、IBA、GA₃ 3 种

异。在 42 °C 高温胁迫下, 枸杞植株 *LbbHLH94-like* 基因在 6、24、48 h 表达量显著高于其他时间点, 其中其在 24 h 表达量最高, 并显著高于 6 h 和 24 h (图 3-A), 其他时间点均处于较低表达水平, 且与对照无显著差异。

低温 (4 °C) 处理枸杞植株后 1 h, *LbbHLH94-like* 基因表达量从对照组急剧降至接近 0 的水平, 3~6 h 持续维持在极低区间, 与对照组差异显著; 9 h 后 *LbbHLH94-like* 基因表达量逐步上升, 9~48 h 呈现平缓的波动回升趋势 (图 3-B)。盐 (300 mmol/L 浓度的 NaCl 溶液) 处理枸杞植株后 1 h, 与对照组相比, *LbbHLH94-like* 基因表达量显著降低, 3 h 时 *LbbHLH94-like* 基因表达量显著上调, 12 h 时 *LbbHLH94-like* 基因表达量达到峰值, 显著高于其他所有时间点, 为响应最强阶段, 12 h 后

激素不同质量浓度诱导下的 qRT-PCR 分析结果显示 (图 4), 该基因的表达模式在随激素类型不同呈现出显著差异。不同质量浓度的 6-BA 激素处理的枸杞植株中的 *LbbHLH94-like* 基因相对表达量均整体上呈先升后降的单峰曲线, 并且峰值集中在 1~24 h, 表明 *LbbHLH94-like* 基因对 6-BA 激素响应迅速且短暂。100 mg/L 与 200 mg/L 的 6-BA 使得枸杞叶片中 *LbbHLH94-like* 基因相对表达量均在 1 h 达最高; 300 mg/L 6-BA 使得枸杞叶片中 *LbbHLH94-like* 基因相对表达量在 9 h 达最高, 之后下降更快 (图 4A~C)。对比 3 个不同质量浓度 6-BA 处理枸杞植株后 *LbbHLH94-like* 基因的相对表



A、B、C 分别为 100、200、300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 激素处理，D、E、F 分别为 30、45、60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 激素处理，G、H、I 分别为 50、100、200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 激素处理。

A, B, and C-treatments with 6-BA at concentrations of 100, 200, and 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; D, E, and F represent treatments with IBA at concentrations of 30, 45, and 60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; and G, H, and I represent treatments with GA_3 at concentrations of 50, 100, and 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

图 4 *LbbHLH94-like* 基因激素处理的表达

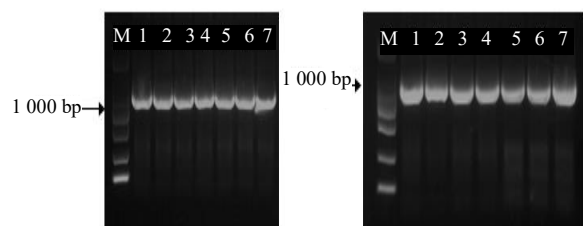
Fig. 4 Expression pattern of *LbbHLH94-like* gene at different hormone treatments

达量，发现在 1 h 时，100 mg/L 质量浓度的 6-BA 处理下，*LbbHLH94-like* 基因的相对表达量变化幅度最大，而随质量浓度的增加，*LbbHLH94-like* 基因相对表达量的变化幅度逐渐减小。表明了 6-BA 对枸杞中 *LbbHLH94-like* 基因的表达是低质量浓度促进，高质量浓度抑制。在 3 个不同质量浓度 IBA 处理下，在 1 h 时，45 mg/L *LbbHLH94-like* 相对表达量变化幅度最大，30 mg/L 浓度的 IBA 处理组与 60 mg/L IBA 处理组相差不大，但 3 个质量浓度都促进了 *LbbHLH94-like* 基因表达量的增加。因此推测 45 mg/L 可能是促进 *LbbHLH94-like* 基因表达量增加的最适质量浓度，并且 IBA 对该基因也存在低质量浓度促进，高质量浓度抑制现象。并且高质量浓度 IBA 还触发了基因的多阶段响应，除早期上调外，中期还存在主动的表达波动，说明高质量浓度信号可能激活了更复杂的调控通路（图 4-D~F）。对比 3 个不同质量浓度 GA_3 处理后 *LbbHLH94-like* 基因的

相对表达量，低质量浓度 GA_3 对基因的诱导是缓慢渐进，无早期瞬时响应，峰值出现于处理后期。中质量浓度 GA_3 使得 *LbbHLH94-like* 基因表达量峰值提前出现，峰值强度远高于低质量浓度组，且响应集中于处理初期。高质量浓度 GA_3 峰值强度低于中质量浓度组，但后期响应更持久。3 个质量浓度都促进了基因表达量的增加，推测 100 mg/L 可能是促进 *LbbHLH94-like* 基因表达量增加的最适质量浓度，并且 GA_3 对该基因也存在低质量浓度促进，高浓度抑制现象（图 4-G~I）。

3.5 *LbbHLH94-like* 过表达载体构建

利用同源重组法将该序列与 pNULPG700 表达载体连接，并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，经 Kan 抗性筛选及 PCR 阳性鉴定，发现构建的重组载体可扩增约 888 bp 的特异条带（图 5-A）。将测序正确的阳性质粒转化至农杆菌 GV3101，在菌液中 PCR 扩增到目的条带（图 5-B），表明载体构建成功。

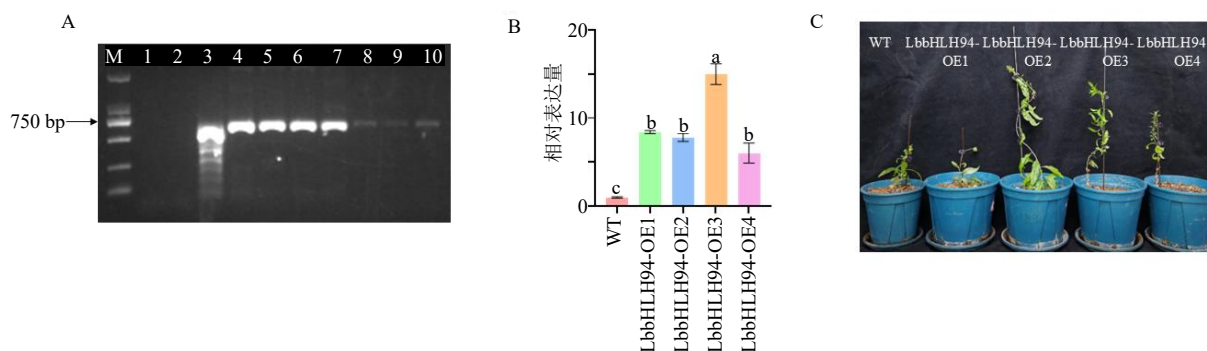


A-pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP 载体大肠杆菌菌液 PCR 鉴定; B-pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP 载体农杆菌菌液 PCR 鉴定; M-Maker; 1~7 为 PCR 扩增产物。

A-PCR detection of pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP vector in *E. coli* 1; B-PCR detection of pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP vector in *Agrobacterium*; M-Marker; Lanes 1-7-PCR products.

图5 pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP 表达载体 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR amplification of pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP



A 为过表达 *LbbHLH94-like* 枸杞 PCR 鉴定, M-Maker; 1-ddH₂O; 2-野生型植株; 3-pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP 质粒; 4~10-转基因植株。B 为过表达 *LbbHLH94-like* 枸杞 qRT-PCR 鉴定, WT 为野生型枸杞, *LbbHLH94-OE1*~*LbbHLH94-OE4-LbbHLH94-like* 过表达株系; 不同小写字母表示组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。C-野生型和过表达植株表型, WT-野生型枸杞, *LbbHLH94-OE1*~*LbbHLH94-OE4-LbbHLH94-like* 过表达株系。

A shows PCR analysis of *LbbHLH94-like*-overexpressing goji berries; M-Maker; 1-ddH₂O; 2-wild-type plants; 3-pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP plasmid; 4-10: transgenic plants; B shows qRT-PCR analysis of *LbbHLH94-like* overexpression in *Lycium barbarum*; WT denotes wild-type *Lycium barbarum*; *LbbHLH94-OE1*~*LbbHLH94-OE4* denote *LbbHLH94-like* overexpression lines. Error bars represent mean $\pm$ standard deviation. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups ($P < 0.05$). C shows the phenotypes of wild-type and overexpression plants; WT denotes wild-type *Lycium*, and *LbbHLH94-OE1* to *LbbHLH94-OE4* denote *LbbHLH94-like* overexpression lines.

图6 过表达植株阳性鉴定

Fig. 6 Positive identification of overexpression plants

行了 qRT-PCR 分析 (图 7)。结果显示, *LbbHLH94-like* 过表达对类胡萝卜素代谢关键酶基因的调控具有明显的靶点特异性与表达差异。其中, 类胡萝卜素合成上游限速基因 *PSY* (图 7-A), 仅 OE3 株系表达量显著高于 WT, 其余过表达株系与 WT 无显著差异, 表明其对 *LbbHLH94-like* 基因具有调控作用。对于同属合成上游的关键基因 *PDS* (图 7-B), *LbbHLH94-like* 过表达表现出极强的正调控效应: 所有 OE 株系表

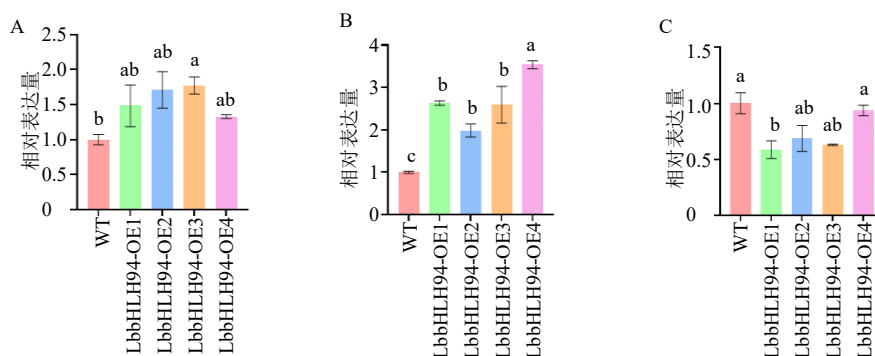
3.6 转基因株系的鉴定

利用 PCR 技术对转基因苗进行阳性鉴定。以野生型植株基因组 DNA 和 pNULPG700-LbbHLH94-like-GFP 质粒作为模板进行扩增, 分别作为阴性和阳性对照。结果共鉴定到 7 株阳性植株 (图 6-A)。采用 qRT-PCR 检测部分株系目的基因转录水平, 发现过表达 (over expression, OE) 株系的目的基因转录水平显著高于野生型株系 (wild type, WT) (图 6-B), 表明最终鉴定到枸杞阳性转基因株系。

3.7 过表达 *LbbHLH94-like* 株系类胡萝卜素代谢相关酶基因表达分析

为了从转录水平进一步解析 *LbbHLH94-like* 对宁夏枸杞类胡萝卜素代谢途径关键酶基因表达的影响, 对过表达 *LbbHLH94-like* 的转基因株系及野生型中 *PSY*、*PDS*、*CCD4* 这 3 个关键酶基因的表达水平进

量均显著高于 WT, 且 OE1、OE4 株系上调幅度更大, 显著高于 OE2、OE3, 表明 *LbbHLH94-like* 可显著激活 *PDS* 转录, 推测其可能参与调控类胡萝卜素合成过程。而下游降解关键基因 *CCD4* 在 *LbbHLH94-OE1*~*LbbHLH94-OE3* 转基因株系中均表现为下调 (图 7-C), 且 OE1 株系表达量显著低于 WT, *LbbHLH94-OE4* 株系中表达量与 WT 相差无几, 推测 *LbbHLH94-like* 对 *CCD4* 起到负调控作用。



A-*PSY* 基因表达分析; B-*PDS* 基因表达分析; C-*CCD4* 基因表达分析。WT 为野生型枸杞, LbbHLH94-OE1~LbbHLH94-OE4 为 *LbbHLH94-like* 过表达株系。

A shows the *PSY* gene expression analysis; B shows the *PDS* gene expression analysis. C shows the *CCD4* gene expression analysis. WT denotes wild-type goji berry; LbbHLH94-OE1~LbbHLH94-OE4 denote *LbbHLH94-like* overexpression lines.

图 7 过表达 *LbbHLH94-like* 枸杞株系中类胡萝卜素代谢关键基因的表达分析

Fig. 7 Analysis of key genes involved in carotenoid metabolism in *L. barbarum* of overexpression expression *LbbHLH94-like*

3.8 转基因株系类胡萝卜素代谢关键酶活性分析

从酶活水平进一步验证 *LbbHLH94-like* 对宁夏枸杞类胡萝卜素代谢关键酶的调控效应, 对过表达 *LbbHLH94-like* 的转基因株系及野生型中 *PSY*、*PDS*、*CCD4* 酶活性进行了测定分析。结果显示, *LbbHLH94-like* 过表达对不同节点酶活性的调控模式与基因表达水平基本一致, 具有明显的靶点特异性。对于类胡萝卜素合成上游关键限速酶 *PSY* (图 8-A), *LbbHLH94-like* 过表达显著提高了其酶活性: 所有 OE 株系的 *PSY* 酶活性均显著高于野生型, 且各 OE 株系之间无显著差异, 说明对于过表达可稳定增强 *PSY* 的酶活性, 为类胡萝卜素合成提供了更强的酶促基础。对于类胡萝卜素合成上游关键酶 *PDS* (图 8-B), *LbbHLH94-like* 过表达表现出明显的正调控效应: OE3 株系的 *PDS* 酶活性最高, OE1、OE2 株系的酶活性略低于 OE3, 整体趋势与 *PDS* 基因的表达上调模式高度吻合, 进一步证实 *LbbHLH94-like* 可有效激活 *PDS* 的酶促功能, 促进类胡萝卜素合成。而对于类胡萝卜素代谢下游降解关键酶 *CCD4* 来说 (图 8-C), *LbbHLH94-like* 过表达表现出抑制效应: OE1、OE3、OE4 株系的 *CCD4* 酶活性显著低于野生型, 其中 OE2 株系与 WT 差异不显著, 说明 *LbbHLH94-like* 过表达可一定程度抑制 *CCD4* 的酶活性, 减少类胡萝卜素的降解消耗。 *LbbHLH94-like* 过表达可通过显著提高 *PSY*、*PDS* 等合成关键酶的活性, 同时部分抑制降解酶 *CCD4* 的活性, 从合成与降解双重途径促进类胡萝卜素的积累, 与前期基因表达及总类胡萝卜素含量的分析结果相互印证, 进一步阐明了 *LbbHLH94-like* 调

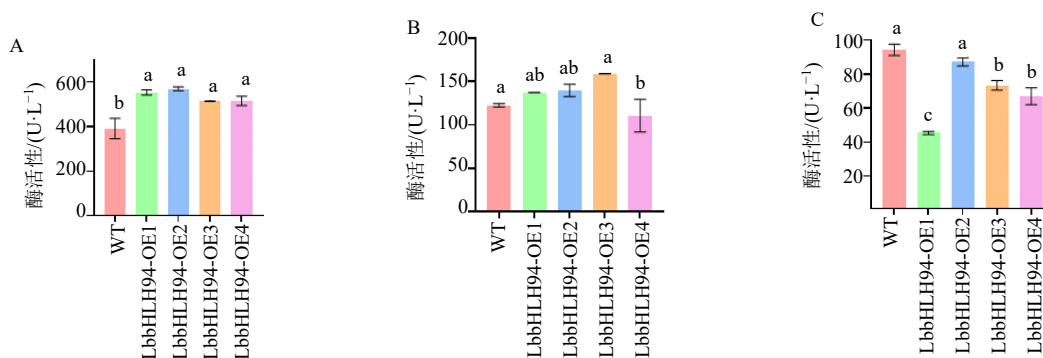
控枸杞类胡萝卜素合成的生理机制。

3.9 过表达 *LbbHLH94-like* 株系总类胡萝卜素含量分析

从生理水平进一步验证 *LbbHLH94-like* 对宁夏枸杞类胡萝卜素合成的调控作用, OE 株系及 WT 植株中的总类胡萝卜素含量分析结果显示 (图 9), *LbbHLH94-like* 过表达可显著提高枸杞果实的总类胡萝卜素含量。其中, LbbHLH94-OE1 株系的总类胡萝卜素含量显著高于野生型及其他 OE 株系; LbbHLH94-OE2、OE3、OE4 株系的总类胡萝卜素含量虽低于 OE1, 但仍高于 WT, 但与 WT 相比差异不显著。结合前期关键酶基因的表达分析结果, *LbbHLH94-like* 过表达株系中 *PDS* 基因的显著上调与总类胡萝卜素含量的提升趋势高度一致, 表明 *LbbHLH94-like* 可能通过激活类胡萝卜素合成途径关键基因的表达, 正向调控枸杞果实中类胡萝卜素的积累, 进一步证实了其在类胡萝卜素生物合成过程中的正调控作用。

4 讨论

bHLH 转录因子家族是植物次生代谢、生长发育及逆境应答的核心调控因子, 在类胡萝卜素合成、果实品质形成及非生物胁迫适应中发挥关键调控作用。尽管该家族在拟南芥、番茄^[11-12]等植物中的研究已较为系统, 然而, 对于兼具重要药用与经济价值的宁夏枸杞, *LbbHLH94-like* 基因的序列特征、组织表达模式、胁迫与激素响应规律, 以及其在类胡萝卜素合成中的功能仍未明确。宁夏枸杞果实核心品质依赖类胡萝卜素等活性成分积累, 其合

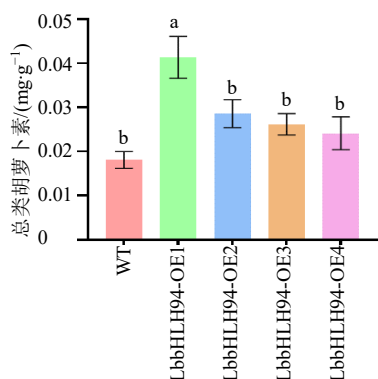


A-PSY 酶活性; B-PDS 酶活性; C-CCD4 酶活性; WT-野生型枸杞, LbbHLH94-OE1~LbbHLH94-OE4 为 *LbbHLH94-like* 过表达株系。

A-PSY enzyme activity; B-PDS enzyme activity; C-CCD4 enzyme activity. WT denotes wild-type goji berry; LbbHLH94-OE1~LbbHLH94-OE4 denote *LbbHLH94-like* overexpression lines.

图 8 过表达 *LbbHLH94-like* 枸杞株系中类胡萝卜素代谢关键酶活性分析

Fig. 8 Analysis of activity of key carotenoid metabolic enzymes in an *LbbHLH94-like* over-expressed in *L. barbarum*



WT 为野生型枸杞, LbbHLH94-OE1~LbbHLH94-OE4 为 *LbbHLH94-like* 过表达株系。

WT denotes wild-type goji berry; LbbHLH94-OE1~LbbHLH94-OE4 denote *LbbHLH94-like* overexpression lines

图 9 过表达 *LbbHLH94-like* 枸杞株系果实的总类胡萝卜素含量分析

Fig. 9 Analysis of total carotenoid content in fruits of the *LbbHLH94-like* over-expressed in *L. barbarum*

成调控机制是品质改良的关键。本研究系统克隆与分析 *LbbHLH94-like* 基因并验证其调控功能,不仅有助于填补枸杞类胡萝卜素合成调控的研究空白,也将为通过分子育种提升枸杞营养品质提供关键理论依据,具有重要的科学价值与应用前景。

本研究成功克隆获得枸杞 *LbbHLH94-like* 基因,开放阅读框全长 888 bp,编码 296 个氨基酸,序列与枸杞基因组参考序列完全一致,表明该基因在‘宁杞 1 号’和 XX 枸杞(基因组测试材料)中高度保守,无氨基酸变异。*bHLH* 家族成员通常以组织特异性与时空特异性表达行使功能,本研究 qRT-PCR 结果显示, *LbbHLH94-like* 在果实成熟期(S5)表达量显著高于根、茎、叶、花等其他组织,且随果实成熟进程持续上调,表明该基因的表达模

式与枸杞果实成熟及类胡萝卜素快速积累高度同步,这一组织特异性与番茄 *SibHLH95*^[32]、猕猴桃 *bHLH149*^[33] 等已报道的正调控类胡萝卜素合成的 *bHLH* 基因高度一致,均表现为果实优势表达、成熟阶段显著诱导,提示其在果实品质形成中发挥重要作用。且该表达特征与番茄、柑橘^[12-13]中调控类胡萝卜素合成的 *bHLH* 基因表达规律一致,从表达层面反映了 *LbbHLH94-like* 参与枸杞果实成熟与品质调控的潜在功能。

非生物胁迫是影响植物生长发育与活性成分积累的重要因素。已有研究证实,小麦 *TabHLH39*、沙棘 *bHLH94*、苹果 *MdCibHLH1* 等 *bHLH* 家族成员均广泛参与植株对多种非生物胁迫的应答过程^[15-17],与上述同源基因相似,本研究发现 *LbbHLH94-like* 对高温、低温、盐、干旱胁迫也呈现出特异性时序表达模式,反映出 *bHLH94* 类基因逆境响应功能在不同植物中具有保守性。不同胁迫条件下基因表达动态存在明显分化,是植物应对逆境的差异化适应策略:高温处理后 *LbbHLH94-like* 延迟上调并持续高表达,说明该基因主要参与枸杞长期耐热调控;低温与干旱胁迫下基因表达先受抑制、后期逐步回升,暗示其在胁迫后期发挥损伤修复与耐逆调节作用;盐胁迫下基因快速激活,则表明其在早期渗透平衡调控与逆境信号传导中扮演重要角色。以上表明, *LbbHLH94-like* 是枸杞逆境调控网络中的关键组分。本研究仅在转录水平解析了该基因的胁迫应答特征,其具体作用通路、蛋白功能,以及非生物胁迫与类胡萝卜素合成之间的交叉调控关系仍不清晰,后续还需结合基因功能验证、分子互作等试验开展深入研究。

植物激素是调控果实发育、色素合成与逆境应答的重要信号^[22]。本研究表明, *LbbHLH94-like* 对 6-BA、IBA、GA₃ 均呈现低促高抑的浓度依赖型响应, 该模式与水稻、桃^[34-35]等物种中受激素诱导调控的表达特征相似。不同激素处理下基因的响应时效、最适浓度存在差异, 一方面源于各类激素本身的功能特性, 另一方面也与枸杞物种特有的调控通路相关, 高浓度激素引发的表达波动则是植物激素稳态失衡、启动负反馈调节的典型表现。这说明 *LbbHLH94-like* 可整合多种激素信号, 是衔接激素通路、果实发育与类胡萝卜素合成的关键节点。本研究仅探究了单一激素的独立作用, 尚未解析激素间互作及该基因上下游调控网络, 后续可开展多激素复合处理与分子互作试验, 进一步完善其调控机制, 为枸杞品质育种提供理论依据。

类胡萝卜素合成与降解的动态平衡决定枸杞果实色泽与营养品质, 本研究通过过表达 *LbbHLH94-like*, 从转录水平、酶活水平及代谢水平系统证实其正向调控功能。转录水平显示, 该基因显著激活类胡萝卜素合成关键基因 *PDS*, 对 *PSY* 有弱激活作用, 同时显著抑制降解基因 *CCD4*。酶活水平显示, 过表达株系 *PSY*、*PDS* 酶活性显著提高, *CCD4* 酶活性显著降低, 与基因表达趋势高度一致。转基因株系 OE1 的总类胡萝卜素含量显著高于野生型, OE2~OE4 株系总类胡萝卜素含量比野生型的稍高, 但不显著, 有待进一步在果实中验证。根据以上结果推测 *LbbHLH94-like* 可能通过促进合成、抑制降解双通路推动类胡萝卜素积累。该机制与番茄、万寿菊^[6,12]中 bHLH 调控类胡萝卜素合成的通路保守, 说明 *LbbHLH94-like* 是枸杞果实类胡萝卜素合成的关键正向调控因子。

本研究系统阐明了枸杞 *LbbHLH94-like* 基因的序列特征、时空表达、胁迫与激素响应模式及其对类胡萝卜素合成的调控功能, 为解析枸杞果实品质形成的分子机制提供了重要依据。但本研究仅从表达分析与过表达层面开展验证, 未通过基因敲除、沉默等手段明确其内源调控功能, 且未深入解析该基因与激素信号、逆境通路之间的分子互作机制。未来可针对 *LbbHLH94-like* 开展稳定遗传转化与基因编辑功能验证, 结合转录组与代谢组挖掘其下游靶基因与调控通路, 同时探究其在逆境胁迫下参与类胡萝卜素合成的分子网络, 为枸杞品质精准改良与分子育种提供更系统、更深入的理论支撑。

本研究成功克隆获得宁夏枸杞 *LbbHLH94-like* 基因, 该基因具有显著的组织与果实发育阶段表达特异性, 且能够响应多种非生物胁迫及外源激素诱导, 表达存在明显的浓度剂量效应。*LbbHLH94-like* 可正向调控类胡萝卜素合成关键基因的表达与酶活性, 抑制类胡萝卜素降解通路, 有效提升枸杞果实类胡萝卜素积累量。本研究表明了 *LbbHLH94-like* 在枸杞果实类胡萝卜素合成调控中的重要功能, 为枸杞品质改良和分子育种提供了优质候选基因与理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 纪吴子仪, 何瑶, 张劭哲, 等. 宁夏枸杞子功效物质及药用价值的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2026, 42(2): 315-322.
- [2] Zhao J H, Xu Y H, Li H X, *et al.* *ERF5.1* modulates carotenoid accumulation by interacting with *CCD4.1* in *Lycium* [J]. *Hortic Res*, 2023, 10(12): uhad230.
- [3] 卢晓悦, 刘雪霞, 池礼鑫, 等. 宁夏枸杞果实转录组分析及类胡萝卜素合成相关差异表达基因的筛选 [J]. 南方农业学报, 2025, 56(3): 706-719.
- [4] Donno D, Mellano M G, Gamba G, *et al.* Analytical strategies for fingerprinting of antioxidants, nutritional substances, and bioactive compounds in foodstuffs based on high performance liquid chromatography-mass spectrometry: An overview [J]. *Foods*, 2020, 9(12): 1734.
- [5] Wei F, Wan R, Shi Z G, *et al.* Transcriptomics and metabolomics reveal the critical genes of carotenoid biosynthesis and color formation of goji (*Lycium barbarum* L.) fruit ripening [J]. *Plants*, 2023, 12(15): 2791.
- [6] Zhang H L, Zhang S Y, Zhang H, *et al.* Carotenoid metabolite and transcriptome dynamics underlying flower color in marigold (*Tagetes erecta* L.) [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16835.
- [7] 刘雪霞, 范文强, 焦慧慧, 等. 基于转录组测序的宁夏枸杞不同品种果实活性成分合成差异表达基因分析 [J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 3015-3036.
- [8] Wei Z H, Shang M Q, Jiang Z C, *et al.* Natural allelic variation of basic helix-loop-helix transcription factor 25 regulates carotenoid biosynthesis in sweet potato [J]. *Plant Biotechnol J*, 2025, 23(7): 2627-2644.
- [9] 王子雨. 辣椒 CaNAC035 基因上游调控因子 CabHLH79 的鉴定及其调控机理的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [10] 吕宝莲, 杨宇昕, 崔立操, 等. 小麦 bHLH 家族转录因子的鉴定及其在盐胁迫条件下的表达分析 [J]. 作物杂志, 2024(1): 65-72.

- [11] 刘发旺, 翟科峰, 张丽丽, 等. 王枣子 bHLH 转录因子家族基因挖掘及鉴定 [J]. 淮北师范大学学报: 自然科学版, 2025, 46(3): 33-40.
- [12] Jia C P, Yang H T, Yang T, *et al.* Comprehensive metabolomic and transcriptomic analyses reveal S1SnRK_{2.6}/SlCHPP-SlHLH95-SIPDS module regulating tomato fruit carotene biosynthesis [J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(44): 28493-28510.
- [13] 刘倩, 邓淑芳, 刘玲, 等. 转录因子 CcbHLH107 调控蜜橘果实转色的功能分析 [J]. 食品科学, 2024, 45(15): 194-204.
- [14] 邓明华, 莫云容, 吕俊恒, 等. 辣椒类胡萝卜素生物合成的分子遗传学研究进展 [J]. 广东农业科学, 2024, 51(2): 71-80.
- [15] Zhai Y Q, Zhang L C, Xia C, *et al.* The wheat transcription factor, TabHLH39, improves tolerance to multiple abiotic stressors in transgenic plants [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1321-1327.
- [16] 钱婷, 赵凡, 张玉洁, 等. 肋果沙棘和西藏沙棘转录因子 bHLH94 基因对海拔适应性分化的研究 [J]. 植物研究, 2022, 42(6): 976-985.
- [17] Ren Y R, Zhao Q, Zhao X Y, *et al.* Expression analysis of the MdCibHLH1 gene in apple flower buds and seeds in the process of dormancy [J]. *Hortic Plant J*, 2016, 2(2): 61-66.
- [18] Nie J, Jiang Y, Lv L J, *et al.* The bHLH transcription factor CsPIF4 positively regulates high temperature-induced hypocotyl elongation in cucumber [J]. *Hortic Plant J*, 2024, 10(5): 1187-1197.
- [19] 惠甜, 沈兵琪, 王连春, 等. 桑树 bHLH 转录因子家族全基因组鉴定与分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(17): 78-93.
- [20] Seo J S, Joo J, Kim M J, *et al.* OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice [J]. *Plant J*, 2011, 65(6): 907-921.
- [21] Teng Y T, Lv M, Zhang X X, *et al.* BEAR1 a bHLH transcription factor, controls salt response genes to regulate rice salt response [J]. *J Plant Biol*, 2022, 65(3): 217-230.
- [22] 刘娇妍, 朱嘉慧, 肖浩扬, 等. 水稻 Os01g0853700 基因对植物激素和非生物胁迫的响应分析 [J]. 江苏农业科学, 2023, 51(23): 28-34.
- [23] 刘强, 杨添博, 刘剑锋, 等. 叶面喷施 6-BA 对盐胁迫下不同种源黑果枸杞幼苗生理指标和光合特性的影响 [J]. 东北林业大学学报, 2024, 52(9): 30-35.
- [24] Zhang W W, Xia L, Peng F L, *et al.* Transcriptomics and metabolomics changes triggered by exogenous 6-benzylaminopurine in relieving epicotyl dormancy of *Polygonatum cyrtoneura* Hua seeds [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 961899.
- [25] 陈紫玉, 巴哈依丁·吾甫尔, 任桂霖, 等. 外源 IBA 对无花果扦插苗抗氧化特性及 IAA 生物合成途径的影响 [J]. 西北植物学报, 2024, 44(7): 1046-1054.
- [26] 陈鸿, 杜金华, 马瑞娟, 等. 外源赤霉素(GA3)对不同桃品种(系)果实品质的影响 [J]. 果树学报, 2025, 42(4): 775-789.
- [27] 作建芬, 林益超, 刘维维, 等. 聚乙二醇-6000 模拟干旱胁迫对三种牧草种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 生态学报, 2025, 45(13): 6414-6426.
- [28] 胡进红, 宋繁, 梁旺利, 等. NaCl 胁迫下宁夏枸杞光合作用相关基因差异表达分析 [J]. 西北植物学报, 2023, 43(1): 106-115.
- [29] 刘灿, 代晓燕, 张玉银, 等. 低钾胁迫下过表达 NtCaM10 对烟草生长及钾素吸收的影响 [J]. 中国烟草科学, 2024, 45(1): 31-38.
- [30] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [31] 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.
- [32] Zhang L C, Kang J, Xie Q L, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor bHLH95 affects fruit ripening and multiple metabolisms in tomato [J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(20): 6311-6327.
- [33] Gan Z, Zhang Y, Yang C, *et al.* A kiwifruit bHLH149 transcription factor modulates carotenoid biosynthesis by directly activating LCYB during postharvest ripening [J]. *Fruit Res*, 2025, 5: e003.
- [34] 蔡欣, 黄钰杏, 崔明月, 等. 水稻 *OsbHLH109* 基因的表达分析 [J]. 广东农业科学, 2023, 50(12): 120-130.
- [35] 康同洋. PpbHLH59 介导乙烯和脱落酸调控桃果实成熟软化的分子机制 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2025.

[责任编辑 时圣明]