

沙棘 *SyGl* 基因克隆及其在雌雄花芽发育过程中的表达分析

任乾丹, 李昕娟, 张恬, 林梦娇, 周武*

青海大学 生态环境工程学院, 青海 西宁 810000

任乾丹, 李昕娟, 张恬, 林梦娇, 周武. 沙棘 *SyGl* 基因克隆及其在雌雄花芽发育过程中的表达分析[J]. 生物工程学报, 2026, 42(1): 409-423.

REN Qندان, LI Xinjuan, ZHANG Tian, LIN Mengjiao, ZHOU Wu. Cloning and expression analysis of *SyGl* during female and male flower bud development in *Hippophae rhamnoides*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2026, 42(1): 409-423.

摘要: 沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是雌雄异株植物, 其性别早期鉴定困难限制了人工沙棘林雌雄合理配置, 影响了沙棘的经济和生态价值。*SyGl* (*Shy Girl*)作为雌性抑制因子, 在沙棘中的功能尚不明晰。为探究 *SyGl* 在沙棘雌、雄花芽发育过程中的功能与机制, 本研究以中国沙棘花芽为材料, 克隆得到 *HrSyGl*, 利用多种在线软件对其进行生物信息学分析和亚细胞定位, 通过转录组测序和实时荧光定量逆转录 PCR(real-time reverse transcription-PCR, RT-qPCR)分析 *HrSyGl* 在中国沙棘 3 个不同发育时期的雌、雄花芽中的表达模式。结果表明, *HrSyGl* 基因编码 DNA 序列(coding DNA sequence, CDS)长度为 444 bp, 编码 147 个氨基酸, 相对分子质量为 16 358.05 Da, 等电点为 5.51, 脂肪族系数为 112.04。该蛋白不存在跨膜结构和信号肽, 存在磷酸化位点, 为稳定、疏水性蛋白。*HrSyGl* 蛋白含有 REC_hyHK_CKII1_RcsC-like 结构域, 其二级结构主要以 α 螺旋为主要结构组成元件。通过同源进化分析发现, 沙棘与鼠李科的枣和苞叶木 *SyGl* 基因在进化上聚为 1 支, 亲缘关系较近。亚细胞定位结果显示, *HrSyGl* 定位于细胞核。RT-qPCR 分析发现, 该基因在中国沙棘不同发育时期雌雄花芽中的表达存在差异, 在雌花芽中的表达呈现先上升后下降趋势, 但在雄花芽中整体呈现上升的表达趋势。本研究为进一步研究 *HrSyGl* 功能和解析沙棘性别分化的分子机制奠定了一定的理论基础。

关键词: 沙棘; *HrSyGl*; 基因克隆; 花芽发育; 基因表达

资助项目: 国家自然科学基金(32160386); 青海省科技厅应用基础研究项目(2024-ZJ-782)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160386) and the Applied Basic Research Program of Qinghai Provincial Science and Technology Department (2024-ZJ-782).

*Corresponding author. E-mail: zhouwu870624@qhu.edu.cn

Received: 2025-05-22; Accepted: 2025-07-11; Published online: 2025-07-31

Cloning and expression analysis of *SyGl* during female and male flower bud development in *Hippophae rhamnoides*

REN Qiandan, LI Xinjuan, ZHANG Tian, LIN Mengjiao, ZHOU Wu*

College of Ecological and Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810000, Qinghai, China

Abstract: *Hippophae rhamnoides* L. is a dioecious plant. The difficulty in early sex identification hinders the rational allocation of male and female plants in *H. rhamnoides* plantations, affecting its economic and ecological value. Few studies examined *SyGl* (*Shy Girl*), a female suppressor gene, in *H. rhamnoides*. To examine how *SyGl* regulates female and male flower bud development, we cloned *HrSyGl* from the flower buds of *H. rhamnoides* and used multiple online tools to perform bioinformatics analysis and subcellular localization prediction. Additionally, we analyzed the expression patterns of *HrSyGl* in female and male flower buds at three different developmental stages through transcriptome sequencing and RT-qPCR. Our results showed that *HrSyGl* contained a 444-bp coding sequence encoding 147 amino acid residues. The deduced protein had the relative molecular mass of 16 358.05 Da, an isoelectric point of 5.51, and an aliphatic index of 112.04. This protein lacked transmembrane domains and signal peptides but contained phosphorylation sites. Our data characterized it as a stable, hydrophobic protein. We identified that the protein HrSyGl contained a REC_hyHK_CKII_RcsC-like domain, with α -helices serving as its major secondary structural elements. The phylogenetic analysis showcased that *HrSyGl* clustered closely with the *SyGl* genes from *Ziziphus* and *Rhamnella rubrinervis* belonging to Rhamnaceae, indicating their close phylogenetic relationship. The subcellular localization results demonstrated that HrSyGl was localized to the nucleus. RT-qPCR revealed differential expression patterns of this gene between male and female flower buds at different developmental stages in *H. rhamnoides*. Specifically, its expression in female flower buds initially increased and then decreased, while that in male flower buds showed a consistently upward trend. Our study established a theoretical foundation for further investigation into the function of *HrSyGl* and the molecular mechanisms underlying sex differentiation in *H. rhamnoides*.

Keywords: *Hippophae rhamnoides*; HrSyGl; gene cloning; flower bud development; gene expression

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)属胡颓子科(Elaeagnaceae Juss)沙棘属(*Hippophae* L.),是雌雄异株的多年生落叶灌木或小乔木^[1-2],广泛生长于中国华北、西北、西南等地^[3]。沙棘作为一种药食同源植物,其果实富含维生素A、维生素C、胡萝卜素、黄酮类化合物等多种营养成分^[4-6]。同时,沙棘具有抗氧化、抗炎、增强免

疫力等功效^[7]。沙棘耐寒、耐旱、耐盐碱,适应性强,能在贫瘠的土壤中生长,由于根系发达,能有效防止水土流失,常用于荒漠化治理和土壤改良^[8-9]。因此,沙棘集经济价值、生态效益和药用价值于一体,被誉为“水土保持先锋植物”和“绿色黄金”^[10],具有极高的研究和开发价值。

自然界被子植物大多是雌雄同株，雌雄异株植物仅占 6%^[11-13]。雌雄异株是沙棘属植物的一个重要特征，在实际生产过程中，雌株和雄株有着不同的价值^[14]。在雌雄混生林中，一般雄株较雌株高大、生长旺盛、枝叶繁茂，更适合作为生态防护林^[15]。雌株较为矮小，枝叶稀疏，但雌株的果实富含多种维生素和活性成分，可加工为果汁、沙棘油等产品创造经济价值^[16]。类似于其他多年生雌雄异株植物，沙棘属实生苗的早期性别鉴定较为困难^[10]，限制了人工沙棘林营造中雌雄比例配置。因此，沙棘属植物的性别鉴定研究对于沙棘产业快速发展具有重要的实践意义。

SyGl (*Shy Girl*) 是在猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 中通过基因组和转录组分析鉴定出的一个 C 型细胞分裂素响应调节因子，在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中的功能分析表明，*SyGl* 作为心皮发育的显性抑制因子发挥作用^[17]。该基因作为雌性抑制因子，位于 Y 染色体上，通过抑制雌蕊发育导致雄花的形成并特异性表达^[18-19]。De Mori 等^[20]利用 CRISPR/Cas9 技术对四倍体猕猴桃雄性植株的 *SyGl* 基因进行编辑，成功筛选出 2 个假定基因敲除的株系。Varkonyi-Gasic 等^[21]利用 CRISPR/Cas9 技术对中华猕猴桃品种 ‘Bruce’ 雄性植株中的 *CEN*、*CEN4* 和 *SyGl* 基因进行诱变，结果表明通过同时靶向编辑 *CEN4* 和 *SyGl* 基因，成功获得了具有早花特性的雌雄同株猕猴桃植株，进一步证明 *SyGl* 基因在猕猴桃性别决定中的雌性化抑制作用。

目前关于沙棘的研究多集中于活性成分、生态修复、产品开发等方面，对于沙棘性别决定机制方面的研究报道较少。本课题组前期对中国沙棘雌、雄花芽不同发育阶段进行转录组测序、miRNA 测序和蛋白质组质谱分析，并通过多组学联合分析中筛选得到与性别分化相关的候选基因 *HrSyGl*。本研究利用逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 技术得到沙棘

cDNA 后使用常规 PCR 克隆得到沙棘 *HrSyGl* 基因，系统分析其生物信息学特征，并研究其亚细胞定位及在雌、雄花芽不同发育阶段的表达模式，以期为进一步研究沙棘性别分化的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料采自青海省西宁市大通回族土族自治县边麻沟村(36°96′65.64″N, 101°84′16.39″E) 自然生长的沙棘雌、雄植株。通过对中国沙棘花芽分化关键期的观察及相关数据的总结，于 4-5 月份 3 阶段对样品进行采集，第 1 阶段和第 2 阶段均为花芽开花之前，第 3 阶段为开花后，3 阶段之间均相隔 10 d。分别选取健康雌株和雄株各 3 株作为生物学重复，采集其 3 个不同发育阶段的花芽为样品，并根据采集时间的先后顺序，雌花芽依次标记为 Female-1-Female-3，雄花芽依次标记为 Male-1-Male-3。所采集的样本一部分立即液氮速冻，保存于 -80 °C 超低温冰箱备用，另一部分立即放入福尔马林-乙酸-乙醇 (formalin-aceto-alcohol, FAA) 固定液中保存，用以形态观察和制备石蜡切片。

1.2 方法

1.2.1 沙棘雌雄花芽的形态观察

将采集得到的新鲜雌雄花芽使用体式显微镜观察并记录其形态。取出放入福尔马林-乙酸-乙醇 (formalin-acetic acid-alcohol, FAA) 固定液的雌雄花芽，20% 盐酸软化 24 h 后流水冲洗 4 h。依次用 70% 乙醇、85 乙醇%、95% 乙醇、无水乙醇和二甲苯混合液(1:1)、二甲苯逐级脱水和透明。随后将雌雄花芽在二甲苯-石蜡混合液(1:1) 中 40 °C 浸泡 16 h 后在纯石蜡(24 h) 中浸蜡，包埋后切成 8 μm 切片，随后将粘好的切片 40 °C 烘干，再经过脱蜡、复水、染色、封片后，将切片放置于光学显微镜下观察，选取清晰完整的切片进行拍照。

1.2.2 沙棘基因组下载及 *HrSyGl* 基因鉴定

通过国家基因库序列归档系统 (China national genebank sequence archive, CNSA) 数据库 (<https://ftp.cnbg.org/pub/CNSA/data2/CNP0001846/CNS0383685/CNA0022752/>) 下载沙棘基因组信息数据文件, 并利用下载的基因组文件, 将猕猴桃 *SyGl* 基因比对到沙棘基因组中, 对 *HrSyGl* 基因进行鉴定。

1.2.3 沙棘总 RNA 提取及反转录

分别取中国沙棘 3 个时期的雌、雄花芽, 于研钵中加入液氮充分研磨, 利用植物组织 RNA 快速提取试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 分别提取 3 个不同发育时期雌、雄花芽总 RNA, 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和纯度。选取高质量 RNA, 按照一步法除基因组 cDNA 合成试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 反转录合成 3 个不同发育时期雌、雄花芽的 cDNA, 保存于 -20°C 冰箱备用。

1.2.4 沙棘 *HrSyGl* 克隆、回收及测序

根据中国沙棘雌、雄花芽转录组测序获得的 Unigene 序列, 通过 NCBI ORF Finder 工具确定开放阅读框 (open reading frame, ORF), 并利用 Premier 5.0 软件设计特异性克隆引物 (表 1)。以

反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增体系为 50 μL : 引物 *HrSyGl*-F-1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、*HrSyGl*-R-1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、10 \times Buffer 5 μL 、dNTP mixture (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、DNA 聚合酶 (1 U/ μL) 1 μL 、cDNA 1 μL 、ddH₂O 40 μL 。扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 15 s, 32 个循环; 72°C 终延伸 5 min; 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳验证后, 使用胶回收试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 进行纯化回收。将回收产物与 pUCmT-Vector 克隆载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有 IPTG (100 mmol/L) 和 X-gal (20 mg/mL) 的氨苄青霉素抗性平板。通过蓝白斑筛选, 挑取白色单菌落, 以 M13-F 和 *HrSyGl*-R-2 引物进行菌落 PCR 验证。选取阳性克隆过夜培养后送至生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序分析。本研究所用引物见表 1。

1.2.5 沙棘 *HrSyGl* 生物信息学分析

采用表 2 所列在线分析平台对 *HrSyGl* 蛋白进行系统的生物信息学分析。通过 NCBI Protein BLAST 功能对 *HrSyGl* 氨基酸序列进行同源比对, 筛选相似度较高的物种, 下载其蛋白序列用于后续分析。利用 ClustalX 2.1 软件的 Do Complete Alignment 功能对下载的 *HrSyGl* 蛋

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Purpose
<i>HrSyGl</i> -F-1	ATGGCGATTAGAAATGATATGATTGG	Gene clone
<i>HrSyGl</i> -R-2	GTTTCTGATGTGAATCAATTGAAGC	
M13-F	GTTGTAACGACGCGCCAG	Colony PCR
<i>HrSyGl</i> -F-2	AGGCATGGGTGTGGATAACA	Real-time fluorescence quantitative PCR
<i>HrSyGl</i> -R-2	AGCAATTGTCAAGACCAGCTT	
<i>Tubulin</i> -F	GGAGATGTTCCGAGAGTTAG	Reference gene
<i>Tubulin</i> -R	GTGAACTCCATCTCATCCATACC	
<i>HrSyGl</i> -F-3	gccgctctagaactagtgatccATGGCGATTAGAAATGATATGATTGG	Plasmid construction
<i>HrSyGl</i> -R-3	cgcccttgctaccatggtaccGTTTCTGATGTGAATCAATTGAAGC	
A580-Seq-R	AGAAGATGGTGCGCTCCTG	Colony PCR for vector construction

The lowercase base portions in the primers *HrSyGl*-F-3/*HrSyGl*-R-3 represent the homologous arm sequences, while the uppercase base portions correspond to the target gene primer sequences.

表2 生物信息学分析网站

Table 2 Websites on bioinformatics analysis

Website	Purpose
ProtParam (https://web.expasy.org/protparam)	Physicochemical property prediction
ProtScale (https://web.expasy.org/protscale)	Hydrophilic/hydrophobic prediction
TMHMM (https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM)	Transmembrane domain prediction
SignalP 4.1 Server (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/SignalP-4.1)	Signal peptide prediction
NetPhos3.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)	Phosphorylation site prediction
WOLF PSORT (https://wolfsort.hgc.jp/)	Subcellular localization prediction
NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)	Domain prediction
SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)	Secondary structure prediction
SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/)	Tertiary structure prediction
PlantCARE (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)	Analysis of cis-acting elements

白同源序列进行比对, 保存 msf 格式文件并导入 GeneDoc 软件将比对好的序列进行美化处理; 利用 MEGA 7.0 软件以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 自展系数(bootstrap)设置为 1 000。通过沙棘基因组文件, 使用 TBtools 软件提取 *HrSyGI* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的序列, 通过 PlantCARE 数据库进行启动子顺式元件分析。

1.2.6 沙棘 *HrSyGI* 亚细胞定位分析

通过设计包含 *Kpn I/BamH I* 双酶切位点以及同源臂的特异性引物(表 1)。将 pYBA1132-GFP 载体用 *Kpn I* 和 *BamH I* 进行双酶切并回收, 用同源重组试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行连接, 重组产物使用热激法转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素(kanamycin, Kan)的平板。挑选阳性克隆, 使用引物对 *HrSyGI*-F-3/A580-Seq-R 进行菌落 PCR, 次日将过夜培养好的阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。如测序结果正确, 则表明 pYBA1132-GFP-*HrSyGI* 载体构建成功。

将 pYBA1132-GFP-*HrSyGI* 以及空载体 PYBA1132-GFP 进行菌液扩繁并使用质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司)提取质粒。以 pYBA1132-GFP-*HrSyGI* 为实验组, 空载体 PYBA1132-GFP 为对照组, 分别与细胞核 GHD7-RFP marker 共转化烟草原生质体细胞,

弱光下培养 8–10 h, 使用激光共聚焦显微镜观察亚细胞定位。

1.2.7 *HrSyGI* 基因表达分析

将采集的 3 个不同发育时期的中国沙棘雌、雄花芽样本送至南京集思慧远生物科技有限公司进行转录组测序分析。通过 Excel 软件整理测序得到的原始数据, 并利用 TBtools 软件将整理后的转录组数据绘制成表达量热图。

以中国沙棘 3 个不同发育时期雌、雄花芽的 cDNA 为模板, 选择 *Tubulin* 作为内参基因, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成特异性引物(表 1)。采用 SYBR Green[天根生化科技(北京)有限公司]进行 RT-qPCR 定量分析, 反应体系总体积为 20 μL : 2 \times SuperReal Color PreMix 10 μL , 正向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)和反向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.6 μL , cDNA 模板与无酶双蒸水的总体积为 8.8 μL 。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 40 个循环。每个样品设 3 次重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算基因的相对表达量, 使用 SPSS 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 最后使用 Graph Prism8.0.2 软件对 RT-qPCR 结果进行可视化。

2 结果与分析

2.1 沙棘雌雄花芽发育的观察

沙棘雌雄花芽外部形态如图 1A 所示, 随着

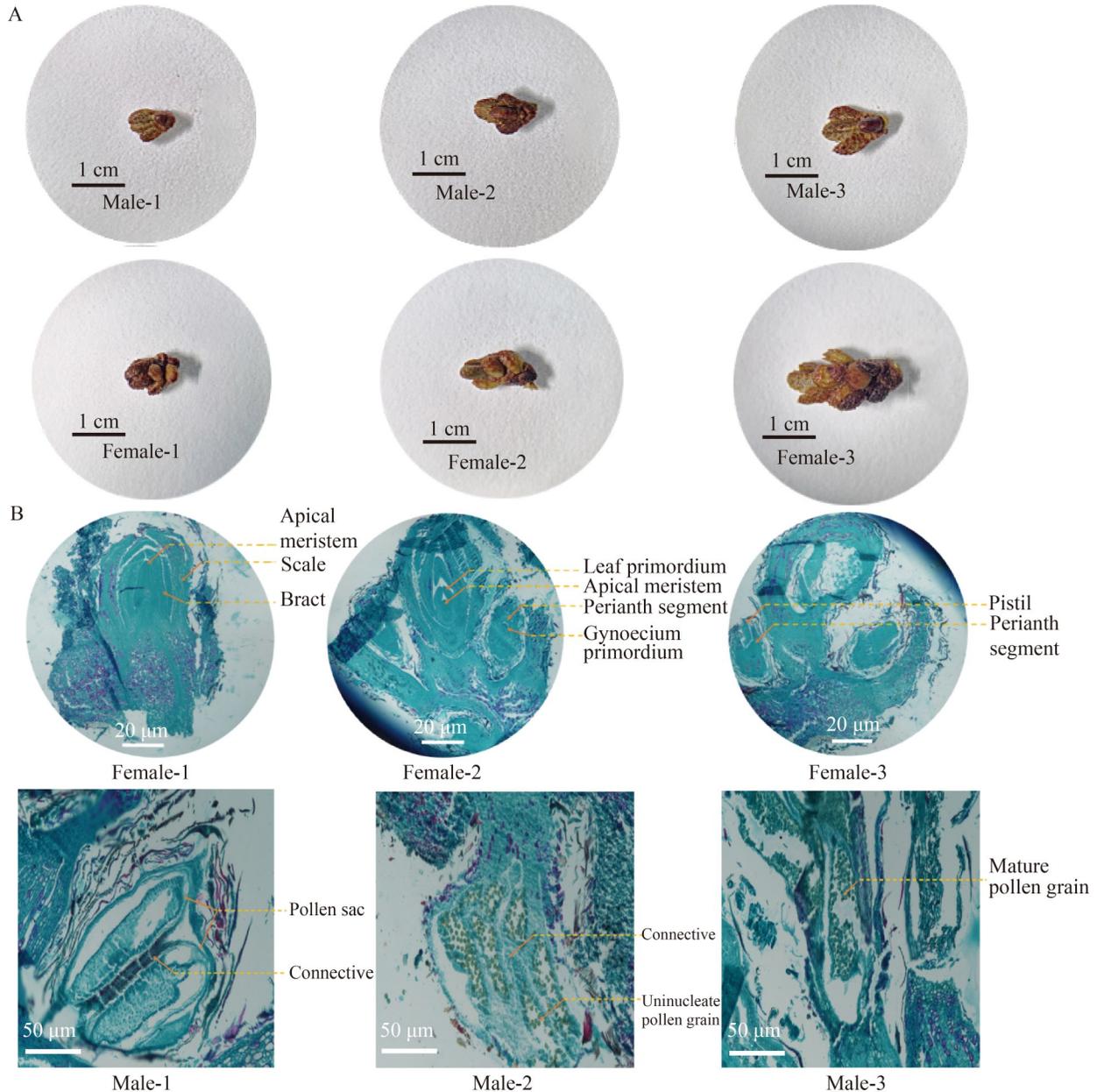


图1 沙棘雌雄花芽不同发育时期外部形态与发育解剖结构 A: 沙棘雌雄花芽不同发育时期外部形态; B: 沙棘雌雄花发育解剖结构。

Figure 1 External morphology and developmental anatomical structure of *Hippophae rhamnoides* floral buds at different developmental stages. A: External morphology of female and male floral buds in *Hippophae rhamnoides* at different developmental stages; B: Anatomical structure of female and male floral development.

时间的增加, 雌雄花芽均有不同程度的增大, 雄花芽大于雌花芽。沙棘雌雄花芽发育解剖结构如图 1B 所示, 可以清晰地看见沙棘雌雄花芽

的发育过程。Female-1 处于未分化期, Female-2 处于雌蕊分化初期, Female-3 处于雌蕊分化末期。由于雄花发育早于雌花, 因此 Male-1 已经

处于分化初期, Male-2 产生单核花粉粒, Male-3 单核花粉粒发育为成熟花粉粒。

2.2 沙棘 *HrSyGl* 基因的鉴定及克隆

通过国家基因库核酸序列归档系统(CNSA)下载沙棘全基因组文件(CNA0022752)显示, 沙棘基因组共 849.04 Mb, 有 12 条常染色体。将猕猴桃 *SyGl* 基因比对到沙棘基因组中, 结果显示, 猕猴桃 *SyGl* 基因在沙棘中有 14 个同源基因, 其中与 *Hiprhalgene26149* 和 *Hiprhalgene13007* 有较高同源性, 分别为 59.016% 和 49.923%, 与其他基因的同源性均低于 40%。*Hiprhalgene26149* 和 *Hiprhalgene13007* 分别位于沙棘的 6 号染色体和 5 号染色体上。将猕猴桃 *SyGl* 基因、*Hiprhalgene26149* 和 *Hiprhalgene13007* 进行结构域分析, 结果表明, *Hiprhalgene26149* 和 *Hiprhalgene13007* 都含有与猕猴桃 *SyGl* 基因相同的功能保守结构域 REC_hyHK_CKII_RcsC-like。基于前期多组学联分析筛选性别分化相关基因的研究结果, 与猕猴桃 *SyGl* 基因具有更高同源性的 *Hiprhalgene26149* 被鉴定为候选基因之一。据此, 该基因被选定为研究对象, 并命名为 *HrSyGl*。

根据沙棘 *HrSyGl* (*Hiprhalgene26149*) 的 CDS 序列设计特异性引物, 经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, 在 250 bp 和 500 bp 之间有明亮条带, 条带位置与 *HrSyGl* 基因大小(444 bp)基本相符, 进行亚克隆载体连接和转化。利用 ClustaX 软件对目的条带测序结果分析, 发现其大小为 444 bp, 与 *HrSyGl* 基因序列匹配率为 100%, 表明 *HrSyGl* 基因克隆成功。

2.3 沙棘 *HrSyGl* 生物信息学分析

2.3.1 沙棘 *HrSyGl* 蛋白理化性质及启动子顺式元件分析

通过 ExPASy ProtParam 在线分析工具对 *HrSyGl* 蛋白的理化性质进行预测, 结果显示 *HrSyGl* 蛋白相对分子质量为 16 358.05 Da; 蛋白

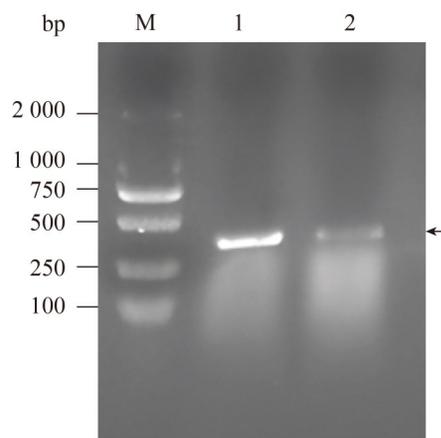


图2 沙棘 *HrSyGl* 基因 PCR 产物电泳图 M: Marker; 1-2: *HrSyGl* 基因。

Figure 2 Electrophoresis of the *HrSyGl* gene PCR product in *Hippophae rhamnoides*. M: Marker; 1-2: *HrSyGl* gene.

分子式为 $C_{711}H_{1185}N_{201}O_{218}S_{10}$; 等电点(isoelectric point, pI)为 5.51, 为酸性蛋白(pI<7.00); 氨基酸残基数为 147, 其中异亮氨酸(isoleucine, Ile)和亮氨酸(leucine, Leu)占比最高, 均为 10.9%, 半胱氨酸(cysteine, Cys)和酪氨酸(tyrosine, Tyr)占比最低, 均为 0.7%; 其带负电荷氨基酸残基总数: 天冬氨酸(aspartic Acid, Asp)和谷氨酸(glutamic Acid, Glu)为 20 个, 带正电荷氨基酸残基总数: 精氨酸(arginine, Arg)和赖氨酸(lysine, Lys)为 16 个; 不稳定指数为 22.89, 小于 40, 推测其为稳定蛋白; 脂肪系数为 112.04。利用 TMHMM 在线预测跨膜结构结果表明, *HrSyGl* 蛋白不存在跨膜结构(图 3A)。疏水性平均值(grand average of hydropathicity, GRAVY)为 0.007, 说明 *HrSyGl* 蛋白为疏水蛋白(图 3B)。利用 Netphos3.1 在线预测该蛋白的磷酸化位点结果表明(图 3C), *HrSyGl* 蛋白存在 8 个磷酸化位点, 其中丝氨酸(serine, Ser) 4 个, 苏氨酸(threonine, Thr) 4 个。SignalP-4.1 在线预测信号肽结果表明(图 3D), *HrSyGl* 蛋白不存在信号肽。利用 WOLF PSORT 在线软件预测 *HrSyGl* 的亚细胞定位, 结果表明 *HrSyGl* 定位于细胞核。顺式作用元件分析结果

显示(图 3E), *HrSyGl* 基因的启动子区不仅包含生长素响应元件(TGA-element)、脱落酸响应元件(abscisic acid responsive element, ABRE)、金属响应元件(metal responsive element, MRE)、赤霉素响应元件 P-box, 还包含与植物生长发育、胁迫有关的顺式作用元件 GT1-motif、ATC-motif、AT1-motif, 以及与种子萌发有关的顺式作用元

件 Box III、O2-site。

2.3.2 沙棘 *HrSyGl* 蛋白结构域及二级、三级结构预测

结构域是蛋白质中独立折叠、具有特定功能的单元。利用 NCBI Conserved Domain Database (CDD) 的 CD-Search 工具对沙棘 *HrSyGl* 蛋白进行保守结构域分析。结果显示沙棘 *HrSyGl* 蛋白

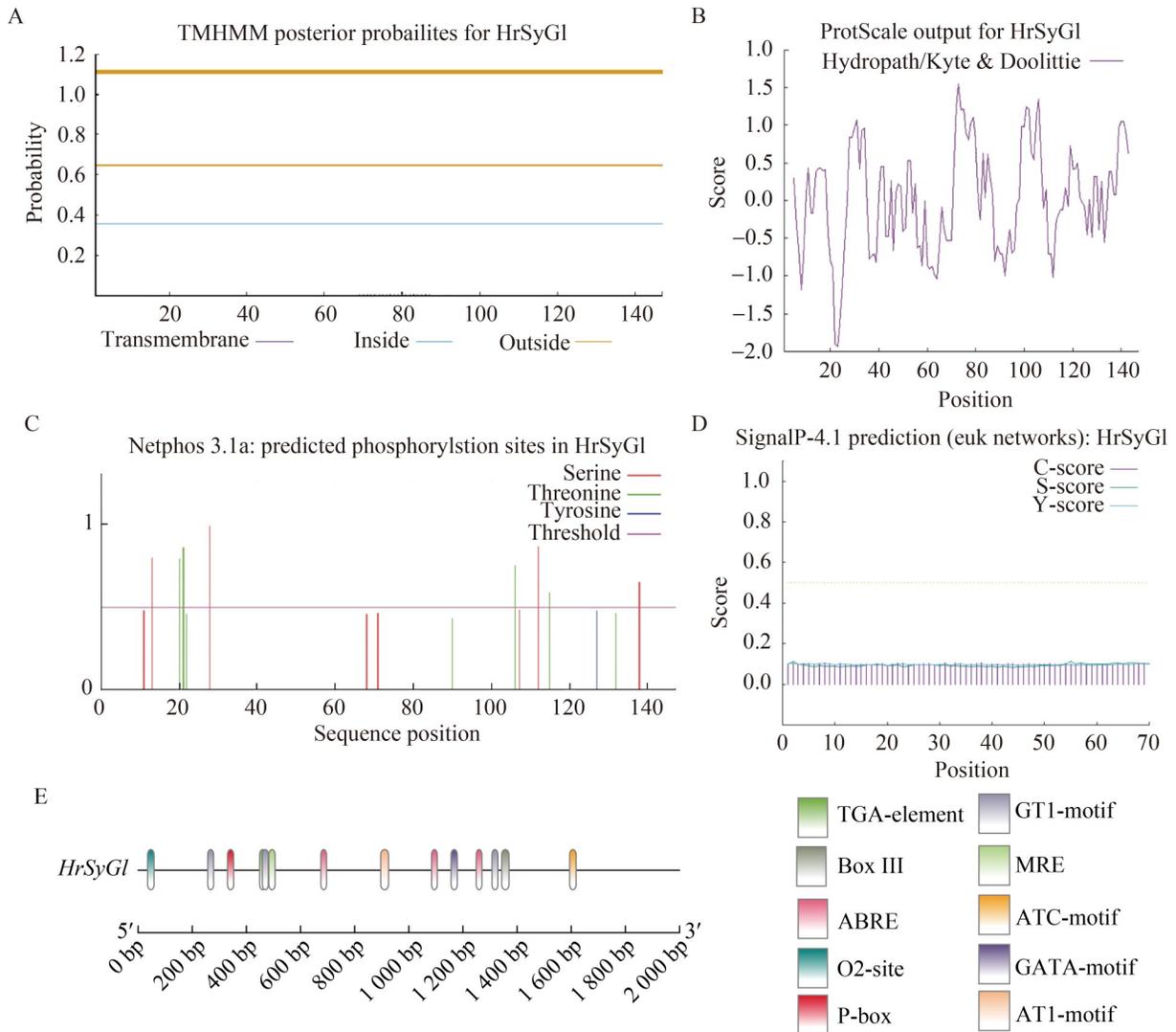


图3 *HrSyGl*蛋白生物信息学分析 A: *HrSyGl*蛋白跨膜结构预测; B: *HrSyGl*蛋白亲疏水性; C: *HrSyGl*蛋白磷酸化位点预测; D: *HrSyGl*蛋白信号肽预测; E: *HrSyGl*基因顺式作用元件。

Figure 3 Bioinformatics analysis of *HrSyGl*. A: Prediction of transmembrane structure of *HrSyGl* protein; B: Hydrophobicity of *HrSyGl* protein; C: Prediction of phosphorylation sites of *HrSyGl* protein; D: Prediction of signal peptide of *HrSyGl* protein. E: *cis*-acting elements of the *HrSyGl* gene.

包含 REC_hyHK_CKII_RcsC-like 特殊保守结构域(图 4A), 属于 REC 超基因家族。该结构域是一种常见的复合结构域, 在细菌中较为常见, 通常出现在组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和杂交组氨酸激酶(hybrid histidine kinase, HyHK)中。

通过 SOPMA 在线预测 HrSyG1 蛋白的二级结构, 结果显示 HrSyG1 蛋白结构组成元件为 α 螺旋(alpha helix): 40.82%; 无规则卷曲(random coil): 26.53%; 延伸链(extended strand): 19.73%; β -转角(beta turn): 12.93% (图 4B), 表明 α 螺旋是该蛋白最主要的二级结构元件。

通过 SWISS-MODEL 软件, 在线预测得到沙棘 HrSyG1 蛋白的三级结构, 结果如图 4C 所示, HrSyG1 蛋白三级结构主要为 α 螺旋, 与二级结构预测结果一致。

2.3.3 沙棘 HrSyG1 氨基酸序列同源性比对和系统进化树分析

将 HrSyG1 氨基酸序列上传到 NCBI 数据库中进行 Blastp 比对, 筛选 HrSyG1 的同源蛋白,

选择同源性较高的蛋白序列并导入 ClustaX 2.1 软件进行氨基酸多重序列比对分析。沙棘 HrSyG1 蛋白与葡萄 (*Vitis vinifera*)、苞叶木 (*Rhamnella rubrinervis*)、红马银花 (*Rhododendron vialii*)、川黔千金榆 (*Carpinus fangiana*)、巴拉圭冬青 (*Ilex paraguariensis*)、枫香树 (*Liquidambar formosana*)、茶树 (*Camellia sinensis*)、大花五桠果 (*Dillenia turbinata*)、翅果连翘 (*Abeliophyllum distichum*)、赫雷拉南鼠刺 (*Escallonia herrerae*)、榴莲 (*Durio zibethinus*)、枣 (*Ziziphus jujuba*) 这 12 个物种的同源性达 59.40%–68.29%, HrSyG1 蛋白与这 12 个物种的总相似度达 62.07%, 比对结果如图 5 所示, 颜色越深的部分则表示序列一致性越高, 也越保守。绿色框中为 HrSyG1 蛋白 REC_hyHK_CKII_RcsC-like 结构域上的金属结合位点, 红色框内为 REC_hyHK_CKII_RcsC-like 结构域上的组氨酸磷酸转移 (histidine phosphotransfer domain, Hpt) 结构域结合位点, 而紫色框内为 REC_

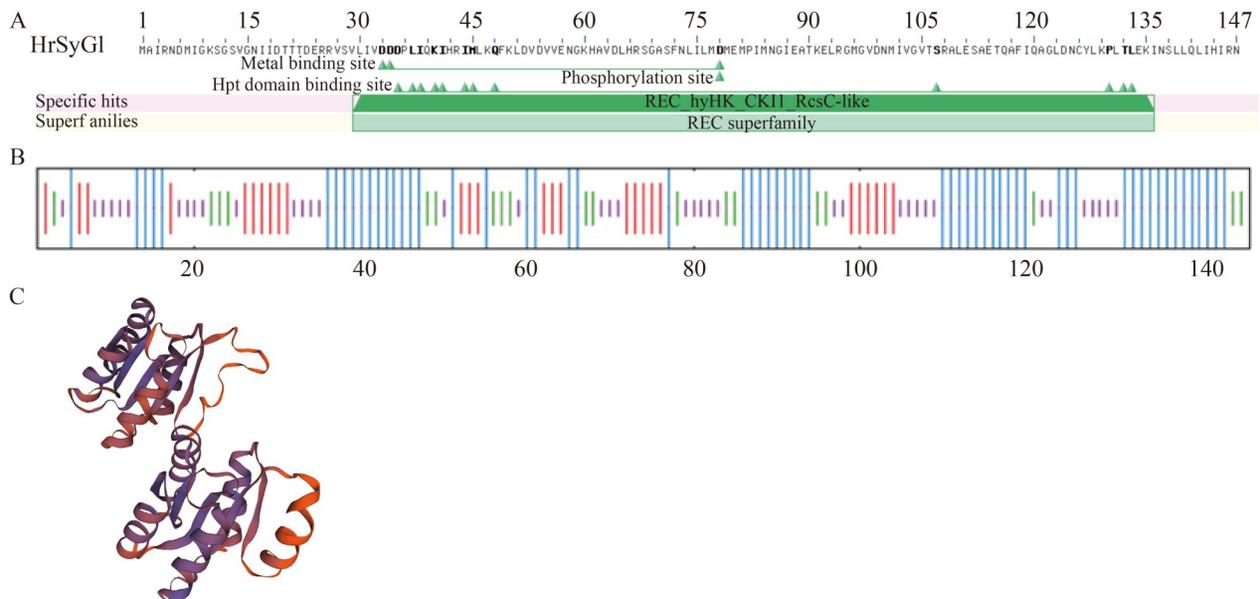


图4 HrSyG1蛋白结构预测分析 A: HrSyG1蛋白结构域预测; B: HrSyG1蛋白二级结构预测; C: HrSyG1蛋白三级结构预测。

Figure 4 Structural prediction analysis of HrSyG1 protein. A: Prediction of protein domain structure of HrSyG1; B: Prediction of the secondary structure of HrSyG1 protein; C: Prediction of tertiary structure of HrSyG1 protein.

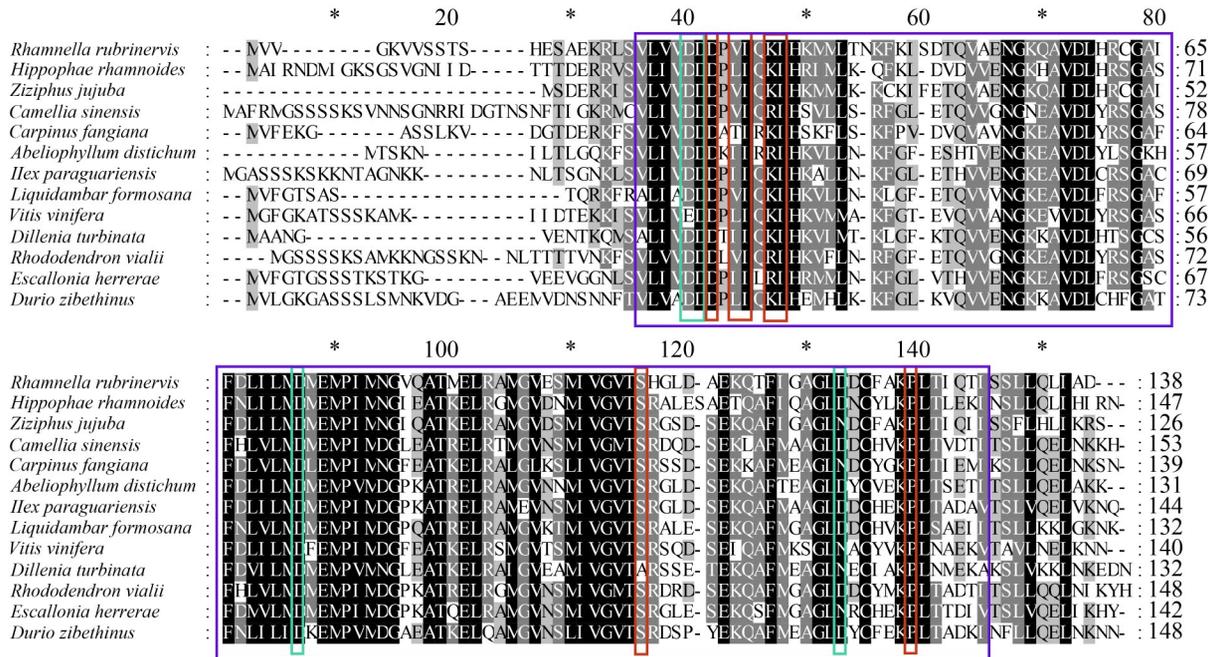


图5 HrSyG1蛋白多重序列比对 绿色框：金属结合位点；红色框：磷酸转移结构域结合位点；紫色框：REC_hyHK_CKII_RcsC-like结构域序列。

Figure 5 Multiple sequence alignment of the HrSyG1 protein. Green box: Metal binding site; Red box: Phosphotransfer domain binding site; Purple box: REC_hyHK_CKII_RcsC-like domain sequence.

hyHK_CKII_RcsC-like 结构域序列，位置在 37-145，因此推测该结构域对于 HrSyG1 蛋白功能具有重要作用。

利用 MEAG7.0 软件构建了沙棘与其他 18 个物种的系统进化树，同科物种用相同的颜色进行标识，结果如图 6 所示。系统进化树聚为 3 大支，沙棘与枣、苞叶木、川黔千金榆、榴莲、长蒴黄麻(*Corchorus olitorius*)聚为 1 支，并且与鼠李科枣和苞叶木的亲缘关系最高，其次与桦木科川黔千金榆、锦葵科榴莲和长蒴黄麻亲缘关系较近。推测在基因水平上，沙棘与鼠李科的鼠李属和苞叶木属存在一定的遗传联系。鼠李科中的一些鼠李属植物如冻绿(*Rhamnus globosa*)、薄叶鼠李(*Rhamnella leptophyllus* Schneid)为雌雄异株，因此推测沙棘 HrSyG1 基因与其他雌雄异株物种中的同源基因具有相似的功能。

2.4 沙棘 HrSyG1 亚细胞定位

通过 WOLF PSORT 在线软件预测 HrSyG1 蛋白定位于细胞核。为了进一步明确 HrSyG1 的亚细胞定位情况，将 HrSyG1 基因通过同源重组方法连接在 PYBA1132-GFP 绿色荧光载体上，然后将空载体 PYBA1132-GFP 和基因融合载体 PYBA1132-GFP-HrSyG1 转烟草原生质体瞬时表达后，在激光共聚焦显微镜下观察定位情况，结果如图 7 所示。PYBA1132-GFP-HrSyG1 载体在细胞核发出绿色荧光，且在暗场下绿色荧光与细胞核 GHD7-RFP 红色荧光重叠为黄色荧光，表明 HrSyG1 定位于细胞核。这一结果与预测的结果相符。

2.5 沙棘 HrSyG1 不同花期的表达量

将中国沙棘 3 个不同发育时期的雌、雄花芽的转录组数据中 HrSyG1 基因的表达量绘制成热图(图 8A)。结果显示，HrSyG1 基因在中国沙

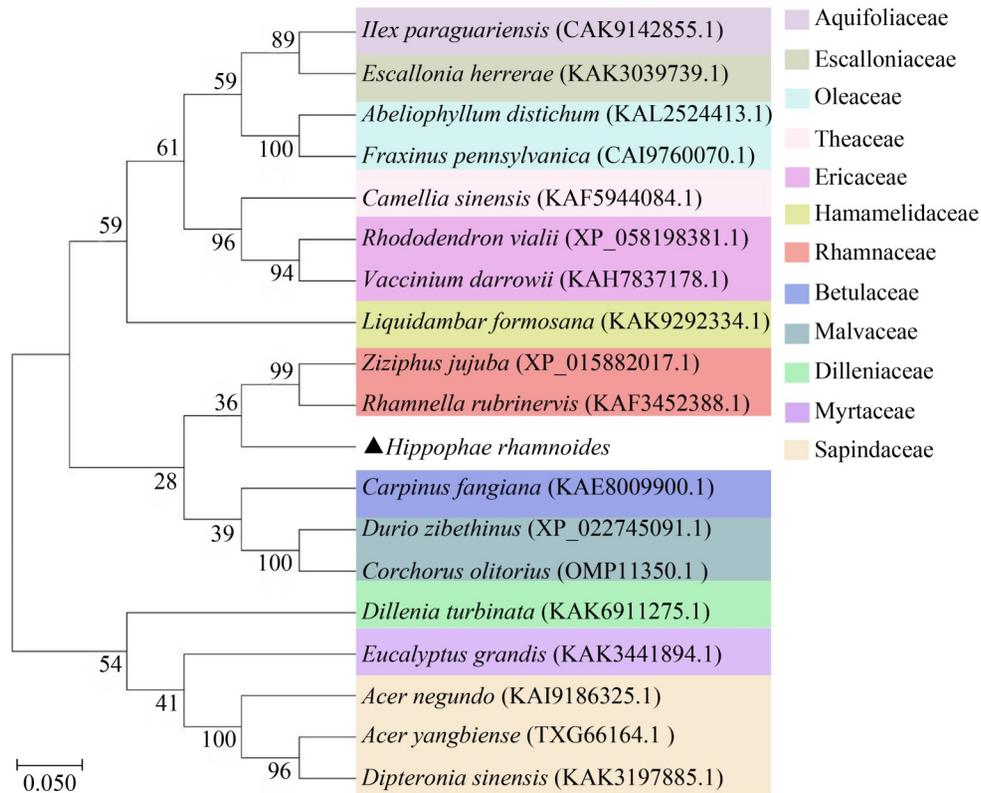


图6 *HrSyGI*及其同源蛋白的系统进化树

Figure 6 Phylogenetic tree of *HrSyGI* and its homologous proteins.

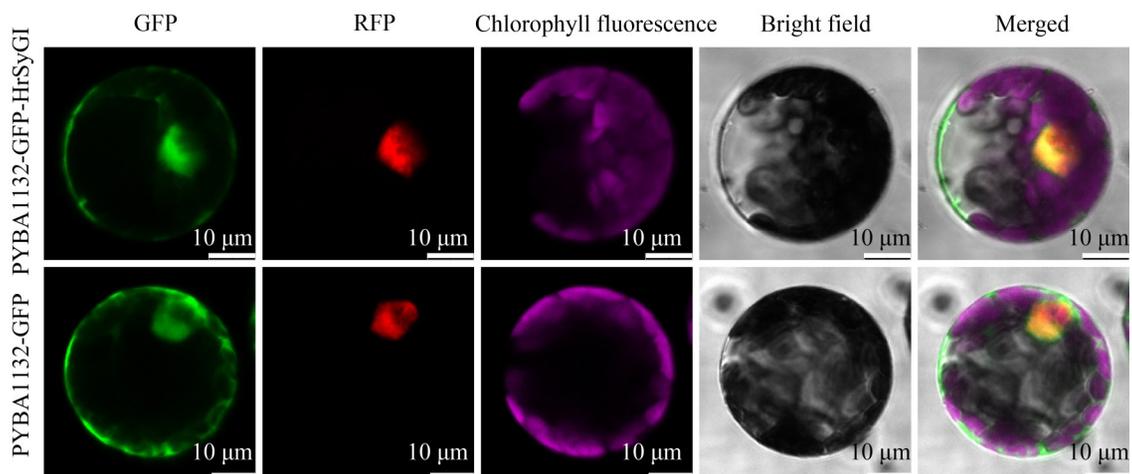


图7 *HrSyGI*蛋白亚细胞定位 GFP: 绿色荧光蛋白; RFP: 红色荧光蛋白; Chlorophyll fluorescence: 叶绿素自发荧光; Bright Field: 明场; Merged: 合并图像; Bar=10 μm 。

Figure 7 Subcellular localization of *HrSyGI* gene. GFP: Green fluorescent protein; RFP: Red fluorescent protein; Bar=10 μm .

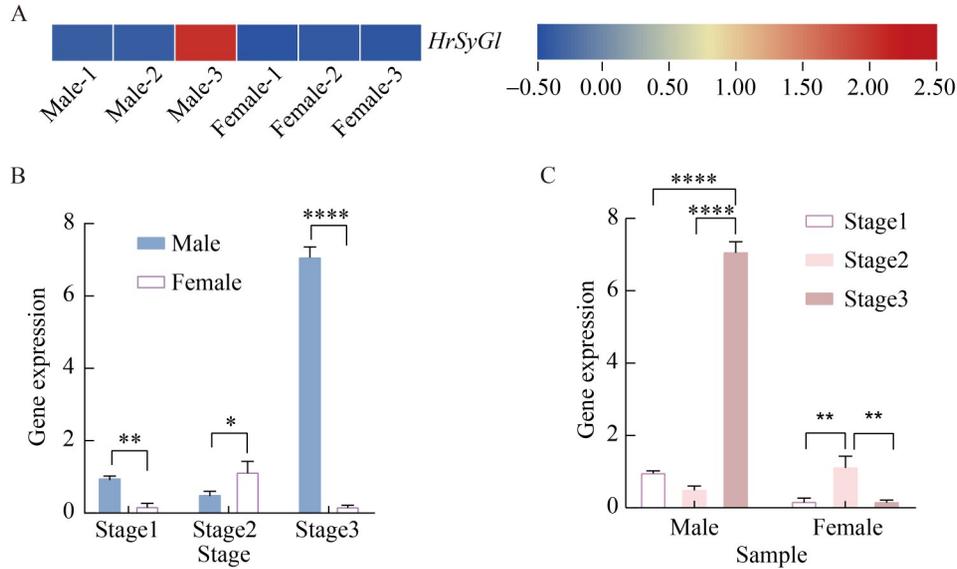


图8 *HrSyGl*基因在中国沙棘雌、雄花芽开花前后不同三个阶段中的表达情况 A: *HrSyGl*基因转录组表达量热图。B: *HrSyGl*基因实时荧光定量分析。横坐标表示沙棘雌雄花芽开花前、后3个阶段; **** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$ 。C: *HrSyGl*基因实时荧光定量组间比较分析。横坐标表示沙棘雄、雌样本。

Figure 8 Expression of the *HrSyGl* gene in different three stages before and after flowering in female and male flower buds of *Hippophae rhamnoides*. A: Heatmap of transcriptomic expression levels of the *HrSyGl* gene. B: Real-time fluorescence quantitative analysis of the *HrSyGl* gene. The horizontal axis represents three stages before and after the flowering of male and female flower buds of *Hippophae rhamnoides*. **** $P < 0.0001$; *** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. C: Intergroup comparative analysis of *HrSyGl* gene real-time fluorescence quantification. The horizontal axis represents *Hippophae rhamnoides* male and female samples.

棘雌花芽开花前后3个阶段中的表达量非常低,几乎没有表达,而在雄花芽中,表达量呈现逐渐升高的趋势,在开花后第3阶段的表达量最高。

采用RT-qPCR技术对*HrSyGl*基因在中国沙棘雌、雄花芽开花前后3个阶段中的表达情况进行分析(图8B)。结果表明,*HrSyGl*基因在中国沙棘3个不同发育时期雌、雄花芽中的表达存在差异,且表达趋势不同:在雌花芽3个阶段中的表达趋势为先上升后下降,在雄花芽中表达量整体升高,其中*HrSyGl*基因在雌花芽开花前第2阶段和雄花芽开花前第3阶段中的表达量最高。以上结果均提示*HrSyGl*基因在沙棘雌、雄花芽分化过程中发挥了不同作用,有可能参与了沙棘的性别分化调控。

3 讨论

沙棘是西北荒漠地区集经济效益和生态效益于一身的雌雄异株植物^[22],雌株和雄株分别具有极高的开发利用价值。但是由于沙棘幼苗时期性别鉴定比较困难^[23],严重制约了沙棘不同性别植株的合理配置,影响了中国沙棘经济和生态价值的充分发挥。因此,探索沙棘性别分化机制具有重要意义。

*HrSyGl*蛋白结构域结果表明,*HrSyGl*蛋白含有REC_hyHK_CK11_RcsC-like保守结构域,与拟南芥信号转导组氨酸激酶(cytokinin independent 1, CK11)和大肠杆菌荚膜合成调节系统(regulator of capsular synthesis, Rcs)有类似的杂合传感器组氨酸激酶/反应调节因子的磷酸受体

结构域(receiver domain, REC), 属于 REC 超基因家族成员。类似于拟南芥的传感器组氨酸激酶 CKII, 它参与多步磷酸转移(multistep phosphorelay, MSP)信号传导, 使植物能够感知并响应环境条件的变化, 并且 CKII 介导的细胞分裂素信号途径参与调控植物生长发育的多个过程^[24]。该家族还包括细菌杂合传感器 HKs, 如大肠杆菌荚膜合成调节蛋白 C(regulator of capsule synthesis C, RcsC)是 Rcs 信号通路的一个组成部分, 控制着细胞分裂和运动等多种生理功能。在猕猴桃的研究中, *SyGI* 基因编码 C 型细胞分裂素响应调节因子^[17], 而细胞分裂素在植物生长发育进程中发挥着关键作用^[25-26], 参与细胞分裂、分化以及器官形成等多个重要过程^[27-28], 这提示沙棘 *HrSyGI* 可能与猕猴桃 *SyGI* 有类似的激素信号通路。*HrSyGI* 亚细胞定位结果表明, 沙棘 *HrSyGI* 定位于细胞核。细胞核定位符合转录调控因子的特性, 提示 *HrSyGI* 可能直接参与基因表达的调控过程。

在猕猴桃的研究中, *SyGI* 基因已被证实为抑制雌性化的因子, 具有“雌性抑制”功能, 促使雄花的形成^[17]。通过 RT-qPCR 技术对中国沙棘雌、雄花芽在开花前、后 3 个阶段的基因表达模式进行分析, 在雌雄花芽发育过程中, *HrSyGI* 基因的表达模式呈现出明显差异。在雌花芽中, *HrSyGI* 基因表达量在第 2 阶段升高而后随发育逐渐下降, 这一趋势可能与雌蕊发育抑制的解除相关。在雄花芽中, *HrSyGI* 表达量随发育明显上升。有研究发现柿子(*Diospyros kaki* Thunb)中存在一组名为 *OGI* (雄性)的基因, *OGI* 不编码蛋白, 而是编码一种很小的 RNA 分子^[29]。与 *SyGI* 基因类似, 雄性基因 *OGI* 可通过促进雄性特征表达并抑制雌性基因 *MeGI* 的发育来调控性别表型^[30]。Wang 等^[31]通过对 *OGI* 在柿子雄花中的表达模式进行研究, 结果表明, 随着时间的增加, *OGI* 表达量会明显上升。这与 *HrSyGI* 基因在沙棘雄花芽中的表达模式有相似之处, 推测高水平表达的 *HrSyGI* 可能有助于

雄蕊相关基因的表达调控, 促进雄蕊的形成, 同时抑制雌蕊原基的形成, 维持雄性花器官的发育方向。顺式作用元件分析结果表明, *HrSyGI* 基因启动子区包含与植物生长发育、胁迫响应、激素响应等相关的元件。如 P-box 元件可响应赤霉素, 通过与赤霉素信号通路中的转录因子如 MYB (myeloblastosis)类蛋白结合, 调控下游基因的表达, 从而参与植物的生长发育过程, 如种子萌发、花器官发育等^[32]; GT1-motif 元件作为植物基因表达调控的核心顺式元件, 通过与 G-box 结合蛋白 1 (G-box binding protein 1, GT-1)类转录因子互作, 在光信号传导、逆境适应及生长发育中发挥关键作用^[33]。因此, 可进一步推测 *HrSyGI* 基因对于沙棘性别分化有重要作用。

本研究中 *HrSyGI* 基因的表达趋势在转录组和 RT-qPCR 分析中一定存在差异, 这主要源于扩增效率差异及实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)检测对转录组数据的筛选效应^[34], 并且研究表明 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq)与 RT-qPCR 数据间存在 15.1%–19.4% 的差异率^[35]。但转录组和 RT-qPCR 结果均显示在中国沙棘不同发育时期雌雄花芽中存在基因表达差异, 提示 *HrSyGI* 参与了沙棘性别分化的过程。

本研究基于课题组前期对中国沙棘雌、雄花芽转录组数据进行分析, 挖掘出了与沙棘性别分化调控有关的基因 *HrSyGI*。通过克隆沙棘 *HrSyGI* 基因, 并对其进行生物信息学分析、亚细胞定位及雌、雄不同花期表达量分析等, 为后续研究该基因功能及沙棘性别决定机制奠定了基础。然而, 目前对于 *HrSyGI* 基因的功能研究尚未见报道, 其具体作用机制尚未明确。未来需要通过一系列功能验证实验, 如利用基因编辑技术(CRISPR/Cas9)对 *HrSyGI* 基因进行敲除或过表达, 观察沙棘植株性别分化及花器官发育的变化, 进一步明确其在沙棘性别决定过程中的具体功能和作用机制。

4 结论

本研究成功克隆了中国沙棘 *HrSyG1* 基因, 其编码基因长度为 444 bp, 编码蛋白相对分子质量为 16358.05 Da, 等电点(pI)为 5.51, 为稳定的疏水性蛋白。*HrSyG1* 蛋白不存在跨膜结构和信号肽序列, 包含有磷酸化位点 8 个; *HrSyG1* 蛋白含有 REC_hyHK_CKII_RcsC-like 特殊保守结构域, 二级结构以 α -螺旋为主, 三级结构预测与二级结构一致; 进化树分析发现沙棘与鼠李科枣和苞叶木的亲缘关系较近; 亚细胞定位分析表明 *HrSyG1* 蛋白定位于细胞核; 通过分析 *HrSyG1* 基因在中国沙棘雌、雄花芽开花前后 3 个阶段的表达量, 发现 *HrSyG1* 基因在雌雄花芽中表达均存在差异, 分别在雌花芽第 2 阶段和雄花芽第 3 阶段表达最高, 推测其与沙棘雌、雄的性别分化密切相关。

作者贡献声明

任乾丹: 方案设计、实验操作、初稿写作; 张恬、林梦娇、李昕娟: 数据管理、实验操作; 周武: 方案设计、经费支持、稿件润色修改、提供材料;

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 李昕娟, 杨盼盼, 张恬, 任乾丹, 周武. 沙棘 LBD 基因家族鉴定及其在花芽发育过程中的表达分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 753-770.
LI XJ, YANG PP, ZHANG T, REN QD, ZHOU W. LBD gene family in *Hippophae rhamnoides*: identification and expression pattern during flower bud development[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 753-770 (in Chinese).
- [2] 张恬, 任乾丹, 陈科, 李昕娟, 孙菁, 周武. 中国沙棘 *HrNRAMP1* 基因克隆及表达分析[J/OL]. 生物工程学报, 2025, <https://doi.org/10.13345/j.cjb.240796>.
ZHANG T, REN QD, CHEN K, LI XJ, SUN J, ZHOU W. Cloning and expression analysis of *HrNRAMP1* in *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, <https://doi.org/10.13345/j.cjb.240796> (in Chinese).
- [3] 陈科, 李昕娟, 张恬, 任乾丹, 孙菁, 周武. 中国沙棘 ACBPs 基因家族成员鉴定及响应铅胁迫的表达分析[J]. 果树学报, 2025, 42(3): 526-542.
CHEN K, LI XJ, ZHANG T, REN QD, SUN J, ZHOU W. Identification and expression analysis of ACBPs family members of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi in response to lead stress[J]. Journal of Fruit Science, 2025, 42(3): 526-542 (in Chinese).
- [4] 朱浩铭, 芦琳琳, 郭丽君, 张士瑾. 沙棘活性成分以及抗肿瘤和抗衰老活性[J]. 南通大学学报(医学版), 2024, 44(4): 367-374.
ZHU HM, LU LL, GUO LJ, ZHANG SC. Bioactive components of *Hippophae rhamnoides* Linnaeus and their anti-cancer and anti-aging activities[J]. Journal of Nantong University (Medical Sciences), 2024, 44(4): 367-374 (in Chinese).
- [5] 石莹莹. 沙棘的化学成分研究进展[J]. 广州化工, 2025, 53(1): 27-29, 38.
SHI YY. Research progress on chemical composition of sea buckthorn[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2025, 53(1): 27-29, 38 (in Chinese).
- [6] 熊青山, 卫丁一, 温娅娅, 陈清, 刘连荣, 龙春宏, 韩超, 戴小华. 沙棘果实化学成分及其药理作用研究进展[J]. 北方农业学报, 2024, 52(3): 57-63.
XIONG QS, WEI DY, WEN YY, CHEN Q, LIU LR, LONG CH, HAN C, DAI XH. Research progress on the chemical composition and pharmacological effects of sea buckthorn fruit[J]. Journal of Northern Agriculture, 2024, 52(3): 57-63 (in Chinese).
- [7] 付依依, 苑鹏, 夏凯, 谭志超, 王永霞. 沙棘的功效成分及生物学功效评价研究进展[J]. 现代食品, 2021, 27(7): 39-42.
FU YY, YUAN P, XIA K, TAN ZC, WANG YX. Research progress of seabuckthorn's functional components and biological efficacy evaluation[J]. Modern Food, 2021, 27(7): 39-42 (in Chinese).
- [8] 海鹭, 尚敏, 罗红梅, 卢嘉华, 白钦文, 郭俊廷, 李雪明, 李彬州. 沙棘对非生物胁迫的响应研究进展[J]. 温带林业研究, 2024, 7(2): 57-60, 67.
HAI L, SHANG M, LUO HM, LU JH, BAI QW, GUO JT, LI XM, LI BZ. Research progress in response of seabuckthorn to abiotic stress[J]. Journal of Temperate Forestry Research, 2024, 7(2): 57-60, 67 (in Chinese).
- [9] 陈晓娜, 赵纳祺, 俞潇, 罗红梅, 刘湘杰, 李刚. 浅谈我国沙棘属植物生态适应性[J]. 温带林业研究, 2023, 6(4): 55-59.
CHEN XN, ZHAO NQ, YU X, LUO HM, LIU XJ, LI G. Research progress on ecological adaptability of *Hippophae* in China[J]. Journal of Temperate Forestry Research, 2023, 6(4): 55-59 (in Chinese).
- [10] 董莉娜. 中国沙棘克隆结构与性别鉴别研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2006.
DONG LN. The study of clonal structure and sex discrimination of *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi[D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2006 (in Chinese).
- [11] Renner SS. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database[J]. American Journal of botany, 2014, 101(10): 1588-1596.

- [12] LI W, FU W, HOU J, YANG Y, YIN T. Evolution of plant sex and molecular mechanisms underlying plants sex separation[J]. *Forestry Research*, 2023, 3: 1.
- [13] NDEM-GALBERT J R, HALL J E, MCDONNELL A J, MARTINE CT. Differential reward in “male” versus “female” pollen of functionally dioecious *Solanum*[J]. *American Journal of Botany*, 2021, 108(11): 2282-2293.
- [14] KOREKAR G, SHARMA RK, KUMAR R, MEENU, BISHT NC, SRIVASTAVA RB, AHUJA PS, STOB DAN T. Identification and validation of sex-linked SCAR markers in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae)[J]. *Biotechnology letters*, 2012, 34: 973-978.
- [15] 卢敏敏, 张国安, 宋雯, 王林. 沙棘雌雄株的水力结构和光合特性研究[J]. *天津农业科学*, 2024, 30(12): 1-5.
LU MM, ZHANG GA, SONG W, WANG L. Study on the hydraulic structure and photosynthetic characteristics of male and female *Hippophae rhamnoides* L.[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2024, 30(12): 1-5 (in Chinese).
- [16] ZENG ZF, WANG JW, TIAN ZQ, NORBU N, CHEN YH, CHEN JF, ZHANG WJ, QIONG L. Development of sex-specific molecular markers for early sex identification in *Hippophae gyantsensis* based on whole-genome resequencing[J]. *BMC Plant Biology*, 2024, 24(1): 1187.
- [17] AKAGI T, HENRY IM, OHTANI H, MORIMOTO T, BEPPU K, KATAOKA I, TAO R. A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(4): 780-795.
- [18] ZHU YR, AHMAD Z, LV YJ, ZHANG YS, CHEN GD. Insight into the characterization of two female suppressor gene families: SOFF and *SyGI* in Plants[J]. *Genes*, 2025, 16(3): 280.
- [19] AKAGI T. Pleiotropic effects of Shy Girl underpin kiwifruit sex chromosome evolution[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(3): 381-382.
- [20] De Mori G, Zaina G, Franco-Orozco B. Targeted mutagenesis of the female-suppressor *SyGI* gene in tetraploid kiwifruit by CRISPR/CAS9[J]. *Plants*, 2020, 10(1): 62.
- [21] ARKONYI-GASIC E, WANG TC, COONEY J, JEON S, VOOGD C, DOUGLAS MJ, PILKINGTON SM, AKAGI T, ALLAN AC. Shy Girl, a kiwifruit suppressor of feminization, restricts gynoeceum development via regulation of cytokinin metabolism and signalling[J]. *New Phytologist*, 2021, 230(4): 1461-1475.
- [22] 李嘉欣, 李鸿燕, 刘丽娥, 张恬, 周武. 沙棘*NRAMP*基因家族鉴定及铅胁迫下表达分析[J]. *生物技术通报*, 2024, 40(5): 191-202.
LI JX, LI HY, LIU LE, ZHANG T, ZHOU W. Identification and expression analysis of the *NRAMP* family in seabuckthorn under lead stress[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(5): 191-202 (in Chinese).
- [23] ZENG ZF, WANG RQ, WANG JW, CHEN YH, WANG YG, SONG ZP, ZHANG WJ, QIONG L. Development and validation of sex-linked molecular markers for rapid and accurate identification of male and female *Hippophae tibetana* plants[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 19243.
- [24] 马苏卓, 苏涵, 刘开创, 黄幼梅, 柴梦楠, 秦源, 蔡汉阳. 细胞分裂素信号调控植物雌配子体发育的研究进展[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2024, 53(2): 153-158.
MA SZ, SU H, LIU KC, HUANG YM, CHAI MN, QIN Y, CAI HY. Progress on function study of cytokinin signaling during female gametophyte development of flowering plants[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2024, 53(2): 153-158 (in Chinese).
- [25] KIEBER JJ, SCHALLER GE. Cytokinin signaling in plant development[J]. *Development*, 2018, 145(4): dev149344.
- [26] HU YJ, SHANI E. Cytokinin activity-transport and homeostasis at the whole plant, cell, and subcellular levels[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(5): 1603-1608.
- [27] FERREIRA FJ, KIEBER JJ. Cytokinin signaling[J]. *Current opinion in plant biology*, 2005, 8(5): 518-525.
- [28] RASHOTTE AM. The evolution of cytokinin signaling and its role in development before Angiosperms[C]// *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press, 2021, 109: 31-38.
- [29] AKAGI T, HENRY IM, TAO R, COMAI L. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons[J]. *Science*, 2014, 346(6209): 646-650.
- [30] LI HW, WANG LY, MAI YN, HAN WJ, SUO YJ, DIAO SF, SUN P, FU JM. Phytohormone and integrated mRNA and miRNA transcriptome analyses and differentiation of male between hermaphroditic floral buds of andromonoecious *Diospyros kaki* Thunb[J]. *BMC genomics*, 2021, 22: 203.
- [31] WANG LY, HAN WJ, DIAO SF, SUO YJ, LI HW, MAI YN, WANG YR, SUN P, FU JM. Study of sexual-linked genes (*OGL* and *MeGI*) on the performance of androecious persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.)[J]. *Plants*, 2021, 10(2): 390.
- [32] 杨天宸, 陈晓童, 吕可, 张荻. 百子莲脱水素基因 *ApSK₃* 对逆境与激素信号的应答模式与调控机制[J]. *园艺学报*, 2021, 48(8): 1565-1578.
YANG TC, CHEN XT, LV K, ZHANG D. Expression pattern and regulation mechanism of *ApSK₃* Dehydrin (*Agapanthus praecox*) response to abiotic stress and hormone signals[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(8): 1565-1578 (in Chinese).
- [33] 王文娇, 邢军杰, 申成丞, 李斌. 黄瓜蜡质基因 *CsCER1* 调控因子 *CsCOL5* 的筛选及其功能分析[J]. *园艺学报*, 2024, 51(5): 1005-1016.
WANG WJ, XING JJ, SHEN CC, LI B. Screening and functional analysis of *CsCOL5*, the upstream regulator of *CsCER1*, in cucumber pericarp wax synthesis[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, 51(5): 1005-1016 (in Chinese).
- [34] ROBERT C, WATSON M. Errors in RNA-Seq quantification affect genes of relevance to human disease[J]. *Genome biology*, 2015, 16: 177.
- [35] EVERAERT C, LUYPAERT M, MAAG JLV, CHENG QX, DINGER ME, HELLEMANS J, MESTDAGH P. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 1559.