

扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员鉴定与表达分析

胡尔西旦·吐尔逊, 谷玉风, 刘欣欣, 葛风伟^①

(新疆师范大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 基于扭果花旗杆 (*Dontostemon elegans* Maxim.) 转录组数据, 鉴定其 bHLH 转录因子家族成员, 并通过生物信息学方法分析该转录因子家族成员的理化性质、保守基序及结构域、系统进化关系、组织表达模式及逆境胁迫表达模式。结果表明: 从扭果花旗杆转录组数据库中共筛选出 66 个 bHLH 转录因子家族成员, 其氨基酸残基数为 63~668, 理论等电点为 pI 4.74 至 pI 10.17, 理论相对分子质量为 7 396.56~73 508.47, 65 个家族成员属于亲水蛋白, 60 个家族成员定位在细胞核中; 所有家族成员含有 motif1 和 (或) motif2, 且都含有保守的 bHLH_SF 超家族结构域。扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员可划分为 13 个亚家族, 亚家族 XIV 含有的扭果花旗杆 bHLH 家族成员最多 (10 个)。组织表达模式分析结果表明: 扭果花旗杆 *bHLH* 基因在不同组织中的相对表达量有所差异, *De11684.2214*、*De11684.23639* 和 *De11684.33169* 在叶中的相对表达量最高, *De11684.2906* 和 *De11684.31669* 在茎中的相对表达量最高, *De11684.7549* 在根中的相对表达量最高, *De11684.7900* 在根和叶中的相对表达量接近且显著 ($P < 0.05$) 高于茎。扭果花旗杆 *bHLH* 基因对不同逆境胁迫有不同程度的响应: 在 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 7 个 *bHLH* 基因的相对表达量在不同时间均显著上调; 在 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚乙二醇 (PEG) 胁迫下, 6 个 *bHLH* 基因的相对表达量在 2 h 时显著下调; 在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 胁迫下, 6 个 *bHLH* 基因的相对表达量在 8 h 时显著上调。综合分析表明: 扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员具有 bHLH 转录因子家族的基本特征; *bHLH* 基因具有组织表达特异性, bHLH 家族成员可能参与盐胁迫和低温胁迫的调控过程。

关键词: 扭果花旗杆; bHLH; 转录因子; 表达分析; 非生物胁迫

中图分类号: Q943.2; Q946-33 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)02-0013-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.02.02

Identification and expression analysis of bHLH transcription factor family members in *Dontostemon elegans* Huerxidant TUERXUN, GU Yufeng, LIU Xinxin, GE Fengwei^① (School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2024, 33(2): 13-21

Abstract: Based on the transcriptome data of *Dontostemon elegans* Maxim., its bHLH transcription factor family members were identified, and the physicochemical properties, conserved motifs and domains, phylogenetic relationships, tissue expression patterns, and adversity stress expression patterns of these transcription factor family members were analyzed by using bioinformatics methods. The results show that a total of 66 bHLH transcription factor family members are screened from the transcriptome database of *D. elegans*, the numbers of amino acid residues are 63-668, the theoretical isoelectric points are pI 4.74 to pI 10.17, the theoretical relative molecular masses are 7 396.56-73 508.47, 65 family members are hydrophilic proteins, and 60 family members are localized in nucleus; all family members contain motif1 and (or) motif2, and all contain conserved bHLH_SF superfamily domain. The bHLH transcription factor family members in *D. elegans* can be divided into 13 subfamilies, and subfamily XIV contains the most

收稿日期: 2023-08-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区教育厅重点实验室“新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室”项目 (XJTSWZ-2022-03)

作者简介: 胡尔西旦·吐尔逊 (1999—), 女, 维吾尔族, 新疆喀什人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。

^①通信作者 E-mail: 14491069@qq.com

引用格式: 胡尔西旦·吐尔逊, 谷玉风, 刘欣欣, 等. 扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员鉴定与表达分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(2): 13-21.

bHLH family members in *D. elegans* (10). The tissue expression pattern analysis result shows that the relative expressions of *bHLH* genes in *D. elegans* are different among different tissues, the relative expressions of *De11684.2214*, *De11684.23639*, and *De11684.33169* are the highest in leaf, those of *De11684.2906* and *De11684.31669* are the highest in stem, that of *De11684.7549* is the highest in root, and those of *De11684.7900* are similar in root and leaf and significantly ($P < 0.05$) higher than that in stem. *bHLH* genes in *D. elegans* have different degrees of responses to different adversity stresses: under $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress, the relative expressions of 7 *bHLH* genes are all significantly up-regulated at different times; under $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ polyethylene glycol (PEG) stress, the relative expressions of 6 *bHLH* genes are significantly down-regulated at 2 h; under $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ stress, the relative expressions of 6 *bHLH* genes are all significantly up-regulated at 8 h. The comprehensive analysis shows that the bHLH transcription factor family members in *D. elegans* have the basic characteristics of the bHLH transcription factor family; *bHLH* genes have tissue expression specificity, and bHLH family members may involve in regulation process of salt stress and cold stress.

Key words: *Dontostemon elegans* Maxim.; bHLH; transcription factor; expression analysis; abiotic stress

植物在生长过程中常遭受干旱、高盐及冻害等一系列非生物胁迫,严重影响其正常生长发育过程。为了降低逆境造成的伤害,植物通过相关转录因子来调控下游基因表达,从而提高自身的抗逆性,因此,转录因子在植物逆境胁迫应答过程中起着非常重要的作用^[1-2]。相关研究表明 bHLH 家族基因表达能提高植物的抗逆能力^[3]。

bHLH 家族是植物中较为庞大的转录因子家族之一^[4-6],因其 N 端碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix)特定的结构域而得名^[7]。bHLH 转录因子家族成员在植物应对逆境胁迫、次生代谢及调控生长发育等过程中起到重要作用^[8-9]。相关研究^[3,10-18]表明:拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] bHLH68、番茄 (*Solanum lycopersicum* Linn.) bHLH96、胡杨 (*Populus euphratica* Oliv.) bHLH35、花生 (*Arachis hypogaea* Linn.) bHLH112 及水稻 (*Oryza sativa* Linn.) bHLH130 在干旱胁迫下,可通过调节脱落酸(ABA)依赖信号通路相关基因的表达来增强机体对活性氧(ROS)的清除能力,从而提高植物的抗旱性;穆 [*Eleusine coracana* (Linn.) Gaertn.] bHLH57、甜菜 (*Beta vulgaris* Linn.) bHLH93、水稻 bHLH035 及拟南芥 bHLH122 在盐胁迫下,可通过 ABA 非依赖途径调控非生物胁迫耐受基因的表达,进而提升植物的耐盐性;甜橙 [*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck] bHLH18、烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) bHLH123 及水稻 bHLH035 经过抗氧化应答、ABA 非依赖途径提升植物抗寒能力。目前已有大量植物 bHLH 转录因子家族成员被鉴定出来,如拟南芥有 162 个^[19]、绿豆 [*Vigna radiata* (Linn.) R. Wilczek] 有 122 个^[20]、白

菜 (*Brassica rapa* var. *glabra* Regel) 有 249 个^[21]、马铃薯 (*Solanum tuberosum* Linn.) 有 108 个^[22]、大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 有 340 个^[23]。

扭果花旗杆 (*Dontostemon elegans* Maxim.) 是十字花科 (Brassicaceae) 花旗杆属 (*Dontostemon* Andr. ex Ledeb.) 多年生草本植物,主要分布于新疆达坂城地区及甘肃西北部^[24],是新疆达坂城荒漠植被组成的重要种类。该种具有较强的抗旱、抗风等优良特性,在维持达坂城强风、干旱的荒漠生态系统稳定性中发挥重要作用^[24-26]。本课题组长期致力于扭果花旗杆的抗逆机制研究,并获得抗逆相关功能基因^[24-28]。为进一步挖掘扭果花旗杆抗逆功能基因,本研究利用该植物转录组数据鉴定扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员,并分析其组织表达模式和逆境胁迫表达模式,为深入研究扭果花旗杆 bHLH 转录因子的功能提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 材料

扭果花旗杆转录组数据 (NCBI 数据库登录号为 PRJNA1000052) 为本课题组前期测序结果。

供试植物为在光照培养室 (光照度 $3\ 000 \text{ lx}$ 、光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、环境温度 $23 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 培养的野生型扭果花旗杆幼苗,苗龄 40 d。采集根、茎、叶,液氮速冻后用 Trizol 法提取总 RNA,经反转录获得各组织的 cDNA,于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于组织表达模式分析。各取 10 株幼苗,分别浇灌 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚乙二醇 (PEG),另取 10 株幼苗进

行低温(4 ℃)处理,于处理后 0、2、6、8、10 和 12 h 取全株叶片提取总 RNA,反转录获得 cDNA,用于基因表达模式分析。

1.2 方法

1.2.1 bHLH 家族成员鉴定 从转录组数据中获得扭果花旗杆 bHLH 家族成员核苷酸序列和氨基酸序列,利用在线软件 SMART(<http://smart.embl.de/>)、NCBI-CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)、HMMER(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>)和 pfam(<http://pfam-legacy.xfam.org/search/>)进行保守结构域分析,筛选出具有 bHLH 结构域的蛋白质。为了保证候选蛋白的可靠性,从拟南芥信息资源数据库 TAIR(<https://www.arabidopsis.org>)下载拟南芥 bHLH 转录因子氨基酸序列,利用 CLUSTALW 在线软件(<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)对扭果花旗杆 bHLH 候选蛋白和拟南芥 bHLH 蛋白进行氨基酸序列比对。

1.2.2 bHLH 家族成员理化性质分析 利用在线软件 ExPaSy(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析已筛选出的扭果花旗杆 bHLH 家族成员的氨基酸残基数、理论相对分子质量、理论等电点和总平均亲水性系数(GRAVY)。利用 WoLF PSORT 在线软件(<https://wolfsort.hgc.jp>)预测扭果花旗杆 bHLH 家族成员的亚细胞定位。

1.2.3 bHLH 家族成员系统进化分析 利用 MEGA-X 软件将扭果花旗杆和拟南芥的 bHLH 家族成员进

行氨基酸序列比对并筛选保守结构域序列,经 NJ 法(bootstrap 值设为 1 000)构建系统进化树,利用 EvolView 在线软件(<https://www.evolgenius.info/evolview-v2>)美化进化树。

1.2.4 bHLH 家族成员保守基序和保守结构域分析 利用 MEME Suite 在线软件(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)获得扭果花旗杆 bHLH 家族成员保守基序文件(搜索参数设为 10),利用 NCBI-CDD 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)获得扭果花旗杆 bHLH 家族成员的保守结构域文件,并利用 TBtools 软件将结果可视化;此外,利用 SnapGene 软件比对扭果花旗杆 bHLH 家族成员氨基酸序列,分析保守基序包含的保守氨基酸位点。

1.2.5 部分 bHLH 基因表达模式分析 随机选择 7 个扭果花旗杆 bHLH 基因(分别为 *De11684.2214*、*De11684.2906*、*De11684.7549*、*De11684.7900*、*De11684.23639*、*De11684.31669*、*De11684.33169*),并以扭果花旗杆的 β -actin 作为内参基因,进行组织表达模式分析及非生物胁迫下的表达模式分析。引物序列及其相应的退火温度见表 1。反应程序为 95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 10 s、相应退火温度退火 10 s、72 ℃ 延伸 20 s,共循环 40 次。所有样品设置 3 个生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对表达量分析,采用 SPSS 27 软件进行统计学分析,采用 GraphPad Prism 8.0 软件作图。

表 1 用于部分 bHLH 基因表达模式分析的引物序列

Table 1 Primer sequences used for expression pattern analysis of some bHLH genes

基因 Gene	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>De11684.2906</i>	GACGAGAGAAATCAACTCATC	TCCACTGTCAGATCATCGGACTC	53
<i>De11684.33169</i>	TGACTTATGATCAATCGGACCG	GAGCTTGCAGAACCGTTAGC	53
<i>De11684.7549</i>	GATGTGTGATTAGTTCCTCCATT	GATCCTGATGATGATGAGCCAGT	55
<i>De11684.7900</i>	GTCAAGGTAAGTACGATGAGCAG	CACCTGATGCTCCGTCATCGT	55
<i>De11684.2214</i>	GCAAGGACACAATCTGGAGGTC	CACGCTTGGCTCTGATCTTACAC	58
<i>De11684.23639</i>	GAGACAGCTTCTGGAAGATCCG	CTTCAAGATATTGTTCTGGATGC	58
<i>De11684.31669</i>	GATCTGGAGAGCGATCTCTGTCTC	GGTAGCAGGACTGGTGAAGTACAT	58
β -actin	TGTCCAAATCTACGAGGGTTT	TTTCCGCTCTGCTGTTGT	55

2 结果和分析

2.1 bHLH 家族成员鉴定和理化性质分析

从扭果花旗杆转录组注释文件中获得 90 个

bHLH 候选基因,剔除冗余后最终筛选得到 66 个扭果花旗杆 bHLH 基因,对其编码蛋白质的理化性质进行分析,结果见表 2。结果显示:扭果花旗杆 bHLH 家族成员的氨基酸残基数为 63~668,理论相对分子质量为 7 396.56~73 508.47,理论等电点为 pI 4.74 至

pI 10.17, 仅有 1 个 bHLH 蛋白的 GRAVY 值为正值, 其余均为负值, 由此判断, 扭果花旗杆 bHLH 家族成员基本属于亲水蛋白。亚细胞定位预测结果显示: 除

De11684.7549、De11684.7899、De11684.17696、De11454.0、De18107.0、De25045.0 定位在叶绿体或高尔基体外, 其余家族成员均定位在细胞核中。

表 2 扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员的理化性质¹⁾

Table 2 Physicochemical property of bHLH transcription factor family members in *Dontostemon elegans* Maxim.¹⁾

蛋白质 Protein	<i>n</i>	<i>m</i>	pI	GRAVY	SL	蛋白质 Protein	<i>n</i>	<i>m</i>	pI	GRAVY	SL
De11684.190	334	35 337.32	6.19	-0.423	N	De11684.27242	340	38 504.92	8.54	-0.602	N
De11684.1570	225	24 363.09	7.75	-0.720	N	De11684.27363	284	31 441.99	5.31	-0.660	N
De11684.1588	107	12 431.34	10.17	-0.750	N	De11684.30821	668	73 508.47	5.22	-0.669	N
De11684.2175	319	36 123.50	5.47	-0.671	N	De11684.31669	135	15 486.37	6.58	-0.750	N
De11684.2214	405	44 857.02	7.38	-0.714	N	De11684.32095	471	52 610.50	6.84	-0.459	N
De11684.2906	365	41 799.67	6.12	-0.804	N	De11684.33169	233	26 573.06	9.25	-0.770	N
De11684.3004	418	46 028.99	8.45	-0.734	N	De11684.35149	410	45 245.16	8.24	-0.894	N
De11684.3244	466	52 813.69	8.18	-0.926	N	De11684.35150	247	27 812.87	6.29	-0.869	N
De11684.3994	63	7 396.56	8.90	-1.068	N	De11684.35586	453	50 290.26	5.80	-0.649	N
De11684.4428	231	25 347.61	9.86	-0.529	N	De3447.0	438	49 640.16	8.67	-0.410	N
De11684.4491	320	35 637.61	4.74	-0.600	N	De4330.0	315	36 889.58	5.87	-0.724	N
De11684.5546	511	55 362.98	6.14	-0.827	N	De5578.0	355	39 345.13	5.85	-0.512	N
De11684.6576	297	33 355.37	5.48	-0.510	N	De5819.0	244	27 945.72	5.40	-0.428	N
De11684.7549	152	16 979.07	8.01	-0.306	C	De6024.0	141	15 744.00	6.10	-0.140	N
De11684.7846	616	67 857.96	6.17	-0.529	N	De6487.1	149	17 515.75	9.34	-1.047	N
De11684.7899	152	17 351.16	10.02	0.039	C	De9059.0	218	25 690.63	9.52	-0.881	N
De11684.7900	390	40 650.11	6.31	-0.455	N	De9087.0	615	69 062.35	4.99	-0.473	N
De11684.8706	239	27 022.94	9.08	-0.597	N	De9228.0	101	11 517.98	9.87	-0.876	N
De11684.8758	507	54 896.79	5.77	-0.480	N	De11454.0	111	12 100.51	6.45	-0.423	C
De11684.11351	139	15 783.82	6.13	-0.141	N	De14094.0	195	22 199.47	7.92	-0.531	N
De11684.12558	221	24 169.11	8.18	-0.598	N	De14380.0	372	41 315.84	6.13	-0.756	N
De11684.14129	237	26 907.51	6.39	-0.723	N	De16199.0	330	36 992.22	5.26	-0.739	N
De11684.15505	473	53 337.63	5.75	-0.717	N	De16853.0	524	58 471.52	5.56	-0.652	N
De11684.15662	325	37 088.06	5.66	-0.689	N	De18054.0	324	34 882.41	8.28	-0.841	N
De11684.16156	660	71 638.90	5.43	-0.541	N	De18066.0	240	27 452.27	6.03	-0.656	N
De11684.16301	326	36 839.36	8.84	-0.997	N	De18107.0	276	30 685.91	9.58	-0.410	G
De11684.17696	121	14 531.14	9.57	0.381	C	De18832.0	389	43 684.15	8.98	-0.642	N
De11684.18581	306	33 361.59	9.39	-0.673	N	De19488.0	269	30 277.50	9.47	-0.604	N
De11684.20567	364	39 856.14	5.35	-0.819	N	De21526.0	379	42 338.86	7.67	-0.518	N
De11684.21129	266	28 016.81	7.91	-0.602	N	De22195.0	404	46 600.78	5.43	-0.591	N
De11684.22017	84	10 249.00	9.72	-0.646	N	De22408.1	157	17 782.46	8.97	-0.554	N
De11684.23639	277	31 830.89	6.47	-0.814	N	De23949.0	202	24 194.93	6.49	-1.177	N
De11684.25722	190	20 538.33	9.14	-0.461	N	De25045.0	268	31 178.64	9.54	-0.414	G

¹⁾ *n*: 氨基酸残基数 Number of amino acid residue; *m*: 理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass; pI: 理论等电点 Theoretical isoelectric point. GRAVY: 总平均亲水性系数 Grand average of hydropathicity; SL: 亚细胞定位 Subcellular localization. N: 细胞核 Nucleus; C: 叶绿体 Chloroplast; G: 高尔基体 Golgi apparatus.

2.2 bHLH 家族成员保守基序和保守结构域分析

保守基序分析结果(图 1)显示: 扭果花旗杆 66 个 bHLH 家族成员中, 所有家族成员含有 motif1 和 (或) motif2, 其中, 64 个家族成员含有 motif1, 56 个家族成员含有 motif2, 54 个家族成员同时含有 motif1 和 motif2, 说明 motif1 和 motif2 为保守基序, 其余基序在不同成员间差异较大, 具有一定的特异性。

对保守基序 motif1 和 motif2 的序列进行分析, 结果(图 2)显示: 二者共由 50 个氨基酸组成, 其中 29 个位点保守性大于 50%, 5 个位点保守性大于 85%。

保守结构域分析结果(图 3)显示: 扭果花旗杆所有 bHLH 家族成员都含有保守的 bHLH_SF 超家族结构域, 含有 motif5 的 De11684.33169、De16853.0、De11684.16156、De11684.30821、De11684.7846、

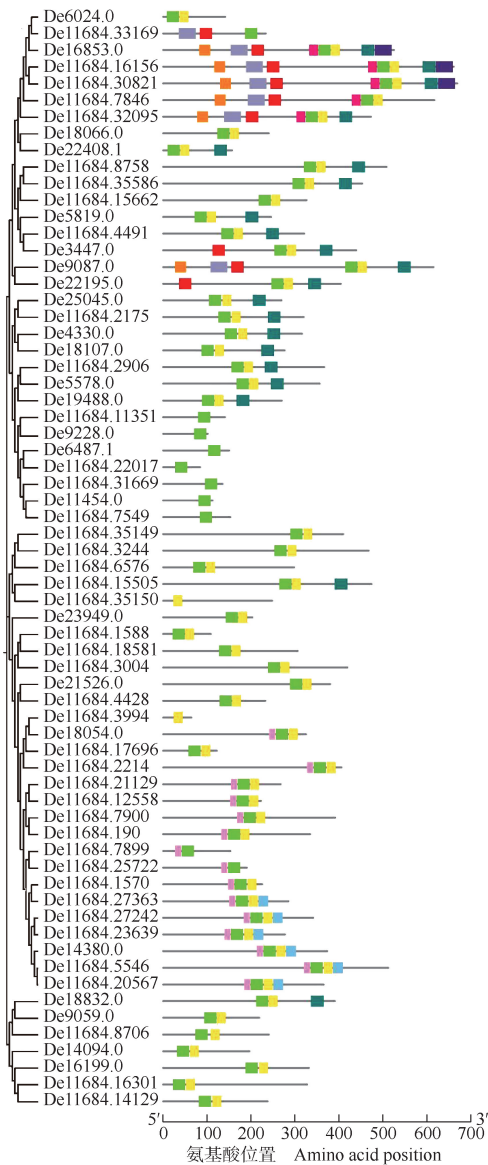


图 1 扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员保守基序分析
Fig. 1 Analysis on conserved motifs of bHLH transcription factor family members in *Dontostemon elegans* Maxim.

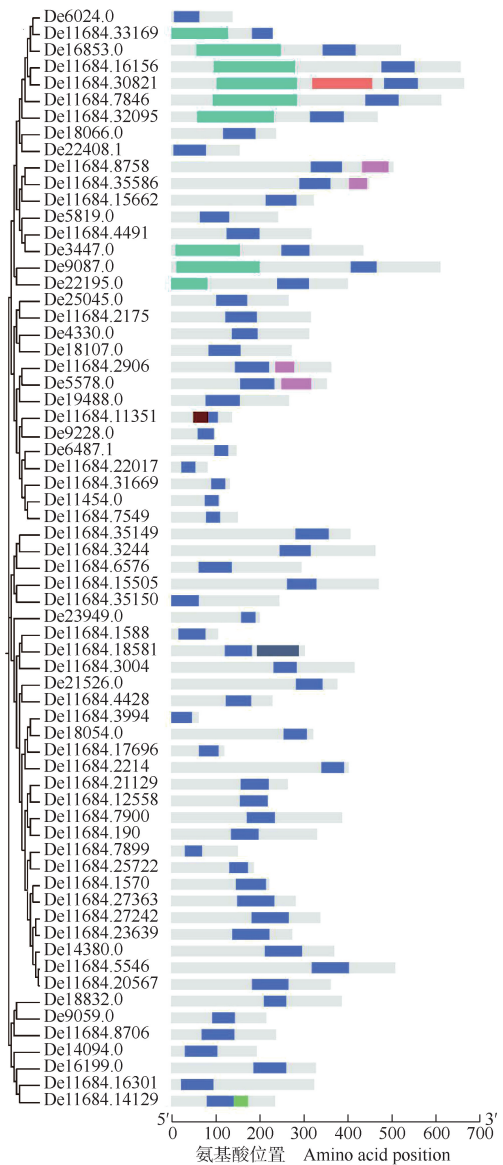


图 3 扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员保守结构域分析
Fig. 3 Analysis on conserved domains of bHLH transcription factor family members in *Dontostemon elegans* Maxim.



图 2 扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员保守基序 motif1 (上图) 和 motif2 (下图) 序列分析
Fig. 2 Analysis on sequences of conserved motifs of motif1 (the figure above) and motif2 (the figure below) of bHLH transcription factor family members in *Dontostemon elegans* Maxim.

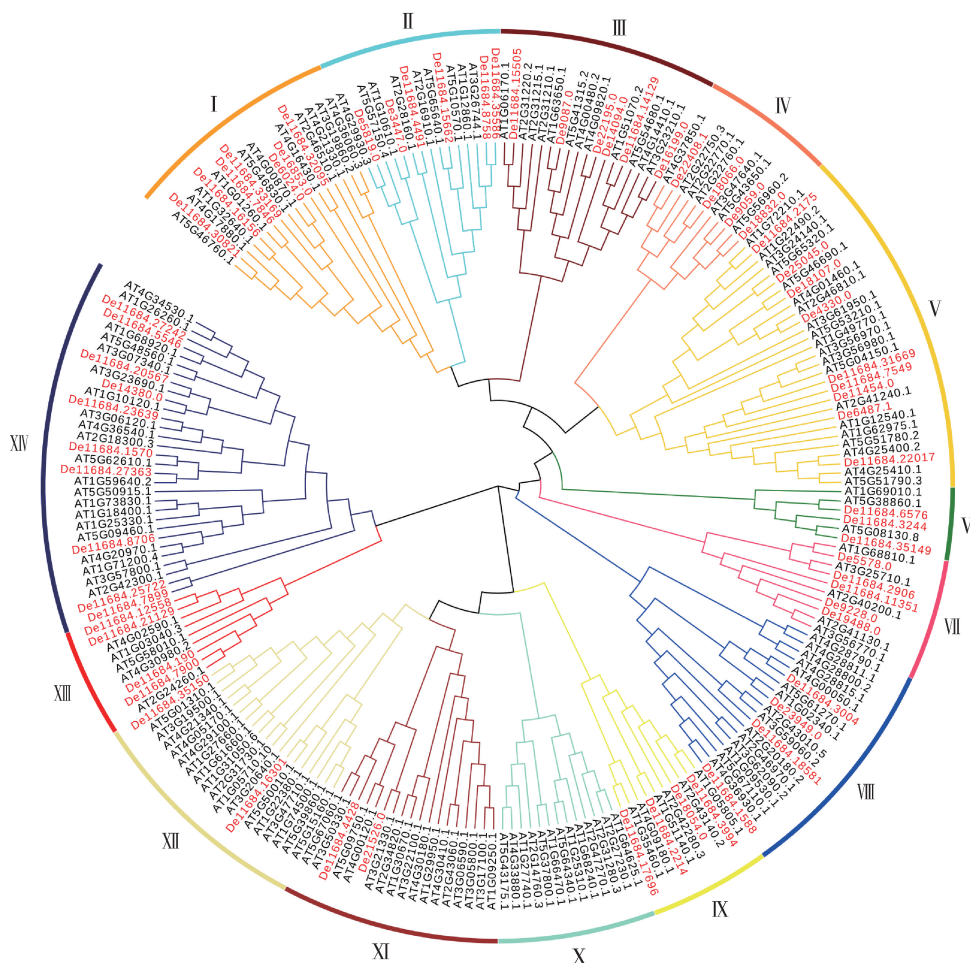
图 3 扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员保守结构域分析
Fig. 3 Analysis on conserved domains of bHLH transcription factor family members in *Dontostemon elegans* Maxim.

De11684.32095、De3447.0、De9087.0、De22195.0 还含有 bHLH-MYC_N 超家族结构域;此外,De11684.30821 含有 PTZ00112 超家族结构域,De11684.35586、De11684.15662、De11684.2906 和 De5578.0 含有 ACT 超家族结构域,De11684.11351 含有 PSD3 超家族结构域,De11684.18581 含有 PABP-1234 超家族结构域,De11684.14129 含有 DUF4140 超家族结构域。

2.3 系统进化分析

基于66个扭果花旗杆 *bHLH* 家族成员和160个拟南芥 *bHLH* 家族成员的氨基酸序列构建系统进化树。结果(图4)表明:这2个种类的 *bHLH* 家族成员

可分为14个亚家族,其中,亚家族X只含有拟南芥的 *bHLH* 家族成员,亚家族XIV含有的扭果花旗杆 *bHLH* 家族成员最多,共10个;亚家族XI和亚家族XII含有的扭果花旗杆 *bHLH* 家族成员最少,各仅2个。



红色和黑色编号分别代表扭果花旗杆和拟南芥的 *bHLH* 转录因子家族成员 Red and black numbers represent *bHLH* transcription factor members in *Dontostemon elegans* Maxim. and *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., respectively.

图4 扭果花旗杆和拟南芥 *bHLH* 转录因子家族成员的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *bHLH* transcription factor family members in *Dontostemon elegans* Maxim. and *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

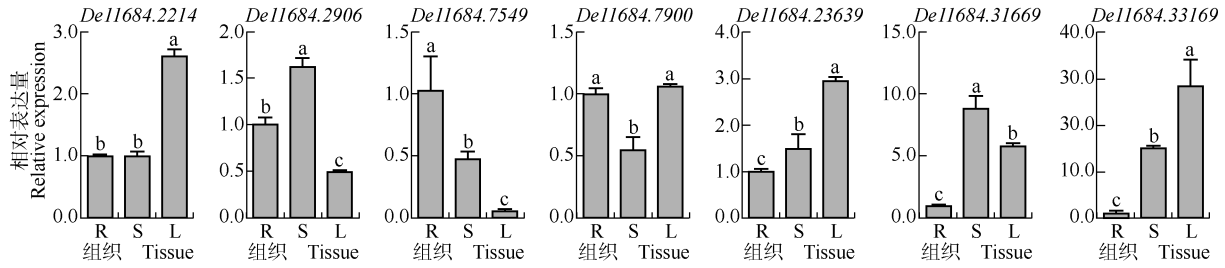
2.4 *bHLH* 基因组织表达模式分析

对7个扭果花旗杆 *bHLH* 基因在根、茎、叶中的表达情况进行分析,结果(图5)显示:*De11684.2214* 的相对表达量在根和茎中接近,且显著 ($P < 0.05$) 低于叶中;*De11684.2906* 的相对表达量在茎中最高、根中次之、叶中最低,三者间差异显著;*De11684.7549* 的相对表达量在根中最高、茎中次之、叶中最低,三者间差异显著;*De11684.7900* 的相对表达量在根和叶中接

近,且显著高于茎;*De11684.23639* 的相对表达量在叶中最高、茎中次之、根中最低,三者间差异显著;*De11684.31669* 的相对表达量在茎中最高、叶中次之、根中最低,三者间差异显著;*De11684.33169* 的相对表达量在叶中最高、茎中次之,三者间差异显著。

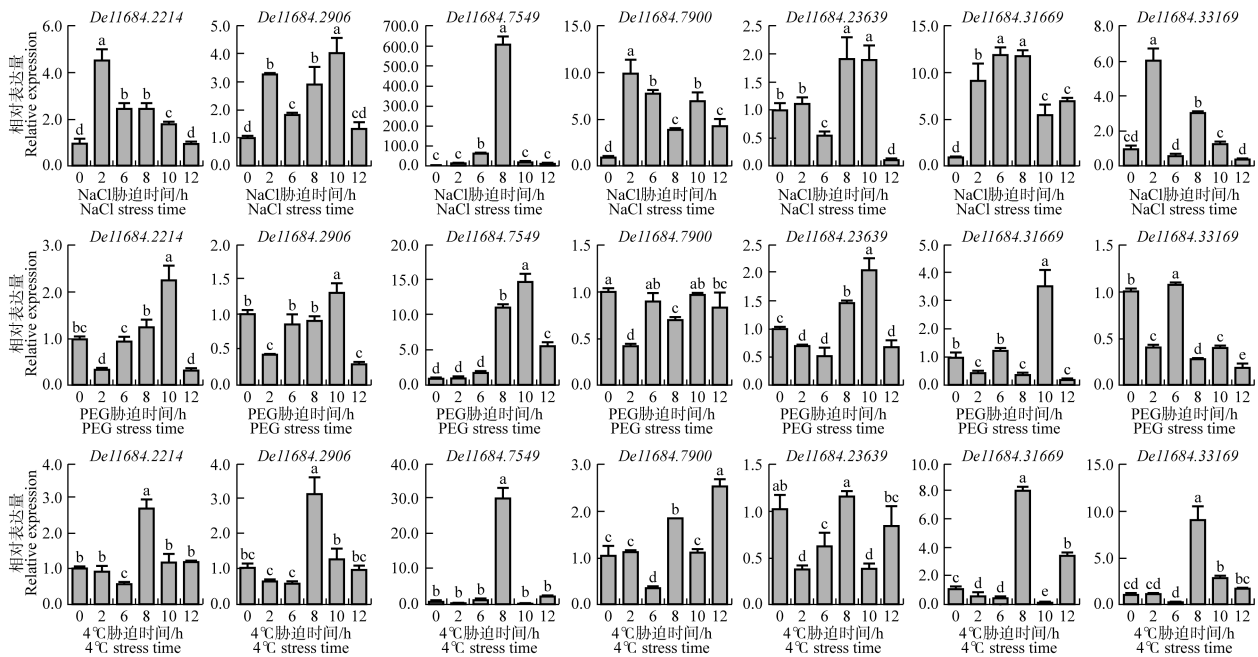
2.5 *bHLH* 基因在非生物胁迫下的表达模式分析

De11684.2214 等基因在3种非生物胁迫下的表达结果(图6)表明:在 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下,



R: 根 Root; S: 茎 Stem; L: 叶 Leaf. 不同小写字母表示在不同组织间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different tissues.

图 5 7 个扭果花旗杆 *bHLH* 基因的组织表达模式分析
 Fig. 5 Analysis on tissue expression patterns of seven *bHLH* genes in *Dontostemon elegans* Maxim.



不同小写字母表示在不同胁迫时间间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different stress times.

图 6 7 个扭果花旗杆 *bHLH* 基因在 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 和 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下的表达模式分析
 Fig. 6 Analysis on expression patterns of seven *bHLH* genes in *Dontostemon elegans* Maxim. under $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG, and $4 \text{ }^\circ\text{C}$

Del11684.2214、*Del11684.2906*、*Del11684.7900*、*Del11684.31669* 和 *Del11684.33169* 的相对表达量在 2 h 时显著 ($P < 0.05$) 上调, *Del11684.7549* 和 *Del11684.23639* 的相对表达量在 8 h 时显著上调。在 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 胁迫下, *Del11684.2214*、*Del11684.2906*、*Del11684.23639* 和 *Del11684.31669* 的相对表达量在 10 h 时显著上调, *Del11684.7549* 的相对表达量在 8 h 时显著上调;除 *Del11684.7549* 外,其余 6 个 *bHLH* 基因的相对表达量均在 2 h 时显著下调。

在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 胁迫下, 7 个 *bHLH* 基因的相对表达量整体在 8 h 时显著上调。以上结果说明扭果花旗杆 *bHLH* 家族成员可能参与抗盐和抗寒调控过程。

3 讨论和结论

bHLH 转录因子家族广泛分布于真核生物中^[29],并在植物生长及抗逆过程中发挥重要作用,为进一步挖掘新疆干旱区植物抗逆基因资源,本研究对

扭果花旗杆 bHLH 转录因子家族成员进行了鉴定,共鉴定出 66 个扭果花旗杆 bHLH 家族成员,少于拟南芥(162 个)^[19]、马铃薯(108 个)^[22]、西瓜[*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai](96 个)^[30],接近于山药(*Dioscorea polystachya* Turczaninow)(67 个)^[9]、马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)(64 个)^[31]、甜樱桃[*Prunus avium* (Linn.) Moench](66 个)^[32]¹⁷;不同植物 bHLH 转录因子家族成员数量的差异可能与基因组复制事件、进化差异或基因组大小有关^[32]¹⁸。本研究中,53.0%的扭果花旗杆 bHLH 蛋白的理论等电点小于 pI 7,属于酸性蛋白;97.0%的扭果花旗杆 bHLH 蛋白 GRAVY 值为负数,为亲水蛋白,与萱草[*Hemerocallis fulva* (Linn.) Linn.]^[33]和银杏(*Ginkgo biloba* Linn.)^[34] bHLH 蛋白理化性质基本一致,这可能是 bHLH 蛋白正常发挥其生物学功能的必要条件。藜芦(*Veratrum nigrum* Linn.)^[8]、马尾松^[31]和大苞萱草(*Hemerocallis middendorffii* Trautvetter et C. A. Meyer)^[35]的亚细胞定位预测结果显示大多数 bHLH 家族成员定位于细胞核内,且扭果花旗杆 60 个 bHLH 家族成员也定位于细胞核中,可能参与细胞核内基因的表达调控。

扭果花旗杆与拟南芥 bHLH 家族成员系统进化关系分析表明:扭果花旗杆 66 个 bHLH 家族成员被分成 13 个亚家族,并且同一亚家族成员大多数具相同的保守结构域^[22];其中, *De11684.35150* 和 *De11684.16301* 与拟南芥开花及花青素合成相关基因 *AT3G19500.1* (*AtbHLH113*) 和盐胁迫应答相关基因 *AT1G61660.1* (*AtbHLH112*) 聚在一起,由此推测,这 2 个基因的功能可能与扭果花旗杆开花和逆境响应相关^[36-37]。

植物的 *bHLH* 基因往往表现出组织特异性^[22],如黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi) *bHLH3* 在叶中及 *bHLH6* 在根中几乎不表达^[38];甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* Linn.) *bHLH121* 在叶中的相对表达量显著高于其他组织,可能参与甘蓝叶的生长发育调控^[39]。扭果花旗杆 7 个 *bHLH* 基因的组织表达结果表明;*De11684.33169*、*De11684.7549*、*De11684.2214* 和 *De11684.23639* 在根、茎和叶中的相对表达量均具有显著差异,由此可知,扭果花旗杆 *bHLH* 基因可能参与不同组织生长发育调控。

盐、干旱和低温等非生物胁迫可以诱导植物 *bHLH* 的表达^[40-41],如葡萄(*Vitis vinifera* Linn.) *bHLH1*

转入拟南芥后增加了拟南芥中黄酮类化合物的积累,增强了其耐盐性和耐旱性^[42];甜菜盐应答基因 *bHLH* 可能参与 ABA 信号途径调控,从而提升植株耐盐性^[43];烟草 *bHLH123* 的过表达增强了转基因烟草植株的耐寒性^[44]。本研究对 7 个扭果花旗杆 *bHLH* 基因在 150 mmol · L⁻¹ NaCl、250 mmol · L⁻¹ PEG 和 4 °C 胁迫下的表达分析发现:在 NaCl 胁迫下,7 个基因的相对表达量在不同时间均显著上调;6 个基因的相对表达量在 PEG 胁迫 2 h 时显著下调;7 个基因的相对表达量在 4 °C 胁迫 8 h 时显著上调。由此预测扭果花旗杆 bHLH 家族成员可能参与抵御盐胁迫和低温胁迫的调控过程。

参考文献:

- [1] ALSAMMAN A M, ABDELSATTAR M, EL ALLALI A, et al. Genome-wide identification, characterization, and validation of the bHLH transcription factors in grass pea [J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 1128992.
- [2] ZHANG Z J, FANG J, ZHANG L, et al. Genome-wide identification of bHLH transcription factors and their response to salt stress in *Cyclocarya paliurus* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1117246.
- [3] RADANI Y, LI R X, KORBOE H M, et al. Transcriptional and post-translational regulation of plant bHLH transcription factors during the response to environmental stresses [J]. *Plants*, 2023, 12 (11): 2113.
- [4] 陈 微, 潘美红, 惠林冲, 等. 基于转录组的洋葱 bHLH 转录因子家族鉴定与生物信息学分析 [J]. *江苏农业科学*, 2023, 51 (5): 11-18.
- [5] 董舒超, 凌嘉怡, 赵丽萍, 等. 转录因子调控番茄抗旱性研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(9): 9-16.
- [6] 黄小芳, 毕楚韵, 王和寿, 等. 甘薯基因组 bHLH 转录因子鉴定与逆境胁迫表达分析 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2021, 50(4): 440-450.
- [7] 孙颖琦, 孟亚轩, 赵心月, 等. 谷子 bHLH 转录因子家族基因鉴定及生物信息学分析 [J]. *种子*, 2021, 40(12): 45-55.
- [8] 寇呈熹, 佟金泉, 马 瑞, 等. 藜芦 bHLH 转录因子分析鉴定 [J]. *中草药*, 2022, 53(14): 4476-4485.
- [9] 朱 涛, 李芳菲, 杨海涵, 等. 山药 *bHLH* 基因家族鉴定及表达分析 [J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2022, 35(3): 393-399.
- [10] LE HIR R, CASTELAIN M, CHAKRABORTI D, et al. *AtbHLH68* transcription factor contributes to the regulation of ABA homeostasis and drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2017, 160(3): 312-327.
- [11] LIANG Y F, MA F, LI B Y, et al. A bHLH transcription factor, SlbHLH96, promotes drought tolerance in tomato [J]. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhac198.

- [12] DONG Y, WANG C P, HAN X, et al. A novel bHLH transcription factor *PebHLH35* from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 450(1): 453-458.
- [13] LI C J, YAN C X, SUN Q X, et al. The bHLH transcription factor *AhbHLH112* improves the drought tolerance of peanut [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21: 540.
- [14] BABITHA K C, VEMANNA R S, NATARAJA K N, et al. Overexpression of *EcbHLH57* transcription factor from *Eleusine coracana* L. in tobacco confers tolerance to salt, oxidative and drought stress [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(9): e0137098.
- [15] WANG Y G, WANG S, TIAN Y, et al. Functional characterization of a sugar beet *BhbHLH93* transcription factor in salt stress tolerance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7): 3669.
- [16] CHEN H C, CHENG W H, HOMG C Y, et al. The transcription factor *OsbHLH035* mediates seed germination and enables seedling recovery from salt stress through ABA-dependent and ABA-independent pathways, respectively [J]. *Rice*, 2018, 11(1): 50.
- [17] GENG J J, LIU J H. The transcription factor *CsbHLH18* of sweet orange functions in modulation of cold tolerance and homeostasis of reactive oxygen species by regulating the antioxidant gene [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(10): 2677-2692.
- [18] ZHAO Q, XIANG X H, LIU D, et al. Tobacco transcription factor *NtbHLH123* confers tolerance to cold stress by regulating the *NtCBF* pathway and reactive oxygen species homeostasis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 381.
- [19] 贾雨彤. 拟南芥转录因子 bHLH146 的功能研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022: 1-2.
- [20] 陈红霖, 胡亮亮, 王丽侠, 等. 绿豆 bHLH 转录因子家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(6): 1159-1167.
- [21] 唐文武, 吴秀兰, 钟佩桥. 白菜 bHLH 转录因子家族的全基因鉴定及表达特征分析 [J]. *江西农业学报*, 2020, 32(6): 1-5.
- [22] 冯建英, 李立芹, 鲁黎明. 马铃薯 bHLH 转录因子家族全基因组鉴定与表达分析 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38(2): 21-33.
- [23] 程琳, 薛亚杰, 付觉民, 等. 大豆 bHLH 转录因子家族成员的进化及功能分化研究 [J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2019, 32(1): 27-38.
- [24] 马薇, 李艳红, 赵惠新, 等. NaCl 胁迫对扭果花旗杆幼苗生理特性和染色体行为的影响 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(10): 3395-3401.
- [25] 邹丽媛, 马薇, 李金玉, 等. 扭果花旗杆 *DeTIP2;1* 基因的克隆、亚细胞定位和表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(12): 2279-2288.
- [26] 邹丽媛, 马薇, 葛伟伟. PEG 胁迫对扭果花旗杆幼苗生理特性和染色体行为的影响 [J]. *分子植物育种*, 2021, 19(14): 4812-4819.
- [27] 马薇, 邹丽媛, 赵惠新, 等. 基于转录组测序分析扭果花旗杆抗旱的主要代谢途径 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(11): 3548-3561.
- [28] 崔鹏, 胡尔西旦·吐尔逊, 邹丽媛, 等. 基于扭果花旗杆转录组的 NAC 家族生物信息学分析 [J]. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 2023, 42(1): 51-59.
- [29] 俎天娇, 乔潇, 张小芳, 等. 干旱胁迫下野生大豆 bHLH 家族转录组分析 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(19): 24-29.
- [30] 何洁, 顾秀容, 魏春华, 等. 西瓜 bHLH 转录因子家族基因的鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(2): 281-294.
- [31] 尚先文, 范付华, 周紫晶, 等. 马尾松苗期转录组 bHLH 基因家族成员鉴定及表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(11): 1947-1959.
- [32] 沈天娇. 甜樱桃 bHLH 家族转录因子发掘及抗寒功能鉴定 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.
- [33] 赵安琪, 张世杰, 张志国, 等. 海水胁迫下萱草 bHLH 转录因子家族的鉴定及表达分析 [J/OL]. *分子植物育种*. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220208.1548.003>.
- [34] 冯磊, 石元豹, 汪贵斌, 等. 银杏 bHLH 家族转录因子生物信息学及表达分析 [J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(2): 400-411.
- [35] 陈丽飞, 刘云怡慧, 李嘉峻, 等. 干旱胁迫下大苞萱草 bHLH 转录因子家族鉴定与分析 [J]. *西南农业学报*, 2023, 36(5): 1027-1038.
- [36] 王文舒. 拟南芥 *bHLH112* 基因参与侧根发育调控和盐胁迫应答的研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2012: 1-79.
- [37] 宋建辉. *bHLH113* 调控拟南芥开花和花青素合成的分子机制研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2020: 28-43.
- [38] 陈妮颖, 刘娟, 袁媛, 等. 黄芩 bHLH 转录因子基因家族生物信息学及表达分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(3): 671-677.
- [39] 秦文斌, 山溪, 张振超, 等. 甘蓝 *BobHLH121* 基因克隆、亚细胞定位及表达分析 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(12): 3320-3329.
- [40] 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.
- [41] 陈柳君. bHLH 转录因子在植物低温胁迫中的研究进展 [J]. *江西农业学报*, 2022, 34(1): 79-87.
- [42] WANG F B, ZHU H, CHEN D H, et al. A grape bHLH transcription factor gene, *VhbHLH1*, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016, 125: 387-398.
- [43] 田焯, 王爽, 路正禹, 等. 甜菜应答盐胁迫诱导表达 *bHLH* 基因的鉴定与分析 [J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2020, 37(6): 712-717.
- [44] 李君霞, 樊永强, 代书桃, 等. bHLH 转录因子在植物抗非生物胁迫基因工程中的应用进展 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(12): 1-9.