

秦文斌,戴忠良,山 溪,等. 甘蓝冷胁迫相关基因 *BobHLH18* 克隆与表达分析[J].江苏农业学报,2019,35(1):149-156.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.022

甘蓝冷胁迫相关基因 *BobHLH18* 克隆与表达分析

秦文斌¹, 戴忠良¹, 山 溪¹, 唐 君², 王神云², 李建斌²

(1.江苏丘陵地区镇江农业科学研究所,江苏 句容 212400; 2.江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室/江苏省农业科学院蔬菜研究所,江苏 南京 210014)

摘要: 利用同源克隆方法在耐寒、迟抽薹甘蓝自交系 Y923 中克隆到一个甘蓝响应冷胁迫 bHLH 转录因子基因 *BobHLH18* 的 DNA 和 cDNA 全长,基因组搜索分析结果表明,该基因位于甘蓝 1 号染色体上,属于 LF1 亚基因组编码基因;序列分析结果表明,该基因含有 4 个外显子和 3 个内含子,编码 338 个氨基酸,蛋白质分子量为 38 380,等电点为 6.80,其编码蛋白质的 N 端含有一个 bHLH 结构域;亚细胞定位分析指出该基因编码蛋白质定位在细胞核上,表明该基因编码蛋白质为核定位蛋白质,与其为转录因子特征相符;序列比对结果显示,*BobHLH18* 蛋白与白菜和拟南芥中的 bHLH 蛋白具有较高的同源性,相似度分别为 90.5% 和 89.0%;聚类分析指出 *BobHLH18* 及其同源蛋白分别聚类成 2 个进化分支,且来自十字花科植物的 bHLH18 同源蛋白质都聚在同一进化分支上;qRT-PCR 分析结果表明 *BobHLH18* 基因受冷胁迫诱导,能在叶片中被较高的诱导表达,表明该基因可能在甘蓝叶片应答冷胁迫过程中起重要作用。

关键词: 甘蓝; *BobHLH18*; 转录因子; 冷胁迫

中图分类号: S635 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0149-08

Molecular cloning and expression analysis of cold stress-related gene *BobHLH18* in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

QIN Wen-bin¹, DAI Zhong-liang¹, SHAN Xi¹, TANG Jun², WANG Shen-yun², LI Jian-bin²

(1. Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences of the Ning-Zhen Hilly District, Jurong 212400, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement/Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, a gene full-length sequence of the cold stress-related bHLH transcription factor *BobHLH18*, was isolated from the cabbage inbred line Y923 with cold and bolting resistance by homologous cloning methods. Genome search analysis results showed that this gene was located on C01 chromosome of cabbage, which belonged to the LF1 sub-genome. Sequence analysis results showed that this gene contained four exons and three introns, and its encoded protein contained 338 amino acids with the molecular weight of 38 380 and the isoelectric point of 6.80, its N terminal contained bHLH domain. Subcellular localization predication analysis results indicated that the protein encoded by *BobHLH18* was located on the nucleus and had nuclear protein features, which was consistent with transcription factor characteristics. Homology analysis results showed that *BobHLH18* protein had high homology with bHLH18 protein in Chinese cabbage and *Arabidopsis*, and the similarities were 90.5% and 89.0%, respectively. Cluster analysis results showed that *BobHLH18* and its homologous proteins could be divided into two evolutionary branches, and the bHLH18 homologs from the cruciferous plants could be clustered into the same division. qRT-PCR analysis results indicated that *BobHLH18* gene was induced by cold stress and had high expression levels at 12 h after cold treatment, suggesting

收稿日期:2018-03-16

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0101702);江苏省重点研发计划项目(BE2017379);江苏省农业科技自主创新基金项目[CX (15) 1016];宁波市科技计划项目(2015C110008)

作者简介:秦文斌(1971-),男,江苏句容人,本科,副研究员,从事蔬菜栽培育种研究。(E-mail) qinwenbinbin@126.com

通讯作者:李建斌,(E-mail) jbli0518@163.com

Abstract: In this study, a gene full-length sequence of the cold stress-related bHLH transcription factor *BobHLH18*, was isolated from the cabbage inbred line Y923 with cold and bolting resistance by homologous cloning methods. Genome search analysis results showed that this gene was located on C01 chromosome of cabbage, which belonged to the LF1 sub-genome. Sequence analysis results showed that this gene contained four exons and three introns, and its encoded protein contained 338 amino acids with the molecular weight of 38 380 and the isoelectric point of 6.80, its N terminal contained bHLH domain. Subcellular localization predication analysis results indicated that the protein encoded by *BobHLH18* was located on the nucleus and had nuclear protein features, which was consistent with transcription factor characteristics. Homology analysis results showed that *BobHLH18* protein had high homology with bHLH18 protein in Chinese cabbage and *Arabidopsis*, and the similarities were 90.5% and 89.0%, respectively. Cluster analysis results showed that *BobHLH18* and its homologous proteins could be divided into two evolutionary branches, and the bHLH18 homologs from the cruciferous plants could be clustered into the same division. qRT-PCR analysis results indicated that *BobHLH18* gene was induced by cold stress and had high expression levels at 12 h after cold treatment, suggesting

that *BobHLH18* gene may play an important role in the response of cabbage leaves to cold stress.

Key words: cabbage; *BoHLH18*; transcription factors; cold stress

冷胁迫是影响作物生长、发育和产量的重要非生物胁迫因子之一。已有研究者指出,转录因子作为转录调控的关键节点在植物应答冷胁迫过程中起重要作用。转录因子在结构上通常具有DNA结合结构域、转录调控域及核定位信号区等功能域^[1-2],其中DNA结合结构域决定着转录因子与顺式作用元件结合的特异性,使其发挥转录调控功能^[3-5]。bHLH转录因子作为一类重要的植物逆境相关转录因子蛋白,因其在结构上含有1个由10~15个氨基酸的氨基酸基本区和40个氨基酸左右的 α -螺旋环- α -螺旋区(HLH区)构成的50~60个氨基酸组成的bHLH保守结构域而得名^[6-8]。其中,基本区域位于bHLH结构域的N-端,具有DNA识别和结合顺式元件的功能^[6, 9-10]。近年来随着多个植物基因组的测序完成,大量的bHLH转录因子家族成员已被鉴定,在拟南芥和水稻中bHLH转录因子家族分别有超过140个和160个成员^[11],而在烟草、二柄短麦草、白菜和番茄中则分别含有190、146、230和159个bHLH成员^[12-15]。

甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)是中国一种重要的芸薹属蔬菜,全国各地均有栽培^[16]。随着近年来甘蓝种植区的扩大,尤其露地越冬甘蓝品种的大面积推广,生产上对耐低温的品种需求逐渐提高^[17]。而目前对甘蓝耐寒材料筛选多依赖于田间自然低温条件下的人工筛选,易受环境干扰,选择效率不高,因而开展耐寒基因鉴定及利用与耐寒基因紧密连锁的分子标记进行辅助选择,是提高甘蓝耐寒育种效率的重要手段^[17-18]。目前,在模式植物拟南芥上已有多个与耐寒性相关的基因被鉴定,如bHLH类的*ICE1*基因、AP2/DREB类的*CBF1/CBF2/CBF3*基因、*COR*基因、bZIP类*RISBZ5/HOS1*基因等^[19-21]。且已有研究表明,拟南芥bHLH转录因子具有广泛的生物学功能,如调节种子萌发^[22],表皮细胞形成^[23],心皮发育^[24],花药发育^[25],果实开裂^[26],黄酮类及花青素生物合成^[27]及响应光敏色素^[28],激素信号^[29],胁迫诱导^[14, 30-32]等过程。

甘蓝Y923为重组自交系,具有耐寒,抽薹迟等特性,目前该材料已进行了三代基因组测序,以其为研究对象鉴定耐寒相关基因,能为后续整合其基因组信息解析甘蓝耐寒机制奠定前期基础。为探讨

bHLH转录因子在甘蓝耐寒方面的功能,本研究利用同源克隆方法,设计甘蓝类bHLH转录因子基因的特异扩增引物,结合RT-PCR技术在甘蓝Y923冷处理全长cDNA文库中,获得一个受冷胁迫诱导表达的bHLH转录因子基因,并根据其与拟南芥*bHLH*基因的同源性,将其命名为*BobHLH18*。本研究对该基因在甘蓝中的序列特征、基因结构、染色体定位及其在冷胁迫下的时空表达模式进行了分析,为进一步研究该基因功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

用于转录因子克隆的甘蓝冷胁迫全长cDNA文库由本实验室构建。基因序列克隆和冷胁迫处理所用的甘蓝材料为结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)自交系Y923。选“四叶一心”期用1/2MS培养液在培养室水培7d的甘蓝幼苗,转入4℃的低温光照培养箱中进行冷胁迫处理,以培养室正常生长的植株为对照,分别在0h、6h、12h、24h和48h时收集处理甘蓝和对照植株的根、茎、叶,液氮速冻,-80℃保存备用。

1.2 *BobHLH18* 基因全长序列的克隆

以T1和T2(表1)为引物,对筛选到的*bHLH18*全长cDNA克隆进行双向测序,通过DNAMAN软件对序列进行拼接组装,得到一致序列后提交NCBI进行ORF的预测。根据bHLH18的cDNA序列设计引物,在甘蓝gDNA中和cDNA中扩增*bHLH18*基因,对PCR产物进行胶回收并克隆到pMD18-T载体上,然后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆进行测序验证。

1.3 *BobHLH18* 基因染色体定位

通过搜索芸薹属基因组数据库Brassica database (BRAD; <http://brassicadb.org/brad/>)中与*BobHLH18*基因序列完全相同的基因座序列及其基因组位置信息,对*BobHLH18*进行电子定位及拷贝数分析。

1.4 *BobHLH18* 基因序列分析

利用DNAMAN和ORF Finder在线软件进行核苷酸和氨基酸同源序列比对和开放阅读框预测。利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de>)在线工具对

bHLH 进行保守域预测。用 EXPASy 在线工具 ProtParam(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行蛋白质的分子量和等电点计算。用 PSORT(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) 在线工具进行蛋白质亚细胞定位预测。同时,以 BobHLH18 蛋白质氨基酸序列作为母序列,在 GenBank 中搜索其他物种中与该基因同源的序列,并通过 MEGA 软件进行进化分析。

1.5 *BobHLH18* 基因时空表达特征分析

根据克隆到的 *BobHLH18* 基因全长 cDNA 序列设计一对特异引物 T3 和 T4(表 1),利用 Light Cycler Roche 480 定量 PCR 仪检测 4 ℃ 低温处理下甘蓝不同器官及不同处理时间下目的基因的表达特征,以甘蓝 β -actin 基因(引物为 T5 和 T6)作为荧光定量 PCR 的内标。定量 PCR 反应总体系为 20 μ l,包括 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa) 10 μ l,特异引物各 1 μ l,cDNA 模板 1 μ l,加双蒸水到 7 μ l,在 Light Cycler Roche 480 上采用 Light Cycler System 进行实时定量 PCR 反应,反应参数:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 10 s,40 个循环,每个循环结束时采集荧光信号。试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来计算基因相对表达量。

表 1 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR amplification

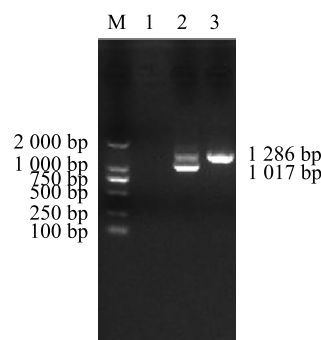
| 引物名 | 引物序列(5'→3') | 用途 |
|-----|----------------------|-----------|
| T1 | ATGAATATGTTCTCCACAAG | PCR 扩增 |
| T2 | TCACAAGAACTTCGATAAAG | PCR 扩增 |
| T3 | CGAAAAGGGACCAAGAGGGC | 定量 PCR 扩增 |
| T4 | ACCCGAGGAGCCATCTTCAC | 定量 PCR 扩增 |
| T5 | AATCCACGAGACAACATAT | 定量 PCR 扩增 |
| T6 | GACCTGCTTCATCATACT | 定量 PCR 扩增 |

2 结果与分析

2.1 甘蓝 *BobHLH18* 基因 gDNA 和 cDNA 序列的克隆

分别以对照甘蓝叶片 DNA 和冷处理甘蓝叶片 cDNA 为模板,利用引物 T1 和 T2 进行目的基因 PCR 产物扩增,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,获得 PCR 扩增产物,长度为 1 000~2 000 bp(图 1),扩增产物经切凝胶回收、克隆并测序,结果表明以 gDNA 为模板,测得该基因 DNA 全长为 1 286 bp,而以 cDNA 为

模板,测得该基因 cDNA 序列长度为 1 017 bp。利用 ORF Finder 分析测序 cDNA 序列,指出 1 017 bp 长度的 cDNA 序列恰好包含一个完整基因编码框。通过对比获得基因组序列与 cDNA 序列,指出该基因包含 3 个内含子和 4 个外显子,经与模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 比对发现,拟南芥 *bHLH18* (GenBank:NP 001077944.1) 与该基因具有较高的相似性,达 89.0%,故将其命名为 *BobHLH18*。



M:DNA marker DL2000;泳道 1:阴性对照,无 PCR 扩增产物;泳道 2:以 cDNA 为模板目的基因 PCR 扩增产物;泳道 3:以 DNA 为模板目的基因 PCR 扩增产物。

图 1 *BobHLH18* 基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *BobHLH18* gene

2.2 *BobHLH18* 的染色体定位

基于 *BobHLH18* 基因序列,利用 Blast 程序在甘蓝基因组数据库中进行同源搜索,得到一条与 *BobHLH18* 基因序列完全相同的基因座序列(Bol028883),该基因被定位在甘蓝的 C01 染色体上,其基因座物理位置信息为 C01:584962-586247(+),表明 *BobHLH18* 基因定位于甘蓝的 C01 号染色体上,且为单拷贝基因。通过基因编码框分析,指出位于甘蓝 1 号染色体上的 *BobHLH18* 基因属于 LF1 亚基因组上正义链编码基因。

2.3 *BobHLH18* 基因碱基序列及其编码蛋白质氨基酸序列分析

利用 DNAMAN 软件拼接正反向测序序列,指出 *BobHLH18* 基因开放阅读框全长为 1 017 bp,编码 338 个氨基酸,并包含一个 HLH 保守结构域(图 2),分子量为 38 380,等电点为 6.80。利用 DNAMAN 软件对 *BobHLH18* 基因编码框的 DNA 和 cDNA 序列进行比对,指出该基因 4 个外显子大小分别为 481 bp、290 bp、129 bp、69 bp,3 个内含子大小为 239 bp、105 bp 和 204 bp。分析该基因内含子剪

切位点显示该基因所用内含子剪切都遵守经典的 GT-AG 剪切法则,其中第二个内含子位于 HLH 结构域内(图 3),即 bHLH 结构域被内含子分隔,这与经典的植物 bHLH 基因内含子分布模式相符。用 SMART 在线工具分析 *BobHLH18* 基因编码蛋白质结构域显示, BobHLH18 蛋白第 163 位氨基酸到 212 位氨基酸具有 bHLH 转录因子家族所具有的典型 HLH 结构(图 3),表明该基因属于 bHLH 转录因子类基因。同时基于 PSORT 在线工具对 *BobHLH18* 基因编码蛋白质的亚细胞定位预测结果,指出 BobHLH18 蛋白亚细胞定位于细胞核,表明该基因编码蛋白质具有转录因子的核定位特征,这与其作为转录因子的特点相符。

2.4 *BobHLH18* 基因编码蛋白质的同源性及系统进化分析

用 Blast 工具在 NCBI 数据库中搜索与

BobHLH18 蛋白同源的蛋白,用 DNAMAN 工具将检索到的同源蛋白与 BobHLH18 蛋白进行比对发现,在氨基酸水平上, BobHLH18 蛋白与已报道的拟南芥(GenBank: NP 001077944.1)、琴叶拟南芥(GenBank: XP 020883057.1)、大白菜(GenBank: XP 009117336.1)、油菜(GenBank: XP 022563236.1)、柑橘(GenBank: XP 006466576.1)、蓖麻(GenBank: XP 002528911.1)、棉花(GenBank: XP 017645100.1)、葡萄(GenBank: XP 002270448.2)、腊梅(GenBank: XP 008236876.1)、桃(GenBank: XP 007205404.1)、梨(GenBank: XP 009347092.1)、苹果(GenBank: XP 008383369.1)中的 bHLH 蛋白均具有同源性,且它们的 HLH 结构域都具有保守的氨基酸残基序列(图 4),这进一步表明 BobHLH18 保守的 HLH 结构与经典的植物 bHLH 结构是一致的。

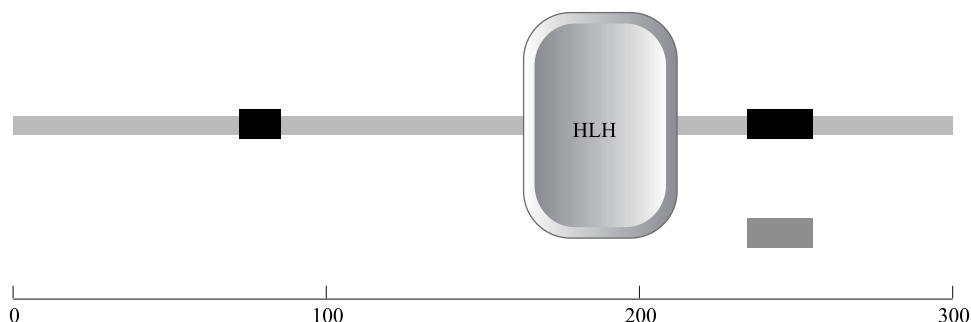
A

```

1  ATGAATATGTTCTCCACAAGATGGTTTTCTGAGCAGGAATTAGAAGAAAATAGCATCATTCAAGAATACCAGATAAACTCA
M  N  M  F  S  T  R  W  F  S  E  Q  E  L  E  E  N  S  I  I  Q  E  Y  Q  I  N  S
82  AGAGTAGGAGAGATCCATGAAGCTCAACACGATCTTCCACACTCTTTCTCAACTCTTATGGCCCCACAGATGATCCTTCT
R  V  G  E  I  H  E  A  Q  H  D  L  P  H  S  F  S  T  L  M  A  P  T  D  D  P  S
163 TACGATGATTTGATTGAAATGAAACCATCAAAGATCCTCAAAACAACTTACATATCACCAAAATTGCCACCACCCTCT
Y  D  D  L  I  E  M  K  P  S  K  I  L  K  T  T  Y  I  S  P  K  L  P  P  P  S
244 TTTCTCTCTCTCTAACTCAAAACTTATCTTCATCATCAGCCTTCTCTAAGAATTCTCTCTCGAGAATGCCTCTCCA
F  P  L  P  P  N  S  K  T  Y  L  H  H  Q  P  S  S  R  I  L  S  F  E  N  A  S  P
325 AATGGTATGGATCATGGGTACGCTCCACCTATCTAAATTCAATCATGAACCCAAAGCTGAGGATGGAGAGCCGCCAAAC
N  G  M  D  H  G  Y  A  P  T  Y  L  N  S  I  M  N  P  K  A  E  D  G  E  P  P  N
406 CGGATGAATGAGCCGATTAATCGAAAAGGGACCAAGAGGGCTCAACCTTTGTATAGAAACCAAACTAATGCGCAAGATCAC
R  M  N  E  P  I  N  R  K  G  T  K  R  A  A  Q  P  L  Y  R  N  Q  T  N  A  Q  D  H
487 ATAATGGCCGAAAGAAAACGTAGAGAGAACTTACTCAACGATTTGTAGCTCTTTCTGCTCTAGTCTTGGCCTGAAAAAG
I  M  A  E  R  K  R  R  E  K  L  T  Q  R  F  V  A  L  S  A  L  V  P  G  L  K  K
568 ATGGACAAGGCTTCTGTGTTGGGAGATGCACTAAAGCATATAAAGTATCTCCAAGAAAGAGTGGGAGAGTTAGAGGAGCAA
M  D  K  A  S  V  L  G  D  A  L  K  H  I  K  Y  L  Q  E  R  V  G  E  L  E  E  Q
649 AAGAGAGAAAAAGATTAGAATCAGTGGTTCTTGTGAACAAGTCTAAGCTGATTTTGGACGATAATAATCAATCATCTTCG
K  R  E  K  R  L  E  S  V  V  L  V  N  K  S  K  L  I  L  D  D  N  N  Q  S  S  S
730 TCTTCGTGTGTGAAGATGGCTCCTCGGGTTAGAACTCCCGAGATTGAAGTAAGATTCTCGGATAATGATGTTCTAATC
S  S  C  E  D  G  S  S  G  L  E  L  P  E  I  E  V  R  F  S  D  N  D  V  L  I
811 AAAATCCTTTGCGAGAAGCAAAAGGGCCATGTTGCCAAGATTATGGCAGAGATTGAGAAATTTAATTTCTCAATAACCAAC
K  I  L  C  E  K  Q  K  G  H  V  A  K  I  M  A  E  I  E  K  F  N  F  S  I  T  N
892 TCAAGTGTGTTGCCCTTTGGACCAACACTTGATATCACCATTATAGCTAAGAAGGAGAATGATTTCGACATGACACTCATG
S  S  V  L  P  F  G  P  T  L  D  I  T  I  A  K  K  E  N  D  F  D  M  T  L  M
973 GATGTTGTAAAGAGCTTAAGGTCCGCTTTATCGAAGTCTTGTGA
D  V  V  K  S  L  R  S  A  L  S  K  F  L  *

```

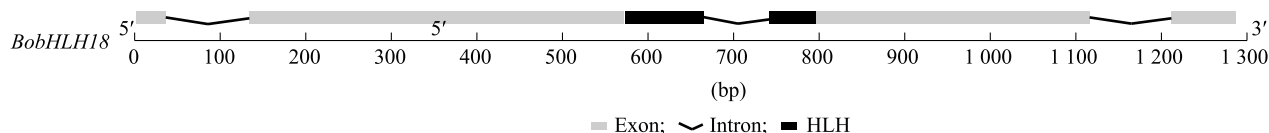
B



A: *BobHLH18* 基因碱基序列及其编码的蛋白质氨基酸序列示意图; B: HLH 结构在 *BobHLH18* 蛋白上的分布。

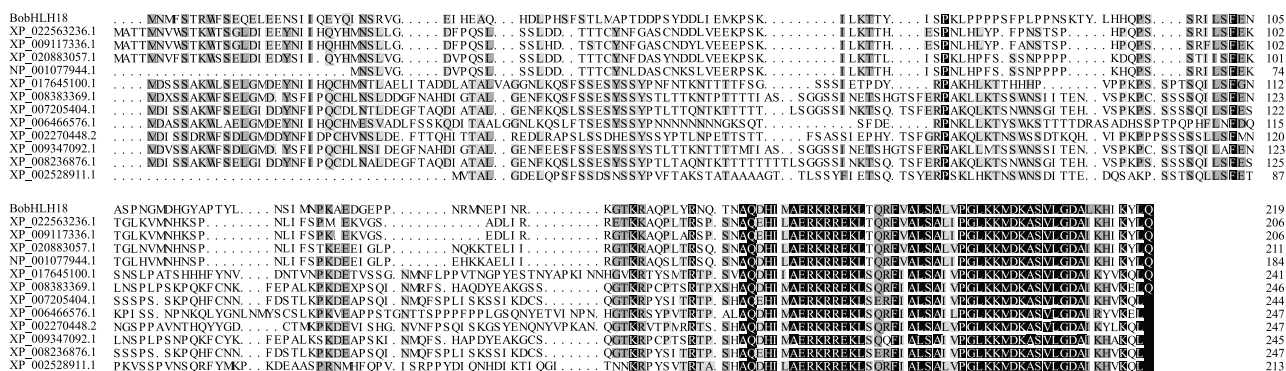
图 2 *BobHLH18* 基因碱基序列及其编码的蛋白质氨基酸序列特征

Fig.2 Characteristics of the base sequence of *BobHLH18* gene and the encoded protein amino acid sequence

图3 *BobHLH18* 基因结构Fig.3 Gene structure of *BobHLH18*

聚类分析结果显示, *BobHLH18* 及其同源蛋白可以分为 2 个进化分支 (group I 和 group II), 且这些来自同一科属内的同源蛋白都能明显聚到一个进化分支上, 如 group II (图 5), 这暗示着来自不同物种的 *bHLH18* 基因的演化可能伴随着物种的分化而分化。且在第一亚分支 (group I) 上来源于蔷薇科的植物能聚在一个分支簇上, 而对应在第二亚分支 (group II) 上, 所有来自十字花科植物的 *bHLH18* 同源物更为明显的聚集在同一个分支簇上 (图 5), 且聚集程度集中, 这表明在进化上十字花科植物的 *bHLH18* 同源物有更近的遗传关系。同时我们也利

用 Blastp 程序在芸薹基因组数据库中检索 *BobHLH18* 在十字花科植物中的同源基因, 在油菜基因组中发现油菜 A 基因组上和 C 基因组上各有 1 个 *BobHLH18* 同源基因, 且二者与 *BobHLH18* 基因的相似性分别为 93.5% 和 91.5%, 而在白菜基因组中, *BobHLH18* 基因与大白菜的 *bHLH18* 同源基因的相似性为 90.5%, 即 *BobHLH18* 基因与油菜中 *BobHLH18* 同源基因具有更近的遗传关系, 这些进一步支持了 *BobHLH18* 及其同源蛋白在十字花科植物中具有更近的演化关系。

图4 在不同植物中多序列比对 *BobHLH18* 同源蛋白Fig.4 Multiple alignments of *BobHLH18* orthologous proteins from different plant species

2.5 冷胁迫下甘蓝 *BobHLH18* 基因的时空表达

以 *Actin* 基因作为甘蓝 *BobHLH18* 基因荧光定量 PCR 的内参, 以冷胁迫下不同时间点甘蓝根、茎、叶为试验材料, 利用荧光定量 PCR 对 *BobHLH18* 基因进行时空表达特征分析。结果 (图 6) 表明, *BobHLH18* 在叶中的表达丰度最高 (图 6 C), 而在根和茎均有不同程度的不表达。通过比

较冷胁迫下 *BobHLH18* 在甘蓝根、茎、叶中的表达差异, 指出甘蓝经 4 °C 低温处理 12 h 后, *BobHLH18* 在茎和叶中表达量出现峰值, 其中在叶片中 *BobHLH18* 有更高的表达量, 这表明该基因受冷胁迫诱导, 且在甘蓝不同组织中存在表达差异, 而不同组织中的表达差异则可能反映该基因在不同组织中所行使的功能异同。

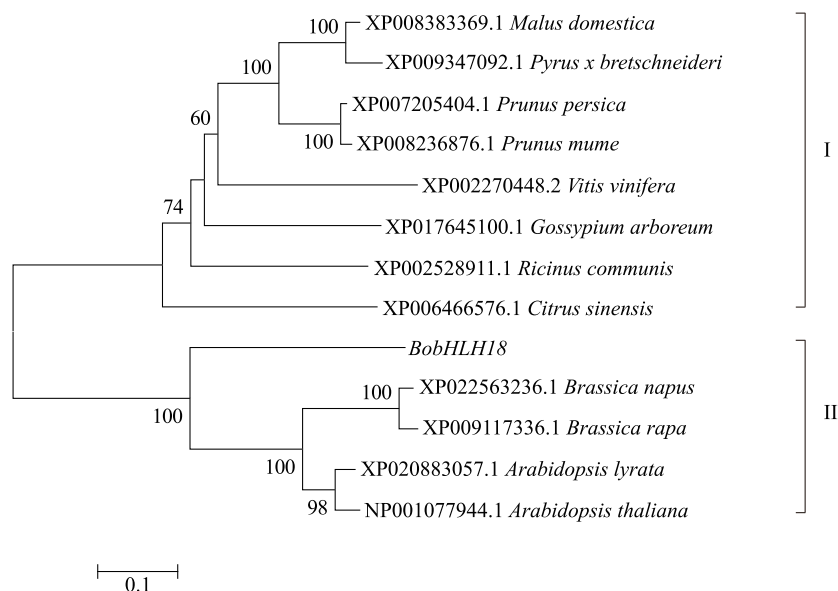


图 5 在不同植物中聚类分析 BobHLH18 同源蛋白

Fig.5 Phylogenetic analysis of BobHLH18 orthologous proteins from different plant species

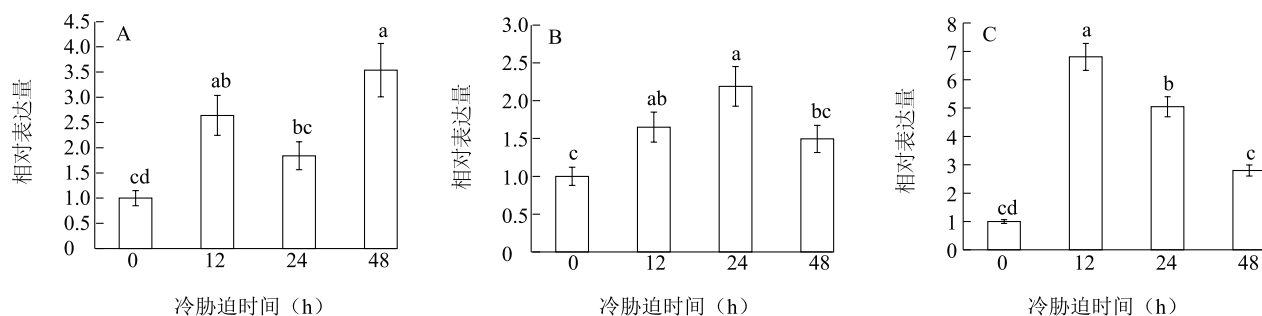


图 6 冷胁迫下 BobHLH18 基因在根(A)、茎(B)和叶(C)中的表达

Fig.6 Expression of BobHLH18 gene from roots (A), stems (B) and leaves (C) under cold stress

3 讨论

在植物中,多个逆境相关转录因子受胁迫诱导而表达,如 bHLH、AP2/EREBP、NAC、WRKY 和 MYB 转录因子等^[19]。这些转录因子通过调控逆境相关信号转导,诱导抗逆基因表达,从而改变植物抗性。目前关于 bHLH 转录因子参与非生物胁迫调控的研究,已在拟南芥和水稻中被广泛展开,但在甘蓝中相关的研究还非常有限。本研究在实验室前期构建的甘蓝冷胁迫全长 cDNA 文库的基础上,鉴定出了 1 个受低温胁迫诱导表达的基因 BobHLH18,该基因编码一个 bHLH 家族转录因子蛋白。结构分析发现,该基因编码的蛋白质含有一个 bHLH 转录因子结构特征保守结构域 HLH;基因全长由 3 个内含子

和 4 个外显子组成,其中第 2 个内含子长度为 105 bp,位于 bHLH 保守结构域内,这种内含子分布模式与已报道的拟南芥 bHLH 基因家族 H 组^[33]、番茄 VIII 组^[15]成员的保守结构域内含子分布模式一致。对于 BobHLH18 基因这种 bHLH 结构域包含一个内含子的分布模式是否与该基因行使其保守功能相关仍需进一步研究。

虽然人们对模式植物中 bHLH 转录因子的功能有一定了解,但当前对非模式植物中的 bHLH 转录因子的研究仍局限在基因克隆、结构鉴定、表达及其相关功能分析等阶段,尤其关于甘蓝 bHLH 基因参与冷胁迫调控的相关报道更少。模式植物拟南芥的研究结果指出,一些 bHLH 转录因子通过结合 CBF/DREB1 基因家族成员启动子区域来正调控冷胁迫

应答^[17, 34-35],同时一些 bHLH 转录因子也能通过与靶基因启动子区的 DNA 顺式作用元件结合来调控靶基因表达,参与植物细胞分化和发育过程^[25, 36]。这种蛋白质与 DNA 结合调控基因表达的特性是具有核定位属性的转录因子的特征,与其转录因子行使功能密不可分。本研究利用 PSORT 在线工具分析了 *BobHLH18* 基因编码蛋白质定位特性,指出该编码蛋白质具有核定位特征,说明该编码蛋白质可能在细胞核内行使其功能,这一特征与先前的报道一致^[35-38]。

植物在生长发育过程中受到环境胁迫时,会引发体内一系列 bHLH 类基因表达。在模式植物中,拟南芥 bHLH 类 *PYE* 基因能在离子缺少条件下正调控植株的生长发育^[31];bHLH 类 *JAM1* 基因能转录抑制和负调控 JA 信号途径^[29];ICE1 作为植物冷信号通路关键调节因子,在冷胁迫下能激活 *CBF* 基因的表达,并传递冷诱导信号^[20, 39],并且超表达 *ICE1* 可提高 *CBF3* 的转录表达,增强转基因植株的耐寒能力^[20]。在非模式植物中,如 *BobHLH18* 基因在正常甘蓝花药发育过程中有 2 个表达高峰,但在 OguCMS 甘蓝不育系花药中该基因下调达 6.4 倍^[36];在冷处理下,苦荞 *FibHLH3* 基因表达量随时间延长持续上升^[40]。李晓刚等^[41]报道在杜梨叶片中 *bHLH122-1* 和 *bHLH122-2* 均受盐、干旱及渗透胁迫诱导表达,但 ABA 处理不影响它们的转录。李宇伟等^[42]报道在低温处理下莢藜苜蓿 *MtbHLH-1* 基因上调表达。袁琳琳等^[43]报道独行菜 *laICE1* 基因在幼苗期经低温处理后,其表达量显著增加,且在低温处理下的表达量显著高于在非低温处理下的表达量。何洁等^[44]报道西瓜中有 21 个 *bHLH* 基因响应非生物胁迫,其中 *ClabHLH41* 基因在低温、盐及 ABA 处理下均显著表达。因此,对该类基因的研究将有助于挖掘植物抗逆相关基因,加速植物抗逆机理研究进程。本研究筛选到一个冷胁迫诱导表达的 bHLH 类基因 *BobHLH18*,与拟南芥 bHLH 转录因子基因 *AtbHLH18* 同源,推测其可能具有与 *AtbHLH18* 类似的功能。本研究发现在受到冷胁迫后甘蓝 *BobHLH18* 基因能在根、茎、叶中不同程度表达,其中在叶片中 12 h 时达到峰值,表明该基因可能参与了甘蓝的抗冷害反应,后续对其功能的深入研究将为揭示甘蓝耐寒机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. Science, 2000, 290(5499): 2105-2110.
- [2] PABO C O, SAUER R T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition [J]. Annu Rev Biochem, 1992, 61: 1053-1095.
- [3] WANAPU C, SHINMYO A. Cis-regulatory elements of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root-specific expression and responsiveness to high-salt stress [J]. Ann N Y Acad Sci, 1996, 782: 107-114.
- [4] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress [J]. Plant Cell, 1994, 6(2): 251-264.
- [5] MATYS V, KEL-MARGOULIS O V, FRICKE E, et al. TRANSFAC and its module TRANS Compel: transcriptional gene regulation in eukaryotes [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Database issue): D108-D110.
- [6] ATCHLEY W R, TERHALLE W, DRESS A. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain [J]. J Mol Evol, 1999, 48(5): 501-516.
- [7] HEIM M A, JAKOBY M, WERBER M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(5): 735-747.
- [8] PIRES N, DOLAN L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants [J]. Mol Biol Evol, 2010, 27(4): 862-874.
- [9] CARRETERO-PAULET L, GALSTYAN A, ROIG-VILLANOVA I, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae [J]. Plant Physiol, 2010, 153(3): 1398-1412.
- [10] ATCHLEY W R, FITCH W M. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(10): 5172-5176.
- [11] LI X, DUAN X, JIANG H, et al. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [12] SONG X M, HUANG Z N, DUAN W K, et al. Genome-wide analysis of the bHLH transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Mol Genet Genomics, 2014, 289(1): 77-91.
- [13] RUSHTON P J, BOKOWIEC M T, HAN S, et al. Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae [J]. Plant Physiol, 2008, 147(1): 280-295.
- [14] NIU X, GUAN Y, CHEN S, et al. Genome-wide analysis of basic

- helix-loop-helix (bHLH) transcription factors in *Brachypodium distachyon*[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1):619.
- [15] SUN H, FAN H J, LING H Q. Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato[J]. BMC Genomics, 2015, 16:9.
- [16] 杨丽梅,方智远,刘玉梅,等. “十一五”我国甘蓝遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 2011(2):1-10.
- [17] 靳哲,张扬勇,方智远,等. 结球甘蓝 *BoCBF1* 与 *BoCBF2* 基因的 CAPS 标记及其对耐寒性的影响[J]. 中国蔬菜, 2012(14):23-30.
- [18] 夏瑞祥,肖宁,洪义欢,等. 东乡野生稻苗期耐冷性的 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3):443-451.
- [19] HUANG G T, MA S L, BAI L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2):969-987.
- [20] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis[J]. Genes Dev, 2003, 17(8):1043-1054.
- [21] LIU C, WU Y, WANG X. bZIP transcription factor OsbZIP52/RISBZ5: a potential negative regulator of cold and drought stress response in rice[J]. Planta, 2012, 235(6):1157-1169.
- [22] OH E, KIM J, PARK E, et al. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2004, 16(11):3045-3058.
- [23] ZHAO H, LI X, MA L. Basic helix-loop-helix transcription factors and epidermal cell fate determination in *Arabidopsis* [J]. Plant Signal Behav, 2012, 7(12):1556-1560.
- [24] GROZDMANN M, BYLSTRA Y, LAMPUGNANI E R, et al. Regulation of tissue-specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in Arabidopsis[J]. J Exp Bot, 2010, 61(5):1495-1508.
- [25] FARQUHARSON K L. A domain in the bHLH transcription factor DYT1 Is critical for anther development[J]. Plant Cell, 2016, 28(5):997-998.
- [26] RAJANI S, SUNDARESAN V. The *Arabidopsis* myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence[J]. Curr Biol, 2001, 11(24):1914-1922.
- [27] MATUS J T, POUPIN M J, CANON P, et al. Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. Plant Mol Biol, 2010, 72(6):607-620.
- [28] LEIVAR P, MONTE E, OKA Y, et al. Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness[J]. Curr Biol, 2008, 18(23):1815-1823.
- [29] NAKATA M, MITSUDA N, HERDE M, et al. A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2013, 25(5):1641-1656.
- [30] KAVAS M, BALOGLU M C, ATABAY E S, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of common bean bHLH transcription factors in response to excess salt concentration [J]. Mol Genet Genomics, 2016, 291(1):129-143.
- [31] LONG T A, TSUKAGOSHI H, BUSCH W, et al. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots [J]. Plant Cell, 2010, 22(7):2219-2236.
- [32] 王翠,兰海燕. 植物 bHLH 转录因子在非生物胁迫中的功能研究进展[J]. 生命科学研究, 2016, 20(4):358-364.
- [33] TOLEDO-ORTIZ G, HUQ E, QUAIL P H. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. Plant Cell, 2003, 15(8):1749-1770.
- [34] 曹宁,张启翔,郝瑞杰,等. 梅花 *PmICE1* 基因的克隆及低温条件下的表达[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(4):21-25.
- [35] 向殿军,殷奎德,满丽莉,等. 大白菜低温胁迫转录因子 *BeICE1* 的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2011, 9(3):364-369.
- [36] 刘海霞,康俊根,颜建明,等. 甘蓝 *OguCMS* 相关的花药优势表达转录因子 *BoBHLH1* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(12):1953-1960.
- [37] 豆玉娟,曹飞,马跃,等. 栽培草莓果实中特异表达的 *bHLH78* 基因的克隆及过量表达载体构建[J]. 分子植物育种, 2014, 12(3):456-465.
- [38] 杨娜. 独行菜种子低温萌发耐受性特性及 bHLH 类转录因子分析[D]. 乌鲁木齐:新疆师范大学, 2017.
- [39] FOWLER S, THOMASHOW M F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway [J]. Plant Cell, 2002, 14(8):1675-1690.
- [40] 姚攀峰,赵学荣,李茂菲,等. 苦荞转录因子基因 *FibHLH3* 的克隆及其非生物胁迫下的表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(2):429-435.
- [41] 李晓刚,李慧,杨青松,等. 杜梨 bHLH 转录因子家族两成员的序列特征及对非生物胁迫的转录响应[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(22):40-45.
- [42] 李宇伟,连瑞丽,王新民. 蕹菜苜蓿低温胁迫响应基因 *Mt-bHLH-1* 的克隆及功能分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(16):3430-3436.
- [43] 袁琳琳,王亚茹,曾卫军,等. 独行菜种子 bHLH 类转录因子基因家族及幼苗 *laICE1* 表达对冷胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2018, 38(1):26-34.
- [44] 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.

(责任编辑:陈海霞)