

张红瑞,理雅,于白音,等.铁皮石斛 *DobHLH96* 基因克隆及表达分析[J].江苏农业科学,2023,51(1):63–70.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2023.01.009

铁皮石斛 *DobHLH96* 基因克隆及表达分析

张红瑞¹,理雅^{1,2},于白音^{1,2,3},刘博婷^{2,3},陈洁²,刘羽佳^{2,3}

[1. 河南农业大学农学院,河南郑州 450046; 2. 韶关学院英东生物与农业学院,广东韶关 512005;
3. 广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室(韶关学院),广东韶关 512005]

摘要:为了探究 *DobHLH96* 基因的生物学特性及其在响应逆境胁迫中的功能,利用同源克隆技术从广东丹霞铁皮石斛中克隆得到 *DobHLH96* 基因的 cDNA 全长序列。结果显示,*DobHLH96* 开放阅读框全长为 960 bp,编码 319 个氨基酸残基,理论相对分子量为 31.2 ku,等电点为 6.51,具有 HLH 结构域,符合 bHLH 结构特征。系统进化树结果显示,*DobHLH96* 蛋白序列与鼓槌石斛中的氨基酸序列同源性最高。*DobHLH96* 在铁皮石斛花器官中的相对表达量最高,具体的花组织排序为花蕾>花柱>萼片。分析结果显示,*DobHLH96* 启动子元件具有与非生物胁迫、干旱、脱水、低温胁迫及脱落酸(ABA)响应等相关的顺式作用元件,而低温、干旱和 ABA 处理均能显著诱导 *DobHLH96* 基因的表达,并且在 3 种处理下该基因的表达模式基本一致,推测铁皮石斛的 *DobHLH96* 基因可能在转录水平上参与 ABA 介导的低温、干旱胁迫响应,可作为候选基因进一步研究其在抵御逆境胁迫中的调控功能。研究结果为深入研究 *DobHLH96* 基因的生物学功能提供了理论依据。

关键词:铁皮石斛;*bHLH* 转录因子;*DobHLH96* 基因;同源克隆;非生物胁迫;表达分析

中图分类号:Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2023)01–0063–08

植物在应对生物、非生物胁迫的过程中逐渐进化形成了由转录因子参与调控的极为复杂而高效的分子应答机制^[1],转录因子是植物参与胁迫应答过程中具有重要调控作用的 DNA 结合蛋白,被激活后能够调控下游相关基因或其他转录因子表达,从而提高植物的抗逆能力^[2]。bHLH 转录因子(transcription factors, TFs)是植物中仅次于 MYB TFs 的第二大转录因子基因家族,由约 60 个氨基酸组成 2 个高度保守的结构域,N 端的碱性区域能与顺式作用元件 E-box(5′–CANNTC–3′)结合;螺旋区域通过 2 个 α-螺旋的相互作用,形成同源/异源二聚体,从而与靶基因启动子的相关部位结合,调控

下游基因表达^[3]。已有研究发现,植物中的 bHLH TFs 参与植株的生长发育、逆境胁迫、调节信号转导与合成代谢等多种重要的生理代谢过程^[4]。例如,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中异源过表达卷柏(*Selaginella tamariscina*) *SlbHLH_{opt}* 基因能够显著提高植株在缺水胁迫、盐胁迫下的种子萌发率、绿色子叶出苗率^[5];拟南芥中 2 个 bHLH TFs(*AtLP1* 和 *AtLP2*)可以调控植株叶片的长宽率及表皮毛形态^[6];另有研究表明,拟南芥 bHLH TFs 能与蓝光受体隐花色素互作来调控开花时间,抑制 *AtbHLH113* 基因的表达,从而推迟植株开花、提高花青素含量^[7–8];丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中的 *SmbHLH92* 基因能够负调控植株毛状根中有关酚酸、丹参酮生物合成关键酶的基因转录水平^[9]。由此可见,bHLH TFs 在植株生长发育和次生代谢物质的合成过程中具有重要作用。另外,bHLH TFs 能够参与植物响应非生物胁迫、病虫害等逆境胁迫过程,如百脉根(*Lotus japonicus*)同源过表达 *LjbHLH7* 基因能够提高植株的抗虫性^[10];同源过表达 *GmbHLH3* 基因的大豆(*Glycine max*)毛状根复合植株和异源转基因拟南芥对 Cl[–]/盐胁迫的耐受性增强^[11];在拟南芥中异源过表达葡萄(*Vitis vinifera*) *VvbHLH1* 基因能够增强转基因拟南芥的耐旱、耐盐能力^[12];异源过表达甜

收稿日期:2022–04–07

基金项目:国家自然科学基金(编号:32000266);广东省基础与应用基础研究基金(编号:2020A1515011438);广东省普通高校创新团队项目(编号:2020KCXTD037);广东省普通高校青年创新人才项目(编号:2020KQNCX076);韶关市科技计划(编号:200810224537583,210731084530203);韶关学院科研重点项目(编号:SZ2019ZK04)。

作者简介:张红瑞(1978—),女,河南鄢陵人,博士,副教授,主要从事中药资源与栽培研究。E-mail:zhanghongrui2003@126.com。

通信作者:于白音,博士,教授,主要从事中药及天然药物资源研究, E-mail:540391135@qq.com;刘羽佳,博士,讲师,研究方向植物逆境生理与分子生物学, E-mail:liuyj1713@dingtalk.com。

菜 (*Beta vulgaris*) *BobHLH93* 基因的拟南芥能够通过增强抗氧化酶活性、减少活性氧 (ROS) 的产生来提高转基因植株对盐胁迫的耐受性^[13]; 异源过表达苹果 (*Malus pumila*) *MdbHLH130* 基因能够提高转基因拟南芥的发芽率和存活率, 增强其抗氧化性, 缓解脱落酸 (ABA) 诱导的气孔关闭及叶片失水^[14]; 过表达水稻 (*Oryza sativa*) bHLH TF (*OsPTF1*) 能提高缺磷条件下同源转基因植株的瞬时磷吸收速率^[15]。另有研究发现, 水稻中的 *OsbHLH6* 基因能够通过调节水杨酸、茉莉酸的信号转导来调节植株在感染稻瘟病时的防御机制^[16]; 小麦 (*Triticum aestivum*) 过表达 *TabHLH49* 基因后能够提高植株的耐旱性^[17]; 烟草 (*Nicotiana tabacum*) *NtbHLH123* 基因能够调控下游 *NtCBF* 基因表达, 其过表达能够增强转基因烟草中的抗氧化酶活性, 从而调控植株的耐寒能力^[18]。由此可见, bHLH TFs 对植物适应和抵御不同逆境胁迫具有重要调控作用。

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 是兰科石斛属多年生草本药用植物, 其干燥茎被《中华人民共和国药典》历版单独收载, 具有益胃生津、滋阴清热的功效, 是我国传统名贵中药材, 被誉为“中华九大仙草之首”, 主要分布于我国安徽、浙江、福建等地。现代药理学研究发现, 铁皮石斛中有多糖、生物碱、氨基酸等多种有效成分, 具有增强免疫力、抗疲劳、抗氧化、降血压、保护肝脏等作用^[19]。在自然条件下, 野生铁皮石斛繁育率较低, 加上近年来生存环境恶化、人为过度采挖等因素的影响, 导致野生铁皮石斛种质资源遭到严重破坏, 已濒临灭绝^[20]。近些年来, 随着组织培养、集成栽培技术的发展, 人们已经完成从野生获取铁皮石斛到栽培铁皮石斛的转变, 但目前还存在栽培品种混杂、成品质量良莠不齐等问题^[21]。因此, 深入研究铁皮石斛 bHLH 转录因子响应逆境胁迫的分子遗传机制, 对于进一步通过遗传改良方法提高铁皮石斛药用有效成分含量及培育高产、优质、抗逆的药用铁皮石斛优良品种具有重要意义。本研究旨在通过筛选铁皮石斛转录组数据, 克隆获得 *DobHLH96* cDNA 全长序列, 并对其理化性质、蛋白结构、进化关系等进行预测分析, 对其组织表达特性及其在低温、干旱胁迫和 ABA 处理下的表达模式进行初步分析, 以期为进一步挖掘 *DobHLH96* 基因的生物学功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

本研究所用试验材料为广东丹霞铁皮石斛, 由韶关市石斛工程技术开发中心提供。将铁皮石斛蒴果进行消毒处理后, 播种于生根培养基中, 无菌培养约 6 个月后, 选取生长状况一致的幼苗进行后续试验。以正常生长的植株为对照, 将低温处理组置于 4 ℃ 恒温、恒湿培养箱中; 模拟干旱处理组用 20% 聚乙二醇 (PEG) - 6000 进行浇灌, 对照组浇灌水; ABA 处理组用 100 μmol/L ABA 浇灌, 对照组浇灌水; 3 个处理组均在处理 0、1、3、6、9、12、24 h 分别进行取样, 用液氮处理 1 min 后, 于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存。每个样品设 3 次生物学重复。

1.2 基因克隆

以铁皮石斛叶片 RNA 为模板, 利用反转录试剂盒 [购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RR036A] 合成 cDNA。根据美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中的云南铁皮石斛同源序列 (序列号: LOC110116474) 设计引物 (F: 5' - ATGTCATTTCGAAA TGCTTTCTT - 3'; R: 5' - TTAGAACGACAGGGGCGG GTT - 3'), 并委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。使用 25.0 μL PCR 扩增体系: 12.5 μL 2 × Master Mix (购自北京兰博利德生物技术有限公司, TO201), 各 1.0 μL 上、下游引物, 2.0 μL cDNA, 用 ddH₂O 补足至 25.0 μL。PCR 反应程序: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 30 个循环; 72 ℃ 7 min。将扩增产物连接至植物表达载体 pROK II 中, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞并选取阳性单克隆进行测序。

1.3 生物信息学分析

在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中使用 Blast P 检索其他物种与铁皮石斛 *DobHLH96* 蛋白的同源序列; 用 DNAMAN、MEGA 11 邻接法对这些序列进行多序列比对和系统进化树的构建; 蛋白结构域、理化性质分别用 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>)、ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行预测; 二级结构、亲疏水性用 SPLIT 4.0 SERVER (<http://split.pmfst.hr/split/4/>) 进行分析; 三级结构用 SWISS - MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行构建; 通过 New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) 对

DobHLH96 启动子的顺式作用元件进行预测分析。

1.4 基因表达分析

将上述样品抽提 RNA 后送至深圳华大基因科技有限公司构建 RNA 文库并测序(Illumina HiSeq™ 2500/Miseq™)。移除接头和低质量的原始数据(raw reads),用 Tophat 2.0 将高质量可用数据(clean reads)与铁皮石斛基因组参考序列进行比对,用 Cufflinks 进行组装,获得转录组数据,基因表达量以 FPKM (fragments per kilobase million) 表示,对铁皮石斛 *DobHLH96* 基因在低温、干旱和 ABA 胁迫处理下的表达模式进行分析。用 SPSS 24.0 软件对数据进行处理和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛 *DobHLH96* 的克隆与序列分析

以铁皮石斛叶片 cDNA 为模板,利用引物进行特异性扩增,电泳结果显示,特异性条带的长度在 1 000 bp 左右,测序获得铁皮石斛 *DobHLH96* 完整的开放阅读框全长序列为 960 bp (图 1 - A),编码 319 个氨基酸残基(图 2)。与参考序列(序列号: LOC110116474)进行对比发现有 6 个碱基差异,其中 1 个非同义替换,5 个同义替换。基因结构和染色体定位分析结果显示,*DobHLH96* 基因位于染色体骨架 NW_021318852.1 区域,含有 2 个内含子、3

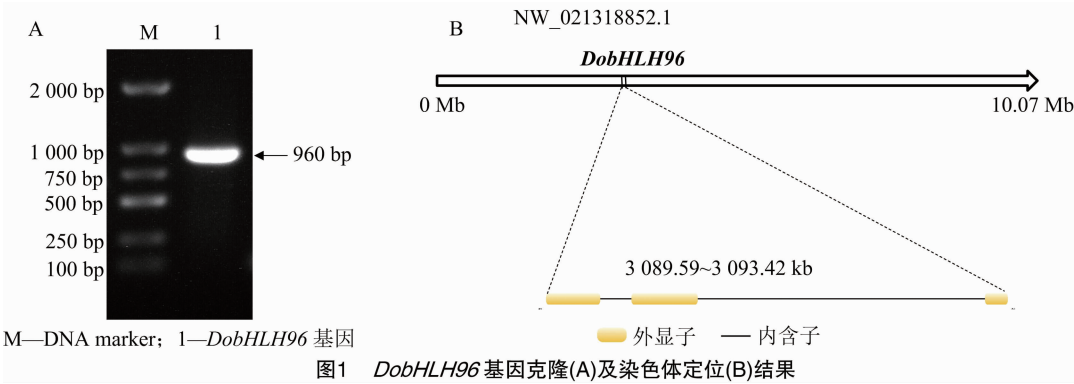


图1 *DobHLH96* 基因克隆(A)及染色体定位(B)结果

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	ATGTCATTCGAAATGCTTTCTTCTCATTGCTTGTATGATACCATCTCGGCCACACCGAGCCCTCATCACCAACAACCACTAAGTTTC								
1	M S F E M L S S S F V V Y D T I S A T P E P H H Q Q P L S F								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
91	CTTTTGTATGCCGGCGCGGATGCCTAAGCCCTGAGTCAGCGATGCTCGGCAGCCTCCAGCCACCGGCAGGGCCGACCGGCTCCACTT								
31	L F D A G G G C L S P E S A M L G S L Q P P A G P Q P A P L								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
181	CCTTCTGTGCGGAGCACAGGGGAAGCGAAGCGGAGCGCGGAGGAGTTGTAAAGAACAAAGAAAGCCGAGACTCAGCGCATG								
61	P S C A G A Q G K R K R R R R P R S C K N K E E A E T Q R M								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
271	ACCCACATTGCCGTCGAGCGCAACCGCGGCGACAGATGAACGAGCACCTCGCGATGCTCCGCTCCCTAATGCCGAATCCTACATCCAA								
91	T H I A V E R N R R R Q M N E H L A M L R S L M P E S Y I Q								
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
361	AGGGGAGACCAGGCCTCAATTGTGGGAGGGGCCATTGACTTCGTCAAGGAAGTGGAGCATCTCCATCCCTCGAAGCTCAAAAGAGA								
121	R G D Q A S I V G G A I D F V K E L E H L L Q S L E A Q K R								
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
451	ACAATTGAGCAAATCAGAGGCCAATGCAAGTATTAATGATTCTGGAGGCGGGCTAATGAGGACCGATGATGAAACAGAGCAGCCTCCT								
151	T I E Q T Q R A N A S I N D S G G G L M R T D D E T E Q P P								
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
541	TTCGCTCAGTTTTTTCCTATCCACAGTACAATTGGTGCCATCCTCGCCATGAGTACCCGTCCCGGCGCGGAGATCCGGTGC CGGCA								
181	F A Q F F A Y P Q Y N W C H P R H E Y P S P A P E I R S P A								
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
631	GTGGCCGACATCGAGGTGACTCTCATCGAGACTCAGCGCAGCCTTCGAATCCTGTGCGCCACAAAGCGCGGCACTAATACAGTTGGTG								
211	V A D I E V T L I E T H A S L R I L S P T R P R Q L I Q L V								
	730	740	750	760	770	780	790	800	810
721	ACTGGCTCCAAGCTCTCAGGCTTTCCATTCTCTCATCTCAATGTTACTACCTTGGACTCCATGGTTCTCTACTCCCTCAGTGTCAAGGTT								
241	T G L Q A L R L S I L H L N V T T L D S M V L Y S L S V K V								
	820	830	840	850	860	870	880	890	900
811	GAGGAAGGATCGAGCCTATCCACAGTGGATGAAATTGCGGCGCGGTGCATCGCATGCTATCGCTCATTGAAGCAGATTCAATTCAGCC								
271	E E G C S L S T V D E I A A A V H R M L S L I E A D S I S A								
	910	920	930	940	950	960			
901	GTTTCATCAAGTTTCTAGACGAACTGTCAAGCAGTCCAAACCGGCCCTGTCTTCTAA								
301	V H Q V F L D E L S S S P N P P L S F *								

箭头表示 *DobHLH96* 基因与参考序列间存在的碱基差异, 数字表示碱基位置

图2 *DobHLH96* 基因的 cDNA 序列及由其推导的氨基酸序列

个外显子(图 1 - B)。

2.2 铁皮石斛 *DobHLH96* 蛋白理化性质分析

ExPASy ProtParam 分析结果显示, *DobHLH96* 蛋白的分子式为 $C_{1357}H_{2174}N_{398}O_{417}S_{14}$, 分子量为 31.2 ku, 理论等电点为 6.51, 不稳定性指数为 82.59, 是不稳定蛋白。用 SPLIT 4.0 SERVER 在线软件对其亲疏水性、蛋白二级结构进行预测, 推测其为亲水性蛋白(图 3 - A), 其二级结构由 22.26%

α -螺旋、9.09% β -折叠构象延伸链和 68.65% 无规则卷曲组成(图 3 - B)。用 SWISS - MODEL 构建的 *DobHLH96* 蛋白的三级结构如图 3 - C 所示, 可见 *DobHLH96* 蛋白与植物转录因子 MYC2 的相似度为 31.25%。在 Pfam 上分析铁皮石斛 *DobHLH96* 蛋白的保守结构域, 结果显示, *DobHLH96* 蛋白具有 HLH 结构域(图 4), 属于 bHLH TFs 家族特有的基因结构域, 表明本研究克隆获得的基因为 *DobHLH96*。

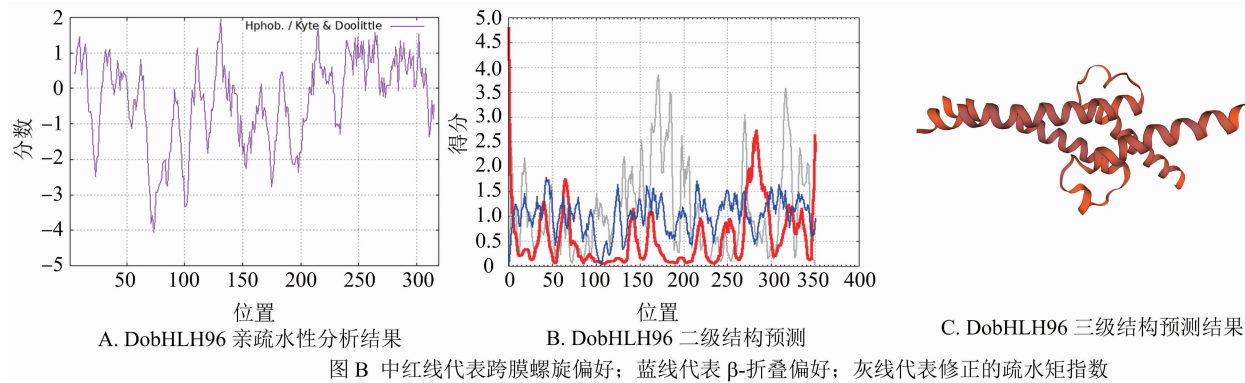


图3 *DobHLH96* 蛋白理化性质分析结果

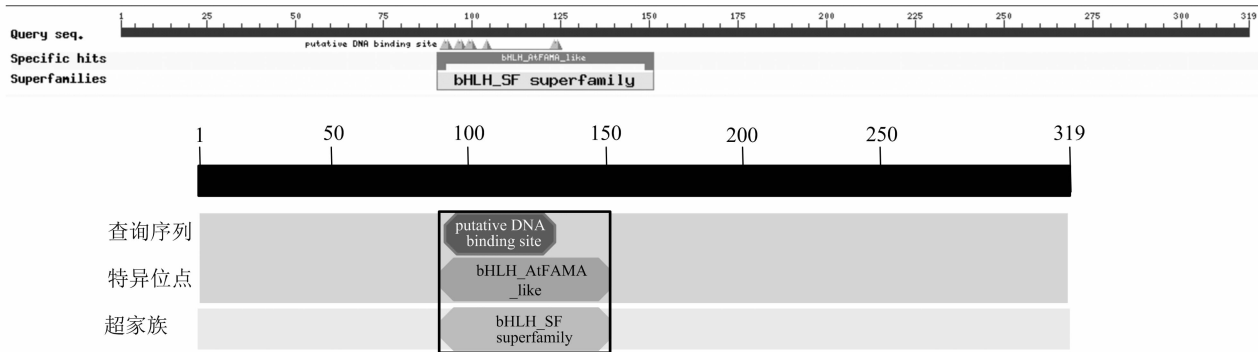


图4 *DobHLH96* 蛋白结构域预测分析结果

2.3 *DobHLH96* 蛋白的同源性和系统发育关系分析

在 NCBI 上利用 Blast P 对铁皮石斛的 bHLH96 氨基酸序列进行同源序列分析, 选择不同物种同源性较高的序列进行比对发现, 与其同源性最高的是鼓槌石斛(KAH0457194), 相似度为 96.5%, 其次是建兰(QDL88322.1), 相似度为 84.95%, 与小兰屿蝴蝶兰(XP_020572213.1)的相似度为 83.39%, 此外与海枣(XP_026662269.2)的相似度也较高。多重序列对比结果显示, *DobHLH96* 蛋白序列与其他植株的 bHLH 蛋白序列均在 88 ~ 139 的位置含有 HLH 结构域(图 5)。用 MAGA 11.0 构建进化树, 发现铁皮石斛 *DobHLH96* 蛋白与鼓槌石斛 bHLH 蛋白聚在同一分支(图 6), 表明其亲缘关系最近。

2.4 *DobHLH96* 的表达模式分析

为了研究 *DobHLH96* 在铁皮石斛不同组织中的表达情况, 从 NCBI 中下载 8 个铁皮石斛组织(花柱、花蕾、叶、唇瓣、灰白根、绿根尖、萼片和茎)的差异表达数据^[22]。结果显示, *DobHLH96* 在铁皮石斛的不同部位均有表达, 但是其相对表达量存在显著差异, 相对表达量排序为花蕾 > 花柱 > 萼片 > 叶 > 灰白根 > 唇瓣 > 茎 > 绿根尖(图 7)。

2.5 *DobHLH96* 在不同胁迫下的表达分析

bHLH 转录因子可响应多种非生物胁迫, 从而提高植株的抗逆性。启动子元件分析结果显示, *DobHLH96* 基因启动子序列中含有低温响应、干旱响应、水分胁迫响应以及 ABA 响应等元件(表 1)。因此, 对 *DobHLH96* 基因在低温、干旱和 ABA 处理

•DobHLH14

KAH7687386.1 参薯
KAH0457194.1 鼓槌石斛
XP_026662269.2 海枣
QDL88322.1 建兰
KAG2676639.1 美国山核桃
PKA60015.1 深圳拟兰
KAG0502841.1 香荚兰
XP_020572213.1 小兰屿蝴蝶兰
KAG1362046.1 椰子
XP_010919940.2 油棕
MQL84107.1 芋

```
MSIFMISSEF...VVF...TISAIP...EPHHQPLSFLETAGG...GCLSPES...AMIGSLQPPAGEQAPLISCAGACGRK 71
MSIBASISNEFFNLLINDS...SAPLATTNLLFNSTGLSLGFGNGDTGSGSSGGNGGG...ASFSSMMMHHGEFTSTVNGGDVKGQGRK 89
MSIFMISSEF...IAY...TISAIP...ELHHQPLSFLETAGG...GCLSQCS...SMIGSLFPFPAAGEQAPLISCAGACGRK 71
MTUBAASNELPTFLIYT...TISAIP...LHHPEASSTPSLLETAG...GGDGVSILG...LAHSAPAMLGGLABA...GGRK 72
MSIFMISSEF...IVVT...TISAIP...EVRHQHSPSLETAGG...GCLSPES...SMISLFPFPAAGEQAPLISCAGACGRK 71
MAIBASISNELFNFIYT...TISAIP...FSSHDSSETSELLENAMPPCNGGILENS...LMTQKRHCGRSC.VVERRQNLAVGGRK 81
MSIBA...LMVT...TISAIP...QTFLLEAAA...SDVLSLFPASVHES...VAGK 44
MSIFMISSEF...IVVT...TISAIP...ELDQHPSPSLETAGG...VSLER...PIVKGFPPLLAHPQPPFPCGAATGGRK 67
MSIFMISSEF...ILYT...TISAIP...EFHQQSPSLETAGG...GCLSPES...SMIGSLFPFPAAGEQAPLISCAGACGRK 71
MTUBAASNELPTFLIYT...TISAIP...LHQPASSCSLLETAGG...GGDGLSLG...VGHSPAMLGGLAVADSRPSTTAGGRK 81
MTUBAASNELPTFLIYT...TISAIP...LHHHEASSTPSLLETAGG...GGDGLSLG...FAHSAPAMLGGLAVADSRPSTTAGGRK 81
MTUBAASISNDFSSFFV...TISAIP...NPHHYFNPSFAALSAANATRGGDEGLKSAAGLPHAMLGSPMAEPSCSSTARGTAQTPSPAAGRK 94
```

•DobHLH14

KAH7687386.1 参薯
KAH0457194.1 鼓槌石斛
XP_026662269.2 海枣
QDL88322.1 建兰
KAG2676639.1 美国山核桃
PKA60015.1 深圳拟兰
KAG0502841.1 香荚兰
XP_020572213.1 小兰屿蝴蝶兰
KAG1362046.1 椰子
XP_010919940.2 油棕
MQL84107.1 芋

```
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 130
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 148
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 130
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 131
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 130
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 140
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 139
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 126
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 130
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 140
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 140
RRRFRRCCKKEAETCRTHIAVERNRRQMNHILAVLRSLMESVIG...GDCASIVG 153
```

HLH

•DobHLH14

KAH7687386.1 参薯
KAH0457194.1 鼓槌石斛
XP_026662269.2 海枣
QDL88322.1 建兰
KAG2676639.1 美国山核桃
PKA60015.1 深圳拟兰
KAG0502841.1 香荚兰
XP_020572213.1 小兰屿蝴蝶兰
KAG1362046.1 椰子
XP_010919940.2 油棕
MQL84107.1 芋

```
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...QRANASINCSGGGLMRTDDETE...CPFFQFFAPQINWFRHEYESP... 202
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...QQDHHHHHHQKVVDHDETE...VPFFQFFAPQINWSDRECOBE... 218
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...QRANASINCSGGGLMRTDDETE...CPFFQFFAPQINWFRHEYESP... 202
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...KGKAEKTPRIEPPGSSSNTDDTE...SPFFQFFAPQINWCHAPRDYEP... 203
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...QKASASINCSRLGSGNDETE...CPFFQFFAPQINWFRHEYESP... 202
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...GAELIIEEDATCKFR...CPFFQFFAPQINWCHAPRDYEP... 204
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...PKKVNQGOIPKMSITSGAINETESGAMGLKDEADVLPPFFQFFAPQINWCHAPRDYEP... 224
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...HESGICINESNGWISTEETI...LPFFQFFAPQINWCHAPRDYEP... 197
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...QKAVNCLNSGNGLKKSNEETE...CPFFQFFAPQINWFRHEYESP... 202
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...KSRAEKTPTEPR...TDETE...SPFFQFFAPQINWCHAPRDYEP... 208
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...KGKAEKTPRIEPPGSSSNTDDTE...SPFFQFFAPQINWCHAPRDYEP... 213
AIDFVKLBHLQLQLKRLQRIET...QRRMACGGGGPRIEDSTVAGGEGGL...PPFFQFFAPQINWCHAPRDYEP... 240
```

•DobHLH14

KAH7687386.1 参薯
KAH0457194.1 鼓槌石斛
XP_026662269.2 海枣
QDL88322.1 建兰
KAG2676639.1 美国山核桃
PKA60015.1 深圳拟兰
KAG0502841.1 香荚兰
XP_020572213.1 小兰屿蝴蝶兰
KAG1362046.1 椰子
XP_010919940.2 油棕
MQL84107.1 芋

```
..AFEIRSPAVADIEVILIEFHASIRLSSTTPCLIQVITGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 295
...SHRAPAMADIEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 309
..AFEIRSPAVADIEVILIEFHASIRLSSTTPCLIQVITGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 295
...PENRSVALVEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 294
..AFHNLSPAVADIEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 295
...MKTEDADIEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 295
..AACESRAPAVADIEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 318
...SFESRPTSPAVADIEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 289
..AFEIRSPAVADIEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 293
...PENRSVALVEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 299
...PENRSVALVEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 304
AGAVAPPTSPAVADIEVILIEFHANRILSRPCLIKLVIGLQALRISLHLVTTILSMVLISLKVVEEGGSLIVDIAAVHMLSLIEA 335
```

•DobHLH14

KAH7687386.1 参薯
KAH0457194.1 鼓槌石斛
XP_026662269.2 海枣
QDL88322.1 建兰
KAG2676639.1 美国山核桃
PKA60015.1 深圳拟兰
KAG0502841.1 香荚兰
XP_020572213.1 小兰屿蝴蝶兰
KAG1362046.1 椰子
XP_010919940.2 油棕
MQL84107.1 芋

```
ISISAVHQVFLDELSSSNPPLSF 319
ETQSNPQAQESVPL... 323
ISISAVHQVFLDELASSNPPLSF 319
EVSALSQ... 301
GTVFVDQVLPDGLGSPRLPLSF 319
EAVLY... 300
ETSAMRQAYHEEHVAASAPRPPLF 342
KVSATHQVQLDELASSPGPPLSF 289
EMSALSQ... 317
EVTALSQ... 306
EALSQ... 311
EALSQ... 341
```

下划实线—HLH结构域; KAH7687386.1—参薯(*Dioscorea alata*); KAH0457194.1—鼓槌石斛(*Dendrobium chrysotoxum*); XP_026662269.2—海枣(*Phoenix dactylifera*); QDL88322.1—建兰(*Cymbidium ensifolium*); KAG2676639.1—美国山核桃(*Carya illinoensis*); PKA60015.1—深圳拟兰(*Apostasia shenzhenica*); KAG0502841.1—香荚兰(*Vanilla planifolia*); XP_020572213.1—小兰屿蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*); KAG1362046.1—椰子(*Cocos nucifera*); XP_010919940.2—油棕(*Elaeis guineensis*); MQL84107—芋(*Colocasia esculenta*)

图5 DobHLH96 蛋白与其他物种 bHLH 蛋白的多重序列比对分析结果

下的表达模式进行分析,结果表明,随着时间的增加,*DobHLH96* 的相对表达量在低温处理下呈先下降后上升而后再下降的趋势,在处理后 6 h 达到最高值(图 8 - A)。在 ABA 处理下,*DobHLH96* 相对表达量的变化趋势与低温处理的变化趋势基本一致,同样是先下降后上升再下降,且相对表达量在处理 6 h 最高(图 8 - B),表明 *DobHLH96* 相对

表达量在 ABA 处理、冷胁迫处理下具有相同的表达模式;在干旱处理下,*DobHLH96* 相对表达量的变化趋势与 ABA 处理类似,其表达水平在处理 9 h 最高(图 8 - C)。

3 讨论

bHLH TFs 广泛存在于动植物中,其蛋白结构最

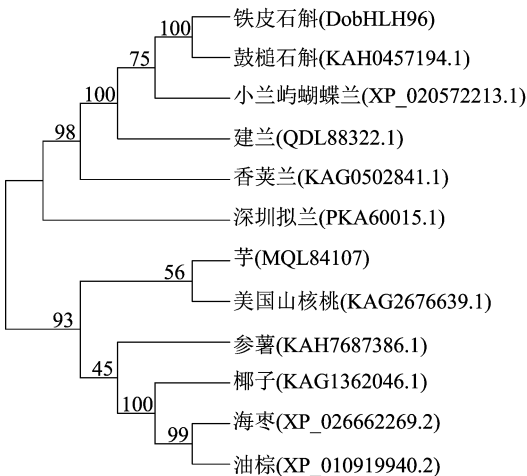
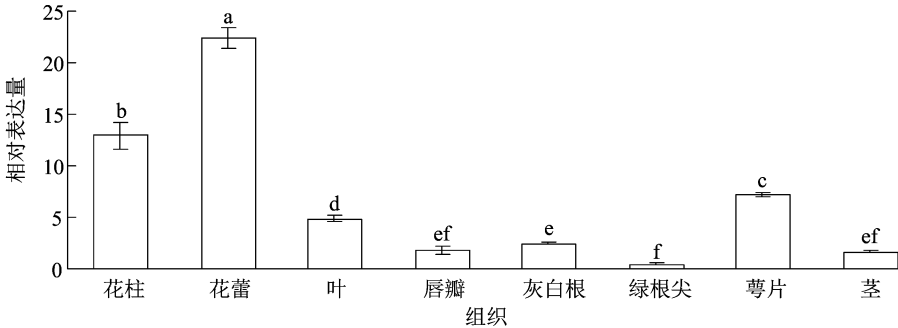


图6 不同植物中 bHLH 同源蛋白的系统进化树



不同组织间标有不同小写字母表示经 Duncan's 多重比较差异显著($P<0.05$)

图7 *DobHLH96* 基因在不同铁皮石斛组织中的相对表达量

表 1 *DobHLH96* 基因启动子元件分析

功能预测	元件名称	元件序列	数量(个)
组织特异表达	GATABOX	GATA	16
花粉特异表达	POLLEN1LELAT52	AGAAA	11
低温响应	MYCONSENSUSAT	CANNTG	16
	LTRECOREATCOR15	CCGAC	3
干旱、水分胁迫响应	LTRECOREATCOR15	CCGAC	3
	MYBIAT	WAACCA	2
	BOXIINTPATPB	ATAGAA	2
	CBFHV	RYCGAC	2
	DRECRTCOREAT	RCCGAC	1
ABA 响应	DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	3

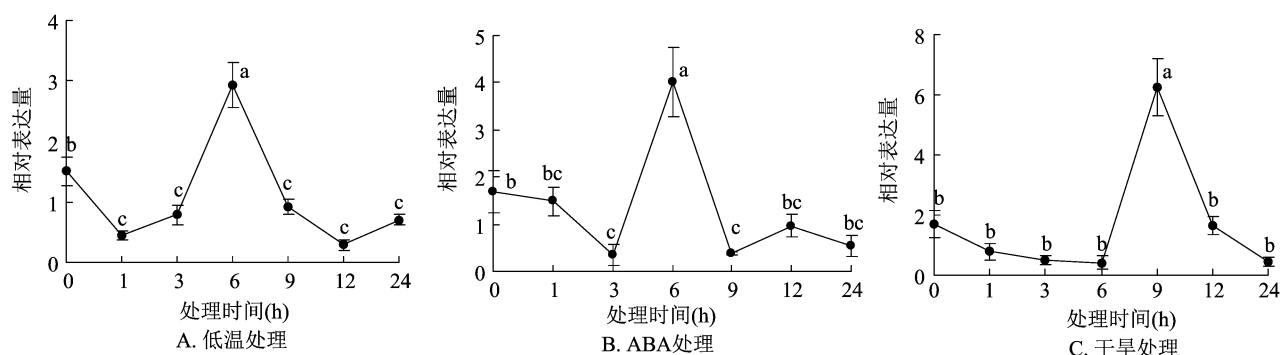
域时发现,该蛋白仅有 1 个 HLH 结构域,缺少碱性区域,属于 D 组的非典型 bHLH 蛋白。

bHLH TFs 在植物不同组织器官中的表达水平存在显著差异,具有不同的功能。管丽婷研究发现,火龙果(*Hylocereus undatus*) *HubHLH2* 基因主要在根中表达,而在茎、果实中的表达量较低^[25];甘蓝型油菜(*Brassica napus*) *BnbHLH122-1* 在各组织器

早于 1989 年在小鼠的肌肉中被发现并得到鉴定^[23],目前已在多种植物中被发现并得到鉴定,其蛋白功能特性大多数是通过在模式植物拟南芥中研究发现的^[4]。前人研究发现,真核生物中的 bHLH 家族成员分为六大类(A、B、C、D、E、F),6 组成员能与不同碱基序列特异性结合,例如 A 组能与 E - Box 核心序列特异性结合,E 组优先结合 CACGNG 序列,它们在生物体内发挥不同的生物学功能,其中 D 组缺少 1 个典型的碱性区域,被称为非典型的 bHLH 蛋白,主要与其他 bHLH 蛋白形成同源二聚体,从而抑制其转录活性^[24]。本研究克隆得到的 *DobHLH96* 的开放阅读框全长序列为 960 bp,编码 319 个氨基酸残基,但是预测保守结构

官中均有表达,从苗期到花期,在根、叶中的表达量升高,但在茎中的相对表达量始终较低^[26];烟草 *NbHLH112* 在叶中的相对表达量较高,尤其是在衰老叶片中的相对表达量最高,在根、花蕾中的相对表达量较低^[27]。本研究发现,*DobHLH96* 在花器官中的相对表达量最高,而在其他组织中的相对表达量较低,暗示该基因在调控铁皮石斛花器官的分化、生殖发育过程中发挥了重要作用。另外,顺式作用元件分析结果显示,*DobHLH96* 启动子序列中含有与花粉及其他组织特异表达相关的元件,因此推测 *DobHLH96* 基因编码非典型的 bHLH 蛋白可能与其他 bHLH 蛋白互动,在铁皮石斛开花和生殖发育过程中起着重要的调控作用。

bHLH TFs 在植物应对非生物胁迫的应答过程中具有重要的调控作用,其参与调控逆境的信号通路可以分为 3 种:独立于 ABA 的信号通路、依赖于 ABA 的信号通路以及 2 种信号通路相互重叠^[4]。以往的研究表明,ICE1 - CBF - COR 是植物抵御低温胁迫的主要信号转导途径^[28],如在柠檬(*Citrus × limon*)中异源过表达枳(*Poncirus trifoliata*) *PtrICE1*



不同时间处理间标有不同小写字母表示经 Duncan's 多重比较差异显著($P < 0.05$)

图8 *DobHLH96* 基因在低温、ABA 和干旱处理下的表达情况

基因能够提高转基因植株中的抗氧化酶活性,减少活性氧的积累,进而提高植株对低温的耐受性^[29];在烟草中过表达枳 *PtrbHLH* 基因能够显著增强植株内的 POD 活性,提高转基因植株在低温条件下的耐寒性^[30]。本研究发现,铁皮石斛 *DobHLH96* 基因在低温和 ABA 处理下的表达模式一致,暗示 *DobHLH96* 基因可能是通过依赖于 ABA 的信号通路响应低温胁迫。值得一提的是,本研究还在 *DobHLH96* 启动子序列中发现了 MYCCONSSENSUSAT (CANNTG) 元件,该元件为 ICE1 - CBF - COR 调控网络中 ICE1 能够识别并结合的 1 个关键序列^[31]。因此,推测 *DobHLH96* 基因可能在有 ABA 存在时通过 ABA 信号途径调控下游基因的表达,从而参与铁皮石斛低温胁迫应答过程。在没有 ABA 存在时,*DobHLH96* 可能通过 ICE1 - CBF - COR 低温信号途径抵御低温胁迫,但具体响应机制尚未可知。此外,前人研究发现,bHLH TFs 在干旱胁迫应答时主要通过调节 ABA 的敏感性、气孔开闭、叶毛状体和根毛的发育来增强植株对干旱的耐受性^[32]。例如在拟南芥中过表达苹果 (*Malus pumila*) bHLH 转录因子 *MdCIB1* 基因能通过提高脯氨酸含量、降低过氧化物积累及增强抗氧化酶活性来增强转基因植株的耐旱能力^[33];苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) *FtbHLH3* 基因在拟南芥中异源过表达,转基因植株能通过 ABA 依赖的信号途径正向调节干旱/氧化胁迫耐受性^[34];在水分胁迫下,外源 ABA 处理可提高甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 内源 ABA 含量,增强抗氧化酶活性^[35]。上述研究均证实,ABA 能通过感知和传递逆境信号,提高 ABA 的信号转导能力,进一步调控植株的抗逆性。本研究发现,*DobHLH96* 基因的表达明显受到低温、干旱和 ABA 处理的诱导,并且在 3 种处理下,

DobHLH96 的表达水平整体呈现相似的变化趋势。另外,*DobHLH96* 基因启动子序列含有与非生物胁迫、ABA、低温及脱水响应相关的顺式作用元件,提示 *DobHLH96* 基因可能通过 ABA 介导的信号途径来响应低温、干旱胁迫,但具体分子调控机制暂不明确。因此,今后应深入挖掘 *DobHLH96* 基因响应干旱和低温胁迫的分子调控机制,为铁皮石斛的遗传改良提供进一步的理论基础。

参考文献:

- [1] 张全琪,朱家红,倪燕妹,等. 植物 bHLH 转录因子的结构特点及其生物学功能[J]. 热带亚热带植物学报,2011,19(1):84-90.
- [2] 刘辉,李德军,邓治. 植物应答低温胁迫的转录调控网络研究进展[J]. 中国农业科学,2014,47(18):3523-3533.
- [3] Kazemitabar S K, Faraji S, Najafi - Zarrini H. Identification and in silico evaluation of bHLH genes in the *Sesamum indicum* genome: growth regulation and stress dealing specially through the metal ions homeostasis and flavonoid biosynthesis[J]. Gene Reports, 2020, 19:100639.
- [4] 朱璐璐,周波. bHLH 蛋白在植物发育及非生物胁迫中的调控[J]. 分子植物育种,2022,20(20):6750-6760.
- [5] Ariyaratne M A, Wone B W M. Overexpression of the *Selaginella lepidophylla* bHLH transcription factor enhances water - use efficiency, growth, and development in *Arabidopsis* [J]. Plant Science, 2022, 315:111129.
- [6] 张娇. 两个 bHLH 转录因子 (*AtLPL* 和 *AtLP2*) 在拟南芥细胞伸长生长中的功能研究[D]. 武汉:华中师范大学,2019:28-29.
- [7] Liu Y W, Li X, Li K W, et al. Multiple bHLH proteins form heterodimers to mediate CRY2 - dependent regulation of flowering - time in *Arabidopsis* [J]. PLoS Genetics, 2013, 9(10):e1003861.
- [8] 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,2020:31-34.
- [9] Zhang J H, Lü H Z, Liu W J, et al. bHLH transcription factor *SmbHLH92* negatively regulates biosynthesis of phenolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2020, 12(3):237-246.

- [10] Chen C, Liu F, Zhang K X, et al. MeJA - responsive bHLH transcription factor *LjbHLH7* regulates cyanogenic glucoside biosynthesis in *Lotus japonicus* [J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(8): 2650 - 2665.
- [11] Liu X, Pi B Y, Du Z Y, et al. The transcription factor *GmbHLH3* confers Cl⁻/salt tolerance to soybean by upregulating *GmCLCI* expression for maintenance of anion homeostasis [J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 194: 104755.
- [12] Wang F B, Zhu H, Chen D H, et al. A grape bHLH transcription factor gene, *VvbHLH1*, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2016, 125(2): 387 - 398.
- [13] Wang Y G, Wang S, Tian Y, et al. Functional characterization of a sugar beet *BvbHLH93* transcription factor in salt stress tolerance [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(7): 3669.
- [14] Zhao Q, Fan Z H, Qiu L N, et al. *MdbHLH130*, an apple bHLH transcription factor, confers water stress resistance by regulating stomatal closure and ROS homeostasis in transgenic tobacco [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 543696.
- [15] Yi K K, Wu Z C, Zhou J, et al. *OsPTFL*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice [J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 2087 - 2096.
- [16] Meng F W, Yang C, Cao J D, et al. A bHLH transcription activator regulates defense signaling by nucleo - cytosolic trafficking in rice [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62(10): 1552 - 1573.
- [17] Liu H, Yang Y, Liu D D, et al. Transcription factor *TabHLH49* positively regulates dehydrin *WZY2* gene expression and enhances drought stress tolerance in wheat [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 259.
- [18] Zhao Q, Xiang X H, Liu D, et al. Tobacco transcription factor *NtbHLH123* confers tolerance to cold stress by regulating the Nt CBF pathway and reactive oxygen species homeostasis [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 381.
- [19] 刘雪娜, 吴雪娇, 刘顺航, 等. 铁皮石斛的药理作用及其保健食品研发进展 [J]. 保鲜与加工, 2021, 21(10): 144 - 150.
- [20] 余文霞, 雷胄熙, 袁媛, 等. 铁皮石斛种质资源 DNA 身份证的构建及遗传相似性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 16 - 21.
- [21] 吴韵琴, 斯金平. 铁皮石斛产业现状及可持续发展的探讨 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 2033 - 2037.
- [22] Zhang G Q, Liu K W, Li Z, et al. The *Apostasia* genome and the evolution of orchids [J]. Nature, 2017, 549(7672): 379 - 383.
- [23] Murre C, Page - McCaw P S, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins [J]. Cell, 1989, 56(5): 777 - 783.
- [24] Hao Y Q, Zong X M, Ren P, et al. Basic helix - loop - helix (bHLH) transcription factors regulate a wide range of functions in *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13): 7152.
- [25] 管丽婷. 火龙果色素相关 bHLH 转录因子克隆及功能分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2019: 20 - 40.
- [26] 唐佳佳, 万云宝, 王茂林. 甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因的克隆、表达模式及胁迫响应分析 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 2021, 58(2): 180 - 188.
- [27] 孙晋浩, 牛文利, 陈志华, 等. 烟草 *NtbHLH112* 基因的克隆、鉴定及表达模式分析 [J]. 中国烟草科学, 2020, 41(5): 8 - 14.
- [28] Wang D Z, Jin Y N, Ding X H, et al. Gene regulation and signal transduction in the ICE - CBF - COR signaling pathway during cold stress in plants [J]. Biochemistry, 2017, 82(10): 1103 - 1117.
- [29] Huang X S, Zhang Q H, Zhu D X, et al. *ICE1* of *Poncirus trifoliata* functions in cold tolerance by modulating polyamine levels through interacting with arginine decarboxylase [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(11): 3259 - 3274.
- [30] Huang X S, Wang W, Zhang Q, et al. A basic helix - loop - helix transcription factor *PtrbHLH* of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates pod - mediated scavenging of H₂O₂ [J]. Plant Physiology, 2013, 162(2): 1178 - 1194.
- [31] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. *ICE1*: a regulator of cold - induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Genes & Development, 2003, 17(8): 1043 - 1054.
- [32] Castilhos G, Lazzarotto F, Spagnolo - Fonini L, et al. Possible roles of basic helix - loop - helix transcription factors in adaptation to drought [J]. Plant Science, 2014, 223(130): 1 - 7.
- [33] Ren Y R, Yang Y Y, Zhao Q, et al. *MdCIB1*, an apple bHLH transcription factor, plays a positive regulator in response to drought stress [J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 188: 104523.
- [34] Yao P F, Li C L, Zhao X R, et al. Overexpression of a tartary buckwheat gene, *FtbHLH3*, enhances drought/oxidative stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 625.
- [35] 李长宁. 水分胁迫下外源脱落酸提高甘蔗抗旱性的机理研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2012: 67 - 70.