

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2019.50610

徐秀荣, 杨克彬, 王思宁, 高志民. 毛竹 bHLH 转录因子的鉴定及其在干旱和盐胁迫条件下的表达分析[J]. 植物科学学报, 2019, 37(5): 610-620

Xu XR, Yang KB, Wang SN, Gao ZM. Identification of bHLH transcription factors in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and their expression analysis under drought and salt stress[J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(5): 610-620

毛竹 bHLH 转录因子的鉴定及其在干旱和盐胁迫条件下的表达分析

徐秀荣, 杨克彬, 王思宁, 高志民*

(国际竹藤中心竹藤资源基因科学研究所, 国家林业局/北京市竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: 以毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie) 为材料, 利用生物信息学方法, 在基因组水平上对其 bHLH 基因家族成员进行鉴定和分析, 并对不同组织中该基因的表达模式以及部分基因在干旱和高盐胁迫条件下的表达情况进行研究。结果显示: 在毛竹中共鉴定出 153 个具有完整保守结构域的 bHLH 基因家族成员 (*PebHLH001* ~ *PebHLH153*), 这些基因内含子数量为 0 ~ 14, 其中 137 个基因的启动子均含有与干旱、盐胁迫相关的顺式作用元件; *PebHLHs* 编码的蛋白长度为 134 ~ 1401 aa; bHLH 家族成员的系统进化分析结果表明, 153 个 *PebHLHs* 可被分为 17 个亚类, 其中 C 亚类的成员数量最多, 为 42 个; 基于转录组数据的表达谱分析结果发现, 有 151 个 *PebHLHs* 在毛竹不同组织和不同生长发育时期有不同程度的表达量; 实时荧光定量 PCR 实验结果显示, 在干旱和盐胁迫处理后, 分别有 14 和 13 个 *PebHLHs* 基因的表达量上调, 分别有 2 和 3 个表达量下调, 但表达模式存在一定差异, 说明他们在应答干旱和盐胁迫过程中可能发挥不同的作用。

关键词: 毛竹; bHLH 基因家族; 基因鉴定; 胁迫; 表达分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)05-0610-11

Identification of bHLH transcription factors in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and their expression analysis under drought and salt stress

Xu Xiu-Rong, Yang Ke-Bin, Wang Si-Ning, Gao Zhi-Min*

(State Forestry Administration/Beijing Key Open Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Institute of Gene Science for Bamboo and Rattan Resources, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: The transcription factors of the bHLH family have important regulatory effects on plant growth and development. Here, *Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie was used as experimental material to understand the characteristics of bHLH family members in bamboo and explore their expression patterns under adverse conditions. Bioinformatics were used to identify and systematically analyze the bHLH family members at the genomic level, and their expression patterns in different tissues and expression of several bHLH genes under high salt and drought stress conditions were further analyzed. Our results identified 153 bHLH transcription factor genes (*PebHLH001* – *PebHLH153*) with complete conserved domains in

收稿日期: 2019-02-15, 退修日期: 2019-03-17。

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2015BAD04B0101)。

This work was supported by a grant from the Sub-Project of the National Science and Technology Support Plan of the Twelfth Five-Year in China (2015BAD04B0101)。

作者简介: 徐秀荣(1990-), 女, 博士研究生, 研究方向为林木遗传育种(E-mail: xuxiurong@icbr.ac.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn)。

Ph. edulis. The number of introns in *PebHLHs* ranged from 0 to 14. The drought and salt stress related *cis*-acting elements were found in the promoters of 137 *PebHLHs*. The length of the proteins encoded by *PebHLHs* ranged from 134 aa (*PebHLH005*) to 1401 aa (*PebHLH083*) with molecular weights of 13.4 to 152.6 kD, respectively. Based on phylogenetic analysis of bHLHs in *Ph. edulis* and *Oryza sativa* L., 153 *PebHLHs* were clustered into 17 subgroups, with the C subgroup containing the highest number (42). According to expression profile analysis of transcriptome data, 151 *PebHLHs* exhibited different expression levels in different tissues and growth stages of *Ph. edulis*. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) showed that 14 *PebHLHs* were up-regulated and two *PebHLHs* were down-regulated after drought stress, whereas 13 were up-regulated and three were down-regulated after salt stress. However, there were some differences in the expression patterns of 16 *PebHLHs*, indicating that they may play different roles in response to drought and salt stress.

Key words: *Phyllostachys edulis*; bHLH gene family; Gene identification; Stress; Expression analysis

碱性螺旋-环-螺旋蛋白 (Basic helix-loop-helix, bHLH) 家族作为植物中重要的转录因子家族之一, 在植物的生长发育和胁迫应答中具有重要作用^[1]. bHLH 结构域是该家族转录因子特有的结构域, 大约含有 50 ~ 60 个氨基酸残基, 由 basic 区域和 HLH 区域两部分组成。basic 区域位于 bHLH 结构域的 N 端且含有 13 ~ 17 个氨基酸, 其中约 6 个为碱性氨基酸, 具有 DNA 顺式元件 E-box (5'-CANNTG-3') 的识别和结合位点; HLH 区域位于 bHLH 结构域的 C 端, 由两个既亲水又亲脂的螺旋及螺旋之间的环状结构, 形成螺旋-环-螺旋结构, 其主要作用是促进蛋白之间的相互作用形成同源或异源二聚体, 并与基因启动子区域的 E-box 元件相互作用^[2-4]。

研究发现, 在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中有 167 个 bHLH 转录因子家族成员^[5]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) 有 162 个^[6]、大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis* (Lour.) Ols-son) 有 230 个^[7]、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) Roem. Et Schult) 有 146 个^[8]、苹果 (*Malus × domestica* Borkh 'Golden Delicious') 有 175 个^[9]等。研究表明, bHLH 在植物中该可能参与了生长发育和形态建成, 如调控胚胎发育^[10]、影响果实开裂^[11]、控制雌蕊发育^[12]和花粉粒形成^[13]等, 也能对生物和非生物胁迫进行应答反应, 特别是应对干旱、高盐、低温等非生物胁迫的响应。如西瓜 (*Citrullus lanatus* L.) 中有 8 个 *ClabHLHs* 基因的表达受低温胁迫的诱导, 有

13 个受 ABA 胁迫的诱导, 14 个受盐胁迫的诱导^[14]; 在茶 (*Camellia sinensis* L.) 中有 39 个 *Cs-bHLHs* 在干旱和高温胁迫下表达量上升, 表明这些基因可以响应干旱和高温胁迫^[15]。此外, 在拟南芥中过量表达小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的 *TabHLH39* 可增强转基因拟南芥的抗旱性、耐盐性及抗冻性^[16], 而葡萄 (*Vitis vinifera* L.) *VvbHLH1* 不仅能促使转基因拟南芥中黄酮类物质的积累, 同时还可以通过 ABA 信号的积累提高转基因植株的耐盐性和耐旱性^[17]。

竹子是禾本科 (Poaceae) 竹亚科 (Bambusoideae) 植物, 具有材性好、成材快、产量高等特点, 是填补木材供给短缺的重要材料来源之一。我国是全世界竹种资源最丰富的国家, 但其主要分布在南方的热带、亚热带地区, 北方的低温、干旱、盐碱等条件严重限制了竹子的栽培与应用。为了扩大竹子的栽培面积, 针对竹子已开展了一些研究, 涉及到组织解剖、生理生化、分子遗传等各个方面, 并取得了良好的进展, 其中竹子的分子生物学研究近年来已成为热点。继毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie) 基因组草图发表以来^[18], 已从全基因组水平对包括 WRKY^[19, 20]、AP2/EREBP^[21] 和 MYB^[22] 等在内的多种抗逆相关转录因子开展了相关研究^[23-25], 但有关 bHLH 转录因子家族的研究相对较少。因此, 本研究以毛竹为实验材料, 利用生物信息学手段对其 bHLH 转录因子家族的成员进行了系统分析, 利用转录组数据对 bHLH 基因在不同组织和不同生长发育时期的基因

表达情况进行分析。在此基础上, 对于干旱和盐胁迫处理下, 16 个 bHLH 基因在毛竹叶片中的表达情况进行了研究, 以期全面了解毛竹 bHLH 转录因子的分子特征, 解析其在竹子响应逆境胁迫过程中的作用机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 毛竹 bHLH 转录因子家族成员的鉴定

利用已发表的水稻 bHLH 氨基酸序列^[5]为探针, 在 PLAZA4.0 软件中根据序列同源性进行 Blast 搜索, 从而获得毛竹 bHLH 候选基因。利用 Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/Pfam/>) 数据库及 NCBI 的 CDS 两种搜索工具鉴定候选序列中保守结构域的完整性^[26], 剔除保守结构域不完整的 bHLH, 最终获得毛竹 bHLH 家族成员的相关序列, 并进行编号。

1.2 毛竹 bHLH 基因核苷酸序列分析

利用在线软件 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 分析毛竹 bHLH 家族的基因结构^[27]。另下载毛竹 bHLH 基因编码区 5' 端上游 2000 bp 的序列, 以此区域作为启动子^[28]。利用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线分析毛竹 bHLH 基因启动子区域的顺式作用元件^[29]。

1.3 毛竹 bHLH 蛋白序列分析

使用 ExPaSy (<http://www.expasy.org/>) 在线工具对毛竹 bHLH 家族成员进行蛋白质分子量、等电点等基本参数的分析^[30]。利用 MEME (<http://meme-suite.org>) 在线软件对毛竹 bHLH 序列的保守元件进行预测分析^[31]。

1.4 毛竹 bHLH 的系统进化分析

利用 Clustal W 工具对毛竹和水稻 bHLH 家族的氨基酸序列进行多重比对分析。利用 MEGA 7.0 软件, 使用邻接法(使用系统默认值)构建系统发育进化树, 重复次数设置为 1000 次。

1.5 毛竹 bHLH 基因在不同组织的表达分析

利用本实验室前期获得的毛竹转录组数据^[18]分析 bHLH 基因的组织表达模式。以 bHLH 基因的 RPKM (Reads per kilobase per million mapped reads) 值表示基因的表达丰度。为方便

统计, 对每个表达数值取以 2 为底数的对数 ($\log_2$), 经均一化后使用 Matrix2png 软件绘制基因表达热图。

1.6 毛竹 bHLH 基因在干旱和盐胁迫下的表达分析

将毛竹实生苗在温度 25℃、光周期为光 16 h/暗 8 h 的条件下培养。以长势一致的两个月的毛竹实生幼苗为材料, 分别用 250 mmol/L NaCl 溶液和 20% PEG 6000 溶液灌溉至基质饱和, 进行盐和干旱胁迫处理。在处理 0、1、3、6、12、24 h 采集毛竹叶片, 液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱保存, 用于基因表达分析。每个处理至少有 10 株幼苗, 重复 3 次。采用 Trizol 法提取毛竹叶片的总 RNA, 反转录合成 cDNA 后, 于 -20℃ 冰箱保存、备用。

在综合分析毛竹 bHLH 基因启动子顺式作用元件的基础上, 选取 16 个启动子富含逆境胁迫应答顺式作用元件且在叶片中表达量较高的基因, 进行基因定量表达分析。使用 Primer 5 软件设计定量 PCR 引物(表 1)。PCR 反应体系为 10 μ L, 包括: 2 $\times$ SYBR II Green 1 Master 5.0 μ L; 正、反向引物各 0.3 μ L (10 μ mol/L); cDNA 模板 1.0 μ L; H₂O 3.4 μ L。两步法进行 PCR 扩增, 程序为: 95℃ 预变性 6 min; 95℃ 变性 10 s, 62℃ 退火 10 s, 共 40 个循环。同时以 *PeNTB* 基因为内参^[32], 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量^[33]。

2 结果与分析

2.1 毛竹 bHLH 转录因子家族成员的鉴定

本研究经 Blast 搜索, 在毛竹基因组中找到 168 条 bHLH 候选序列, 共获得具典型 bHLH 结构域的同源基因 153 个, 依次命名为 *PebHLH001* ~ *PebHLH153*。序列分析结果显示, 预测 *PebHLHs* 编码的蛋白序列差异较大, 长度为 134 (*PebHLH005*) ~ 1401 (*PebHLH083*) aa, 对应分子量为 13.4 kD ~ 152.6 kD, 理论等电点 pI 为 4.52 (*PebHLH132*) ~ 10.13 (*PebHLH024*)。蛋白亲疏水性分析发现, 平均疏水值在 -0.014 ~ -0.876 间, 表明大多数 *PebHLHs* 属于亲水蛋白, 但亲水性存在一定差异, 亲水性最强的是 *PebHLH051*, 最弱的是 *PebHLH043*。

表 1 实时定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences used in real-time quantitative PCR

基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>PebHLH011</i>	CATTTCGGCTACGGGTCG	CTCCGCACTGGGCACAAC
<i>PebHLH035</i>	AGCTCTGCGCAACTCATGGCT	CGGCCTCTCCACGCTGCATA
<i>PebHLH045</i>	CCGTTCGCCAGATTCTTCG	CCGCCCTCACC GTTACCA
<i>PebHLH062</i>	CAAGTAGCGCATCTTTGCTTAAG	AGCTCGATGAGATCAAACCTGAG
<i>PebHLH067</i>	CCTCTTCGCGTCCAGCACCA	GCTCCTGCCGTCTGAAGCTGA
<i>PebHLH072</i>	CAGCCGTGGCGAGACACTT	CAGCTCTGGTAATGGCGAATGA
<i>PebHLH074</i>	TGGGTGCGAATCAGGCG	TGATTCCCAGTAAAAGCAGCAC
<i>PebHLH095</i>	TCTCGCTCCACACCGGAGGT	GTTGCGCTGCTTGCCAGTT
<i>PebHLH100</i>	GGCCTACGCACCGTCGTCTT	GCTCGACGCGGAAGGCAGAT
<i>PebHLH102</i>	AGTCGTCCAATGCCACCG	TGATCCTCCCTGCACAAACG
<i>PebHLH110</i>	CCGCGGCTTCCAACACCTG	TGGAGCTTGGTTGAGCACCCT
<i>PebHLH112</i>	CGGAGTGCACTGGTGGTGCT	GTGCAGCCGCAGTTGCCAAT
<i>PebHLH115</i>	AACGTCTCGCGCCTGCAGAA	ACGAGCAGGAGGGCCATAGG
<i>PebHLH123</i>	TGACCCAGCATCAAGCACCTT	GGACACGTCGTGGAATGTTCCCT
<i>PebHLH124</i>	CCGCCGGAGAGGAGAACGAC	CGAGCAGCGCGTCGTTGATG
<i>PebHLH140</i>	TCAAGTGCGCACCGAGCAGT	TGCCAGGATTTGGCGTGCT
<i>PeNTB</i>	TCTTGTTTGACACCGAAGAGGAG	AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT

2.2 毛竹 bHLH 转录因子家族成员基因结构及蛋白保守结构域

本研究发现，*PebHLHs* 的基因长度差异较大，最长为 2952 bp (*PebHLH039*)，最短为 405 bp (*PebHLH034*)；内含子数为 0 ~ 14 个，其中有 12 个基因 (7.84%) 没有内含子，有 94 个基因 (61.43%) 内含子数≤5 (图 1: A)。进化关系相近的成员间通常具有相似的外显子/内含子模式，即外显子的数量、位置和长度均相近。蛋白基序预测结果表明，毛竹 bHLH 蛋白家族成员共包含 15 个未知基序(图 1: B)，每个蛋白序列均含有保守基序 4 和 5，且都位于 HLH 结构域，推测这两个基序可能与 HLH 结构域的功能密切相关。

2.3 毛竹 bHLH 系统进化分析

研究表明，毛竹与水稻同属于禾本科，在进化上其亲缘关系较近，而且水稻作为单子叶模式植物，对其 bHLH 家族已进行了比较深入的研究，其 167 个 *OsbHLHs* 被分为了 22 个亚类^[5]。本研究利用水稻和毛竹的 bHLH 氨基酸序列，构建了系统进化树，结果表明(图 2)，与水稻的 22 个亚类相比较，毛竹 153 个 *PebHLHs* 成员分布在 17 个亚类中，其中两个物种都是 C 亚类的成员数量

最多，B、I 和 Q 亚类中毛竹的成员数量较少，仅为 1 个；而 G、H、J、O 和 T 这 5 个亚类中不包含毛竹 bHLH 家族成员。

2.4 毛竹 *PebHLHs* 在不同组织中的表达分析

本研究利用转录组数据对毛竹 *PebHLHs* 在不同组织中的表达模式进行了分析，结果显示(图 3)，153 个 *PebHLHs* 在毛竹不同组织之间的表达存在明显差异。其中 151 个 *PebHLHs* 在毛竹不同组织和不同生长发育时期有不同程度的表达，而 *PebHLH130* 和 *PebHLH148* 没有检测到基因表达。另外，A、E、N 和 U 4 个亚类的 *PebHLHs* 主要在花序中表达，在笋中的表达量相对较低或未检测到表达；而 K 和 V 亚类的大部分基因在笋中的表达量相对较高。bHLH 家族成员的表达差异，表明不同 *PebHLHs* 在毛竹不同组织和不同发育阶段可能发挥不同的作用。

2.5 干旱和盐胁迫下毛竹叶片中 *PebHLHs* 的表达分析

毛竹 *PebHLHs* 上游启动子序列分析结果表明，137 个 *PebHLHs* 基因的启动子均含有与干旱、盐和低温等胁迫相关的作用元件，其中有 94 个(62%)富含响应干旱和盐胁迫的顺式作用元件，

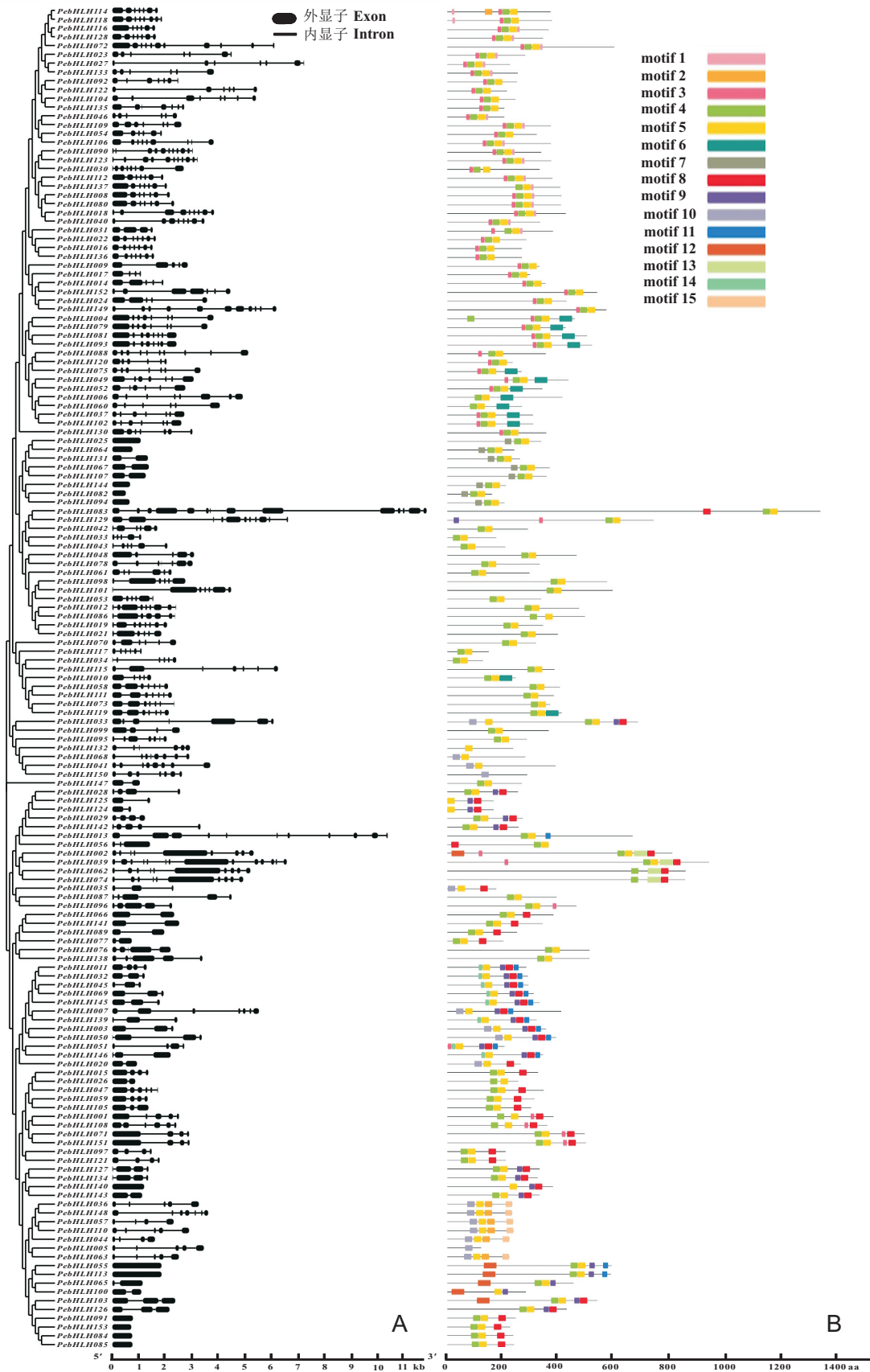
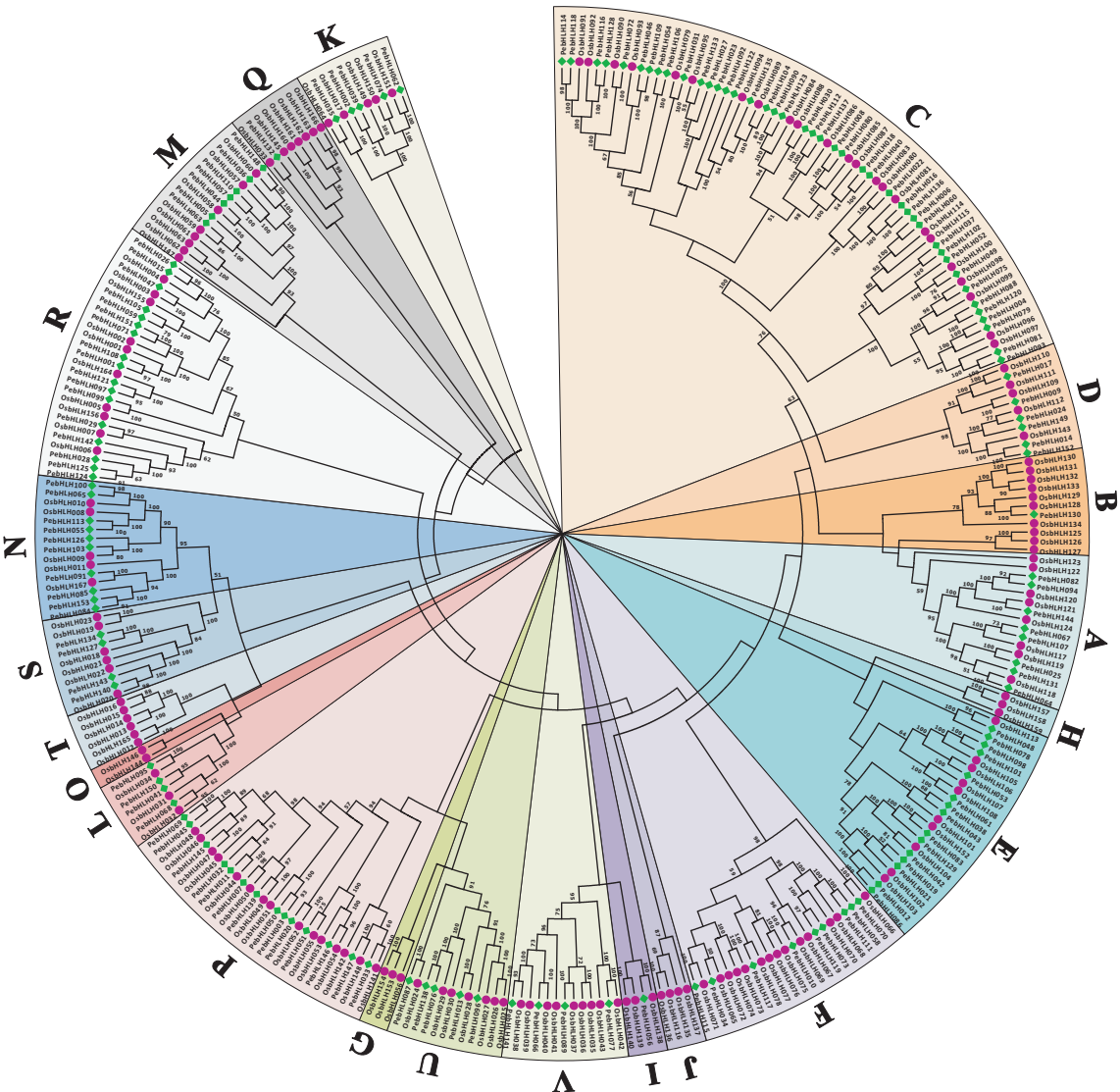


图 1 毛竹 bHLH 家族基因结构 (A) 和蛋白保守基序 (B)

Fig. 1 Gene structure (A) and conserved protein motif (B) of bHLH family in *Phyllostachys edulis*



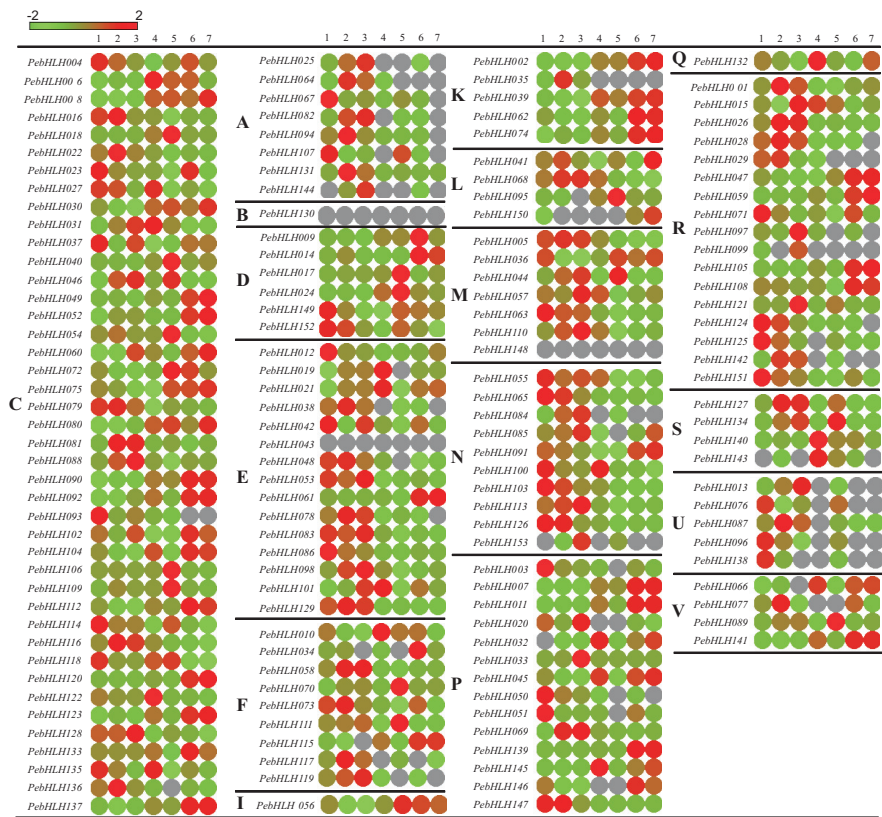
分枝上的数字表示自展值。Pe：毛竹；Os：水稻；A ~ U：代表不同亚类。
Numbers on major branches indicate bootstrap estimates for 1000 replicate analyses. Pe: *Phyllostachys edulis*; Os: *Oryza sativa*; A~U: represent different subgroups, respectively.

图2 毛竹与水稻 bHLH 转录因子的系统进化分析
Fig. 2 Phylogenetic analysis of bHLH transcription factors in *Phyllostachys edulis* and *Oryza sativa*

如 LTR、TC-rich repeats 和 MBS 等(表 2)。为了探究毛竹 *PebHLHs* 在干旱和盐胁迫条件下的表达模式，本研究结合转录组表达谱数据(图 3)，选取了 16 个在叶片中相对表达量较高的 *PebHLHs*，进行干旱和盐胁迫条件下的表达分析。

研究结果显示，在干旱胁迫条件下，*Pe-bHLH110* 和 *PebHLH124* 的表达模式相似，呈先下降后上升再下降的趋势，在 24 h 时的表达量均低于对照(图 4)。其他 14 个 *PebHLHs* 的表达量最终呈上调的趋势，其中除 *PebHLH102* 以外，其他基因的表达量在处理前期(12 h 之前)均发生明显变化，各基

因表达量的最大值约为对照的 2~7 倍，但在不同基因中最大值出现的时间存在一定差异，如 *PebHLH011* 和 *PebHLH045* 在处理 1 h 就达到了最大值；*Pe-bHLH100* 和 *PebHLH124* 在处理 6 h 达到最大值。14 个 *PebHLHs* 表达量的变化呈 4 种基本变化趋势(图 4)，即持续上升(*PebHLH112* 和 *PebHLH123*)、先上升后下降(*PebHLH067* 和 *PebHLH140*)、先上升后下降再上升(*PebHLH011*、*PebHLH45*、*Pe-bHLH062*、*PebHLH072*、*PebHLH074*、*PebHLH095*、*PebHLH100* 和 *PebHLH115*)和先下降后上升(*Pe-bHLH035* 和 *PebHLH102*)。



1: 叶片; 2: 早花期花序; 3: 盛花期花序; 4: 地下茎; 5: 根; 6: 20 cm 笋; 7: 50 cm 笋。从绿色到红色代表基因表达水平从低到高, 灰色代表在该组织中未检测到基因表达。A~U: 代表不同亚类。
1: Leaves; 2: Early panicles; 3: Advanced panicles; 4: Rhizomes; 5: Roots; 6: 20 cm shoots; 7: 50 cm shoots. Green to red indicates gene expression levels from low to high, respectively. Gray represents no expression detected in tissue. A~U: Represent different subgroups, respectively.

图 3 *PebHLHs* 在毛竹不同组织中的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of *PebHLHs* in different tissues of *Phyllostachys edulis*

表 2 16 个 *PebHLHs* 基因启动子序列中与干旱和盐胁迫相关的顺式作用元件分析

Table 2 Analysis of *cis*-acting elements related to drought and salt stress in promoter regions of 16 *PebHLHs*

基因名称 Gene name	低温应答元件 Low-temperature responsive element (LTR)		TC 富集重复 TC-rich repeat		MYB 结合位点 MYB binding site (MBS)	
	序列 Sequence	数量 No.	序列 Sequence	数量 No.	序列 Sequence	数量 No.
<i>PebHLH011</i>					CAACTG	2
<i>PebHLH035</i>	CCGAAA	1	ATTCTCTAAC	1		
<i>PebHLH045</i>	CCGAAA	1				
<i>PebHLH062</i>					CAACTG	3
<i>PebHLH067</i>	CCGAAA	1			CAACTG	1
<i>PebHLH072</i>			ATTCTCTAAC	1		
<i>PebHLH074</i>	CCGAAA	2	GTTTCTTAC	1		
<i>PebHLH095</i>			ATTCTCTAAC	1	CAACTG	3
<i>PebHLH100</i>			ATTCTCTAAC	1		
<i>PebHLH102</i>	CCGAAA	2	ATTCTCTAAC	1	CAACTG	2
<i>PebHLH110</i>	CCGAAA	1	GTTTCTTAC	1		
<i>PebHLH112</i>	CCGAAA	1			CAACTG	1
<i>PebHLH115</i>	CCGAAA	3				
<i>PebHLH123</i>			ATTCTCTAAC	2	CAACTG	2
<i>PebHLH124</i>	CCGAAA	1				
<i>PebHLH140</i>			GTTTCTTAC	1		

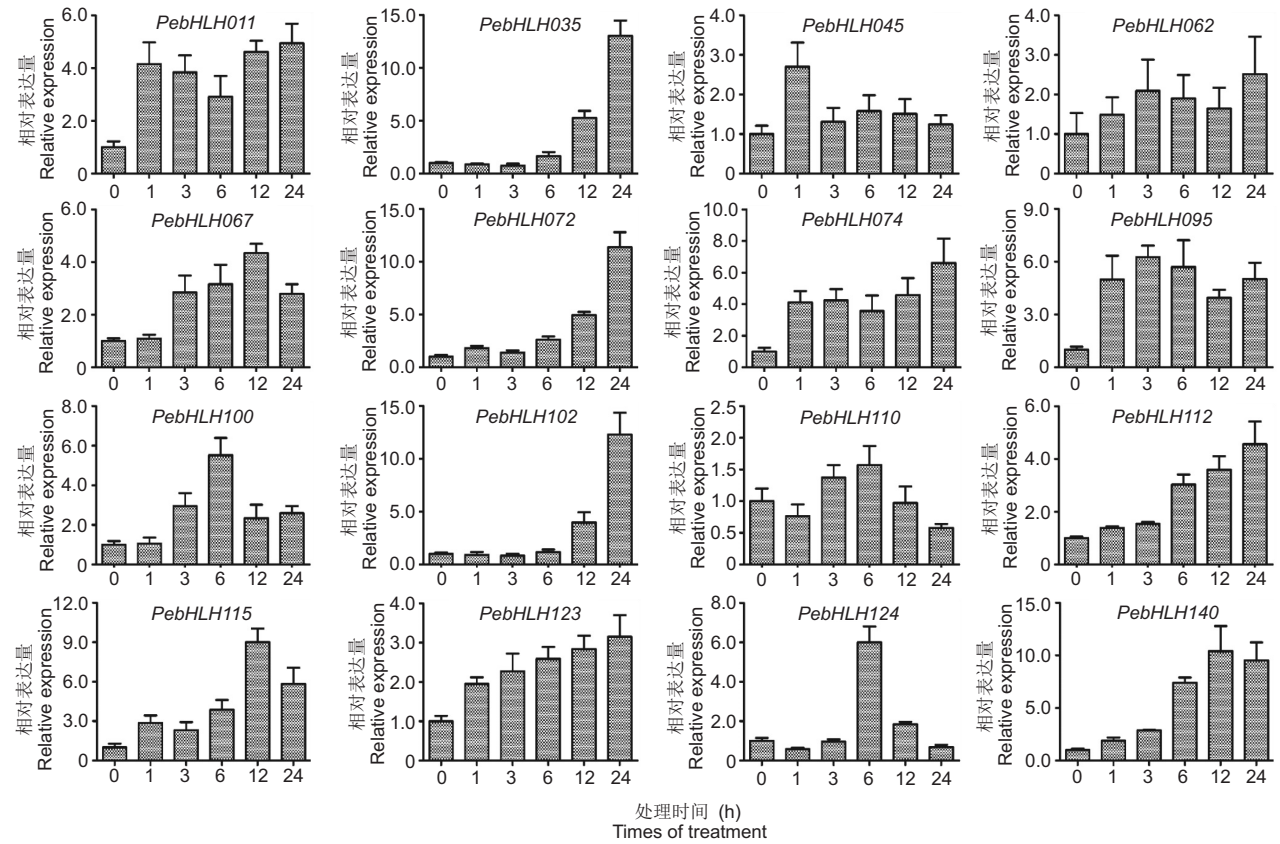


图4 干旱胁迫条件下毛竹叶片中 *PebHLHs* 的表达模式
Fig. 4 Expression profiles of *PebHLHs* in leaves of *Phyllostachys edulis* under drought stress

在盐胁迫处理条件下，有 13 个基因的表达最终呈现出上调的趋势(图 5)，其中 4 个基因的表达量持续上升(*PebHLH062*、*PebHLH072*、*PebHLH110* 和 *PebHLH112*)；6 个基因的表达量为先上升后下降 (*PebHLH035*、*PebHLH074*、*PebHLH095*、*PebHLH102* 和 *PebHLH140*)；4 个基因的表达量呈先上升后下降再上升的变化规律 (*PebHLH011*、*PebHLH067*、*PebHLH100* 和 *PebHLH115*)。另外，*PebHLH045* 和 *PebHLH123* 的表达量均呈先上升后下降的趋势，且最终表达量均低于对照；而 *PebHLH124* 则为先下降后上升、再下降再上升，最终表达量降低，24 h 时的表达量约为对照的 16%。

3 讨论

毛竹基因组的发表与应用^[18, 34, 35]，对从基因组水平鉴定转录因子家族成员的特点提供了便利。根据 bHLH 转录因子特有的保守结构域，本研究通过生物信息学方法，利用已有毛竹基因组数据

库，并结合毛竹重测序获得的数据^[35]，共鉴定出 153 个 *PebHLHs*，比前人报道的 137 个^[36]增加了 16 个，但仍然少于水稻的 167 个^[5]。系统进化树分析结果表明，与水稻相比，毛竹 bHLH 家族成员并没有分布在所有亚类中，有 5 个亚类中没有毛竹 bHLH 家族的成员，推测这可能是毛竹进化成现代二倍体的过程中发生了基因的丢失。另外，毛竹在 C 亚类中的 bHLH 成员数量最多，这与水稻^[5]、拟南芥^[6]和苹果^[9]的聚类结果相似，该亚类转录因子的功能主要被预测为逆境响应和参与依赖 ABA 的信号传导^[14]。本研究中毛竹 C 亚类的 4 个基因 (*PebHLH072*、*PebHLH102*、*PebHLH112* 和 *PebHLH123*) 在干旱和盐胁迫过程中的表达变化支持了这一推测。毛竹 bHLH 家族在 B、I 和 Q 亚类中的成员数量最少，仅为 1 个，说明该亚类内的成员进化速度相对缓慢，推测这些基因在功能上相对比较保守^[7]，可能对毛竹的生长发育有着非常重要的调控作用。

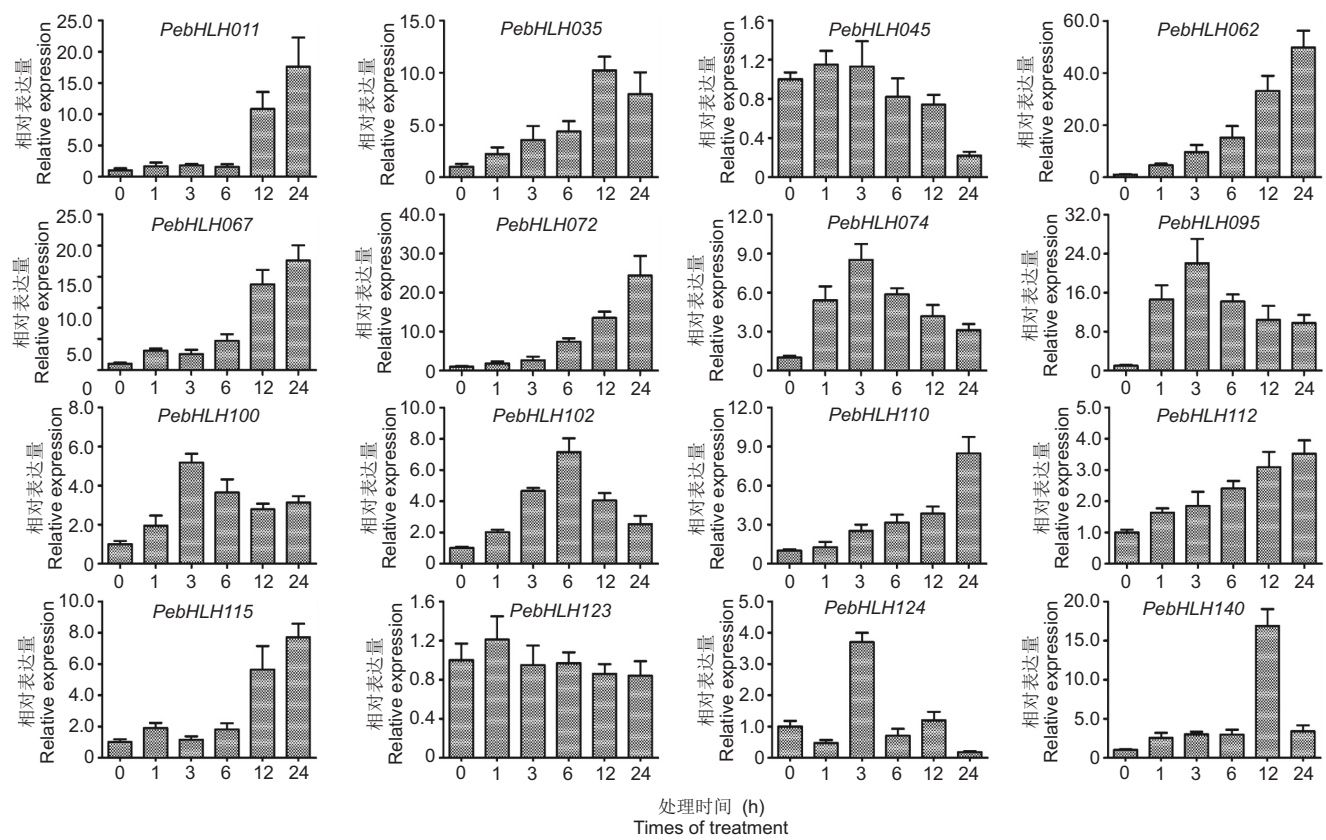


图 5 盐胁迫下毛竹叶片中 *PebHLHs* 基因的表达模式
Fig. 5 Expression profiles of *PebHLHs* in leaves of *Phyllostachys edulis* under salt stress

基因的表达模式是反映基因功能的一个主要方面。本研究转录组表达谱分析结果显示，有 151 个 *PebHLHs* 在毛竹不同组织和不同生长发育时期有不同程度的表达，表明他们在毛竹中功能的多样性。*PebHLHs* 上游启动子序列中富含多种环境胁迫应答相关的作用元件，表明其功能受到环境的影响。干旱和盐胁迫处理后，毛竹叶片中同一基因表达的差异以及不同 *PebHLHs* 基因间表达量的差异进一步说明 *PebHLHs* 功能的多样性和复杂性。此外，在植物体内 bHLH 基因的表达是一个复杂的调控网络，bHLH 启动子区域内含有 bZIP 特异性识别的 ABRE 元件间接参与 ABA 信号通路。在香杨 (*Populus koreana* Rehder) 中 PkbHLH2 作为 PkbZIP2 下游的转录因子，通过 PkbZIP2 的诱导激活作用，再诱导其自身作用靶基因的表达，成为功能性蛋白，使植物表现出干旱耐性^[37]。另有研究推测，非生物胁迫响应过程中一些可能的 bHLH 下游靶基因，如 CBF/DREB 可能在植物响应非生物胁迫中起关键作用^[38]。毛竹 bHLH 的表达调控比较复杂，BambooNET ([http://bioinformatics.](http://bioinformatics.cau.edu.cn/bamboo/index.html)

[cau.edu.cn/bamboo/index.html](http://bioinformatics.cau.edu.cn/bamboo/index.html)) 在线分析预测结果表明，*PebHLH072* 受到 bZIP 转录因子的调控，与 C-x8-C-x5-C-x3-H 型锌指蛋白相互作用，与 β -半乳糖苷酶 2 (*PH01001907G0400*)、谷氨酸脱羧酶 (*PH01000571G0410*) 等基因呈现正向共表达，而与热激蛋白 (*PH01002242G0120*)、磷酸酶家族蛋白 (*PH01000156G0830*) 等基因呈现负向共表达。因此 *PebHLHs* 在毛竹中的功能是多样的，其表达调控将是一个复杂的调控网络，要揭示其对竹子生长发育以及在抗逆中的作用机制尚需进行大量的研究工作。

参考文献：

[1] Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8) : 1749–1770.
[2] Murre C, Mccaw PS, 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.
[3] Atchley WR, Terhalle W, Dress A. Positional dependence,

- cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain [J]. *J Mol Evol*, 1999, 48(5): 501–516.
- [4] Sailsbery JK, Dean RA. Accurate discrimination of bHLH domains in plants, animals, and fungi using biologically meaningful sites[J]. *BMC Evol Biol*, 2012, 12(1): 154.
 - [5] Li XX, Duan XP, Jiang HX, Sun YJ, Tang YP, *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.
 - [6] Bailey PC, Martin C, Toledo-Ortiz G, Quail PH, Huq E, *et al*. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2497–2502.
 - [7] Song XM, Huang ZN, Duan WK, Ren J, Liu TK, *et al*. Genome-wide analysis of the bHLH transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis* (Lour.) Olsson) [J]. *Mol Genet Genomics*, 2014, 289(1): 77–91.
 - [8] Niu X, Guan YX, Chen SK, Li HF. Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors in *Brachypodium distachyon* [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 619.
 - [9] Mao K, Dong QL, Li C, Liu CH, Ma FW. Genome wide identification and characterization of apple bHLH transcription factors and expression analysis in response to drought and salt stress [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 480.
 - [10] Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, *et al*. RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1924–1935.
 - [11] Arnaud N, Girin T, Sorefan K, Fuentes S, Wood TA, *et al*. Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(19): 2127–2132.
 - [12] Heisler MG, Atkinson A, Blystra YH, Walsh R, Smyth DR. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein [J]. *Development*, 2001, 128(7): 1089–1098.
 - [13] Sorensen AM, Kröber S, Unte US, Huijser P, Dekker K, *et al*. The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor [J]. *Plant J*, 2010, 33(2): 413–423.
 - [14] 何洁, 顾秀容, 魏春华, 杨小振, 李好, 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.
He J, Gu XR, Wei CH, Yang XZ, Li H, *et al*. Identification and expression analysis under abiotic stresses of the bHLH transcription factor gene family in watermelon [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(2): 281–294.
 - [15] Cui X, Wang YX, Liu ZW, Wang WL, Li H, *et al*. Transcriptome-wide identification and expression profile analysis of the bHLH family genes in *Camellia sinensis* [J]. *Funct Integr Genomics*, 2018, 18(5): 489–503.
 - [16] Zhai Y, Zhang L, Xia C, Fu S, Zhao G, *et al*. The wheat transcription factor, TabHLH39, improves tolerance to multiple abiotic stressors in transgenic plants [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1321–1327.
 - [17] Wang FB, Zhu H, Chen DH, Li ZJ, Peng RH, *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 Tiss Organ Cult*, 2016, 125(2): 387–398.
 - [18] Peng ZH, Lu Y, Li LB, Zhao Q, Feng Q, *et al*. The draft genome of the fast growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456–461.
 - [19] Wu M, Liu HL, Han GM, Cai RH, Pan F, *et al*. A moso bamboo *WRKY* gene *PeWRKY83* confers salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11721.
 - [20] Li L, Mu SH, Cheng ZC, Cheng YW, Zhang Y, *et al*. Characterization and expression analysis of the *WRKY* gene family in moso bamboo [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6675.
 - [21] Wu HL, Lü H, Li L, Liu J, Mu SH, *et al*. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factors family and the expression patterns of DREB genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126657.
 - [22] Yang KB, Li Y, Wang SN, Xu XR, Sun HY, *et al*. Genome-wide identification and expression analysis of the MYB transcription factor in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PeerJ*, 2019, 6: e6242.
 - [23] Wu M, Li Y, Chen D, Liu H, Zhu DY, *et al*. Genome-wide identification and expression analysis of the IQD gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24520.
 - [24] Pan F, Wang Y, Liu HL, Wu M, Chu WY, *et al*. Genome-wide identification and expression analysis of SBP-like transcription factor genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 486.
 - [25] Zhang YT, Tang DQ, Lin XC, Ding MQ, Tong ZK. Genome-wide identification of MADS-box family genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and a functional analysis of *PeMADS5* in flowering [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 176.
 - [26] 何龙燕, 刘武阳, 娄永峰, 肖复明. 毛竹 GRF 转录因子家族的全基因组鉴定与分析 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(5): 713–720.
He LY, Liu WY, Lou YF, Xiao FM. Genome wide identification and expression profile analysis of the GRF family genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Plant Science*, 2018, 36(5): 713–720.

- tion and analysis of the GRF transcription factor family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(5): 713–720.
- [27] 郭安源, 朱其慧, 陈新, 罗静初. GSDS: 基因结构显示系统 [J]. *遗传*, 2007, 29(8): 1023–1026.
- Guo AY, Zhu QH, Chen X, Luo JC. GSDS: a gene structure display server [J]. *Hereditas*, 2007, 29(8): 1023–1026.
- [28] Liu HL, Wu M, Li F, Gao YM, Chen F, Xiang Y. TCP transcription factors in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*): Genome-wide identification and expression analysis [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1263.
- [29] Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, *et al.* PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 325–327.
- [30] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 597–603.
- [31] Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 202–208.
- [32] Fan CJ, Ma JM, Guo QR, Li XT, Wang H, *et al.* Selection of reference genes for real-time quantitative PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573.
- [33] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [34] 赵广枝, 孙化雨, 赵韩生, 高志民. 毛竹基因组测序及数据应用研究现状 [J]. *世界竹藤通讯*, 2015, 13(3): 8–13.
- Zhao GZ, Sun HY, Zhao HS, Gao ZM. Research status of genomic sequencing and data application of *Phyllostachys edulis* [J]. *World Bamboo and Rattan*, 2015, 13(3): 8–13.
- [35] Zhao HS, Gao ZM, Wang L, Wang JL, Wang SB, *et al.* Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Gigascience*, 2018, 7(10): 1–12.
- [36] Chen XR, Xiong R, Liu HL, Wu M, Chen F, *et al.* Basic helix-loop-helix gene family: Genome wide identification, phylogeny, and expression in moso bamboo [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2018, 132(11): 104–119.
- [37] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 238(1–2): 17–25.
- [38] 王昕嘉, 李昆志. 植物 bHLH 转录因子参与非生物胁迫信号通路研究进展 [J]. *生命科学*, 2015, 27(2): 209–216.
- Wang XJ, Li KZ. Progress of plant bHLH transcription factors involved in abiotic stress signaling pathways [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(2): 209–216.

(责任编辑: 周 媛)