

高粱镉胁迫响应基因 *sbbHLH168* 的表达特征及生物信息学分析于文慧¹, 郑佳², 李杨华², 杨明川¹, 王雅利¹, 张子路¹, 龚利娟¹, 康振辉^{1*}

(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 四川宜宾 644000; 2. 五粮液股份有限公司, 四川宜宾 644000)

摘要 [目的] 以高粱基因 *sbbHLH168* 为研究对象, 探究其耐镉胁迫发热分子机制, 对培育耐镉高粱提供了理论参考。[方法] 从高粱品种“BTx623”镉胁迫下转录组数据(RNA-seq)中筛选出一个受镉胁迫后显著上调表达的基因 *sbbHLH168*, 使用在线软件对其生物信息进行分析; 通过洋葱表皮侵染进行亚细胞定位; 构建 pGBKT7-*sbbHLH168* 载体验证 *sbbHLH168* 基因的转录激活活性; 将水培至四叶一心的高粱置于 NaCl、PEG、ABA、ACC、GA 和 JA 溶液处理, 分别在 0、1、12、24 和 48 h 提取 RNA, 通过 RT-qPCR 检测 *sbbHLH168* 基因的相对表达量。[结果] *sbbHLH168* 基因的开放阅读框长度为 567 bp, 编码 189 个氨基酸残基, 蛋白分子量为 20.55 kD, 理论等电点(PI)为 8.86, 为碱性带正电的蛋白, 定位于细胞核, 具有较强的转录激活活性。*sbbHLH168* 基因在盐、干旱和植物激素胁迫下表达量整体呈上升趋势, 但表达量在不同处理时间存在明显差异。对 *sbbHLH168* 基因在不同组织中的表达发现, 该基因在高粱的根和叶中均有表达, 其中在盐、干旱、ABA、GA 和 JA 胁迫下, *sbbHLH168* 基因在处理 12 h 时表达量最高。而在 ACC 处理时, 则在处理 24 h 时表达量最高。[结论] *sbbHLH168* 基因是一个定位在细胞核有转录激活活性的转录因子, 属于 bHLH 家族。

关键词 高粱; *sbbHLH168*; 生物信息学分析; 表达特征; 转录激活活性

中图分类号 Q81 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)24-0086-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.24.019



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Expression and Bioinformatics Analysis of Cadmium Stress Response Gene *sbbHLH168* in *Sorghum bicolor*

YU Wen-hui¹, ZHENG Jia², LI Yang-hua² et al (1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin, Sichuan 644000; 2. Wuliangye Group Co., Ltd., Yibin, Sichuan 644000)

Abstract [Objective] The study aimed to explore the molecular mechanism of cadmium stress tolerance in *Sorghum bicolor* gene *sbbHLH168*, which plays an important role in plant response to biotic and abiotic stresses, it provides a theoretical reference for breeding cadmium-tolerant *Sorghum bicolor*. [Method] A significantly up-regulated *sbbHLH168* was screened from the transcriptome data (RNA-seq) of *Sorghum bicolor* cultivar ‘BTx623’ under cadmium stress, and its biological information was analyzed by on-line software subcellular localization of *sbbHLH168* gene was carried out by infection of onion epidermis, pGBKT7-*sbbHLH168* vector was constructed to verify the transcriptional activation activity of *sbbHLH168* gene, and *Sorghum bicolor* plants cultured in water were treated with NaCl, PEG, ABA, ACC, GA and JA solutions, RNA was extracted at 0, 1, 12, 24 and 48 hours respectively, and the relative expression of *sbbHLH168* gene was detected by RT-qPCR. [Result] The open reading frame length of *sbbHLH168* gene was 567 bp, encoding 189 amino acid residues. The molecular weight of *sbbHLH168* protein was 20.55 kDa, and the theoretical isoelectric point (PI) was 8.86. *sbbHLH168* was a basic protein with positive charge, which was located in the nucleus of cells, it has strong transcriptional activation activity. The expression level of *sbbHLH168* was increased under salt, drought and plant hormone stress, but the expression level was significantly different at different treatment time. The expression of *sbbHLH168* gene in different tissues showed that *sbbHLH168* gene was expressed in root and leaf of *Sorghum bicolor*, and the highest expression level was observed under salt, drought, ABA, GA and JA stress for 12 h. In ACC treatment, the highest expression level was observed at 24 h. [Conclusion] *sbbHLH168* gene is a transcription factor with transcriptional activation activity located in the nucleus and belongs to bHLH family.

Key words *Sorghum bicolor*; *sbbHLH168*; Bioinformatics analysis; Expression characteristics; Transcriptional activation activity

高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] 属于禾本科单子叶植物, 具有较强的耐盐碱、耐高温和抗旱等抗逆特性。高粱的生产和生物量相较于其他粮食作物更高, 因此是许多非洲和许多发展中国家的重要食物来源^[1]。近年来, 高粱受到真菌、重金属、低温、干旱等逆境胁迫的影响, 严重影响高粱的产量和品质^[2]。其中, 镉是植物生长发育的一种非必需元素, 它很容易被根吸收, 并通过木质部运输到叶中。植物内镉的积累会引起各种毒性症状, 例如叶片变黄、萎蔫、生物量减少和细胞死亡等^[3]。因此, 对高粱抗逆胁迫基因进行研究具有重要意义。

自然界的植物在生长发育过程中不可避免地会受到许

多生物和非生物胁迫的影响^[4]。为了生存, 植物本身必须利用广泛的生理生化过程来应对各种压力^[5], 这些反应通过激活或抑制基因特异性表达来进行调节^[6]。基因特异性表达途径之一是转录因子与顺式元件的相互作用, 特异性表达与环境胁迫有关的基因, 以维持植物的正常生命活动^[7]。转录因子(transcription factor, TF) 又称反式作用因子, 其主要功能是激活或抑制基因的转录效应。通过转录因子的调控作用, 可以利用转录因子来改良植物的抗逆性^[8]。根据其 DNA 保守结构域的不同, 可以分为 AP2/EREBP、MADS、bZIP 和 MYB 等若干个家族^[9], 在与植物抗逆性相关的转录因子家族中, bHLH 家族是植物中仅次于 MYB 家族的第二大家族^[10], 它是由 bHLH 特征结构域定义的 DNA 结合蛋白超家族, 该结构域包含参与 DNA 结合的基本区域和 HLH 区域充分的二聚结构域^[11]。随着分子生物学的发展和基因组序列的增加, 越来越多的 bHLH 转录因子被鉴定出来。例如, 花生 (*Arachis hypogaea* Linn.)、短柄草 [*Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv.]、苹果 (*Malus pumila* Mill.) 和大豆 [*Glycine*

基金项目 四川省科技厅重点项目“利用 CRISPR/cas9 技术创制五粮液酿酒专用高粱新品种”(2020YFN0023); 五粮液产学研合作项目(CXY2021ZR010)。

作者简介 于文慧(1997—), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。* 通信作者, 副教授, 从事植物分子生物学研究。

收稿日期 2022-11-01; **修回日期** 2022-12-08

max (Linn.) Merr.] 的基因组分别包含 261、146、188 和 155 个 *bHLH* 基因^[9,12-13]。植物 bHLH 转录因子调节大量基因的表达,涉及广泛的调节途径^[14],如植物次生代谢:水稻 (*Oryza sativa* L.) bHLH 家族成员 *OsbHLH148* 被证明通过调节茉莉酸信号参与介导耐寒性^[15]。*bHLH112* 增加了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 细胞的 ABA 水平。拟南芥 *AtbHLH40* 则与赤霉素的合成转导有关^[16]。响应逆境胁迫:如 *AtbHLH12* 基因可以正向调控拟南芥对盐、干旱及渗透胁迫的抵抗力^[17]; *IbHLH1* 在苹果对冷胁迫的适应中发挥重要作用^[18]。控制细胞的生长:如水稻的稀穗突变体 LAX 是控制植株顶端分生组织的主要调节因子^[19]。拟南芥 *SPATULA* 基因参与花形态建成和角果发育等多种发育过程^[20]。*AtbHLH95* 基因通过控制胚胎发育延缓植物的生长^[21]; 拟南芥的 *AtbHLH21* 和水稻的 *OsbHLH164* 对花粉粒的形成及绒毡层细胞的发育有着关键的调控作用^[22]。这些结果表明, bHLH 转录因子除了调节植物生长发育之外,还在植物应对各种非生物胁迫中起着关键作用。已知的植物 *bHLH* 基因序列主要来源于水稻和拟南芥 2 种模式植物,对其他植物 bHLH 蛋白的功能研究还比较少^[23]。笔者从高粱镉胁迫下的转录组数据中筛选出一个显著上调表达的基因 *sbbHLH168*。通过生物信息学等方法分析该基因的基本特征,并通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测 *sbbHLH168* 基因在不同非生物胁迫处理下在高粱根和叶中的相对表达量,了解其在抗逆胁迫中的作用,以期对 *sbbHLH168* 基因的研究提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料及主要试剂

试验材料包括实验室提供的高粱品种“BTx623”和 P30-GFP 载体,以及市场上购买的洋葱 (*Allium cepa* L.)。试验所用试剂包括 TRIzol 试剂和 DNA Maker DL 2000 购自天根生化科技 (TIANGEN) 有限公司; PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒, TB Green® Premix Ex Taq™ II 购于宝日医 (北京) 生物技术有限公司, 2×EasyTaq® PCR SuperMix 购自北京全式金 (TransGen Biotech) 生物技术有限公司。试验所用设备为 Genesy 96T 基因扩增热循环仪 (西安天隆科技有限公司), TG16 高速离心机 (四川蜀科仪器有限公司), EF-UPR 激光共聚焦显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司), Nano Drop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国), 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国), RQH 智能人工气候培养箱 (郑州生元仪器有限公司), CFX96 Real-Time PCR System 定量荧光 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), JY300E 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 多种非生物胁迫处理

将高粱种子置于水培盒中培养至四叶一心时进行盐胁迫 (100 mmol/L NaCl) 和干旱胁迫 (20% PEG 2 000) 以及 100 μmol/L ABA (脱落酸)、100 μmol/L ACC (乙烯合成前体)、100 μmol/L GA (赤霉素) 和 100 μmol/L JA (茉莉酸) 处理。并在处理后的 0 (CK)、1、12、24 和 48 h 分别取其根和叶组织样品,置于液氮中速冻,剩余样品于 -80 °C 冰箱保存备用。每组试验设置 3 次生物

学重复^[24]。

1.2.2 高粱 *sbbHLH168* 基因的获取和克隆

通过对高粱品种“BTx623”进行镉胁迫,从 RNA-seq 数据筛选到 1 个受镉胁迫诱导显著上调表达的 *sbbHLH168* 基因。根据 Trizol 试剂法提取各处理高粱根和叶组织样品的 RNA,并根据 Prime-Script™ RT reagent kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,使用 Primer Premier 5.0 设计引物 (*sbbHLH168F/R*) (表 1)。PCR 反应体系为 20.0 μL: 2.0 μL cDNA、上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL、2×EasyTaq® PCR SuperMix 10 μL、6.4 μL ddH₂O。PCR 反应程序为预变性: 95 °C 1 min; 95 °C 20 s, 58.6 °C 20 s, 72 °C 30 s, 进行 35 个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 保存。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验,将目的片段用 DNA 纯化回收试剂盒回收后连接至 PMD19-T (Simple) 载体上,并转化大肠杆菌 trans5a 感受态细胞,然后挑取阳性克隆提交至华大基因生物科技 (重庆) 有限公司测序。

1.2.3 高粱 *sbbHLH168* 基因的相对表达量

使用 Beacon Designer 8.0 设计定量引物 (*QsbbHLH168F/R*) (表 1)。以 cDNA 为模板,高粱 *sbPP2A* 基因为内参,通过 Bio-Rad CFX96 对样品 *sbbHLH168* 的相对表达量进行检测。反应体系为 20.0 μL: 7.4 μL ddH₂O、10 μL SYBR/TB Green II、7.4 μL RNase-free ddH₂O、1.0 μL cDNA 模板及定量引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL,反应程序为预变性: 95 °C 30 s, 变性: 95 °C 5 s, 退火: 60 °C 30 s, 循环 40 次后进行融解曲线分析。每组试验设 3 次生物学重复。使用 GraphPad Prism 9.0 软件作图,同时进行差异显著性分析。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the experiment

序号 No.	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'—3')
1	<i>sbbHLH168-F</i>	ATGGAGAGGAAGGAGATCGAGAG
2	<i>sbbHLH168-R</i>	TCATACCAATGCTCTGAGTCTTTCA
3	<i>QsbbHLH168-F</i>	AATGTTCCACACCATCCA
4	<i>QsbbHLH168-R</i>	ATACCAATGCTCTGAGTCTTT
5	<i>sbbHLH168-sacI-F</i>	ATCGAGTTCATGGAGAGGAAGGAGATCGAGAG
6	<i>sbbHLH168-BamHI-R</i>	CGGGATCCTCATACCAATGCTCTGAGTCTTTCA
7	<i>sbbHLH168-BD-F</i>	CGGAATTCATGGAGAGGAAGGAGATCGAGAG
8	<i>sbbHLH168-BD-R</i>	CGGGATCCTCATACCAATGCTCTGAGTCTTTCA
9	<i>sbPP2A-F</i>	AACCCGCAAAACCCAGACTA
10	<i>sbPP2A-R</i>	TACAGGTCGGGCTCATGGAAC

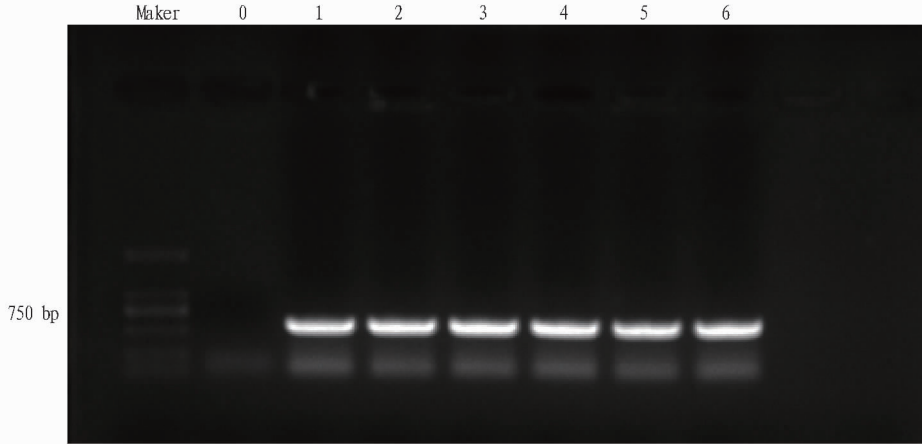
1.2.4 *sbbHLH168* 蛋白生物信息学分析

利用 NCBI 在线工具查找 *sbbHLH168* 基因的 CDS 序列,通过 Translate 将其翻译成氨基酸序列。使用 Protein Blast 对该氨基酸序列进行同源序列比对,将同源序列利用 DNAMAN 8.0 进行多重序列比对;使用 MEGA 11.0 软件中的 Neighbor-Joining 构建同源序列的系统发育树;利用 ExPasy 在线工具 ProtParam 和 ProtScale 对 *sbbHLH168* 蛋白的等电点 (PI)、分子量 (MW)、

不稳定系数、氨基酸组成和蛋白亲水性进行分析;通过 TMpred Server 程序预测 *sbbHLH168* 蛋白的跨膜区;利用 SOPMA 在线程序预测蛋白的二级结构。

1.2.5 *sbbHLH168* 蛋白的亚细胞定位。通过引物 *sbbHLH168*-SacI-F 和 *sbbHLH168*-BamHI-R(表 1) 进行 PCR 反应,得到含有 SacI 和 BamHI 酶切位点但不含终止密码子的 *sbbHLH168* 全长 CDS 片段,经过双酶切后连接到 P30-GFP 载体上。经过测序比对,将成功构建的质粒 P30-*sbbHLH168*-GFP 与 P30-

GFP 载体分别通过电击法转化到农杆菌 EHA105 中,并进行菌落 PCR 检测。对验证正确的阳性克隆置于 YEB 液体培养基中,于 28 ℃,180 r/min 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 约为 1.0,将菌液离心重悬后于无菌条件下侵染洋葱下表皮细胞。将侵染后的洋葱下表皮置于 28 ℃ 暗培养,2 d 后将洋葱下表皮细胞分别在荧光显微镜的明场及绿色荧光通道下观察。亚细胞定位载体 P30-*sbbHLH168*-GFP 构建见图 1。



注:0 为阴性对照,1~6 为载体转入农杆菌后的菌落 PCR 鉴定结果。

Note:0 is negative control,1~6 represent the PCR identification results after the vector transferred into *Agrobacterium tumefaciens*, respectively.

图 1 亚细胞定位载体 P30-*sbbHLH168*-GFP 构建

Fig.1 Construction of P30-*sbbHLH168*-GFP subcellular localization vector

1.2.6 *sbbHLH168* 蛋白的转录激活活性。以 cDNA 为模板,用引物 *sbbHLH168*-BD-F/R(表 1) 进行 PCR 扩增,得到含有 EcoRI 和 BamHI 酶切位点的 *sbbHLH168* 全长 cDNA,经双酶切后连接到酵母双杂交的诱饵载体 pGBKT7 上,酶切鉴定后通过 PEG/LiAc 法转化至酵母 Y2HGOLD 感受态细胞中。同时转化 pGBKT7 空质粒作为阴性对照,涂布于 SD-Trp 平板上,待菌落长出后挑取单菌落重悬于 10 μL 灭菌的双蒸水中,取 1 μL 重悬液点在 SD-Trp 和 SD-Trp/X-α-gal(α-半乳糖苷酶作用的发色底物) 固体培养基上,通过观察菌落是否变蓝来检测 *sbbHLH168* 蛋白的转录激活活性。

2 结果与分析

2.1 高粱 *sbbHLH168* 基因的表达量 为进一步探究 *sbbHLH168* 基因的表达水平,将其进行不同非生物胁迫及植物生长物质处理。结果表明(图 2),*sbbHLH168* 在根和叶中均有表达,并具有组织特异性,其中在叶中的表达量高,根中少。相较于 CK,*sbbHLH168* 均有差异性表达,其中盐胁迫(NaCl)能显著诱导其表达,呈先上升后下降的趋势,对高粱叶的诱导在 12 h 达到最大值,根在 24 h 达到最大值。聚乙二醇(PEG)、脱落酸(ABA)和茉莉酸(JA)处理下,*sbbHLH168* 基因的表达量呈上升—下降—上升的趋势,均在 12 h 达到最大值。*sbbHLH168* 在乙烯合成前体(ACC)和赤霉素(GA)处理下,其表达量呈现先上升后下降的趋势,分别在 24、12 h 达到最大表达量。这表明 NaCl、PEG、ABA、ACC、GA 和 JA 等外源非生物胁迫处理可以诱导 *sbbHLH168* 的表达,从表达量

看,*sbbHLH168* 对 NaCl 的响应更加强烈。这表明 *sbbHLH168* 基因受 NaCl、PEG、ABA、ACC、GA 和 JA 等外源非生物胁迫处理的诱导,证明 *sbbHLH168* 基因参与高粱的非生物胁迫响应,正向调控其抵抗非生物胁迫的能力。

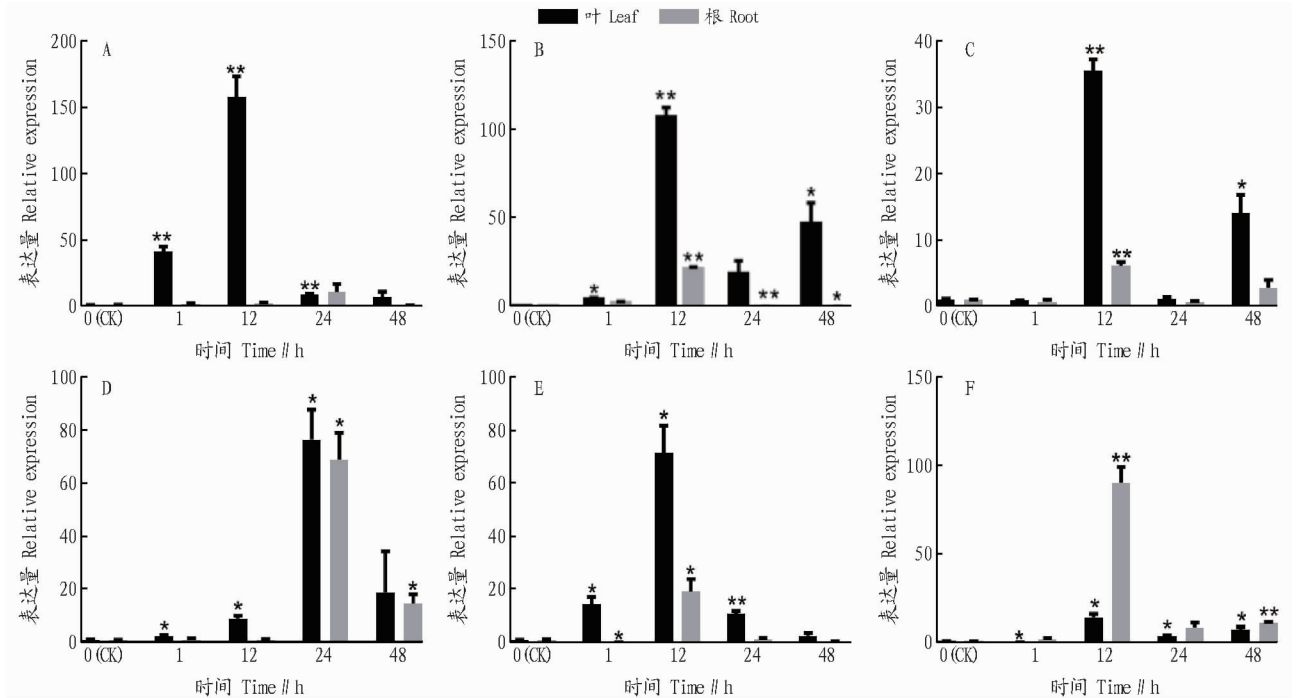
2.2 蛋白的结构预测分析 *sbbHLH168* 基因的开放阅读框为 567 bp,编码 189 个氨基酸残基。蛋白的一级结构预测表明,其分子量为 20.55 kD,理论等电点为 8.86。蛋白的氨基酸组成中阴性氨基酸(Asp + Glu)有 25 个,阳性氨基酸(Arg + Lys)有 28 个,属于碱性蛋白,其不稳定系数为 48.84,属于不稳定蛋白。亲/疏水性分析表明,*sbbHLH168* 蛋白的平均亲水系数为 -0.286(图 3A),即该蛋白为疏水性蛋白。TMpred 预测表明该蛋白不含跨膜区(图 3B)。保守结构域分析显示,*sbbHLH168* 基因的氨基酸序列在第 1~60 位有 1 个 bHLH_SF 结构域(图 3C),表明该蛋白属于 bHLH 家族。

通过 SOPMA 对 *sbbHLH168* 氨基酸序列进行分析并预测其二级结构(图 4A、图 4B)。结果表明,*sbbHLH168* 包含 α 螺旋、β 转角、无规则卷曲和延伸链,其中占比最多的是 α 螺旋(52.13%)和无规则卷曲(36.17%),其空间结构如图所示(图 4C)。

2.3 *sbbHLH168* 蛋白定位在细胞核且有较强的转录激活活性 通过 Cell-PLoc 2.0 在线程序进行预测,结果表明该蛋白位于细胞核中。将 *sbbHLH168* 与 GFP 荧光信号融合表达,结果表明,GFP 荧光蛋白在整个细胞中均有表达,而 *sbbHLH168* 和 GFP 融合蛋白仅在细胞核中表达(图 5A),说明 *sb-*

bHLH168 定位在细胞核中。转录激活活性分析表明,PG-BKT7 载体转化的酵母仅能在 SD/-Trp 平板上生长,而 PG-BKT7-*sbbHLH168* 转化的酵母在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/X-a-

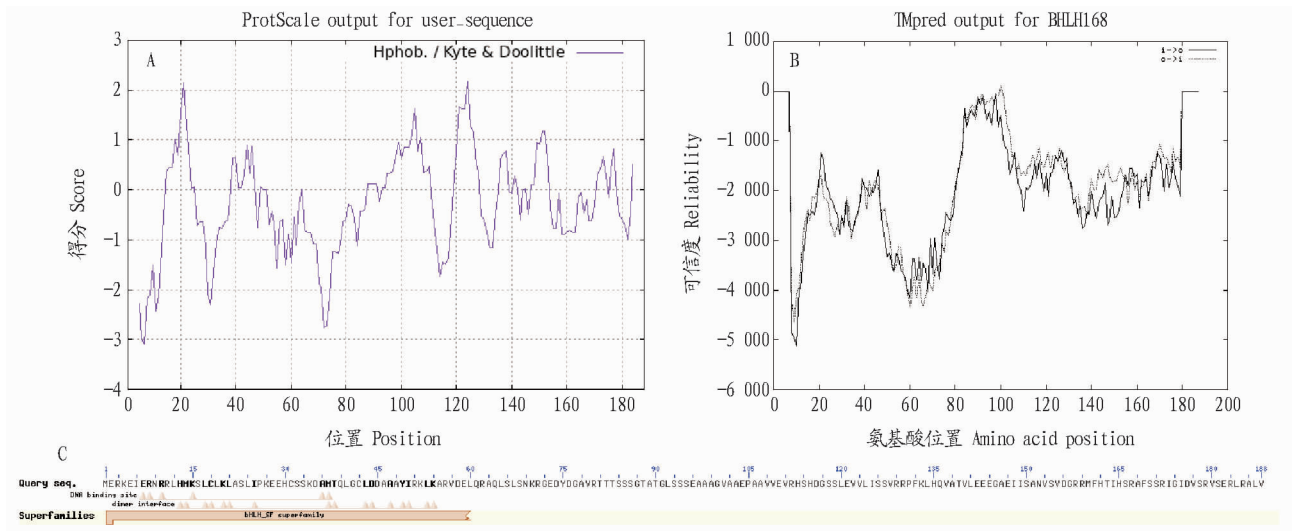
gal 平板上均能生长,且在含 X-a-gal 的平板上酵母菌落会变蓝。说明 *sbbHLH168* 转录因子具有较强的转录激活活性(图 5B)。



注: A.100 mmol/L NaCl; B.20% PEG 6 000; C.100 μmol/L ABA; D.100 μmol/L ACC; E.100 μmol/L GA; F.100 μmol/L JA。 * 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著。
 Note: A.100 mmol/L NaCl; B.20% PEG 6 000; C.100 μmol/L ABA; D.100 μmol/L ACC; E.100 μmol/L GA; F.100 μmol/L JA。 * and ** indicate significant differences at 0.05 and 0.01 level, respectively.

图 2 不同处理下水培高粱苗根和叶中 *sbbHLH168* 基因的相对表达

Fig.2 Relative expression analysis of *sbbHLH168* in leaves and roots of *Sorghum bicolor* under different treatments



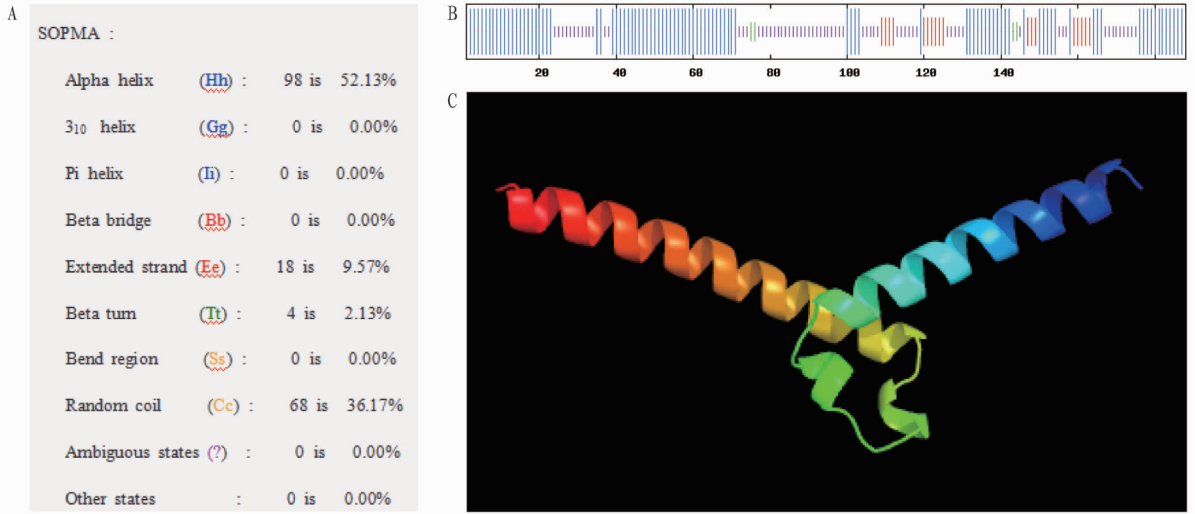
注: A.疏水性分析; B.跨膜区; C.功能域预测。
 Note: A.Hydrophobic analysis; B.Prediction of transmembrane(TM) region; C.Domain prediction.

图 3 *sbbHLH168* 蛋白氨基酸序列分析

Fig.3 Amino acid sequence analysis of *sbbHLH168* protein

2.4 蛋白序列比对及系统发生树分析 基于 NCBI 的 Protein BLAST 程序, 比对与 *sbbHLH168* 同源的蛋白氨基酸序列。序列对比结果表明, *sbbHLH168* 蛋白与南荻 (*Miscanthus*

lutarioriparius) 的一致性最高, 为 77.5%。其次是稭 [*Eleusine coracana* (Linn.) Gaertn.] 64.4%、黍 (*Panicum hallii*) 66.15%、黍稷 (*Panicum miliaceum*) 66.15%、柳枝稷 (*Panicum virgatum*)

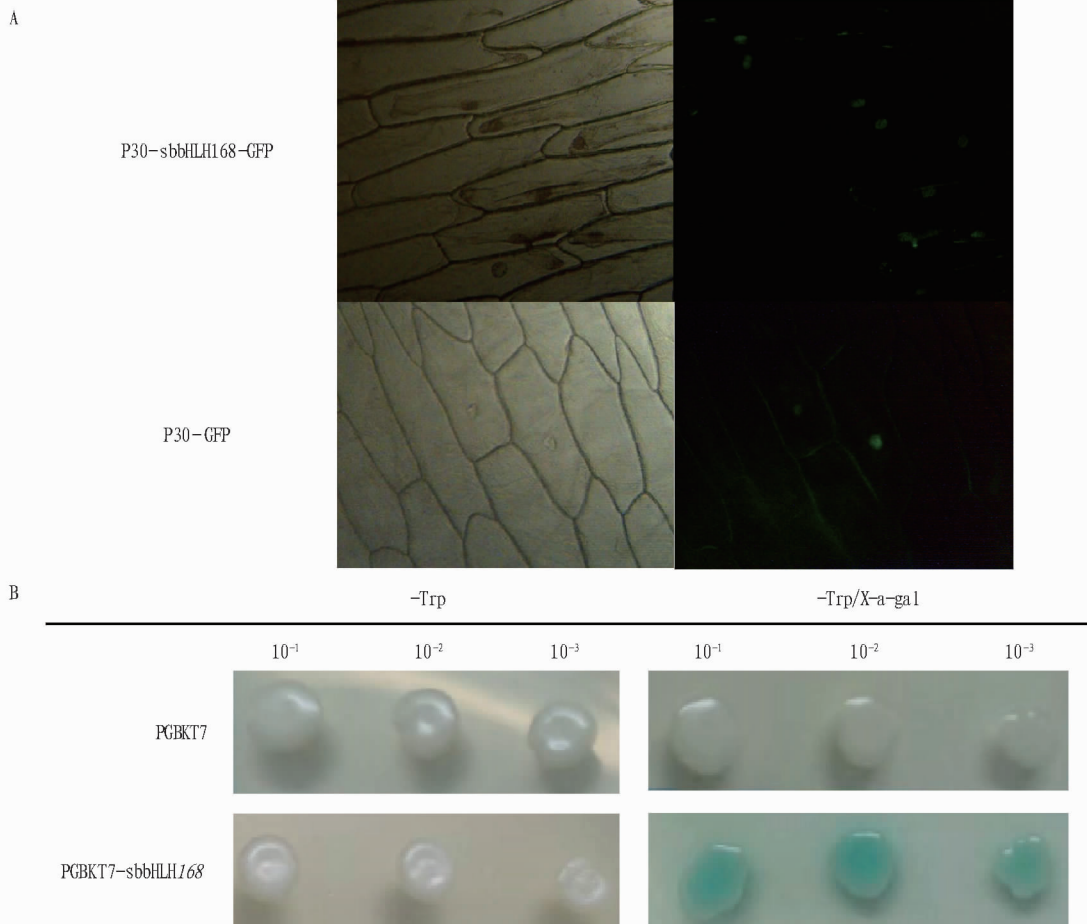


注:A、B. SOPMA 预测的二级结构;C.蛋白二级结构。

Note:A,B.Secondary structure predicted by *sbbHLH168*;C.Schematic diagram of protein secondary structure.

图4 *sbbHLH168* 蛋白结构预测

Fig.4 Structural prediction of *sbbHLH168* protein



注:A.亚细胞定位;B.转录激活活性分析。

Note:A.Subcellular localization;B.Transcriptional activation activity analysis.

图5 *sbbHLH168* 蛋白的亚细胞定位与转录激活活性分析

Fig.5 Subcellular localization and transcriptional activation activity analysis of *sbbHLH168* protein

65.62%、小米(*Setaria italica*) 63.54%、弯叶画眉草[*Eragrostis curvula*(*Schrad.*) *Nees*] 62.23%、狗尾草(*Setaria viridis*)

60.96%、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*) 57.98%等,均表现出较高的同源性。

运用 MEGA 11.0 软件,通过 Neighbor-Joining 对筛选出的蛋白序列进行比对分析,构建系统发育树,其中矫正参数值设置为 1 000。高粱 *sbbHLH168* 和 MICAD6211412.1、MI-

CAD6203892.1、SbSORBI 3001G350300、SbBDA96 01G371800 和 MICAD6232386.1 在同一分支,表明其与南荻亲缘关系最近(图 6,7)。

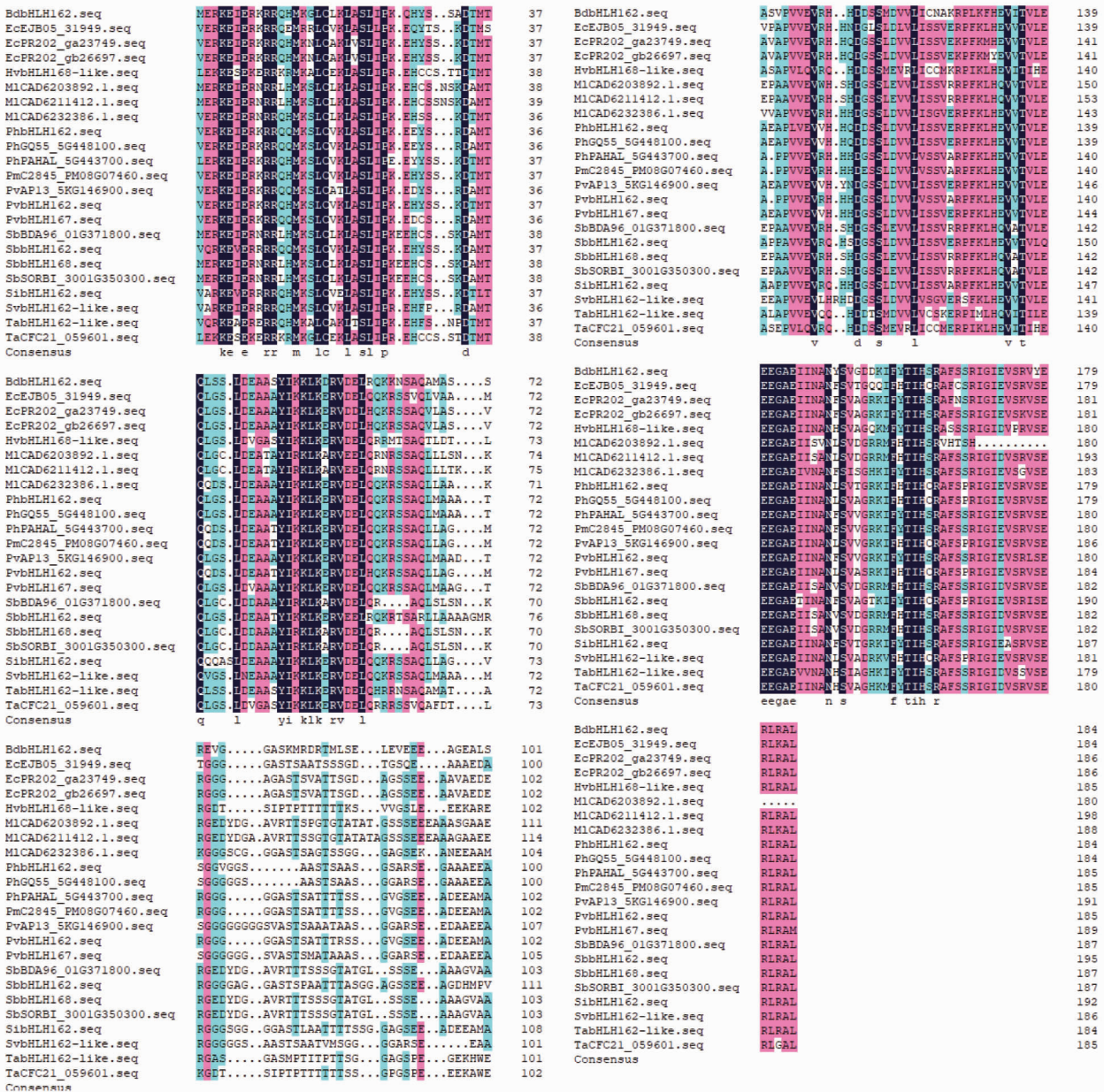


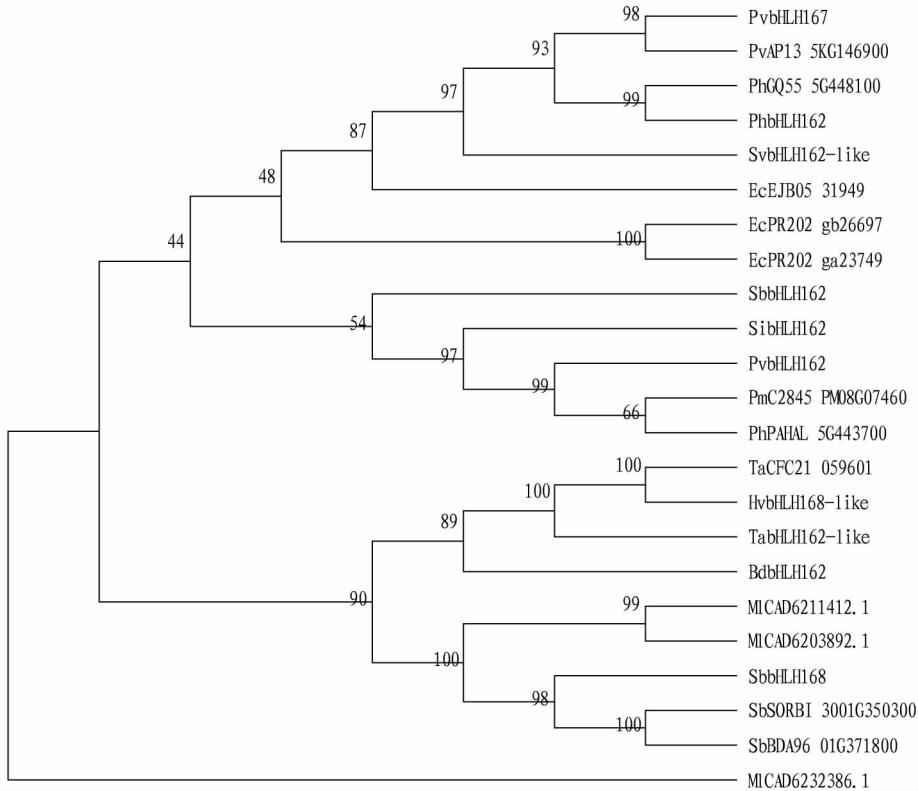
图 6 sbbHLH168 相关蛋白的序列比对

Fig.6 sbbHLH168 proteins sequence alignment

3 讨论

植物在生长发育过程中易受到生物和非生物胁迫的影响,植物为了适应复杂的生长环境,在长期进化中,植物形成了多种抗胁迫的机制[25]。其中, *bHLH* 基因参与植物代谢调节、生长发育及对环境信号反应等过程。该研究采用实时定量荧光 PCR 检测高粱在 NaCl、PEG、ABA、ACC、GA 和 JA 处理下 *sbbHLH168* 基因的表达量,试验结果表明, *sbbHLH168* 基因在根和叶中的表达量整体呈上升趋势,并且盐胁迫能显著诱导其表达,这表明 *sbbHLH168* 基因参与了高粱的非生物胁迫响应。目前许多前人的研究都可以证明 *bHLH* 基因响应植物的非生物胁迫,如在小麦中,通过 *TabHLH1* 基因对 ABA 途

径的调节,提高小麦对干旱的适应性[26]。水稻基因 *Os-bHLH148* 过表达,调节 JA 途径和 OsJAZ (茉莉酸 ZIM 结构域)蛋白的功能[27]。PRE1 的过表达激活了拟南芥中赤霉素依赖性反应[28]。bHLH39 的过表达增加了小麦对盐胁迫的耐受性[29]。35S:CSbHLH 增强了转基因拟南芥和黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 幼苗对 NaCl 和 ABA 的耐受性[30]。苹果中的 *MbHLH130* 通过维持 ROS 的稳态来提高转基因烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 缺水胁迫的耐受性[31]。沙漠杨树 (*Populus euphratica* O.) 的 *PebHLH35* 在拟南芥中的转基因表达通过调节植物的气孔发育和光合作用来增加对缺水胁迫的耐受性[32]。综上所述, bHLH 蛋白在植物响应逆境胁迫中发挥重要



注: Ml. 南荻 (*Miscanthus lutarioriparius*); Ec. 稷 (*Eleusine coracana* (Linn.) Gaertn.); Ph. 黍 (*Panicum hallii*); Pm. 黍稷 (*Panicum miliaceum*); Pv. 柳枝稷 (*Panicum virgatum*); Si. 小米 (*Setaria italica*); Ec. 弯叶画眉草 (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees); Sv. 狗尾草 (*Setaria viridis*); Bd. 二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*); Sb. 高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); Ta. 小麦 (*Triticum aestivum* L.); Hv. 大麦 (*Hordeum vulgare* L.)。

图7 sbbHLH168 相关蛋白系统进化树

Fig.7 sbbHLH168 proteins sequence alignment and phylogenetic tree

作用,可以提高植物抵抗不良环境的能力。今后可以通过构建 *sbbHLH168* 基因在植物中的过表达或敲除来进一步研究 *sbbHLH168* 基因在植物生长发育和抗逆胁迫过程的功能。

4 结论

植物 bHLH 转录因子在植物的生长发育过程中发挥重要作用,但目前对于高粱 bHLH 转录因子的研究还缺乏深入研究。该研究以高粱 *sbbHLH168* 基因为研究对象,利用 PCR 技术成功克隆了该基因的 cDNA 全长序列,并在 DNA 水平上分析了其基因结构。采用各种生物信息学软件对其编码蛋白 *sbbHLH168* 的理化性质、亲/疏水性、保守结构域和二级结构等进行分析,结果表明,*sbbHLH168* 基因全长 567 bp,编码 189 个氨基酸;*sbbHLH168* 蛋白二级结构多为无规则卷曲和 α 螺旋,是一种无跨膜区域的不稳定疏水性蛋白,具有 HLH_SF 结构域。系统进化关系分析表明,高粱 *sbbHLH168* 与南荻、稷和黍的亲缘关系最近,与植物分类地位一致。

参考文献

[1] 高靖,陆劲羽,逢洪波,等. *SbGA20ox1* · *SbGA20ox3* 和 *SbGA2ox3* 基因对高粱品种赤霉素表达水平的影响[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(2): 105-108.

[2] 杜巧丽,蒋君梅,陈美晴,等. 高粱转录因子 *SbWRKY71* 基因的克隆及其在逆境胁迫下的表达分析[J]. 核农学报, 2021, 35(7): 1532-1539.

[3] CLEMENS S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants[J]. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1707-1719.

[4] HOU L, LIU W, LI Z, et al. Identification and expression analysis of genes responsive to drought stress in peanut[J]. *Russ J Plant Physiol*, 2014, 61(6): 842-852.

[5] DENG Y Q, BAO J, YUAN F, et al. Exogenous hydrogen sulfide alleviates salt stress in wheat seedlings by decreasing Na^+ content[J]. *Plant Growth Regul*, 2016, 79(3): 391-399.

[6] CHEN M, SONG J, WANG B S. NaCl increases the activity of the plasma membrane H^+ -ATPase in *C₃* halophyte *Suaeda salsa* callus[J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(1): 27-36.

[7] 刘晓月,王文生,傅彬英. 植物 bHLH 转录因子家族的功能研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(6): 391-397.

[8] 杨致荣,王兴春,李西明,等. 高等植物转录因子的研究进展[J]. 遗传, 2004, 26(3): 403-408.

[9] 徐磊,胡小文,姚艳丽,等. 甜高粱 *WRKY* 转录因子基因的克隆与表达分析[J]. 西南农业学报, 2017, 30(11): 2429-2435.

[10] MAO K, DONG Q L, LI C, et al. 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: 1-15.

[11] CHEN W Q, ZHAO L R, LIU L, et al. Iron deficiency-induced transcription factors bHLH38/100/101 negatively modulate flowering time in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Sci*, 2021, 308: 1-8.

[12] GAO C, SUN J L, WANG C Q, et al. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix gene family in peanut and assessment of its roles in pod development[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): 1-19.

[13] KAVAS M, BALOĞLU 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.

[14] CASTELAIN M, HIR R L, BELLINI C. The non-DNA-binding bHLH transcription factor *PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7* is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*[J]. *Physiol Plant*, 2012, 145(3): 450-460.

[15] SEO J S, JOO J, KIM M J, et al. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice[J]. *Plant J*, 2011, 65(6): 907-921.

鹌鹑在 11 d 之后 *MyoD* 基因的表达量显著高于 aa 基因型个体,并且 2 组个体 *MyoD* 基因的表达均表现出相似的增长趋势,但 AA 和 Aa 基因型的增长幅度较为显著。

4 结论

朝鲜鹌鹑 *MyoD* 基因存在 A700G 同义突变位点,AA 和 Aa 基因型个体的胸围显著高于 aa 基因型个体,*MyoD* 基因在胚胎肌肉发育的 11 d 以后开始发挥作用,携带 A 等位基因的个体 *MyoD* 基因表达量高,生长发育快。

参考文献

[1] 刘佩,庞有志,张小辉,等.朝鲜鹌鹑 *OCA2* 基因克隆及其多态性与羽色的相关性[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(2):7-14,25.

[2] 范心凤,金四华,高斌,等.不同日龄皖南三黄鸡肌肉中 *MyoD* 基因表达及相关分析[J].安徽农业大学学报,2019,46(5):785-790.

[3] 何明亮,张欣超,陈福祥,等.京海黄鸡 *MyoD* 基因外显子 1 多态性对生长和繁殖性状的遗传效应[J].中国家禽,2019,41(24):53-55.

[4] 张久盘,王锦,张娟,等.固原鸡生肌调节因子 *MyoD* 基因克隆及其组织表达分析[J].中国家禽,2018,40(21):11-16.

[5] YANG Z Q, QING Y, ZHU Q, et al. Genetic effects of polymorphisms in myogenic regulatory factors on chicken muscle fiber traits[J]. Asian-Australian journal of animal sciences, 2015, 28(6): 782-787.

[6] FENG X, WANG Z Y, WANG F, et al. Dual function of *VGLL4* in muscle regeneration [J]. *Embo journal*, 2019, 38(17): 1-16.

[7] 陈宽维,高玉时,王志跃,等.中华人民共和国农业行业标准 家禽生产

性能名词术语和度量统计方法[J].中国禽业导刊,2006,23(15):45-46.

[8] 家禽生产性能名词术语和度量统计方法[C]//中国畜牧业协会禽业分会.首届中国黄羽肉鸡行业发展大会会刊.广州:中国畜牧业协会,2008:240-246.

[9] VELLEMAN S G, COY C S, EMMERSON D A. Effect of the timing of post-hatch feed restrictions on broiler breast muscle development and muscle transcriptional regulatory factor gene expression[J]. *Poultry science*, 2014, 93(6): 1484-1494.

[10] 魏岳.边鸡 *MSTN* 基因、*MyoD* 家族部分基因和 *Smad3* 基因多态性与生长和屠体性状的相关性分析以及表达的研究[D].扬州:扬州大学,2014.

[11] MCFARLAND D C, PESALL J E, COY C S, et al. Effects of 17 β -estradiol on turkey myogenic satellite cell proliferation, differentiation, and expression of glypican-1, *MyoD* and myogenin[J]. *Comparative biochemistry and physiology. Part A: Molecular and integrative physiology*, 2013, 164(4): 565-571.

[12] COLE N J, HALL T E, MARTIN C I, et al. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. [J]. *Journal of experimental biology*, 2004, 207(24): 4239-4248.

[13] ALVES H J, ALVARES L E, GABRIEL J E, et al. Influence of the neural tube/notochord complex on *MyoD* expression and cellular proliferation in chicken embryos[J]. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2003, 36(2): 191-197.

[14] MOK G F, MOHAMMED R H, SWEETMAN D. Expression of myogenic regulatory factors in chicken embryos during somite and limb development [J]. *Journal of anatomy*, 2015, 227(3): 352-360.

(上接第 92 页)

[16] ARNAUD N, GIRIN T, SOREFAN K, et al. Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(19): 2127-2132.

[17] LIU W W, TAI H H, LI S S, et al. bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism[J]. *New Phytol*, 2014, 201(4): 1192-1204.

[18] FENG X M, ZHAO Q, ZHAO L L, et al. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene *MdC1bHLH1* encodes an ICE-like protein in apple[J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 1-14.

[19] KOMATSU K, MAEKAWA M, UJIE S, et al. *LAX* and *SPA*: Major regulators of shoot branching in rice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20): 11765-11770.

[20] HEISLER M G, ATKINSON A, BYLSTRA Y H, et al. *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein[J]. *Development*, 2001, 128(7): 1089-1098.

[21] KONDOU Y, NAKAZAWA M, KAWASHIMA M, 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.

[22] 郑玲,代琪芳,陈雪冬.森林草莓 bHLH 家族基因的鉴定与分析[J].江苏农业科学,2022,50(2):47-52.

[23] 杨梦婷,张春,王作平,等.玉米 *ZmbHLH161* 基因的克隆及功能研究[J].作物学报,2020,46(12):2008-2016.

[24] 李格,孟小庆,李宗芸,等.甘薯盐胁迫响应基因 *lbMYB3* 的表达特征及生物信息学分析[J].植物学报,2020,55(1):38-48.

[25] 樊铸珊,罗兴录,单忠英,等.木薯 *SCARECROW-LIKE (SCL)* 基因克隆、

生物信息学及非生物胁迫下表达分析[J].南方农业学报,2020,51(8):1888-1895.

[26] YANG T R, YAO S F, HAO L, et al. Wheat bHLH-type transcription factor gene *TabHLH1* is crucial in mediating osmotic stresses tolerance through modulating largely the ABA-associated pathway[J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(11): 2309-2323.

[27] KIRIBUCHI K, SUGIMORI M, TAKEDA M, et al. *RERJ1*, a jasmonic acid-responsive gene from rice, encodes a basic helix-loop-helix protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(3): 857-863.

[28] LEE S M, LEE S, YANG K Y, et al. Overexpression of *PRE1* and its homologous genes activates Gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(5): 591-600.

[29] ZHAI Y Q, ZHANG L C, XIA C, 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.

[30] LI J L, WANG T, HAN J, et al. Genome-wide identification and characterization of cucumber *bHLH* family genes and the functional characterization of *CsbHLH041* in NaCl and ABA tolerance in *Arabidopsis* and cucumber [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 1-20.

[31] 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]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 1-16.

[32] 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]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 453-458.