

# 甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因的克隆、 表达模式及胁迫响应分析

唐佳佳, 万云宝, 王茂林

(四川大学生命科学学院 生物资源与环境教育部重点实验室, 成都 610065)

**摘要:** 为了进一步探究甘蓝型油菜 bHLH 转录因子的生物学功能, 本实验采用同源克隆技术从甘蓝型油菜中克隆了 2 个 bHLH122 转录因子基因全长 cDNA 序列, 分别命名为: *BnbHLH122-1* (GenBank 登录号为 MT795160) 和 *BnbHLH122-2* (GenBank 登录号为 MT795161)。生物信息学分析表明, *BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 蛋白为不稳定的亲水性蛋白, 都含有 bHLH 保守结构域, 分别与白菜和甘蓝中预测的 bHLH122 蛋白的亲缘关系最近。亚细胞定位和转录激活活性验证实验结果表明两个 *BnbHLH122* 蛋白均定位在细胞核且具备转录激活活性。qRT-PCR 实验结果表明 *BnbHLH122-1* 基因主要在花期的根中表达, *BnbHLH122-2* 基因主要在苗期的根和花期的花中表达。此外, 高温、低温、干旱、高盐、渗透、核盘菌胁迫以及 ABA、SA、MeJA 激素处理均能显著影响 *BnbHLH122* 基因的表达, 由此说明甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因可能在维持植株正常的生长发育和抵御逆境胁迫过程中发挥重要调节作用。

**关键词:** 甘蓝型油菜; *BnbHLH122* 基因; qRT-PCR; 亚细胞定位

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.026001

## Cloning, expression pattern and stress responses analysis of *BnbHLH122* genes in *Brassica napus* L.

TANG Jia-Jia, WANG Yun-Bao, WANG Mao-Lin

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** In order to explore the biological function of bHLH transcription factors in *Brassica napus* L., two full-length cDNA sequences of bHLH122 transcription factor genes were cloned from *Brassica napus* L. by homologous cloning method and named *BnbHLH122-1* (GenBank accession number: MT795160) and *BnbHLH122-2* (GenBank accession number: MT795161) respectively. Bioinformatics analysis showed that both *BnbHLH122* proteins were unstable hydrophilicity proteins with the bHLH conserved domain, which were closely related to the predicted bHLH122 proteins in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*, respectively. The results of subcellular localization and transcriptional activation verification showed that both *BnbHLH122* proteins were located in the nucleus and had transcriptional activation activity. Then the qRT-PCR results showed that the *BnbHLH122-1* gene is mainly expressed in

收稿日期: 2020-08-05

基金项目: “国家重点研发计划”项目子课题(2018YFD0100500); 四川省育种攻关项目(2016NYZ0031)

作者简介: 唐佳佳(1993-), 女, 重庆市合川区人, 硕士生, 主要从事植物遗传与分子生物学研究。E-mail: 874263835@qq.com

通讯作者: 王茂林。E-mail: mlwang@scu.edu.cn

the roots at the flowering stage, and the *BnbHLH122-2* gene is mainly expressed in the roots at the seedling stage and flowers at the flowering stage. Besides, the expression of *BnbHLH122* genes was significantly affected by the stresses of high temperature, low temperature, drought, salt, osmosis, *Sclerotinia sclerotiorum* and the hormone treatments of ABA, SA and MeJA, indicating that *BnbHLH122* genes may play important roles in regulation in the progress of maintaining normal growth and development and resisting stresses in *Brassica napus* L.

**Keywords:** *Brassica napus* L.; *BnbHLH122* genes; qRT-PCR; Subcellular localization

## 1 引言

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是我国种植面积最广的油菜类型,可用于生产食用油、生物柴油和动物饲料等,有着很高的经济价值<sup>[1]</sup>.然而,甘蓝型油菜的产量和品质常常受到极端温度、高盐、干旱等非生物胁迫的影响,因此,培育具有较强抗逆性的甘蓝型油菜新品种已然成为了农业生产的当务之急<sup>[2]</sup>.相关研究表明,植物转录因子(Transcription factors, TFs)可与环境胁迫应答基因的启动子区的顺式作用元件相互作用,并通过元件调节应答基因的表达水平,从而增强植物机体对环境胁迫的耐受性<sup>[3]</sup>.

植物 bHLH(basic Helix-Loop-Helix)转录因子是植物体内必不可少的转录因子家族成员之一,能够参与调控植物的生长发育、胁迫响应等过程<sup>[4]</sup>.在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,*SPATULA* 基因参与调控花器官的发育和种子的萌发过程<sup>[5-6]</sup>; *PIF3* 基因能够负向调控植物的光的形态建成<sup>[7]</sup>; *AtbHLH92* 基因的过表达能在一定程度上增强转基因植株对高盐和甘露醇的耐受性<sup>[8]</sup>.在烟草(*Nicotiana benthamiana*)中,*NbbHLH1* 和 *NbbHLH2* 基因正向调控由茉莉酸诱导的尼古丁的合成<sup>[9]</sup>; *NtbHLH123* 基因能够参与调控植物冷应激反应<sup>[10]</sup>.在水稻(*Oryza sativa*)中,*Os-bHLH148* 基因所编码的蛋白能够与 OsJAZ 蛋白相互作用,从而调控水稻的耐旱性<sup>[11]</sup>.除此之外,人们还发现辣椒中的 *CabHLH94* 基因在青枯菌对辣椒的侵染过程中起正向调节作用<sup>[12]</sup>.

综上所述,植物 bHLH 转录因子家族参与调节植物体内的多项生理生化反应是植物体内重要的调控因子.但是,目前对于植物 bHLH 转录因子家族的功能研究还十分局限,大部分研究工作都还停留在拟南芥、烟草、水稻等模式植物中.本研究对甘蓝型油菜 bHLH122 转录因子基因进行了克隆、表达模式和胁迫响应分析,为进一步阐明甘蓝型油

菜中该转录因子的作用和有效利用 bHLH 转录因子家族成员培育抗逆性油菜新品种奠定基础.

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)科乐油 1 号和本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*),由本实验提供,种植在 25 °C 的植物光照培养室内(光照/黑暗=16 h/8 h).

### 2.2 方 法

2.2.1 甘蓝型油菜总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 利用植物总 RNA 提取试剂盒(购自成都福际公司)提取甘蓝型油菜的总 RNA,具体操作步骤详见试剂盒说明书.然后以检测合格的 RNA 为模板,按照 *TransScript*<sup>®</sup> One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒(购自北京全式金公司)操作步骤合成 cDNA.

2.2.2 *BnbHLH122* 基因编码区全长的克隆 根据 NCBI 甘蓝型油菜数据库中所预测的 bHLH122 转录因子基因序列,设计特异性引物(见表 1),然后采用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(购自南京诺维赞)扩增其编码区全长序列,扩增体系为 50  $\mu$ L,扩增程序为 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 34 个循环, 72 °C 后延伸 5 min. PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,采用北京天根的胶回收试剂盒进行纯化回收,回收产物再连接到 *pESAY*<sup>®</sup>-Blunt 克隆载体上,转化进 *Trans1-T1* 感受态细胞,菌液涂在含有卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养,结合蓝白斑筛选和菌落 PCR 鉴定结果,挑选出阳性单菌落扩大培养并采用质粒小提试剂盒(购自北京天根生物公司)提取质粒,最后将质粒送往华大基因有限公司进行测序.

2.2.3 *BnbHLH122* 基因的生物信息学分析 利用 DNAMAN 软件对测序所得的基因序列进行序列比对;采用 ExPASy 在线分析系统里的 Prot-

Param(<https://web.expasy.org>)工具预测蛋白质的理化性质;使用在线工具 SWISS-MODEL(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)对 *BnbHLH122* 基因所编码的蛋白进行三级结构预测;利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树。

表 1 PCR 扩增引物序列

Tab. 1 Primers sequence used in PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
BnbHLH122-1-F	AACCTTCCTCAGTTCTCT
BnbHLH122-1-R	CTATGATCCGACTCTCACCA
BnbHLH122-2-F	CACGTTCTCTTTTCACCTCTC
BnbHLH122-2-R	CTATGCACAAATCCATCCCTG

2.2.4 亚细胞定位分析和转录激活活性验证 首先根据 *BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因的 CDS 区分别设计出带有特异性酶切位点的引物,引物序列见表 2 和表 3(下划线标示酶切位点)。然后以 2.2.2 所得的测序正确的阳性克隆质粒为模板,参照 2.2.2 中的方法对目的基因(不包含终止子)进行 PCR 扩增和纯化回收。再用 T4 连接酶将双酶切后的目的片段与 pBI221-EGFP、pGBKT7 载体质粒分别连接起来。再转化进 *Trans5α* 感受态细胞,在含有抗生素(氨苄霉素/卡那霉素)的 LB 平板上进行筛选。菌落 PCR 鉴定和质粒测序后,①亚细胞定位:利用 PEG 介导的烟草原生质体瞬时表达法将测序正确的重组质粒分别转化进烟草叶片原生质体,并以 pBI221-EGFP 空质粒为对照组,经 22 °C 暗培养 16 h 后,在显微镜下观察原生质体;②转录激活活性验证:利用 LiAc 介导的酵母细胞转化法将 pGBKT7-*BnbHLH122-1* 和 pGADT7、pGBKT7-*BnbHLH122-2* 和 pGADT7、pGBKT7 和 pGADT7(对照组)三组混合质粒分别共转化进酵母感受态细胞中,再将菌液分别划线在二缺 SD/-Leu/-Trp 和四缺 SD/-Leu/-Trp/-His 平板上,倒置于 30 °C 培养箱中暗培养 3~7 d 后,拍照保存。

表 2 亚细胞定位引物

Tab. 2 Primers of subcellular localization

名称	酶切位点	序列(5'→3')
GFP- <i>BnbHLH122-1</i> -F	<i>Xba</i> I	TGCTCTAGAATGGAGT-CAGAGTTTCAGC
GFP- <i>BnbHLH122-1</i> -R	<i>Bam</i> H I	CGCGGATCCGCGCA-CAAGAGCATCTACA
GFP- <i>BnbHLH122-2</i> -F	<i>Bam</i> H I	CGCGGATCCATGGAGT-CAGAGTTTCAGC
GFP- <i>BnbHLH122-2</i> -R	<i>Sac</i> I	CGAGCTCCTCGCA-CAAGAGCATCTACA

表 3 转录激活活性验证引物

Tab. 3 Primers of transcription activity verification

名称	酶切位点	序列(5'→3')
BD- <i>BnbHLH122</i> -F	<i>Eco</i> R I	CCGGAATTCATGGAGT-CAGAGTTTCAGC
BD- <i>BnbHLH122</i> -R	<i>Bam</i> H I	CGCGGATCCGCTTCTAGT-TTCACGCAC

### 2.2.5 *BnbHLH122* 基因的时空表达模式分析

将科乐油一号油菜置于 25 °C,光照 16 h:黑暗 8 h 条件下培养,分别采集油菜苗期、抽薹期以及花期的根、茎、叶与花速冻于液氮中,每 3 株油菜为 1 个样品池,不同时期不同组织各取 3 个重复样品池。分别提取各个样品的 RNA,并反转录成 cDNA,以其为模板进行 qRT-PCR 分析 *BnbHLH122* 基因的时空表达模式。定量引物见表 4,内参基因为甘蓝型油菜 *βactin* 基因(GenBank 登录号:AF111812)。按照 *TransScript*<sup>®</sup> Tip Green qPCR Super Mix(购自北京全式金公司)使用说明书,设计反应体系为:20 μL,其中模板 1 μL,上下游引物各 0.4 μL,2×*TransStart*<sup>®</sup> Tip Green qPCR Super Mix 10 μL,Nuclease-free Water 8.2 μL。反应程序采用三步法:94 °C 预变性 30 s,40 个循环(94 °C 变性 5 s,55 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 10 s),同时绘制溶解曲线(从 65 °C 上升至 95 °C,每个循环上升 0.5 °C)。实验设有 3 次技术重复,并且最终结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因表达量,GraphPad Prism7 作图。

表 4 荧光定量引物

Tab. 4 The primer for quantification

引物名称	引物序列(5'-3')
qPCR- <i>BnbHLH122-1</i> -F	CCGACAAGCCCCGAGACG
qPCR- <i>BnbHLH122-1</i> -R	ACCTCCATCGCCGGAATAT
qPCR- <i>BnbHLH122-2</i> -F	GAGCAGTTACTCTCAGATTCTATT
qPCR- <i>BnbHLH122-2</i> -R	GCGTATCCATGTTTGAACAAGA
<i>β-actin</i> -F	TCTTCCTCAGCTATCCTCCG
<i>β-actin</i> -R	AGCCGTCTCCAGCTCTTGC

2.2.6 *BnbHLH122* 基因在逆境胁迫和激素处理下的基因表达分析 种植于土壤中的甘蓝型油菜,待其长至四叶一心期时,参照王静等人<sup>[13]</sup>的处理方法,选取长势相同的植株分别进行以下处理:①非生物胁迫:将植株分别放在 4 °C 和 40 °C 的光照培养箱(日照 16 h:黑暗 8 h)中进行冷胁迫处理

和热胁迫处理,然后每间隔 2 h 进行一次取样;渗透、盐以及干旱的处理是将植株清洗干净后,转移至 1/2×Hogland 营养液中缓苗 3 d,然后把油菜分别放在含有 200 mmol/L 甘露醇、200 mmol/L NaCl 和 20% PEG6000 的 1/2×Hogland 营养液中进行处理,再在 0、3、6、9、12、24、48 h 时各取一次样。②核盘菌胁迫:将直径为 6 mm 的带有核盘菌(购自北纳生物公司,菌种编号为 BNCC 122299)菌丝的菌块接种在油菜叶片上,套上塑料袋保持湿度,然后在 0、6、9、12、24、48、72 h 时各取一次样。③激素处理:将植株转移至 1/2×Hogland 营养液中缓苗 3 d,然后把油菜分别放入含有 0.05% 无水乙醇和 0.01% Tween-20 的 100 μmol/L ABA、SA 以及 MeJA 激素的 1/2×Hogland 营养液中进行处理,再在 0、3、6、9、12、24 h 时各取一次样。以上所有处理均设置三次独立重复试验。将采集的所有样品分别进行 RNA 提取并合成 cDNA 后,参考 2.2.5 进行 qRT-PCR 定量分析。

2.2.7 *BnbHLH122* 基因的启动子分析 在 NCBI 上查找到 *BnbHLH122* 参考基因上游约 2 000 bp 左右的 DNA 序列,将其载入 PlantCARE

在线软件中进行分析。

### 3 结果与分析

#### 3.1 *BnbHLH122* 基因编码区克隆和序列比对

采用同源克隆技术,以甘蓝型油菜 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到两条不同的基因序列,分别命名为 *BnbHLH122-1* (GenBank 登录号: MT795160)和 *BnbHLH122-2* (GenBank 登录号: MT795161)。 *BnbHLH122-1* 的 CDS 区全长为 1 086 bp,共计编码 361 个氨基酸, *BnbHLH122-2* 的 CDS 区全长为 1 095 bp,共计编码 364 个氨基酸。这两个基因的 CDS 序列的相似性为 96.57%,氨基酸序列的相似度为 97.53%。与甘蓝型油菜参考基因组数据库中预测的 2 个参考基因相比, *BnbHLH122-2* 与 LOC106435350 所编码的氨基酸序列一致, *BnbHLH122-1* 与 LOC106346071 的氨基酸序列的相似度为 98.08%。与拟南芥 *AtbHLH122* 基因相比, *BnbHLH122-1*、 *BnbHLH122-2* 与拟南芥 *AtbHLH122* 基因所编码的氨基酸序列相似度分别为 79.95%、81.51%,氨基酸序列比对结果见图 1。

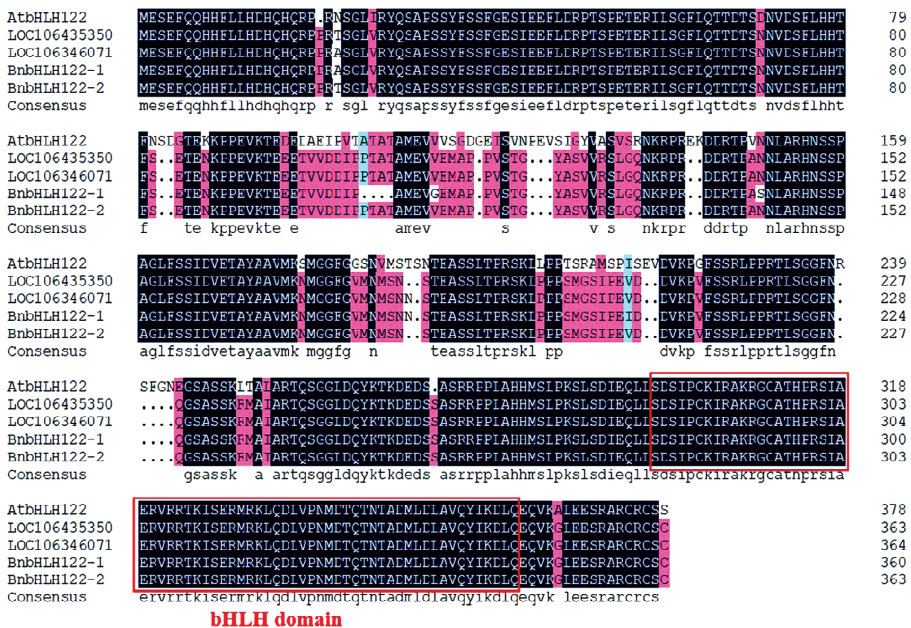


图 1 氨基酸序列比对  
注：“.”表示缺失位点。

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences  
Note：“.” Represents the missing site.

#### 3.2 *BnbHLH122* 蛋白质理化性质分析和三级结构预测

3.2.1 *BnbHLH122* 蛋白质理化性质分析 利用 ProtParam 工具对两个甘蓝型油菜 *BnbHLH122*

基因所编码的蛋白质的理化性质进行分析,结果如表 5 所示,两个基因所编码的蛋白的不稳定系数均高达 60 多,均为不稳定蛋白质。两个 *BnbHLH122* 基因所编码的蛋白质的总平均亲水性 (GRAVY)

分别为-0.694、-0.684, 均为亲水性蛋白质。

表 5 *BnbHLH122* 蛋白的理化性质

Tab. 5 Physicochemical properties of *BnbHLH122*

基因	氨基酸数	相对分子质量	不稳定系数	等电点	总平均亲水性
<i>BnbHLH122-1</i>	361	39964.73	63.28	6.61	-0.694
<i>BnbHLH122-2</i>	364	40306.14	62.49	6.61	-0.684

3.2.2 *BnbHLH122* 蛋白质的三级结构预测 利用 SWISS-MODEL 在线分析平台构建 *BnbHLH122* 蛋白和 *AtbHLH122* 蛋白的三级结构模型, 结果发现两个 *BnbHLH122* 蛋白同 *AtbHLH122* 蛋白的三级结构均含有 bHLH 转录因子家族中的典型的螺旋-环-螺旋结构, 进一步表明两个 *BnbHLH122* 蛋白属于 bHLH 转录因子家族, 但三者空间结构并不完全相同, 存在一定差异。

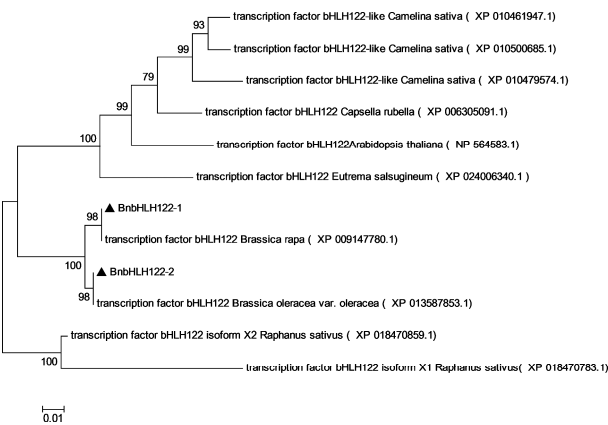


图 2 bHLH122 蛋白系统进化树分析

注: 分支旁的数字表示该节点在 1 000 次重复引导验证后的可信度; 标尺上的数字为氨基酸替换率。

Fig. 2 The phylogenetic tree analysis of bHLH122 proteins

Note: The numbers next to the branch represent the reliability of the node after 1 000 repeated guidance verification; the number on the scale represents the amino acid replacement rate

### 3.3 *BnbHLH122* 蛋白系统进化树分析

系统进化树结果表明(见图 2), *BnbHLH122-1* 蛋白与白菜(*Brassica rapa*)中的 bHLH122 转录因子高度同源, *BnbHLH122-2* 蛋白则与甘蓝(*Brassica oleracea*)中的 bHLH122 转录因子高度同源。众所周知, 甘蓝型油菜(AACC,  $n=19$ )是白菜(AA,  $n=10$ )和甘蓝(CC,  $n=9$ )自然杂交加倍而成, 因此我们推测 *BnbHLH122-1* 位于 A 组染色体, 来源于白菜, 而 *BnbHLH122-2* 位于 C 组染色体, 来源于甘蓝。进化树中 *BnbHLH122* 蛋白与拟南芥中的 bHLH122 转录因子并没有被划分在同

一支上, 即它们之间的亲缘关系并没有比甘蓝、白菜、萝卜等物种近, 这也暗示着它们之间的生物学功能可能在进化过程中出现了分化。

### 3.4 *BnbHLH122* 蛋白的亚细胞定位

将构建好的 pBI221-*BnbHLH122-1*-EGFP 和 pBI221-*BnbHLH122-2*-EGFP 重组质粒转入烟草原生质体进行瞬时表达, 结果如图 3 所示, 在对照组 35S-EGFP 中, 烟草原生质体的细胞核和细胞质内均观察到绿色荧光信号, 而在实验组 35S::*BnbHLH122-1*-EGFP 和 35S::*BnbHLH122-2*-EGFP 中, 只在烟草原生质体的细胞核内观察到较强的绿色荧光信号, 表明 *BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 蛋白定位在细胞核, 这符合转录因子的一般特征。

### 3.5 *BnbHLH122* 蛋白的转录激活活性验证

转录激活活性验证结果如图 4 所示, 在二缺(SD/-Leu-Trp)平板上无论是两个实验组还是对照组的酵母细胞都能正常生长, 表明实验组和对照组的质粒都成功共转化进了酵母细胞, 并且 pGBKT7 质粒中的 *TRP1* 基因和 pGADT7 质粒中的 *LEU2* 基因在酵母细胞中均正常表达。但是, 在四缺平板(SD/-Leu-Trp-His-Ade)上只有两个实验组 pGBKT7-*BnbHLH122-1* + pGADT7 和 pGBKT7-*BnbHLH122-2* + pGADT7 的酵母细胞能够正常生长, 对照组 pGBKT7 + pGADT7 的酵母细胞不能正常生长, 由此说明 *BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因所编码的两个蛋白均具有转录激活活性, 能够启动下游报告基因的表达。

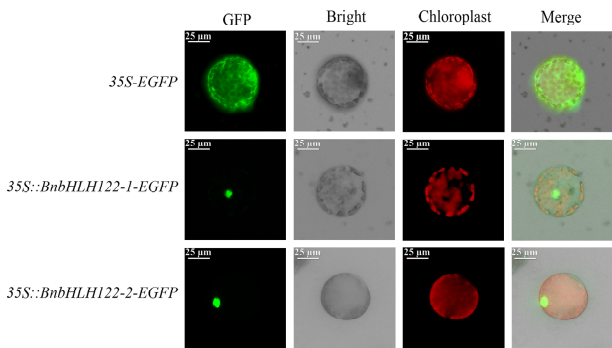


图 3 甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 蛋白的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of *BnbHLH122*

### 3.6 *BnbHLH122* 基因时空表达模式分析

利用 qRT-PCR 分析甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因的时空表达模式, 结果如图 5 所示, 甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因在植株苗期、抽薹期以及花期的根、茎、叶、花中均有表达。从苗期

到花期,甘蓝型油菜的根和叶中的 *BnbHLH122-1* 基因的表达水平呈现出上升趋势,而茎中 *BnbHLH122-1* 基因的表达水平相对较低且稳定,整体而言,*BnbHLH122-1* 基因在花期的根中的表达量最高。从苗期到花期,*BnbHLH122-2* 基因的表达水平在根、茎、叶中均呈现出先下降后上升的趋势,在抽薹期的表达量相对较低。整体而言,相较于其他组织器官,茎中 *BnbHLH122-2* 基因的表达量相对较低,在苗期的根中和花期的花中 *BnbHLH122-2* 基因的表达量最高。

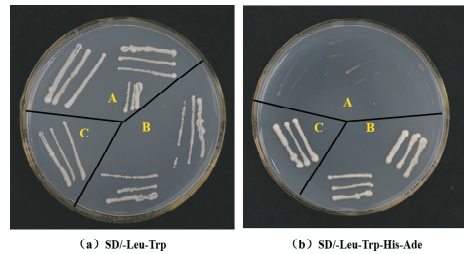


图 4 *BnbHLH122* 蛋白转录活性验证结果  
注: A: pGBKT7 + pGADT7; B: pGBKT7-*BnbHLH122-1* + pGADT7; C: pGBKT7-*BnbHLH122-2* + pGADT7.  
Fig. 4 The identification of transcriptional activity of *BnbHLH122* proteins  
Note: A: A: pGBKT7 + pGADT7; B: pGBKT7-*BnbHLH122-1* + pGADT7; C: pGBKT7-*BnbHLH122-2* + pGADT7.

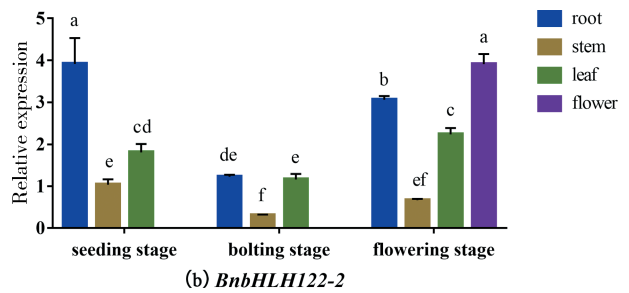
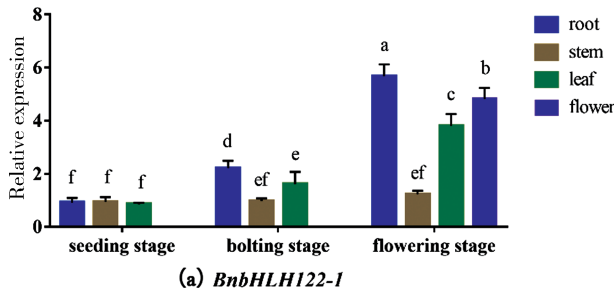


图 5 甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因的时空表达模式分析

注: 误差条显示平均值的标准误差, 柱形图上的不同小写字母表示各个时期的不同组织中相对表达量的显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 5 Spatial and temporal expression of *BnbHLH122* in *Brassica napus* L.

Note: The error bars represent the standard error of the mean, and the different lowercase letters over columns represent significant differences in relative expression in different tissues at different periods ( $P < 0.05$ ).

### 3.7 逆境胁迫和激素处理下的 *BnbHLH122* 基因表达响应

在非生物胁迫条件下,甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因的表达情况见图 6(a)~(e)。在低温胁迫下,*BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因的表达均受抑制,分别在胁迫后的第 6 和 2 h 表达量降至最小值,分别是 0 h 的 0.5 和 0.2 倍。在高温胁迫下,*BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因的表达水平均呈现先上升后下降的趋势,分别在胁迫后的第 8 h 和 4 h 表达量达到最大值,分别是 0 h 的 10 倍和 5.4 倍。在干旱胁迫下,2 个 *BnbHLH122* 基因的表达均受诱导,且均在胁迫后的第 48 h 表达量达到最大值,分别为 0 h 的 3.8 倍和 3.9 倍。此外,*BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因还能响应高盐和渗透胁迫,表达量均呈现先上升后下降的趋势,在盐胁迫后的第 12 h 表达量均达到最大值,分别约为 0 h 的 4 倍和 3.5 倍,在渗透胁迫后第 12 h、第 9 h 表达量分别达到最大值,分别是 0 h 的 6.8 倍和 9.2 倍。

在核盘菌胁迫下,2 个 *BnbHLH122-2* 基因的表达量均呈现先上升后下降的趋势(见图 6(f)),

在胁迫后的第 9 h 时 *BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因的表达量均达到最大值,分别为 0 h 的 3.5 倍和 2 倍,之后基因的表达量开始下调,到第 72h 表达量降到最低值,分别为 0 h 的 0.2 倍和 0.03 倍。

在外源激素 ABA、SA 和 MeJA 处理条件下,甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因的表达情况如图 6(g)~(i)所示,甘蓝型油菜 *BnbHLH122-1* 基因的表达受 ABA、SA 和 MeJA 的诱导,分别在处理后的第 6、12 和 6 h 时表达量达到最大值,分别为 0 h 的 3、11.4 和 4 倍,*BnbHLH122-2* 基因的表达受外源激素 SA 的诱导,在第 6 h 达到最大值为 0 h 的 6.9 倍,而在 ABA 和 MeJA 处理条件下,该基因的表达量下降,分别在第 3 h 和 6 h 达到最低值,均只有 0 h 的 0.08 倍。

### 3.8 *BnbHLH122* 基因的启动子序列分析

通过 PlantCARE 在线软件对两个 *BnbHLH122* 参考基因的启动子序列进行分析,结果显示它们的启动子均含有参与 ABA 响应的元件顺式作用元件 ABRE 以及参与 MeJA 响应的顺式作用元件 CGTCA-motif、TGACG-motif。此外,

*LOC106346071* 参考基因的启动子区还包含参与 SA 响应的顺式作用元件.

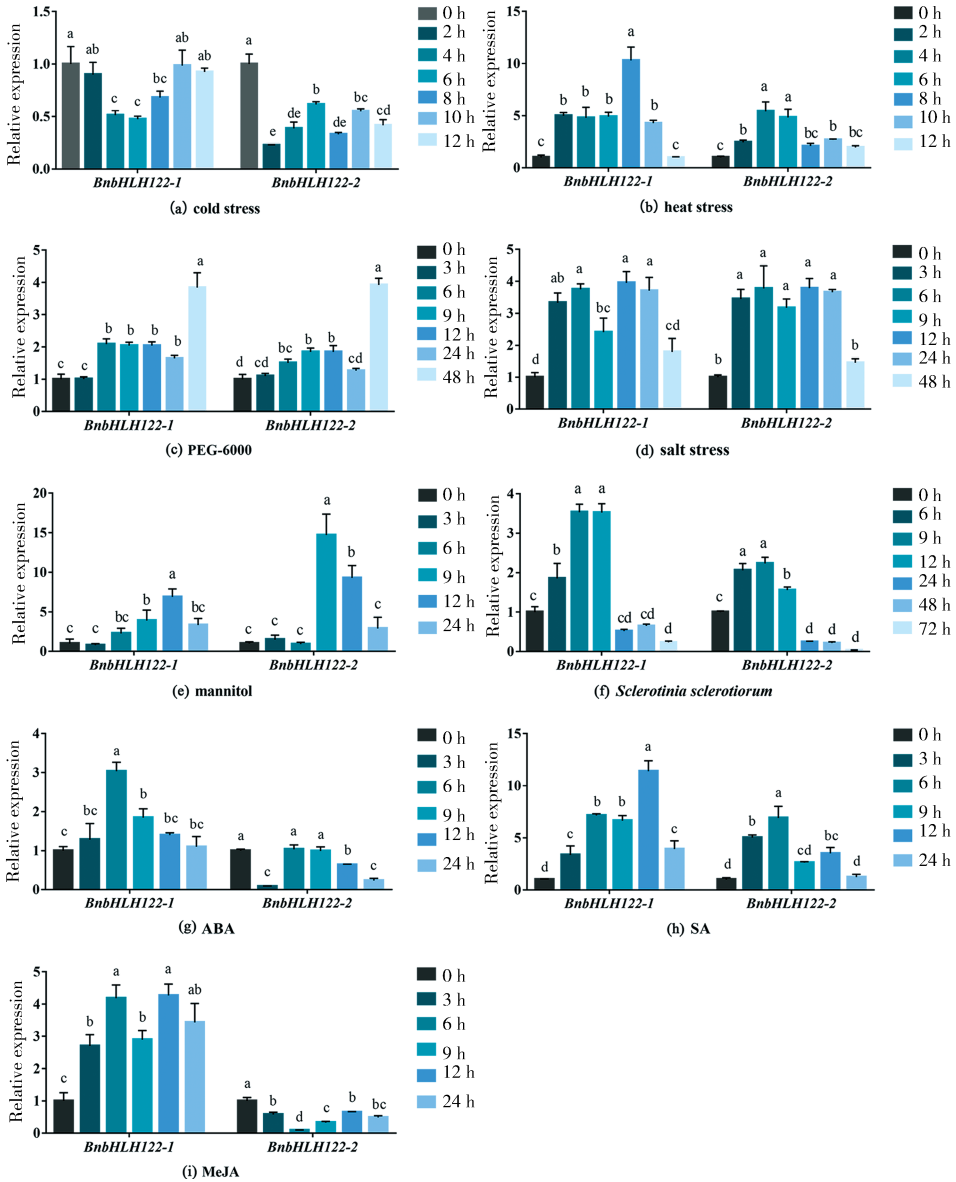


图 6 *BnbHLH122* 基因在不同胁迫和激素处理下的表达分析

注: 误差条显示平均值的标准误差, 柱形图上的不同小写字母表示在不同处理条件下每个基因在不同时间点的相对表达量的显著性差异 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 6 Relative expression of *BnbHLH122* genes under different stresses and hormones

Note: The error bars represent the standard error of the mean, and the different lowercase letters over columns represent significant differences in relative expression of each gene at different points under different treatments ( $P < 0.05$ ).

## 4 讨论

bHLH 转录因子家族广泛分布在真核生物体内, 是植物体内不可缺少的调控因子. 本实验从甘蓝型油菜中克隆到 2 个基因, 分别命名为: *BnbHLH122-1*、*BnbHLH122-2*. 经序列比对、生物信息学分析、亚细胞定位和转录激活活性验证实验结果表明克隆所得基因为甘蓝型油菜 bHLH122 转录因子基因, 且 *BnbHLH122-1*、*BnbHLH122-*

2 和 *AtbHLH122* 基因的氨基酸序列、蛋白质结构均不完全相同, 2 个 *BnbHLH122* 基因分别与白菜、甘蓝中的 bHLH122 转录因子基因的同源性较高, 与 *AtbHLH122* 基因不属于同一分支, 由此推测它们发挥的生物学功能可能存在差异.

研究表明, 植物 bHLH 转录因子能够结合在下游基因启动子区的 E-box 顺式作用元件上, 调控相关基因的表达<sup>[14]</sup>, 参与植物的生长发育和抗逆反应, 例如拟南芥 bHLH122 转录因子可以参与

调节 *CO* 基因的表达从而影响拟南芥花周期,促使植株出现早花现象;烟草 *NtHLH123* 转录因子能够激活 *NtCBF* 基因的表达,提高植株对冷胁迫的耐受性<sup>[10]</sup>. 本实验通过 qRT-PCR 技术分析了 2 个 *BnbHLH122* 基因的时空表达模式和胁迫响应,结果发现它们主要在甘蓝型油菜的根和花中表达,并且响应低温、高温、干旱、高盐、渗透以及核盘菌胁迫,在多种胁迫条件(如低温、高温、渗透等)下两个基因的表达模式存在差异,例如表达量的极值、达到极值的时间点以及表达量上调或者下调后持续的时间等,因此推测 *BnbHLH122-1* 基因和 *BnbHLH122-2* 基因不仅能够参与调节甘蓝型油菜的花和根的生长发育过程,在甘蓝型油菜抵御生物胁迫和非生物胁迫过程中发挥着重要的调节,并且它们之间可能不存在功能冗余,而是通过相互配合共同参与调控,但具体的调节机制需要进一步研究.

植物激素 ABA、JA 所介导的信号转导途径不仅能够参与调节植物的生长发育,同时也在植物抵御外界胁迫过程中发挥重要作用<sup>[16-17]</sup>. 研究表明,一些 bHLH 转录因子能够通过调节 ABA 和 JA 信号通路参与植物的抗逆过程,如 bHLH 转录因子 *ZmPIF3* 是 ABA 信号途径中的正向调节因子,它通过减少气孔开口以控制水分流失来增强植株节水和抗旱性状<sup>[18]</sup> 等. 本次实验结果表明甘蓝型油菜 *BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因响应 ABA 和 MeJA 激素处理,但两者的响应模式存在明显差异,而且 *BnbHLH122* 基因的启动子区还含有依赖于 ABA 信号通路的响应元件 ABRE 以及 MeJA 响应元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif,由此推测甘蓝型油菜中的 *BnbHLH122-1* 和 *BnbHLH122-2* 基因对胁迫的响应过程可能依赖于 ABA 信号转导途径和 MeJA 信号转导途径,并且它们可能以不同的调节方式参与调控相关靶基因的表达,从而协同调节植物的抗逆反应.

此外,2 个 *BnbHLH122* 基因的表达还受激素 SA 的诱导,*BnbHLH122* 基因的启动子区也找到了与 SA 信号转导途径相关的响应元件. SA 信号通路是植物抗病过程中重要的调节途径<sup>[19]</sup>,表达分析显示甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因响应核盘菌胁迫,因此推测甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因可能参与调节植株的抗病过程,并且该过程还依赖于 SA 信号转导途径. 但有趣的是,本实验发现核盘菌和 SA 处理均能诱导 *BnbHLH122-2* 基因的

表达,JA 处理能抑制该基因的表达,研究表明,JA 和 SA 所介导的信号通路能以相互拮抗的方式调控植株的抗病过程<sup>[20]</sup>,如拟南芥 *WRKY70* 转录因子<sup>[21]</sup>,这似乎暗示着 *BnbHLH122-2* 基因可能以 JA 和 SA 信号通路相互拮抗的方式调控植株的抗病过程.

综上所述,甘蓝型油菜 *BnbHLH122* 基因响应高温、低温、高盐、干旱、渗透、核盘菌等多种胁迫,对该类基因的功能研究将有利于培育出具有更强抗逆性甘蓝型油菜新品种,但它们的具体的抗逆机制尚不明确,还需进一步的探究.

### 参考文献:

- [1] 郭燕枝, 杨雅伦, 孙君茂. 我国油菜产业发展的现状及对策[J]. 农业经济, 2016, 7: 44.
- [2] Wang Z, Yang C, Chen H, *et al.* Multi-gene co-expression can improve comprehensive resistance to multiple abiotic stresses in *Brassica napus* L. [J]. *Plant Sci*, 2018, 274: 410.
- [3] Liu J H, Peng T, Dai W. Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32: 303.
- [4] 朱婷. 大麦 bHLH 转录因子家族的鉴定及系统进化和表达分析[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2019.
- [5] Alvarez J, Smyth D R. *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*[J]. *Development*, 1999, 126: 2377.
- [6] Heisler M G B, 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: 1089.
- [7] Lin L, Liu X, Yin R. *PIF3* integrates light and low temperature signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 93.
- [8] Jiang Y, Yang B, Deyholos M K. Functional characterization of the Arabidopsis bHLH92 transcription factor in abiotic stress [J]. *Mol Genet Genomics*, 2009, 282: 503.
- [9] Todd A T, Liu E, Polvi S L, *et al.* A functional genomics screen identifies diverse transcription factors that regulate alkaloid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant J*, 2010, 62: 589.
- [10] Qiang Z, Xiang X, Dan L, *et al.* Tobacco transcription factor *NtHLH123* confers tolerance to



- cold stress by regulating the ntcbf pathway and reactive oxygen species homeostasis [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 381.
- [11] 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: 907.
- [12] 薛宝平. 辣椒 bHLH 基因家族的鉴定、表达分析及 CabHLH94 在应答青枯菌侵染中的作用[D]. 延安: 延安大学, 2019.
- [13] 王静, 白九元, 古少波, 等. 甘蓝型油菜 *BnbHLH92* 基因的克隆和表达分析[J]. *四川大学学报: 自然学科版*, 2019, 56: 1169.
- [14] Atchley W R, Terhalle W, Dress A. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain [J]. *J Mol Evol*, 1999, 48: 501.
- [15] Ito S, Song Y H, Josephson-Day A R, *et al.* FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 3582.
- [16] Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, *et al.* ABA-me-
- diated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants [J]. *J Plant Res*, 2011, 124: 509.
- [17] Katsir L, Chung H, Koo A, *et al.* Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11: 428.
- [18] Gao Y, Wu M, Zhang M, *et al.* Roles of a maize phytochrome-interacting factors protein ZmPIF3 in regulation of drought stress responses by controlling stomatal closure in transgenic rice without yield penalty [J]. *Plant Mol Biol*, 2018, 97: 311.
- [19] Koo Y M, Heo A Y, Choi H W. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator [J]. *Plant Pathol J*, 2020, 36: 1.
- [20] Mao P, Duan M R, Wei C H, *et al.* WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 833.
- [21] Li J, Brader G, Palva E T. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 319.

#### 引用本文格式:

中文: 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*, 2020, 58: 026001.

英文: Tang J J, Wang Y B, Wang M L. Cloning, expression pattern and stress responses analysis of *BnbHLH122* genes in *Brassica napus* L. [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2021, 58: 026001.