

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.06.028

甘蓝型油菜 *BnbHLH92* 基因的克隆与表达分析

王 静, 白九元, 古少波, 赵 云, 王 睿

(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: 为研究甘蓝型油菜 bHLH 转录因子的功能, 采用同源克隆技术从甘蓝型油菜中克隆了 5 个 *BnbHLH92* 基因全长 cDNA 序列, 分别命名为 *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2*、*BnbHLH92-3*、*BnbHLH92-4*、*BnbHLH92-5*, 其编码区长度分别为 738, 657, 684, 741, 717bp. qRT-PCR 实验表明, 除 *BnbHLH92-1* 外, 其它的 *BnbHLH92* 基因主要在抽薹期和花期的根中表达, *BnbHLH92-1* 主要在抽薹期和花期的根以及二叶一心期的叶中表达. 非生物胁迫显著影响 *BnbHLH92* 基因的表达, 使其表达量升高. 低温胁迫下, *BnbHLH92* 基因分别在胁迫后 4、6、6、6、6 h 表达量达最高. 高温胁迫下, 5 个 *BnbHLH92* 基因分别在胁迫后 2、6、6、8、4 h 表达量达最高. 盐胁迫下, *BnbHLH92* 基因分别在胁迫后 6、6、24、24、24 h 表达量达最高. 在 ABA 诱导下 *BnbHLH92* 基因表达量也有不同程度的增加, 分析发现 *BnbHLH92* 基因的启动子序列上存在 ABA 响应元件(ABRE).

关键词: 甘蓝型油菜; bHLH 转录因子; 基因克隆; 非生物胁迫

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)06-1169-08

Molecular cloning and expression analysis of *BnbHLH92* genes in *Brassica napus* L.

WANG Jing, BAI Jiu-Yuan, GU Shao-Bo, ZHAO Yun, WANG Rui

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

Abstract: To study the functions of bHLH TFs in *Brassica napus*, five full-length cDNA sequences of *BnbHLH92* genes are cloned from *Brassica napus* by the homologous cloning method and named as *BnbHLH92-1*, *BnbHLH92-2*, *BnbHLH92-3*, *BnbHLH92-4*, *BnbHLH92-5*, respectively. And the length of the coding region for each gene is 738, 657, 684, 741, 717 bp, respectively. The qRT-PCR result shows that *BnbHLH92-1* gene is expressed in the root of the bolting stage and flowering stage as well as the two leaves stage, but the other *BnbHLH92* genes mainly expressed in the roots of the bolting stage and the flowering stage. The expression of *BnbHLH92* genes is significantly affected by abiotic stress, which increases the amount of genes expression. The expression level of five *BnbHLH92* genes reach its highest under a low temperature stress for 4, 6, 6, 6 and 6 h, under a high temperature stress for 2, 6, 6, 8 and 4 h, under a salt stress for 6, 6, 24, 24 and 24 h, respectively. The expression of each *BnbHLH92* gene is also increased in different degrees under ABA induction. It is found that there is an ABA response element (ABRE) on the promoter sequence of each *BnbHLH92* gene.

Keywords: *Brassica napus*; bHLH transcription factor; Gene cloning; Abiotic stress

收稿日期: 2019-04-19

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1802605); 四川省科技支撑计划(2018YFC1802605)

作者简介: 王静(1994-), 女, 四川绵阳人, 硕士生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: wangjingtime@163.com

通讯作者: 王睿. E-mail: wangray1987@scu.edu.cn

1 引言

甘蓝型油菜是我国重要的油料作物, 菜籽既可以作为食用油原料也可以作为工业用油的原料, 但是甘蓝型油菜经常受到盐、干旱和低温等非生物胁迫的影响, 导致产量下降, 因此培育出强耐受性的甘蓝型油菜品种成为当前农业中的迫切需求^[1-2]. 植物在受到非生物胁迫后, 通过启动体内多种分子机制调控与生理生化有关的应答反应, 从而快速修复非生物胁迫对植物造成的损伤, 以适应不断变化的环境.

转录因子(TFs)通过与各种非生物胁迫应答基因启动子区的顺式元件相互作用以激活或抑制相关的下游基因的表达, 这在植物非生物胁迫应答反应中起着至关重要的作用^[3]. 在众多调控机制中, 转录因子所介导的非生物胁迫应答反应至关重要, 这些调控应激反应的转录因子家族包括 MYB 家族, bHLH(碱性螺旋-环-螺旋)家族, DREB(脱水响应结合元件)家族, ERF(乙烯响应元件结合因子)家族, bZIP(碱性/亮氨酸拉链结构域)家族, 和 WRKY 家族^[4]. bHLH 转录因子家族是植物中第二大转录因子家族, 目前很多报道表明 bHLH 转录因子也参与了植物的抗逆性. 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, AtbHLH 44 和 AtbHLH 122 通过降低 PP2Cs 编码基因的表达来响应干旱胁迫^[5-6]. 在拟南芥中异源过表达葡萄(*Vitis vinifera* L.) *VvbHLH 1* 基因通过增加黄酮的总含量提高转基因拟南芥的耐盐性和耐旱性^[7]. 在水稻(*Oryza sativa* L.)中, 一些 bHLH 转录因子也参与响应非生物胁迫. 例如, 水稻 bHLH2 转录因子通过上调胁迫应答基因 *DREB1A/CBF3*、*RD29A*、*COR15A* 和 *KIN1* 的表达从而调控盐胁迫信号而并不是依赖于 ABA 信号途径^[8]. 在甘蓝型油菜中, 仅有少数的 bHLH 转录因子的功能得到了鉴定. 例如, bHLH 转录因子家族中的 BnTT8 参与调控种子萌发和幼苗形态建成, BnTT8 可能参与调控了胁迫响应基因的表达. 当突变体和野生型拟南芥在高盐和高糖胁迫下, *AtABI2*、*AtCBL1*、*AtCBL9*、*AtNCED3*、*AtRD29A*、*AtRD22* 以及 *AtKINI* 基因的转录水平存在显著差异, 拟南芥转基因株系 tt8-4-35S; BnTT8 对突变体中上述基因的表达有一定的回补作用^[9]. ICE1 蛋白具有 MYC 转录因子家族特有的 bHLH(basic helix-loop-helix) DNA 结合域,

拟南芥中的 ICE1 被证明与低温胁迫有关. qRT-PCR 实验表明, 在低温胁迫下 *BnICE1* 基因的表达受低温胁迫的诱导^[10]. 拟南芥中的 *AtbHLH92* 基因被报道参与调控拟南芥的盐胁迫应答反应, 在盐胁迫下该基因受到强烈的诱导表达^[11]. 在盐胁迫下, 甜菜根和叶中的 *BvbHLH92* 基因响应诱导表达, 但 *BvbHLH92* 基因在甜菜根和叶部位的诱导表达在强度及时间上存在一定差异^[12]. 可以看出 bHLH92 转录因子可能参与盐胁迫应答反应相关过程, 提高植物耐盐性. bHLH 转录因子在植物抗逆方面的作用非常显著, 但相对于其他植物抗逆相关的转录因子家族而言, bHLH 转录因子家族在植物抗逆中的研究则相对滞后, 且主要集中于拟南芥和水稻等模式生物中, 而甘蓝型油菜等非模式生物中研究较少.

基于以上研究, 甘蓝型油菜中参与非生物胁迫应答的 bHLH 转录因子的鉴定和功能表征对于阐明与应激反应相关的分子网络提供一定的理论基础. 植物转基因技术的应用, 植物能够获得更多的优良性状, 过表达抗性基因的转基因植物非生物胁迫下表现出更强的耐受性. 因此探究甘蓝型油菜 bHLH92 转录因子是否具有抗逆功能, 对利用基因工程技术开发出产量高、品质好、抗逆性强的甘蓝型油菜品种显得尤为重要.

2 材料和方法

2.1 材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)科乐油 1 号由四川大学生命科学学院油菜课题组提供, 种植于四川大学生命科学学院光照培养室.

2.2 方法

2.2.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成 甘蓝型油菜总 RNA 提取利用 OMEGA 公司 RNA 提取试剂盒进行, 以检测后质量合格的 RNA 作为模板, 反转录 cDNA 按照全式金公司反转录试剂盒说明书进行.

2.2.2 *BnbHLH92* 基因编码区全长的克隆 根据拟南芥中的 *AtbHLH92* 基因序列, 与油菜数据库比对, 找到同源基因后, 根据同源基因设计引物, 引物序列见表 1. PCR 反应采用擎科公司金牌 Mix, PCR 反应体系为 25 μ L, 反应程序为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 51 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 1 min, 4 $^{\circ}$ C 保存. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

后, 利用蓝光切胶仪切胶, 并采用天根胶回收试剂盒进行回收. 回收产物与全式金公司 T 载体进行连接, 然后转化 Tans1-T1 感受态细胞, 复苏 1 h 后, 将菌液涂布于含有 Kan、IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基上, 在 37 °C 生化培养箱中倒置过夜培养. 挑选白色单克隆进行菌落 PCR, 阳性克隆送擎科公司测序.

2.2.3 序列分析与同源聚类分析 利用 DNA-MAN 对所测序列的核苷酸及氨基酸序列进行比对分析. 利用 ExPASy 里的 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具对蛋白质的分子量、氨基酸组成和等电点等基本性质进行预测. 用 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 同源模建 *BnbHLH92* 的蛋白三级结构. 利用 MEGA 6.0 软件重建 NJ (Neighbor-Joining) 系统进化树进行同源聚类分析.

2.2.4 *BnbHLH92* 基因的时空表达分析 在甘蓝型油菜的二叶一心期、四叶一心期、抽薹期、花期分别采取植株的根、茎、叶, 提取 RNA 后, 利用 qRT-PCR 分析 *BnbHLH92* 基因的时空表达情况. 定量引物见表 2, 内参基因为 β actin (GenBank 登陆号: AF111812), 试剂为全式金公司 Trans-Start Tip Green qPCR SuperMix. 反应体系为 20 μ L, 其中模板 1 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, Mix 10 μ L, ddH₂O 8.2 μ L. 实验采用三步法进行, 其反应程序设定为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s, 第二步到第四步设定 40 个循环. 溶解曲线绘制的程序为: 从 65 °C 上升到 95 °C, 每个循环上升 0.5 °C. *BnbHLH92* 基因的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 采用 Graph-Pad Prism 绘图.

表 1 PCR 扩增目标基因编码区所用引物序列

Tab. 1 Primers sequence used in PCR to amplify the target CDS fragments

引物名称	引物序列
BnbHLH92-12-F	5'-GTGAGAAAGTGAGAGAAAGATG-3'
BnbHLH92-12-R	5'-CGACAAAGCAGAAAGTCA-3'
BnbHLH92-3-F	5'-ATGATAGTCCAAAACCTAGAA-3'
BnbHLH92-3-R	5'-AGCAGTGAGAAAGTGAGAG-3'
BnbHLH92-4-F	5'-TCAACAAAGCAGTGCCAA-3'
BnbHLH92-4-R	5'-CGTAGCGATAGCGAGAGA-3'
BnbHLH92-5-F	5'-TTGACCGTAACGTTAATATACTA-3'
BnbHLH92-5-R	5'-TCACAACCAAGATCCTCAAC-3'

表 2 荧光定量引物

Tab. 2 The primers for quantification

引物名称	引物序列
qBnbHLH92-1-F	5'-GTCAATACAAAAGGAACCTCAG-3'
qBnbHLH92-1-R	5'-GACTCAGATACGAGGAGAGG-3'
qBnbHLH92-2-F	5'-CGGTCGTCTAACAAAATATCA-3'
qBnbHLH92-2-R	5'-CAGCAAGTCAAGACAAAAGG-3'
qBnbHLH92-3-F	5'-ATAATAGTCCAAAACCTAGAAA-3'
qBnbHLH92-3-R	5'-ACTCAAAACGGTCCAAGC-3'
qBnbHLH92-4-F	5'-CTCCCAGAAGCTTCGTTTC-3'
qBnbHLH92-4-R	5'-GCCACTGTTTCAGACTGAT-3'
qBnbHLH92-5-F	5'-ACTCCTTTTGTGTTTGACTTTC-3'
qBnbHLH92-5-R	5'-TAAGATGGTATTTGTAGTGCTAC-3'
q β -actin-F	5'-TCTTCTCACGCTATCCTCC-3'
q β -actin-R	5'-AGCCGTCTCCAGCTCTTG-3'

2.2.5 冷胁迫、热胁迫、盐胁迫下及 ABA 诱导下基因表达分析 待甘蓝型油菜生长至四叶一心期时, 小心从土里拔出, 洗净, 然后放进 1/2Hogland 营养液中缓苗 2 d, 冷胁迫和热胁迫处理温度分别为 4 °C 和 40 °C, 对照组温度为 25 °C, 分别在 2、4、6、8、10、12、24 h 采样, 盐胁迫在加有 200 mM NaCl 的 1/2Hogland 溶液模拟, 分别在 3、6、9、12、24、48 h 采样. 盐胁迫处理温度为 25 °C. ABA 处理用添加有 0.05% 无水乙醇和 0.01% Tween-20 的 100 μ mol/L ABA 喷施叶片和浇灌根部. 分别在 3、6、9、12、24 h 采样. 所有油菜在光周期为光照 16 h 黑暗 8 h 中生长. 分别提取 RNA 后, 进行 qRT-PCR 实验.

3 结果与分析

3.1 *BnbHLH92* 基因编码区全长克隆与序列分析

利用甘蓝型油菜科乐油 1 号的 cDNA 为模板扩增, 得到五个片段, 测序后命名, 在植物转录因子数据库中 Plant TFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 运行 Blast 工具将克隆得到的序列与拟南芥转录因子数据库比对, 比对结果显示我们克隆得到的序列与拟南芥 *bHLH92* 相似度最高, 因此我们从甘蓝型油菜中克隆的基因为 *bHLH92* 基因, 分别命名为 *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2*、*BnbHLH92-3*、*BnbHLH92-4* 和 *BnbHLH92-5*.

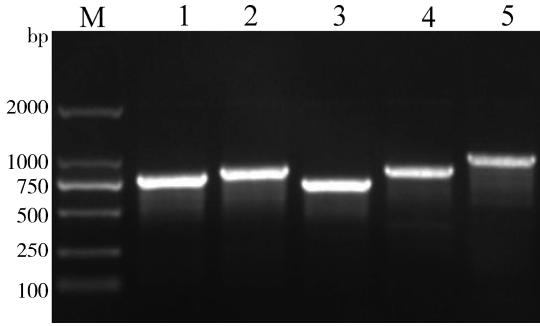


图 1 BnbHLH92 阳性克隆 PCR 鉴定

M:DL 2000DNA Maker; 1: *BnbHLH92-1*; 2: *BnbHLH92-2*; 3: *BnbHLH92-3*; 4: *BnbHLH92-4*; 5: *BnbHLH92-5*

Fig. 1 Identification of BnbHLH92 positive clone PCR

3.2 BnbHLH92 氨基酸序列理化性质分析

通过在线分析软件 ExPASy ProtParam 对甘蓝型油菜 BnbHLH92 基因的氨基酸的理化性质进行分析, 各项理化性质参数如表 3 所示, 当不稳定系数大于 40 时, 预测蛋白质就不稳定, 因此 BnbHLH92 蛋白均为不稳定蛋白. 总平均亲水性代表序列中所有氨基酸残基亲水值的总和与氨基酸数量的比值, 负值越大表示亲水性越好, 正值越大表示疏水性越强, 结果显示, BnbHLH92 均为亲水性蛋白质.

表 3 BnbHLH92 氨基酸序列的理化性质

Tab. 3 Physicochemical properties of amino acid sequences

序列	氨基酸数	相对分子质量	不稳定系数	等电点	总平均亲水性
BnbHLH92-1	245	2 8379.29	53.71	5.95	-0.668
BnbHLH92-2	218	2 4978.53	47.54	6.92	-0.562
BnbHLH92-3	227	2 6235.08	45.19	7.74	-0.473
BnbHLH92-4	246	2 8438.28	52.39	9.06	-0.794
BnbHLH92-5	238	2 7575.44	50.65	9.35	-0.808

3.3 BnbHLH92 的三级结构预测

利用 SWISS-MODEL 同源建模了拟南芥及甘蓝型油菜 bHLH92 转录因子的三级结构, 如图 2 所示, AtbHLH92 和 BnbHLH92 预测的三级结构中均存在 bHLH 转录因子家族中典型的螺旋-环-螺旋结构, 进一步证实甘蓝型油菜 BnbHLH92 属于 bHLH 家族, 其中 BnbHLH92-1 蛋白的三级结构与拟南芥 AtbHLH92 蛋白的三级结构构象高度相似, BnbHLH92-2 也与 BnbHLH92-3 的三级结构构象类似. 在 BnbHLH92 中所预测的 5 个蛋白质三级结构构象并不是完全相同的, 说明这 5 个基因可能并不是冗余基因, 他

们表达的 BnbHLH92 可能在植物的生长发育中有着不同的功能, 这为我们接下来的实验引发了新的思考.

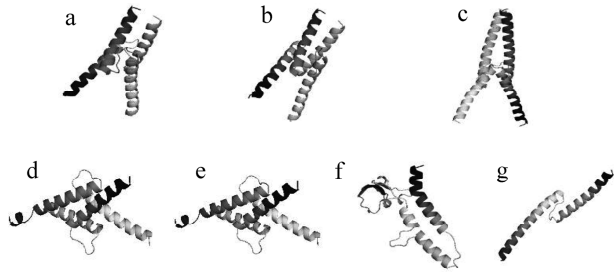


图 2 BnbHLH92 转录因子三级结构预测

(a) AtbHLH92-1; (b) AtbHLH92-2; (c) BnbHLH92-1; (d) BnbHLH92-2; (e) BnbHLH92-3; (f) BnbHLH92-4; (g) BnbHLH92-5

Fig. 2 Prediction of tertiary structures of BnbHLH92 protein

3.4 BnbHLH92 同源聚类分析

通过在 NCBI 中进行 Blast 序列比对, 查找并筛选到来自不同物种的 16 条与 BnbHLH92 同源性较高的 bHLH 蛋白的氨基酸序列. 首先利用 DNAMAN 对氨基酸序列进行同源比对, 然后通过 MEGA 5.0 对它们进行同源性聚类分析, 将这 16 条序列和 *BnbHLH92* 基因的 5 条氨基酸序列一起绘制 NJ 系统进化树, 结果如图 3 所示. 分析发现, BnbHLH92 的蛋白序列与其它十字花科的 bHLH92 分布在进化树的一个分支上, 而葡萄、核桃、杨树、苹果、土豆、牵牛的 bHLH92 聚在另一个分支上, 说明在 BnbHLH92 与十字花科中其它的 bHLH92 亲缘关系较近. *BnbHLH92-1*、BnbHLH92-2、BnbHLH92-3 与甘蓝亲缘关系最近. BnbHLH92-4 与甘蓝的另外一条序列亲缘关系最近. BnbHLH92-5 与芜菁亲缘关系最近. 由于甘蓝型油菜是芜菁与甘蓝祖先种杂交所形成异源多倍体植物, 说明甘蓝型油菜 BnbHLH92 基因可能来自不同的祖先种, 暗示着这些基因可能发挥着不同的功能.

3.5 BnbHLH92 基因的时空表达分析

由图 4a, *BnbHLH92-1* 主要在二叶一心期的叶, 抽薹期和花期的根中表达, 其次是抽薹期的叶、花期的叶、二叶一心期的根中表达. 由图 4b, 在二叶一心期、四叶一心期和抽薹期中, 每个时期的根、茎、叶的不同组织之间表达量之间没有显著性差异. 在花期时, 根和茎中的表达量显著增加, 并且分别达到最大值. 此时, 花期根中的表达量是二叶一心期根中的 5.13 倍, 花期茎中的表达量是二叶一心期茎中 2.85 倍. 综合来看, 在甘蓝型油

菜发育的四个时期里, *BnbHLH92-2* 在根和茎中的表达量呈现出上调的趋势, 而叶中的表达量没有出现显著性的变化. 由图 4c, *BnbHLH92-3* 主要在抽薹期和花期的根中表达分别达到了二叶一

心表达量的 115.96 倍和四叶一心时期表达量的 76 倍. 由图 4d, *BnbHLH92-4* 和 *BnbHLH92-5* 主要在抽薹期和花期的根中表达.

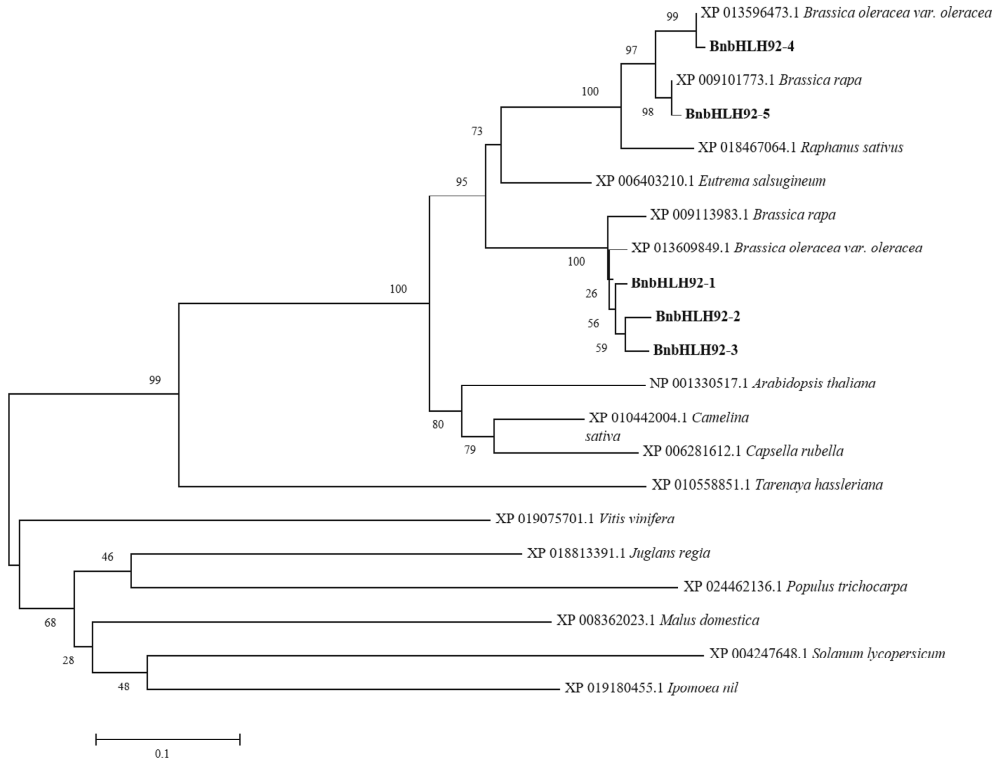


图 3 甘蓝型油菜 bHLH92 转录因子的同源性聚类分析

标尺上的数字代表氨基酸替换率, 分支上的数字代表 Bootstrap 验证中 1000 次重复该节点的可信度.

Fig. 3 Homology cluster analysis of bHLH92 transcription factors in *Brassica napus* L.

The numbers on the ruler represent the amino acid replacement rate, The numbers on the branch represent the reliability present of bootstraps value based on 1000 replicates.

3.6 低温、高温、盐胁迫及 ABA 诱导下的表达分析

由图 5a, *BnbHLH92* 基因对低温胁迫均有响应. *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2* 与 *BnbHLH92-5* 对低温胁迫有着相似的响应模式, 呈现出先增加后下降的趋势, 分别在胁迫后 4、6、6 h 表达量达到最大值, 分别是 0 h 的 9.73、5.70、4.15 倍. *BnbHLH92-3* 和 *BnbHLH92-4* 在低温胁迫下有着相似的表达模式, 总体呈现出先增加后下降的趋势, 但是在 4 h 表达量有明显的下降, 都在 6 h 表达量达到最大值, 分别是 0 h 的 6.69 和 2.26 倍. 由图 5b, 总体来看, *BnbHLH92* 基因对高温胁迫均有一定程度的响应, *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2* 和 *BnbHLH92-5* 在高温胁迫下有着相似的响应模式, 表达量呈现出先升高再下降的趋势, 分别在胁迫后 2、6、4 h 表达量最高, 为 0 h 的 2.69、3.89、4.73 倍. *BnbHLH92-3* 和 *Bn-*

bHLH92-4 在低温胁迫下有着相似的应答模式, 呈现出表达量先下降出现显著性差异, 然后再上升至最大值, 最后再下降. 分别在 6 h 和 8 h 表达量达到最大值, 为 0 h 的 1.85 和 3.64 倍. 由图 5c, 总体来看, *BnbHLH92* 基因对盐胁迫均有一定程度的响应, *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2* 和 *BnbHLH92-4* 在盐胁迫下有着相似的响应模式, 呈现出先增加再下降的趋势, 分别在 6、6、24 h 表达量达到最大值, 此时的表达量是 0 h 的 1.73、1.57、6.16 倍, 随后表达量开始下降. *BnbHLH92-3* 和 *BnbHLH92-5* 在低温胁迫下有着相似的应答模式, 呈现出表达量先上升再下降然后再上升至最大值, 然后又开始下降的趋势. 在 24 h 表达量达到最大值, 分别是 0 h 的 2.32、5.98 倍. 由图 4d, *BnbHLH92* 基因受 ABA 的诱导调控, 其中 *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2* 和 *BnbHLH92-3* 的响应模式类似, 在受到 ABA 诱导

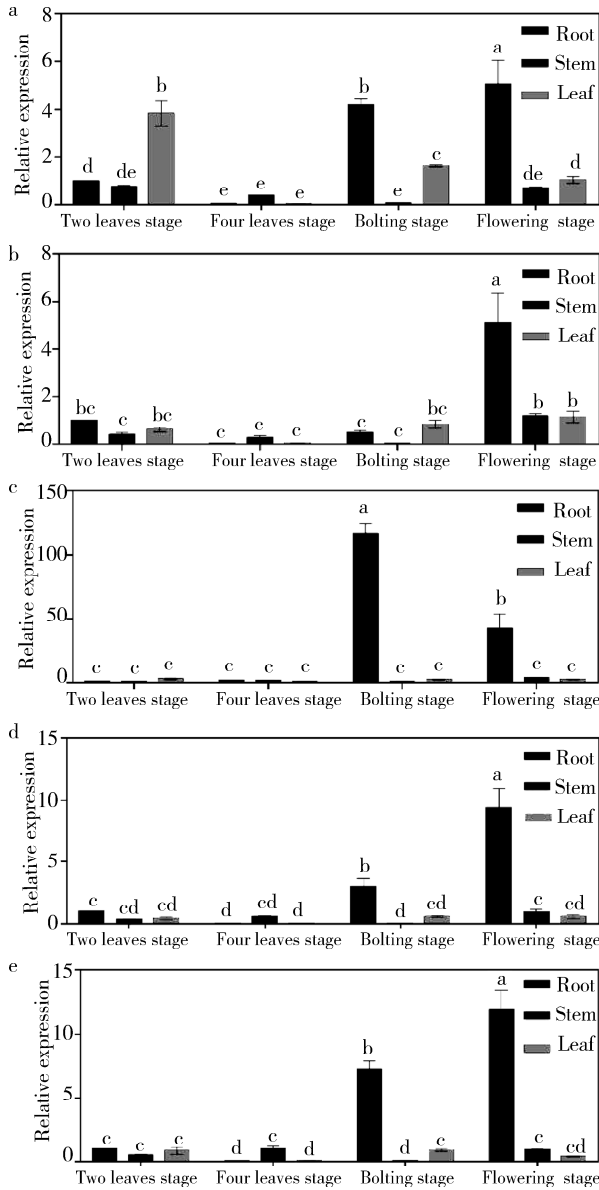


图 4 甘蓝型油菜 *BnbHLH92* 基因的时空表达分析

(a) *BnbHLH92-1*; (b) *BnbHLH92-2*; (c) *BnbHLH92-3*; (d) *BnbHLH92-4*; (e) *BnbHLH92-5*; 不同小写字母表示在不同时期不同组织中的显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Temporal and spatial expression analysis of *BnbHLH92-2*

(a) *BnbHLH92-1*; (b) *BnbHLH92-2*; (c) *BnbHLH92-3*; (d) *BnbHLH92-4*; (e) *BnbHLH92-5*; Different lowercase letters indicate significant differences in different tissues at different times ($P < 0.05$)

后, 表达量总体呈现先上升再降低的趋势, 但是他们的响应程度不是一致的, *BnbHLH92-3* 的响应程度最为剧烈, 分别在 12、9、9 h 表达量达到最大值, 分别是 0 h 的 3.66、1.62、6.32 倍。 *BnbHLH92-4* 和 *BnbHLH92-5* 在受到 ABA 诱导后, 表达量变化的趋势相似, 总体的表达量都在上升, 但是在 9 h 它们的表达量都骤降, 发生这一现象的具体原因还需要进一步的探究。

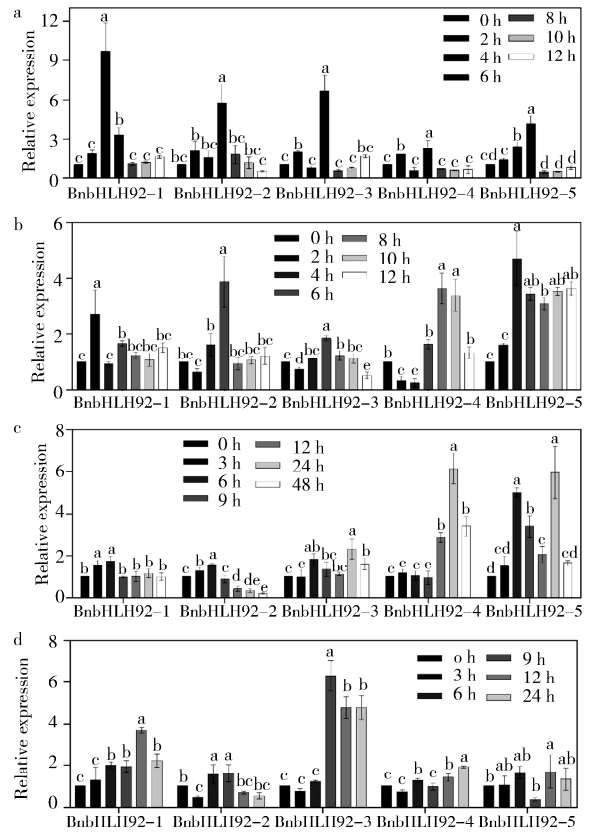


图 5 *BnbHLH92* 基因在不同处理下的表达分析

(a) 冷胁迫; (b) 热胁迫; (c) 盐胁迫; (d) ABA 诱导; 不同小写字母表示在不同处理下每个基因中不同时期的显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Relative expression of *BnbHLH92* genes under different treatments

(a) cold treatment; (b) heat treatment; (c) salt treatment; (d) ABA treatment; different lowercase letters indicate significant differences in different periods of each gene under different treatments ($P < 0.05$)

3.7 *BnbHLH92* 基因的启动子分析

通过 PlantCARE 在线分析 *BnbHLH92* 基因的启动子序列, 结果显示, 在 *BnbHLH92-1* 的启动子区域同时存在 ABRE 顺式作用元件和 DRE 顺式作用元件, 而 *BnbHLH92-2*、*BnbHLH92-3* 和 *BnbHLH92-4* 的启动子区域有 ABRE 顺式作用元件, 不存在 DRE 顺式作用元件。

4 讨论

大量证据表明 bHLH 转录因子在植物的生长发育过程中发挥着重要的作用。目前已有许多植物 bHLH 转录因子克隆出来进行鉴定, 但甘蓝型油菜 bHLH92 转录因子尚未进行克隆及功能鉴定。本研究从甘蓝型油菜中克隆得到了 *BnbHLH92-1*, *BnbHLH92-2*, *BnbHLH92-3*, *BnbHLH92-4*, *BnbHLH92-5* 基因编码区序列, 对这 5 个基因

进行了克隆与表达分析。

BnbHLH92 基因的在甘蓝型油菜生长周期中表达模式分析发现, *BnbHLH92* 主要在根中的表达。除 *BnbHLH92-2* 的抽薹期外, *BnbHLH92* 基因在抽薹期和花期表达量都上调, 并出现了显著性差异。但是在分析 *BnbHLH92-3* 的时空表达模式发现它在抽薹期根中的表达量陡增, 达到了二叶一心期根中表达量的 115.96 倍, 虽然在花期根中的表达量有所下降, 但是, 花期根中的表达量仍然是二叶一心期的 42.13 倍。这样的表达量变化引起了我们的注意, 经重复实验后, 发现表达量变化依然高达上百倍, 这说明很可能是 *BnbHLH92-3* 受到了其它因素的影响。分析发现, 这可能是甘蓝型油菜染上了根肿病所致, 在抽薹期时, 根肿的症状已经比较明显, 在抽薹期以前的二叶一心及四叶一心期, 尚未见根肿病症状, 因此 *BnbHLH92-2* 表达量的上升可能和受到了生物胁迫有关, 根肿病是否会影响到 *BnbHLH92-2* 的表达还需要进一步的实验论证。

植物基因组中包含许多的与胁迫应答有关不同家族的转录因子, 如 CBF 家族、NAC 家族、MYB 家族、AP2/EREBP 家族、bZIP 家族和 WRKY 家族等, 这些转录因子家族目前研究较多^[13]。然而, 植物的另一类重要的转录因子 bHLH 转录因子家族, 研究较少。到目前为止, 只有少数 bHLH 转录因子被报道在抗逆性中发挥重要作用。由于 bHLH 转录因子是一个大家族, 探索更多对胁迫应答相关的 bHLH 基因将有助于更好地理解该家族成员在胁迫信号网络中的作用^[14]。一般情况下, 基因在胁迫应答早期对外界环境反应迅速, 在诱导数小时后达到最大表达水平, 随后表达水平下降^[15]。例如, 在野生型拟南芥中, *AtbHLH122* 的相对表达量在干旱胁迫下 12 h 达到最大值^[5]。总体来看, *BnbHLH92* 基因同时参与到了甘蓝型油菜对低温、高温、盐害等胁迫的响应中, 可能在植物抗逆性上发挥着重要作用。通过对利用 qRT-PCR 分析 *BnbHLH92* 基因响应非生物胁迫, 我们发现在低温胁迫和高温胁迫下, *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2* 和 *BnbHLH92-5* 的表达模式是相似的, 而 *BnbHLH92-3* 和 *BnbHLH92-4* 的表达模式是相似的。在盐胁迫下, *BnbHLH92-1*、*BnbHLH92-2* 和 *BnbHLH92-4* 的响应模式类似, *BnbHLH92-3* 和 *BnbHLH92-5* 的响应模式类似。甘蓝型油菜 *BnbHLH92* 基因均

在非生物胁迫的响应中发挥着各自的作用。在不同非生物胁迫下, 不同 *BnbHLH92* 基因的响应速度和响应程度也是不一样的, 说明甘蓝型油菜 *BnbHLH92* 不同基因可能在胁迫下的不同时间段发挥着作用。他们之间的功能并不是完全冗余的, 可能是互相配合抵抗逆境。

ABA 是植物响应盐害、干旱、低温等非生物胁迫反应的主要介质, 并调节 ABA 依赖的胁迫应答基因的表达。根据 ABA 参与非生物胁迫应答的情况, 将植物中非生物胁迫应答通路分为两类: 依赖于 ABA 的信号通路和独立于 ABA 的信号通路。相应地, 在胁迫应答诱导基因启动子区域内的顺式作用元件也分为两类: 依赖于 ABA 的信号途径对应 ABRE 元件; 独立于 ABA 的信号途径对应 DRE 元件^[16]。在 ABA 的诱导下, *BnbHLH92* 基因都受到了 ABA 的诱导表达, 并且在 *BnbHLH92* 基因启动子区域均发现了 ABA 响应元件(ABRE)的存在, 但是在 *BnbHLH92-1* 的启动子区域还发现了 DRE 元件的存在。因此, *BnbHLH92* 可能通过 ABA 依赖途径调控甘蓝型油菜对非生物胁迫的耐受性, 但是具体机制还需要进一步验证。

总之, 甘蓝型油菜 bHLH92 转录因子参与响应高温、低温、盐等非生物胁迫, 但是具体调控机制还需要进一步深入的研究。*BnbHLH92* 转录因子的抗逆功能深入了解, 这对利用基因工程技术开发出产量高、品质好、抗逆性强的甘蓝型油菜品种具有重要的作用。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 宋验红, 冯刚, 王浩杰, 等. 甘蓝型油菜 BnDHAR 基因的克隆及表达分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2017, 54: 851.
- [3] Rehman S, Mahmood T. Functional role of DREB and ERF transcription factors: regulating stress-responsive network in plants [J]. *Acta Physiol Plant*, 2015, 37: 1.
- [4] Mao K, Dong Q, 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: 480.
- [5] Liu W, Tai H, Li 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: 1192.
- [6] Jung C, Seo J S, Han S W, *et al.* Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 623.
- [7] Wang F, Zhu H, Chen D, *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 Org*, 2016, 125: 387.
- [8] Zhou J, Li F, Wang J L, *et al.* Basic helix-loop-helix transcription factor from wild rice (OrbHLH2) improves tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Physiol*, 2009, 166: 1296.
- [9] 齐双慧. 甘蓝型油菜 BnTT8 转录因子的克隆与功能分析[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2018.
- [10] 张腾国, 常燕, 王娟. 油菜 BnICE1 的克隆及表达分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46: 205.
- [11] 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.
- [12] 王宇光, 李海英. 甜菜 BvBHLH92 基因组织表达及亚细胞定位研究[J]. *黑龙江大学工程学报*, 2017, 8: 45.
- [13] Wang Z, Xiong L, Li W, *et al.* The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 1971.
- [14] Yao P, Sun Z, Li C, *et al.* Overexpression of *Fagopyrum tataricum* FtbHLH2 enhances tolerance to cold stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2018, 125: 85.
- [15] Yamaguchi Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 781.
- [16] 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: 208.

引用本文格式:

中文: 王静, 白九元, 古少波, 等. 甘蓝型油菜 *BnbHLH92* 基因的克隆与表达分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 1169.

英文: Wang J, Bai J Y, Gu S B, *et al.* Molecula cloning and expression analysis of *BnbHLH92* genes in *Brassica napus* L. [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 1169.