

云南野生黄牡丹 *PlbHLH3* 转录因子 基因的克隆与表达

史倩倩, 周琳, 李奎, 王雁*

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要:以云南野生黄牡丹为试材,基于已构建的花瓣转录组数据库,筛选到了24个与花色素苷合成相关的bHLH转录因子蛋白同源性高的Unigene序列,命名为*PlbHLH1*~24。通过开放阅读框(ORF)的氨基酸序列比较和系统进化树分析,发现*PlbHLH3*可能参与调控花色素苷合成,其ORF包含一个2040 bp的开放阅读框,编码一个679个氨基酸的蛋白;其氨基酸序列与葡萄*VvMYC1*和苹果*MdbHLH3*的亲缘关系最近,相似性达60%以上。相对荧光定量PCR分析表明,*PlbHLH3*在黄牡丹和紫牡丹的不同组织中均有表达,在两者的花药,心皮和花瓣中的表达显著高于在萼片和叶片中的表达;*PlbHLH3*在紫牡丹的硬蕾期高丰度表达,而在黄牡丹的硬蕾期表达量最低,在其他4个时期的表达量显著或极显著高于在硬蕾期的表达量。本研究推测*PlbHLH3*参与黄牡丹花色素苷合成的调控作用,为今后深入探讨黄牡丹花色形成机制奠定理论基础。

关键词:黄牡丹; bHLH; 花色素合成; 基因克隆; 表达分析

中图分类号:S685.11

文献标识码:A

Isolation and Expression of *PlbHLH3* Transcription Factor Genes in *Paeonia lutea*

SHI Qian-qian, ZHOU Lin, LI Kui, WANG Yan

(Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry,
Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Twenty-four unigene sequences shared high homology with bHLH transcription factor protein involved in plant anthocyanin biosynthesis were obtained from previous-constructed tree peony (*Paeonia lutea*) petal transcriptome database and named as *PlbHLH1*~24. By amino acid sequence comparing and phylogenetic tree analysis, it showed that *PlbHLH3* was considered to be related to regulate anthocyanin biosynthesis, contained a 2040 bp ORF encoding 679 amino acid residues with typical bHLH structural domain; the predicted protein sequence of *PlbHLH3* also shared high similarity with other bHLH transcription factor that related to anthocyanin biosynthesis such as *VvMYC1* and *MdbHLH3*. Relative Real-Time PCR analysis indicated that *PlbHLH3* expressed in different tissues of *P. lutea* and *P. delavayi*, the expression in carpel, anther and petal was significantly higher than that in sepal and leaf; *PlbHLH3* reached the highest abundance at early stage of *P. lutea*,. For *P. delavayi*, the *PlbHLH3* reached the lowest level at early stage, and was significantly or extremely significantly lower than that in other four stages. In conclusion, it is inferred that *PlbHLH3* might associate with the regulatory of anthocyanin biosynthesis in *P. lutea* and this would provide the basis for insight into the molecular mechanisms underlying tree peony yellow flower pigmentation.

Key words: *Paeonia lutea*; bHLH; anthocyanin biosynthesis; gene cloning; expression analysis

收稿日期:2014-08-29

项目基金:“863”计划(SQ2010AA1000687008)、国家自然科学基金项目(31201654)

作者简介:史倩倩(1987—),女,在读博士。主要研究方向:花卉遗传改良。电话:15210036859; E-mail:shiqianqian2005@163.com

* 通讯作者:王雁,国家林业局林木培育重点实验室(中国林业科学研究院林业研究所),研究员。E-mail:chwy8915@sina.com

花色素主要包括类黄酮、类胡萝卜素、叶绿素和甜菜色素及其衍生物,其中类黄酮是大多数花色形成的决定性素群^[1],多分布于种子植物的叶、花、果实、种子及其他组织的液泡中。花色素生物合成由结构基因和调控基因共同调控^[2],其中目前研究证明花色素合成的转录因子包括 MYB 蛋白、bHLH 蛋白和 WD40 重复蛋白^[3]。

bHLH(basic helix-loop-helix,碱性螺旋-环-螺旋)转录因子构成了真核生物蛋白质中的一个大家族,其成员在生物的生长发育调控过程中起着非常重要的作用。每个 bHLH 基序约由 60 个氨基酸组成,其中的 19 个位点具有高度保守性,含有两个亚功能区,即位于 C 末端的 HLH 区域和 N 末端的碱性氨基酸区域^[4]。bHLH 转录因子在植物的花色素合成^[5]、花器官发育^[6-7]、光形态建成^[8]、激素应答^[9-12]、金属离子体内平衡^[13-14]等方面发挥重要作用。目前拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) TT8、玉米(*Zea mays*) (*Lc*、*B*、*R/B*)、水稻(*Oryza sativa* Linn) OSB1、矮牵牛(*Petunia hybrida*) (*AN1*、*AN4*、*AN11*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*) *Delila*、牵牛(*Ipomoea nil*) (*InDEL*、*InIVS*、*InbHLH3*)、非洲菊(*Gerbera jamesonii*) *gmyc1*、龙胆(*Gentiana scabra*) *GtbHLH1*、亚洲杂交百合(*Asian hybrid lily*) *LhbHLH2*、苹果(*Malus domestica*) *MdbHLH3* 等多种植物的调控花色素合成相关基因的 bHLH 转录因子得到了克隆并进行了功能鉴定^[15-28]。

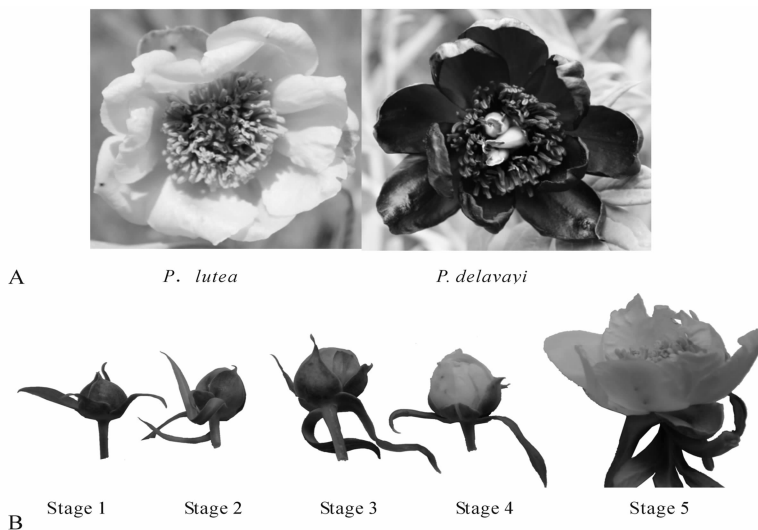
云南野生黄牡丹(*Paeonia lutea*)是中国西南地

区特有种,属于芍药科芍药属牡丹组的落叶亚灌木^[29-32],不仅是我国特有的珍贵木本花卉和具极高药用价值的药用植物,而且是牡丹花色改良育种的珍稀育种资源^[33]。目前虽然中原牡丹的花色素合成途径的部分结构基因(*PsCHS1*、*PsCHI1*、*PsDFR1*、*PsF3H1*、*PsF3'HI*、*PsANSI*)已被分离^[34-35],但关于黄牡丹的花色素代谢途径的结构基因和转录因子基因 *bHLH* 还未见报道。因此本研究拟依据黄牡丹转录组测序获得的 unigene 信息并结合 RT-PCR 和 RACE 技术,克隆并筛选出与花色素苷相关的候选 *bHLH* 基因,并对其在黄牡丹和紫牡丹(*P. delavayi*)不同发育阶段和花盛开期的不同组织中的表达模式进行分析,为探究 *bHLH* 转录因子在黄牡丹花色形成过程中的作用,特别是为牡丹花色定向遗传改良和品种创新提供新的理论依据和基因资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

4月底至5月上旬,采取位于滇西北香格里拉县城以西 25 km 左右的滑雪场附近(27°57' N, 99°35' E)的黄牡丹(*P. lutea*)和紫牡丹(*P. delavayi*)的 5 个时期(stage 1:硬蕾期、stage 2:圆桃期、stage 3:透色期、stage 4:初开期和 stage 5:盛开期)的花瓣及盛开期(stage 5)的叶片、萼片、雄蕊和雌蕊,取下后分别用锡箔纸包好,立即用液氮速冻后于 -80℃ 冰箱中保存备用。



A: 黄牡丹(左)和紫牡丹(右)盛开期的花; B: 黄牡丹的 5 个开放时期

图 1 试验材料

1.2 基因全长序列的克隆

采用改进的 CTAB 法^[35] 提取试验材料的总 RNA。检测质量合格后,以 1 μg 总 RNA 为模板,利用 M-MLV 反转录酶 (Promega 公司) 合成 cDNA 第一链。然后根据已测得的黄牡丹转录组数据库中的 bHLH 转录因子 Unigene 信息设计特异引物 (表 1)。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶检测,凝胶回收与预期片段大小一致的条带,连接到 PMD-T19 载体

(Takara) 上,再转化到大肠杆菌 DH5a,通过蓝白筛选及质粒酶切鉴定后,由北京中美泰和科技公司进行测序。其中引物设计采用 PrimerPremier5.0 和 DNAMAN (ver. 6.0.3.99) 软件进行。除 RACE 实验中通用引物为试剂盒附带以外 (序列见 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书),其余各基因扩增引物委托上海生工生物公司合成,序列如表所示。

表 1 黄牡丹 *bHLH* 基因克隆及表达分析所用引物

作用	基因	Unigene 编号	引物序列 (5'-3')	
分离基因	<i>PibHLH3</i>	CL4938. contig2	CACTACTCCCCTCCACAATCCTCATCT	5 RACE
			TTTAGCGTGCCATTTCTTCACAACA	3 RACE
	<i>PibHLH5</i>	CL6535. contig2	TGGAGTGTGAGAATTGGGGTCTGTG	3 RACE
			CCTTTGCTTCTCAGGCTGTATGGTT	5 RACE
	<i>PibHLH8</i>	Unigene9277	TCTGGAGGCAATGGATTACATACGAT	3 RACE
			AAGGGGTTTGCCATATCGCTGA	5 RACE
	<i>PibHLH9</i>	CL10589. contig1	TGGGGCTTCTTCTTGTTCCTCTGC	3 RACE
			TCCTAGCTTTCTTTAGAGCCCCACC	5 RACE
	<i>PibHLH11</i>	Unigene1483	ACCACTGACTATTGGAACCTGCTTTG	5 RACE
			TCCAGTTCGGTTGGAATGTATGA	3 RACE
	<i>PibHLH12</i>	Unigene2862	CCTTTGATTTTCTGTCTTGTCTCG	5 RACE
			AGAGGCAAAGAGGTCGTATGAAGTGG	3 RACE
	<i>PibHLH15</i>	Unigene9522	TCTTTGTCCTGTTTCATTCGTCTT	5 RACE
			GACCTATCCCACTCAAGCACCTCC	3 RACE
<i>PibHLH17</i>	Unigene9611	TGTAAGGGAACCACAAAGACAGGAGC	5 RACE	
		AGTCCGATCAGCAGAATAATGAAAGG	3 RACE	
<i>PibHLH24</i>	Cl2997. contig6	GGAACCGCAAAGGACGACTA/CGTAGCGGCAAACCTATCCA		
		GAGTGGGGTTGAATCCTTG/AAGATTTCTGGATAGCTCTGTGGC		
qRT-PCR	<i>PibHLH3</i>	CL4893. contig2	GGAACCGCAAAGGACGACTA/CGTAGCGGCAAACCTATCCA	
	<i>Helicase</i>	CL6029. Contig2	GAGTGGGGTTGAATCCTTG/AAGATTTCTGGATAGCTCTGTGGC	

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN6.0 软件进行序列翻译和氨基酸相似性比对,并通过 ExPASy Protparam (http://www.expasy.org/compute_pi/) 运用 Compute pI/Mw 软件对目的基因编码蛋白等电点和分子量进行预测,并运用 ProtScale 软件对其疏水性预测分析。联网至 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi> 预测蛋白质保守结构域。利用 MEGA5.2.2 软件中的 Neighbor-Joining (邻位相连法, NJ) 法进行系统进化树分析。

1.4 qRT-PCR 表达分析

以 *Helicase* 为内参基因,应用 qRT-PCR 法分析 *PibHLH3* 在不同发育阶段和不同组织的表达模式,引物序列见表 1。反转录反应体系为:总 RNA 2 μL , 5 \times PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 1 μL , Random primer (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Oligo dT primer (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , RNAfree H₂O 11 μL 。参照 TaKaRa 公司的荧光定量试剂盒 STBR PrimeScriptTM RT-PCR

Kit 说明书,建立 20 μL 反应体系: cDNA 模板 2 μL , 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL , 特异引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 50 \times ROX Reference Dye II 0.4 μL , H₂O 6.8 μL 。荧光定量 PCR 在 ABI 7500 实时定量 PCR 仪上进行,反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 通过加热扩增产物 60 至 95 $^{\circ}\text{C}$, 获得溶解曲线。每个试验设 3 次重复,利用 ABI 7500 PCR 仪 Sequence Detection software 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 黄牡丹 *PibHLH* 基因家族的分离及花色素苷相关 bHLH 转录因子的筛选

对本课题组前期构建的黄牡丹花瓣转录组数据库 (未发表) 进行 Blastx 分析发现有 31 个 Unigene 注释为 bHLH 转录因子 (表 2)。但其中同一 Unigene 的不同 contig 的序列一致性很高,如 CL6977. contig1 与 CL6977. contig2 的序列一致, CL10589.

contig1 与 CL10589. contig2 序列完全相同, CL13397. Contig1 与 CL13397. Contig2 序列相同, CL14660. Contig1 与 CL14660. Contig2 序列相似等。据此推测 24 个 bHLH 序列可能参与调控花色素苷合成。其中 9 个 bHLH 转录因子序列较短或均在保守区域,需要根据 unigene 信息设计特异引物,利用 RACE 技术对其进行 ORF 全长扩增(表 1)。然后将这 24 个 *PibHLH* 成员与已经鉴定了调控花色素合成的 bHLH 转录因子,如拟南芥 *TT8*、玉米 (*Lc*、*B*、*R/B*)、水稻 *OSBI*、矮牵牛 (*AN1*、*AN4*、*AN11*)、金鱼草

Delila、牵牛 (*Ipomoea purpurea*) (*InDEL*、*InIVS*、*In-bHLH3*)、非洲菊 *gmyc1*、龙胆 *GtbHLH1*、亚洲杂交百合 *LhbHLH2*、苹果 (*MdbHLH3*、*MdbHLH33*) 等多种植物进行系统进化树分析^[15-28](图 2)。由图可见:*PibHLH3* 与葡萄 *VvMYC1* 先聚类在一起,再与苹果 *MdbHLH3*、矮牵牛 *PhAN1* 聚为一枝,与其他植物调控花色素合成的 bHLH 基因聚类在一起;而其他 23 个 bHLH 成员聚为一大枝;这说明 *PibHLH3* 可能参与花色素合成的调控。

表 2 与 *bHLH* 转录因子基因相关的 24 个 Unigene 基本信息

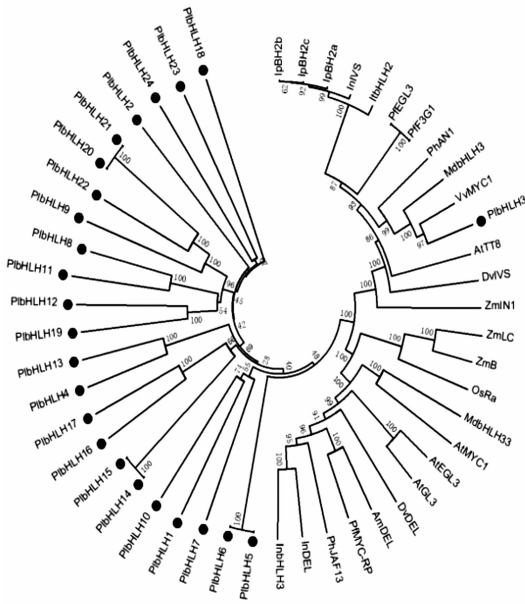
Unigene 编号	Unigene 长度/bp	Blastx 比对结果
CL6535. Contig1	1 635	transcription factor bHLH13 [<i>Vitis vinifera</i>]
CL6977. Contig1	1 284	transcription factor bHLH123-like [<i>Vitis vinifera</i>]
CL6977. Contig2	330	transcription factor bHLH123-like [<i>Vitis vinifera</i>]
CL7910. Contig2	753	transcription factor bHLH35-like [<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>]
CL10589. Contig1	1 593	transcription factor bHLH49-like [<i>Vitis vinifera</i>]
CL10589. Contig2	249	transcription factor bHLH49-like [<i>Vitis vinifera</i>]
CL13397. Contig1	396	Transcription factor bHLH61 isoform 2 [<i>Theobroma cacao</i>]
CL13397. Contig2	477	Transcription factor bHLH61 isoform 2 [<i>Theobroma cacao</i>]
CL14660. Contig1	1 620	transcription factor ICE1 isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]
CL14660. Contig2	1 620	transcription factor ICE1 isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene1483	1 008	transcription factor bHLH68 [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene2862	1 491	Transcription factor bHLH69, putative isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]
Unigene6893	645	transcription factor bHLH104-like [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene9277	456	transcription factor bHLH113-like [<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>]
Unigene9293	699	transcription factor bHLH51-like [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene9522	819	transcription factor bHLH63-like [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene9596	864	transcription factor bHLH71 [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene9611	861	transcription factor bHLH96-like [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene11808	2 169	transcription factor bHLH140-like [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene12352	2 115	DNA-binding superfamily protein, putative isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]
Unigene13617	918	transcription factor UNE12 [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene20504	711	transcription factor bHLH147 [<i>Vitis vinifera</i>]
Unigene22890	837	transcription factor bHLH79 isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]
CL2253. Contig1	930	Transcription factor bHLH69, putative [<i>Theobroma cacao</i>]
CL2253. Contig2	1 041	Transcription factor bHLH69, putative [<i>Theobroma cacao</i>]
CL2306. Contig2	372	transcription factor bHLH62-like [<i>Vitis vinifera</i>]
CL2306. Contig4	1 299	transcription factor bHLH62-like [<i>Vitis vinifera</i>]
CL2843. Contig1	789	bHLH-like DNA binding protein [<i>Vitis vinifera</i>]
CL2843. Contig2	789	bHLH-like DNA binding protein [<i>Vitis vinifera</i>]
CL2997. Contig6	645	transcription factor bHLH47-like isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]
CL2997. Contig7	387	transcription factor bHLH47-like isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]

2.2 黄牡丹 *PibHLH3* cDNA 序列分析

利用 NCBI 提供的 ORF Finder 进行分析发现 *PibHLH3* cDNA 包含一个 2 040 bp 的开放阅读框 (openreadingframe, ORF) 和一个 poly(A) 尾巴, 5' 非

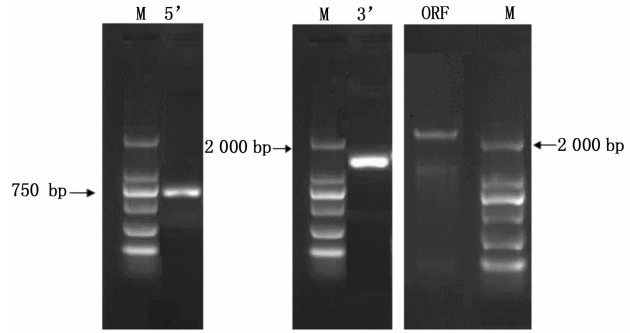
编码区长 265 bp, 3' 非编码区长 127 bp。其 ORF 编码一个含 679 个氨基酸的蛋白质(图 3), Protparam (http://www.expasy.org/compute_pi/) 预测所编码蛋白的分子量 (Mw) 为 167.364 kD, 理论等电点

(pI) 为 4.90。



IpBH2a: ABW69686; *IpBH2b*: ; ABW69687; *IpBH2c*: ABW69687; *InIVS*: BAE94394; *InbHLH2*: BAD18984; *PjEGL3*: AB103172; *PjF3G1*: BAC56998; *PhANI*: AAC25927; *MdbHLH3*: ADL36597; *VvMYC1*: ACC68685; *AtTT8*: AJ277509; *DvIVS*: BAJ33516; *ZmIN1*: AAB03841; *ZmLC*: ABD72707; *ZmB*: CAA40544; *OsRa*: AAC49219; *MdbHLH33*: ABB84474; *AtMYC1*: BAA11933; *AtEGL3*: NP_176552; *AtGL3*: NP_680372; *DvDEL*: BAJ33516; *AmDEL*: AAA32663; *PfMYC-RP*: BAA75513; *PhJAF13*: AAC39455; *InDEL*: AB232774; *InbHLH3*: BAE94395

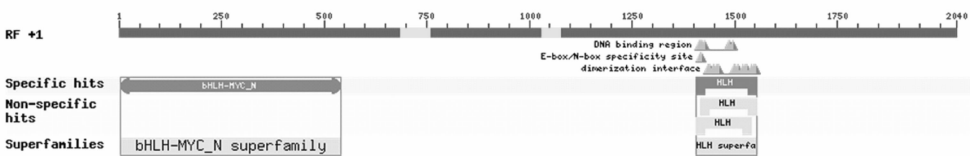
图2 *PibHLH1* ~ 24 与其他物种 bHLH 氨基酸序列的系统进化树分析



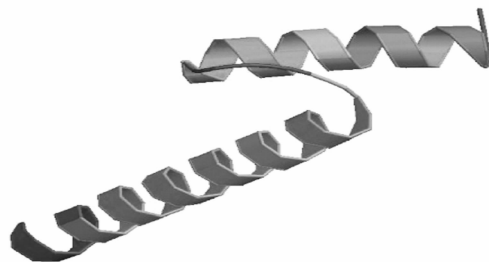
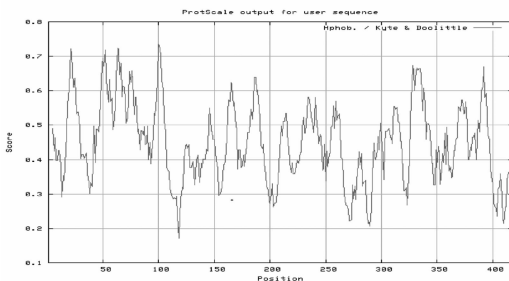
M: DNA marker DL2000. A:5' RACE 扩增; B:3' RACE 扩增; C:ORF 扩增产物

图3 黄牡丹 *PibHLH3* 基因的 PCR 扩增电泳

利用 BlastP 对 *PibHLH3* 编码的蛋白保守域进行预测发现, *PibHLH3* 编码的蛋白的保守结构域为 HLH (图 4 - A)。在 HLH 保守域的特异位点(图 5)包括由 6 个残基组成的 DNA 结合位点(第 472、473、474、476、496、499 个氨基酸残基), 1 个残基组成的 E-box/N-box 特异位点(第 473 个氨基酸残基)和 14 个残基构成的二聚接口(第 481、482、485、486、488、489、501、504、508、509、510、514、516、517 个氨基酸残基); HLH 保守域的非特异位点分两类: 一类是螺旋-环-螺旋 DNA 结合域(图 4 - A), 另一类是 helix loop helix 域(图 4 - A), 属于典型的碱性-螺旋-环-螺旋(basic helix-Loop-Helix)结构域。其编码蛋白的疏水性分析表明, 编码蛋白均为为亲水区(图 4 - B)。三级结构预测, 其模型相似度与 4f21B 模型达到 34.55% (图 4 - C)。



A



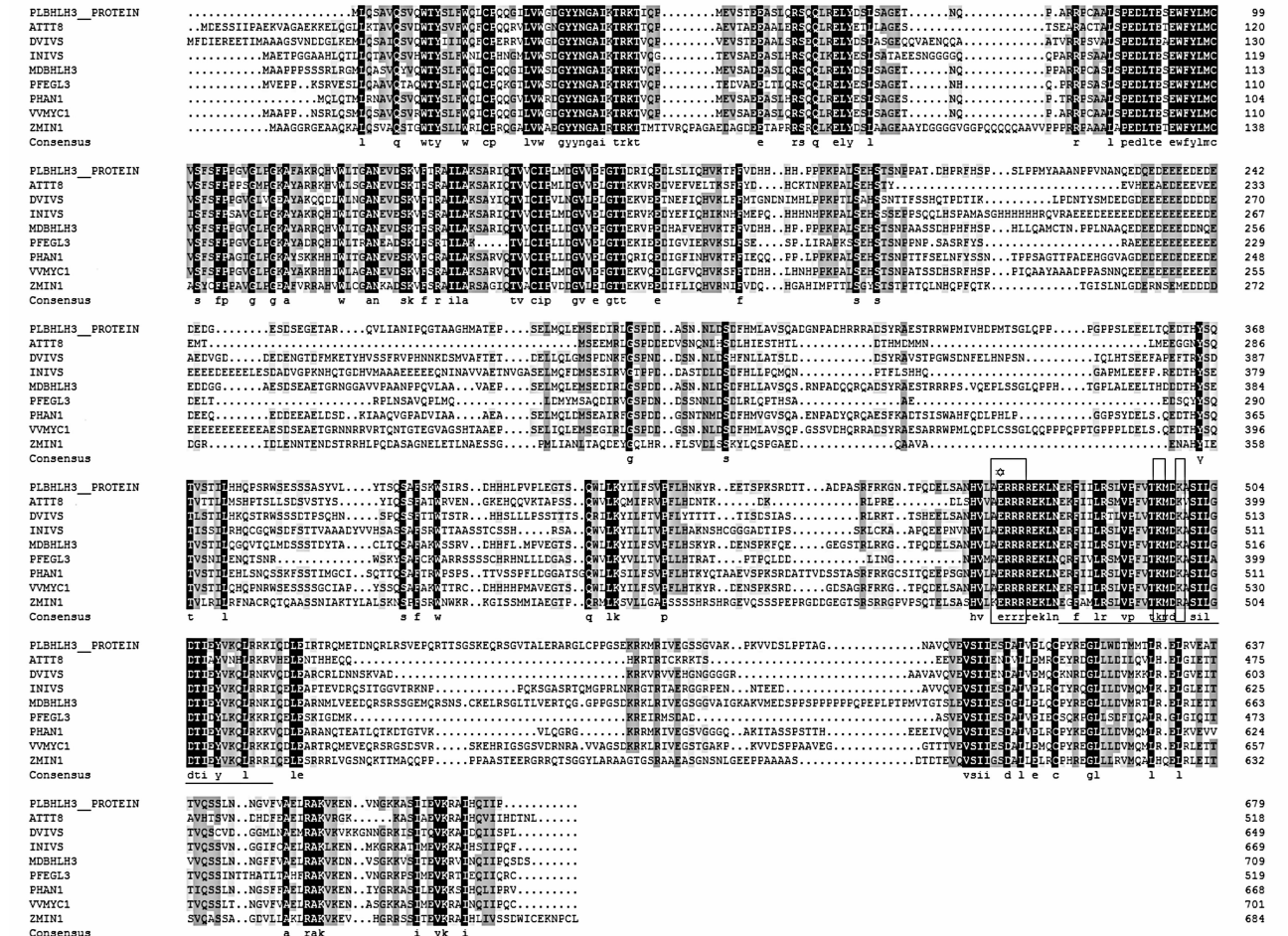
C

A. 结构域分析; B 疏水性分析. ; C. 三级结构预测

图4 黄牡丹 *PibHLH3* 基因的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件对黄牡丹 *PibHLH3* 编码氨基酸与其他物种花色苷合成相关的 bHLH 蛋白进行同源性分析。结果发现,黄牡丹 *PibHLH3* 与已知其他植物的调控花色苷合成的 bHLH 蛋白氨基酸序列有较高的同源性,其中与葡萄 *VvMYC1* 相似性最高,达 63.37%;其次与苹果 *MdbHLH3* 和 *PhANI* 相

似性也较高,分别为 62.50% 和 51.98%;与玉米 *ZmINI1* 和拟南芥 *AtTT8* 相似性最低,分别为 34.03% 和 34.65% (图 5)。氨基酸序列比对结果分析与构建的系统进化树(图 2)分析结果一致,说明 *PibHLH3* 基因参与花色苷合成的调控。



方框处为 DNA 结合位点;星号处为 E-box/N-box 特异位点;下划线处为二聚接口。

AtTT8:拟南芥, *DnIVS*:大丽花, *InIVS*:牵牛花, *MdbHLH3*:苹果, *PjEGL3*:白苏, *PhANI*:矮牵牛, *VvMYC1*:葡萄, *ZmINI1*:玉米。

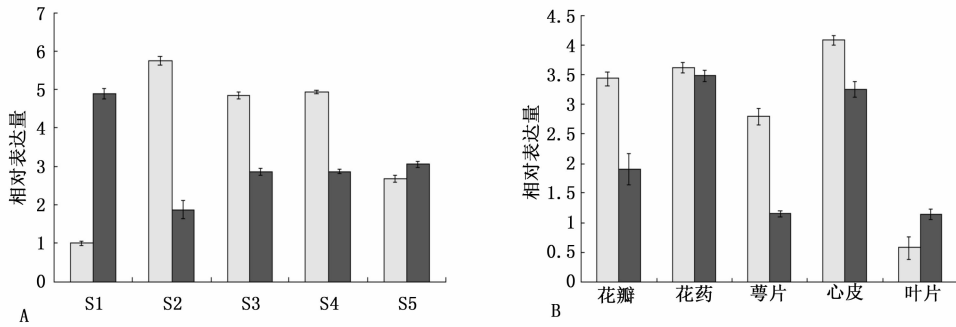
图 5 *PibHLH3* 与其他植物氨基酸序列的同源性比较

2.3 相对荧光定量 PCR 表达分析

以黄牡丹 *Helicase* 基因为内参照,采用荧光定量 PCR 方法对黄牡丹和紫牡丹的不同发育时期(图 6 - A)和盛开期的不同组织(图 6 - B)中 *PibHLH3* 的表达进行检测,结果表明, *PibHLH3* 在黄牡丹和紫牡丹的不同时期的表达模式不同,在紫牡丹的硬蕾期高丰度表达,在其他 4 个开发时期的表达量相似,极显著低于在硬蕾期的表达量,而在黄牡丹的硬蕾期表达量最低,在其他 4 个时期的表达量显著或极显

著高于在硬蕾期的表达量,在第 2、3、4 时期的表达量相似。

PibHLH3 在黄牡丹和紫牡丹盛开期的不同组织中均有表达。在黄牡丹的组织中,表达量从高到低依次为心皮、花药、花瓣、萼片和叶片,在叶片中的表达量显著低于在其他组织中的表达量。而在紫牡丹的花药中的表达量最高,其次是心皮和花瓣,在叶片中的表达量最低。这与黄牡丹和紫牡丹的不同组织的形态一致。



A. *PlbHLH3* 在不同发育阶段的表达模式,1~5:花瓣的五个发育阶段;B. *PlbHLH3* 在盛开期的不同组织中的表达模式

□ 黄牡丹; ■ 紫牡丹

图6 在黄牡丹和紫牡丹中 *PlbHLH3* 转录因子的相对表达量

3 讨论

bHLH 转录因子蛋白具有典型的碱性螺旋-环-螺旋(basic Helix-Loop-Helix, HLH)结构域,以二聚体的形式结合到特异的 DNA 序列上,调控下游基因的表达^[36]。本研究分离得到的 *PlbHLH3* 基因所推测编码的蛋白序列也具有 bHLH 结构域,表明黄牡丹 *PlbHLH3* 基因属于 bHLH 类转录因子基因。

bHLH 转录因子以多基因家族形式存在植物体内,参与多种植物生命活动,如类黄酮生物合成^[5]、植物逆境胁迫响应^[37-38]、雄蕊和花粉粒发育^[6-7]等,其中调节类黄酮生物合成是植物 bHLH 转录因子最重要的功能之一。Li 对拟南芥和水稻 bHLH 家族基因序列和表达活性的研究表明序列相似的 bHLH 基因在水稻和拟南芥中具有相似的功能^[39]。本研究分离得到的 24 个 bHLH 基因中,*PlbHLH3* 基因所编码的蛋白质序列与调控花色苷合成的 bHLH 蛋白同源性较高如葡萄 *VvMYC1*^[40]、苹果 *MdbHLH3*^[41] 和矮牵牛 *PhANI*^[42],推测 *PlbHLH3* 基因可能参与调控黄牡丹花色苷的生物合成。*PlbHLH3* 基因的生物学功能还需后续工作进行阐明,如探究其表达规律、研究基因功能等。

bHLH 转录因子对植物花色苷合成基因的表达的调控作用,具有组织特异性。如金鱼草的 bHLH 转录因子 DELILA 的表达具有较强的组织特异性,主要在花冠、萼片、子叶和茎中起作用^[43];矮牵牛 *PhANI* 在其花色苷生物合成调控中起重要作用,主要参与花瓣或花药花色苷生物合成的调控^[25, 42, 44-46]。bHLH 转录因子与 MYB 蛋白相互作用共同调控花色苷的合成,如非洲菊的 R2R3-MYB

蛋白 GMYB10 与 bHLH 蛋白 GMYC1 相互作用共同激活 *DFR* 表达,且 GMYC1 具有较强的器官、组织和花类型特异性。如其调节花冠和心皮中的 *DFR* 表达,对冠毛和雄蕊中却不调节^[47]。本研究中,*PlbHLH3* 在黄牡丹和紫牡丹的花药,心皮和花瓣中的表达显著高于在萼片和叶片中的表达,这与两者的不同组织的形态一致。

黄牡丹的花瓣的花色素成分主要为查尔酮和黄酮、黄酮醇的混合物,包括 2',4',6',4-四羟基查尔酮、异杞柳苷及山奈酚、槲皮素、异鼠李素、金圣草素等^[48,49],而紫牡丹的花瓣的花色素成分主要是芍药花素-3,5-二葡萄糖苷^[50-51]。*PlbHLH3* 在紫牡丹的硬蕾期高丰度表达;而在黄牡丹的硬蕾期表达量最低,在其他 4 个时期的表达量显著或极显著高于在硬蕾期的表达量,在第 2、3、4 时期的表达量相似,这与 *PsDFR1* 中原牡丹的紫色系和黑色系品种的花瓣的整个着色过程中都保持较一致的表达水平,而在黄色系品种的‘透色期’表达量达到最高,并随着花朵的开放表达量逐渐降低^[35]。同时这与切花菊 (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.) 的 bHLH 在不同发育时期的表达模式基本一致,即转录因子 bHLH 表达先于结构基因在蕾期即有强烈表达^[52]。因此综合研究结果表明 *PlbHLH3* 转录因子参与调控黄牡丹的花色素合成,其如何发挥作用及与 MYB 转录因子和 WDR 重复蛋白的协调作用还需进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 黄金霞,王亮生,李晓梅,等. 花色变异的分子基础与进化模式研究进展[J]. 植物学通报,2006, 23(4): 321-333.
- [2] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin

- biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071–1083.
- [3] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 63–70.
- [4] 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*, 2000, 19(1): 84–90.
- [5] Nesi N, Debeaujon I, Jond C, *et al.* The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis siliques*[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(10): 1863–1878.
- [6] Heisler MG, Atkinson A, Bylstra YH, *et al.* SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein[J]. *Development*, 2001, 128: 1089–1098.
- [7] Sorensen A M, Kröber S, Unte U S, *et al.* The *Arabidopsis* ABORTED MICROSPORES (*AMS*) gene encodes a MYC class transcription factor[J]. *Plant J*, 2003, 33(2): 413–423.
- [8] Leivar P, Monte E, Oka Y, *et al.* Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness[J]. *Curr Biol*, 2008, 18(23): 1815–1823.
- [9] Abe H, Urao T, Ito T, *et al.* *Arabidopsis AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 63–78.
- [10] Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, *et al.* JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(7): 1938–1950.
- [11] Li H, Sun J, Xu Y, *et al.* The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*. 2007, 65(5): 655–665.
- [12] Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Galstyan A, *et al.* PARI and PAR2 integrate shade and hormone transcriptional networks[J]. *Plant Signal Behav*. 2008, 3(7): 453–454.
- [13] Rampey R A, Woodward AW, *et al.* An *Arabidopsis* basic helix-loop-helix leucine zipper protein modulates metal homeostasis and auxin conjugate responsiveness[J]. *Genetics*. 2006, 174(4): 1841–1857.
- [14] Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, *et al.* The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(7): 2219–2236.
- [15] Ludwig SR, Habera LF, Dellaporta SL, *et al.* Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissuespecific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 86(18): 7092–7096.
- [16] Chandler V L, Radicella J P, Robbins T P, *et al.* Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous; Isolation of B utilizing R genomic sequences[J]. *Plant Cell*, 1989, 1(12): 1175–1183.
- [17] Goff S A, Cone K C, Chandler V L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins[J]. *Genes Dev*. , 1992, 6(5): 864–875.
- [18] Goodrich J, Carpenter R and Coen E S. 1992. A common gene regulates pigmentation patten in diverse plant species. *Cell*, 68(5): 955–964.
- [19] Elomaa P, Mehto M, Kotilainen M, *et al.* A bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on *dihydrofl avonol-4-reductase (dfr)* gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (*Asteraceae*). *Plant J*. , 1998, 16(1): 93–99.
- [20] Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, *et al.* The purple leaf (Pl) locus of rice: The pl allele has a complex organization and includes two Genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis . *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(9): 982–991.
- [21] Park K, Ishikawa N, Morita Y, *et al.* A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea Purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytolmelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation . *The Plant Journal*, 2007b, 49(4): 641–654
- [22] Nakatsuka T, Haruta K S, Pitaksutheepong C, *et al.* Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers[J]. *Plant Cell Physiol*. 2008, 49: 1818–1829.
- [23] Espley R V, Hellens R P, Putterill J, *et al.* Red colouration in apple fruit due to the activity of the MYB transcription factor, *MdMYB10*[J]. *Plant J*. , 2007, 49: 414–427.
- [24] Franken P. , Schrell S. , Peterson P A. , *et al.* Molecular analysis of protein domain function encoded by the myb-homologous maize genes *CI*, *Zm1* and *Zm38*[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6(1): 21–30.
- [25] Spelt C, Quattrocchio F, Mol JNM, *et al.* Anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1619–1631.
- [26] Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, *et al.* Two R2R3-MYB genes, homologs of petunia AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of Asiatic hybrid lily [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 463–474.
- [27] Wang Kui-lin, Bolitho, K. , Grafton, K. , *et al.* An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 50.
- [28] 王 勇,陈克平,姚 勤. bHLH 转录因子家族研究进展[J]. *遗传*, 2008, 30(7): 821–830.
- [29] 方文培. 中国芍药属植物的研究[J]. *植物分类学报*, 1958, 7(4): 297–323.
- [30] 王蓬英. 中国牡丹品种图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997, 2–7.
- [31] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [32] 龚 询. 滇牡丹复合群体分类研究[J]. 7 昆明植物研究所, 1990.
- [33] 王志芳, 王 雁, 岳 桦. 珍稀资源: 黄牡丹[J]. *中国城市林业*, 2007, 5(2): 59–60.
- [34] Zhou L, Wang Y, Ren L, *et al.* Overexpression of Pl-CH11, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony (*Paeonia*

- suffruticosa*), reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 16(3): 285–295.
- [35] Zhou L, Wang Y, Peng Z. Molecular characterization and expression analysis of chalcone synthase gene during flower development in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(8):1275–1284.
- [36] Fan C, Purugganan M D, Thomas D T, *et al.* Heterogeneous evolution of the Myc-like Anthocyanin regulatory gene and its phylogenetic utility in *Cornus* L. (Cornaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 33(3): 580–594.
- [37] Jiang Y, Deyholos M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes[J]. *BMC Plant Biol*, 2006, 6(1): 25.
- [38] Jiang Y, Yang B, Deyholos M K. Functional characterization of the *Arabidopsis* bHLH92 transcription factor in abiotic stress[J]. *Mol Genet Genomics*, 2009, 282(5): 503–516.
- [39] Li XX, Duan XP, Jiang HX, *et al.* Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4):1167–1184.
- [40] Hichri I, Heppel S C, Pillet J, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine [J]. *Mol Plant*, 2010, 3(3): 509–523.
- [41] Xie X B, Li S, Zhang R F, *et al.* The bHLH transcription factor *MdbHLH3* promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(11): 1884–1897.
- [42] Quattrocchio F, Wing J F, Va K, *et al.* Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes [J]. *Plant J*, 1998, 13(4): 475–488.
- [43] Martin C, Prescott A, Mackay S, *et al.* Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J*. 1991, 1(1): 37–49.
- [44] Quattrocchio F, Wing J F, Leppen H, *et al.* Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5(11): 1497–1512.
- [45] Quattrocchio F, Baudry A, Lepiniec L, *et al.* The regulation of flavonoid biosynthesis. In: Grotewold E(ed) *The science of flavonoids* [J]. New York, Springer, pp. 2006: 97–122.
- [46] de Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, *et al.* The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals [J]. *Genes & Development*, 1997, 11:1422–1434.
- [47] Elomaa P, Mehto M, Kotilainen M, *et al.* A bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on *dihydroflavonol-4-reductase (dfr)* gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (*Asteraceae*). *Plant J.*, 1998, 16(1):93–99.
- [48] Li C, Du H, Wang L, *et al.* Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia* section *Moutan*) yellow flowers [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 8496–8503.
- [49] 周琳, 王雁, 律春燕, 等. 云南野生黄牡丹花色素成分的鉴定 [J]. *东北林业大学学报*, 2011, 39(8):52–54.
- [50] Wang LS, Hashimoto F, Shiraishi A, *et al.* Phenetics in tree peony species from China by flower pigment cluster analysis [J]. *J Plant Res*, 2001a, 114: 213–221.
- [51] Wang LS, Shiraishi A, Hashimoto F, *et al.* Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars [J]. *J Plant Res*, 2001b, 114:33–43.
- [52] 韩科厅, 赵莉, 唐杏姣, 等. 菊花花色素苷合成关键基因表达与花色表型的关系 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(3):516–524.