广西植物 Guihaia Jan. 2026, 46(1): 110-122 http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202411029

袁媛, 董家帮, 徐艳姣, 等, 2026. 太白贝母种子低温萌发过程中 C3H 基因家族鉴定及表达分析 [J]. 广西植物, 46(1): 110-122.

YUAN Y, DONG J B, XU Y J, et al., 2026. Identification and expression analysis of C3H gene family during low-temperature germination of *Fritillaria taipaiensis* seeds [J]. Guihaia, 46(1): 110-122.

太白贝母种子低温萌发过程中 C3H 基因家族鉴定及表达分析

袁　媛[1,2], 董家帮[1,2], 徐艳姣[1,2], 李　炎[1,2], 张晓玉[1,2], 吴　靓[1,2], 陈永生[3], 梁艳丽[1,2*]

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心/云南省药用植物生物学重点实验室, 昆明 650201; 3. 丽江绿之源生物药业科技开发有限公司, 云南 丽江 674100)

摘　要: 为解析 *C3H* 基因在太白贝母种子萌发过程中的作用,基于低温萌发转录组数据,该研究通过生物信息学的方法对太白贝母 C3H 基因家族进行系统鉴定及表达分析,筛选出 5 个低温高表达候选基因并解析其对赤霉素(GA_3)和脱落酸(ABA)的响应机制。结果表明:(1)C3H 家族 65 个成员中 7 个为稳定亲水蛋白、58 个不稳定亲水蛋白,蛋白长度差异显著(197~1 451 aa),仅 FtC3H43 和 FtC3H50 定位于叶绿体/内质网,其余位于细胞核。(2)保守基序分析发现,Motif1 和 Motif3 普遍存在 C3H 蛋白中;系统进化分析结果显示,196 条 C3H 蛋白被聚类为 5 个不同的分支,分别标记为 I-Ⅴ,太白贝母 C3H 成员与拟南芥和水稻表现出较近的亲缘关系。(3)GA_3 处理下,*FtC3H22* 和 *FtC3H35* 在 A-C 时期促进萌发,*FtC3H40* 在 A 期、*FtC3H46* 在 E 期响应调控;ABA 处理时 *FtC3H46* 显著上调,而 *FtC3H22* 和 *FtC3H35* 下调,推测 *FtC3H46* 参与 ABA 介导的抗寒途径,*FtC3H22* 和 *FtC3H35* 则正向调控萌发。该研究揭示了 C3H 蛋白家族在太白贝母种子萌发过程中的重要作用和复杂调控机制。

关键词: 太白贝母, C3H, 种子萌发, 生物信息分析, 表达模式

中图分类号: Q943　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1000-3142(2026)01-0110-13

Identification and expression analysis of C3H gene family during low-temperature germination of *Fritillaria taipaiensis* seeds

YUAN Yuan[1,2], DONG Jiabang[1,2], XU Yanjiao[1,2], LI Yan[1,2], ZHANG Xiaoyu[1,2], WU Liang[1,2], CHEN Yongsheng[3], LIANG Yanli[1,2*]

收稿日期: 2025-04-29　**接受日期:** 2025-06-06

基金项目: 云南省科技厅重大科技专项(202302AA310030); 云南省科技厅乡村振兴科技专项(202304BI090009); 迪庆藏族自治州科技计划项目(2023ZXND01); 科技人才与平台计划项目(202005AC160040); 云南省科技厅农业联合专项(202101BD070001-008)。

第一作者: 袁媛(1999—),硕士研究生,主要从事基因资源的挖掘与利用,(E-mail)303355927@qq.com。

*通信作者: 梁艳丽,教授,博士研究生导师,主要从事药用植物资源研究,(E-mail) liangyanlimt@sina.com。

(1. *College of Agriculture and Biotechnology*, *Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China; 2. *National and Local Joint Engineering Research Center for Germplasm Innovation and Utilization of Southwest Chinese Medicinal Materials/Key Laboratory of Medicinal Plant Biology in Yunnan Province*, *Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China; 3. *Lijiang Lüzhiyuan Biotechnology Pharmaceutical Technology Development Co.*, *Ltd.*, Lijiang 674100, Yunnan, China)

Abstract: To analyze the role of *C3H* genes during the germination of *Fritillaria taipaiensis* seeds, this study utilized low-temperature germination transcriptome data and bioinformatics methods to systematically identify and analyze the expression of the C3H gene family in *F. taipaiensis*. Five low-temperature candidate genes with high expression were identified and their response mechanisms in response to gibberellic acid (GA_3) and abscisic acid (ABA) were elucidated. The results were as follows: (1) Among 65 identified C3H family members, 7 were classified as stable hydrophilic proteins and 58 exhibited instability, with significant variation in protein length (197-1 451 aa). Only FtC3H43 and FtC3H50 were localized to chloroplast/endoplasmic reticulum, while the others were nuclear-localized. (2) Conserved motif analysis revealed that Motif1 and Motif3 were widely present in C3H proteins. Phylogenetic analysis results showed that 196 C3H proteins were clustered into five distinct clades (I-V), with *F. taipaiensis* C3Hs showing close evolutionary relationships to those in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. (3) Under GA_3 treatment, *FtC3H22* and *FtC3H35* promoted germination during early-to-mid stages (A-C), while *FtC3H40* and *FtC3H46* exhibited stage-specific expression at stages A and E, respectively. ABA treatment significantly upregulated *FtC3H46* but downregulated *FtC3H22* and *FtC3H35*, suggesting *FtC3H46* might mediate ABA-dependent cold stress responses, whereas *FtC3H22* and *FtC3H35* played positive roles in germination regulation. This study reveals the important role and complex regulatory mechanism of the C3H protein family in the seed germination of *F. taipaiensis*.

Key words: *Fritillaria taipaiensis*, C3H, seed germination, bioinformation analysis, expression pattern

川贝母是我国珍稀名贵中药材,具有润肺止咳、化痰平喘、散结消肿等功效(刘梓贤等,2022)。太白贝母(*Fritillaria taipaiensis*)为川贝母药材的重要基原植物,是百合科贝母属多年生草本药用植物。该物种主要分布在云南、重庆、四川、甘肃等海拔 3 000 m 以上的高山区域(中国科学院中国植物志编辑委员会,1997)。值得注意的是,自 2021 年贝母属植物被列入国家二级保护植物后(国家林业和草原局 农业农村部,2021),野生资源的采挖受到严格限制,导致原料市场供给缺口持续扩大,使得人工栽培的川贝母逐渐成为药材市场的主要来源(郭尚磊,2020)。太白贝母的繁殖生物学特性较为特殊:其种子繁殖过程中存在生育期(约 100 d)与休眠期(可达 200 d 以上)的显著时序差异。这种生物学特性导致实际栽培中有效生育期缩短,成为制约产量提升的关键因素(李庆等,2021)。因此,突破种子休眠机制、促进萌发进程,对于延长植株生长期、提高鳞茎生物量积累具有重要实践价值,这也是当前太白贝母人工栽培研究的重点方向。

蒋明等(2016)研究表明,C3H 蛋白家族在植物生长发育与逆境响应中具有多维度调控功能。对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究揭示了该家族成员的特异性作用机制:*AtC3H14* 通过介导次生细胞壁生物合成途径调控植株形态建成(Ko et al.,2009),而 *AtC3H15* 则表现出双重调控特性——既能正向增强灰霉病抗性,又可负向抑制系统获得性抗性(Wang et al.,2020)。值得关注的是,C3H 蛋白对木质素代谢通路的调控效应在木本植物中尤为显著。Li 等(2022)研究表明,大青杨(*Populus ussuriensis*) *PuC3H35* 通过激活 *PuEARLI1* 基因表达,特异性促进根系木质素合成与维管组织分化,这种分子级联反应不仅加速根系发育进程,还显著提升植株整体抗逆能力。

低温胁迫作为植物生长发育的重要限制因子,其分子应答机制研究备受关注。在楸树(*Catalpa bungei*)低温响应信号转导网络解析中,Bao 等(2024)研究发现 C3H 基因家族成员 *CbuC3H24* 和 *CbuC3H58* 呈现显著的低温诱导表达特征,它们被证实为调控楸树耐寒性的关键效应因子。值得注意的是,植物激素网络在低温响应中具有枢纽作用:赤霉素(GA_3)作为破除种子休眠的核心信号分子,与脱落酸(ABA)构成的拮抗调控模块,共同决定种子萌发进程与抗逆响应

平衡。前人研究虽已明确 C3H 蛋白在植物发育调控中的普适性功能,但针对其在药用植物低温萌发阶段的特异性作用机制——特别是对 GA_3、ABA 信号通路的调控方式及其在太白贝母种子低温发芽中的生物学功能,仍属尚未探明的科学盲区。

课题组前期研究发现,低温胁迫处理可显著提升太白贝母种子的萌发速率与萌发同步性,揭示其种子萌发过程具有独特的低温响应特性。基于 C3H 锌指蛋白在植物低温信号转导与发育调控中的核心作用(蒋明等,2016),本研究为深入研究太白贝母 C3H 家族成员在太白贝母种子低温萌发过程中的生物学功能,通过整合生物信息学预测与分子生物学验证技术,系统开展以下研究:(1)鉴定 FtC3H 家族成员并系统解析其理化特性与亚细胞定位特征;(2)构建包含系统进化关系、保守结构域分布及组织特异性表达模式分析;(3)基于低温萌发过程的激素动态变化,筛选与 GA_3 和 ABA 信号通路协同响应的关键 FtC3H 成员。

1 材料与方法

1.1 材料

野生抚育的太白贝母种子来源于重庆市巫溪县兰英乡西安村,经重庆市中药研究院彭锐研究员鉴定为太白贝母。

1.2 方法

1.2.1 转录组测序及组装与低温(4 ℃)层积与常温(25 ℃)层积处理构建太白贝母种子萌发对照体系 材料获取与处理流程如下:(1)初代种子。2020 年 6 月采收成熟蒴果,筛选饱满种子液氮速冻后-80 ℃保存(A 组)。(2)层积处理。剩余种子湿沙层积(湿度 30%~40%),经 30 d 室温适应后转入 4 ℃处理,动态监测胚发育进程。(3)分期取样。分别于胚率约 12%(A)、25%(B)、50%(C)、100%(D)及种胚突破种皮 1~3 mm(E)采集低温处理样本,同步获取对应时间点常温层积对照样本(a、b、c、d、e)。(4)萌发诱导。胚成熟后转至 15 ℃ 促发胚根生长,选取种胚突破种皮 1~3 mm 种子作为终末样本。最终建立包含 5 个发育阶段(A-E)及 5 个对照时间点(a-e)进行转录组测序。

1.2.2 试验材料处理 本试验样品采集于 2023 年 7 月,在 4 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗的条件下进行培养。基于转录组数据,如图 1 所示,选取 5 个不同生长阶段的种子各 50 粒,用 2 种不同的植物激素处理(100 mg · L^{-1}的 ABA 和 100 mg · L^{-1}的 GA_3处理),以清水作为对照。处理后,在 0 h 和 0.5 h 时立即将种子表面的水分擦干,放入液氮中快速冷冻,转移至-80 ℃中存储,供后续实验使用。

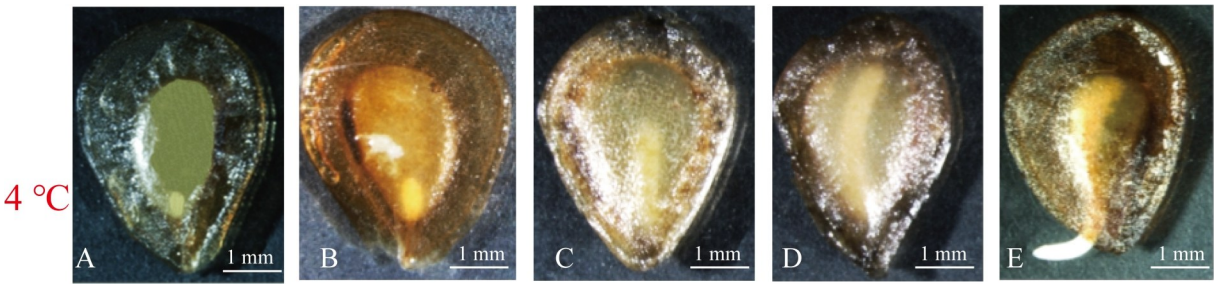
1.2.3 太白贝母 C3H 基因家族鉴定 原始数据经过过滤、测序错误率、GC 含量的分布检查,获得用于后续分析使用的 Clean reads。将 Trinity 拼接得到的转录本序列(86 662 条),经 Rapclust 层次聚类优化,获得非冗余 Unigenes 集,通过 KEGG、NR、Swiss-Prot、KOG、Trembl 数据库联合注释,成功注释到 61 574 条 Unigenes。基于太白贝母种子萌发的转录组测序数据,利用 NR、NT、Swiss-Prot 和 PFAM 数据库,对太白贝母 *C3H* 基因进行筛选注释,并将注释得到的转录因子相关基因编码的蛋白进行 NCBI BLAST 和 SMART 预测。

1.2.4 太白贝母 C3H 基因家族亚细胞定位及理化性质分析 对太白贝母种子 C3H 基因家族成员的氨基酸数、等电点(pI)、不稳定指数、相对分子质量、带正负电残基总数等在 Expasy 在线网站(http://web.expasy.org/protparam/)进行预测;同时深入挖掘太白贝母种子 C3H 基因家族成员的亚细胞定位信息,将收集的太白贝母种子 C3H 基因家族成员的序列数据,利用 CELLO 在线分析工具(http://cello.life.nctu.edu.tw/)获取 C3H 成员在细胞内定位的精确信息。

1.2.5 太白贝母 C3H 基因家族系统进化树构建

基于 PlantTFDB(http://planttfdb.gao-lab.org/)下载的水稻和拟南芥 C3H 氨基酸序列,通过 MEGA 7.0 软件(Kumar et al.,2016)对太白贝母、水稻和拟南芥的 C3H 基因家族氨基酸序列进行多序列比对,采用 MEGA 的邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树,其中 Bootstrap 为 1 000。通过 iTOL 在线网站(https://itol.embl.de/)进行美化。

1.2.6 太白贝母 C3H 基因家族系统发育树、保守结构域和保守基序分析 利用 MEGA 7.0 软件对太白贝母 C3H 基因家族氨基酸序列进行多序列比对,并构建系统发育树,利用 NCBI 的 CD-Search 在线工具(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi)进行保守结构域分析,利用 MEME 在线网站进行保守氨基酸基序分析,利用 TBtools(Chen et al.,2020)进行可视化,并完成进



A. 胚率约 12%；**B**. 胚率约 25%；**C**. 胚率约 50%；**D**. 胚率约 90%；**E**. 种胚突破种皮 1~3 mm。下同。
A. Embryo rate is about 12%; **B**. Embryo rate is about 25%; **C**. Embryo rate is about 50%; **D**. Embryo rate is about 90%; **E**. Seed embryo breaks through the seed coat by 1-3 mm. The same below.

图 1　太白贝母种胚发育的 5 个时期
Fig. 1　Five stages of seed embryo development in *Fritillaria taipaiensis*

表 1　实时荧光定量 PCR 引物
Table 1　Primers for quantitative real-time PCR

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
FtC3H22	cluster29704-TRINITY_DN58536_c0_g1_i1	CTTCCCTTGCAGGTCCCATT	GTAGGAGCGTTGTCGCACTA
FtC3H35	cluster7141-TRINITY_DN739_c0_g1_i3	ATGCTGCTGCTGGTAACTGT	AAGCACACGGTCCAAGCATA
FtC3H36	cluster75787-TRINITY_DN83620_c0_g1_i1	ATTCTCCCAAATGCAGCCCA	CATTCGAAACCGAACCCTGC
FtC3H40	cluster6131-TRINITY_DN8673_c0_g2_i5	AAGAGCCCTGCCGTAACTTC	GGCCTCTTTCGATTGCGAAC
FtC3H46	cluster8985-TRINITY_DN2317_c0_g1_i16	AAGAACAGCGTCTACGCCTC	CTGTTGCAGGATCCTTTGCG

化树、保守结构域和保守氨基酸基序的综合绘图。

1.2.7 太白贝母候选 *C3H* 基因在 GA_3 和 ABA 处理下的表达模式分析　在转录组数据分析与注释的基础上，利用转录组数据挑选出太白贝母低温种子萌发过程中 5 个阶段表达水平最高的 5 个 *C3H* 基因，利用 NCBI 的 Primer-BLAST 设计特异性引物（表 1），进行实时荧光定量 PCR 实验，并将得到的相对表达量数据进行整理，使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件中的 *t* 检验方法比较检验处理间差异显著性并绘制图表。

（1）实时荧光定量 PCR 反应体系构建：使用反转录 cDNA 和相关引物进行体系构建（表 2），配置过程在冰中进行。

（2）实时荧光定量 PCR 反应程序：对配置好的体系进行上机操作（表 3），最终通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行表达量计算。每次试验均进行 3 次生物学重复，将均一化处理后的数据，使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件中的 *t* 检验方法比较检验处理间差异显著性并绘制图表。

表 2　实时荧光定量 PCR 反应体系
Table 2　Quantitative real-time PCR reaction system

试剂 Reagent	剂量 Dose（μL）
模板（cDNA） Template（cDNA）	0.5
正向引物 Forward primer	0.4
反向引物 Reverse primer	0.4
双蒸水（ddH_2O） Double distilled water（ddH_2O）	8.7
2×ChamQ Universal SY BR qPCR Master Mix	10

表 3　实时荧光定量 PCR 反应程序
Table 3　Quantitative real-time PCR reaction procedures

反应步骤 Reaction step	反应温度 Reaction temperature（℃）	反应时间 Reaction time	循环圈数 Number of cycles
预变性 Pre-denaturation	95	3 min	40
变性 Degeneration	95	10 s	
吸收荧光值 Absorption fluorescence value	60	30 s	
	95	15 s	
建立溶解曲线 Establish dissolution curve	60	1 min	
	95	1 s	

2 结果与分析

2.1 太白贝母 C3H 基因家族鉴定及理化性质分析

将前期课题组的太白贝母转录组数据注释得到的 61 574 条蛋白序列提交至 PlantTFDB 数据库中进行 BLAST 分析,通过 CDD 和 pfam 对得到的序列进行筛选验证,共筛选得到 65 条具有 C3H 结构域的序列,将其分别命名为 FtC3H1-FtC3H65。65 条 C3H 转录因子的氨基酸数在 197~1 451 之间,其中 FtC3H14 氨基酸数最多(1 451),FtC3H25 氨基酸数最少(197);等电点为 4.59~9.70。脂肪性系数为 34.87~78.44,不稳定指数为 29.32~77.38(表 4)。GRAVY 值为-1.588~-0.223,65 条太白贝母种子 C3H 的氨基酸序列中有 45 条亲疏水值是负值且小于-0.5,占 69.23%,可以推出大部分太白贝母种子 C3H 蛋白是亲水蛋白,两性蛋白占 30.77%,并且没有明显的疏水区域,因此可认为这些蛋白都是亲水蛋白。综合上述理化性质分析,太白贝母种子 C3H 蛋白中有 7 个 C3H 蛋白属于稳定亲水蛋白,58 个 C3H 蛋白属于不稳定亲水蛋白,亚细胞定位预测显示,除 FtC3H43 和 FtC3H50 定位在叶绿体和内质网以外,其余 C3H 蛋白均位于细胞核中,该预测结果可为后续研究太白种子 C3H 转录因子家族的功能提供了重要的线索和基础。

2.2 太白贝母种子 C3H 基因家族进化分析

系统进化分析结果表明,196 条 C3H 蛋白被聚类为 5 个不同分支,分别标记为 I-Ⅴ。在 5 个分支中均同时包含了太白贝母、拟南芥和水稻的 C3H 家族成员,各家族成员在第 5 个分支中的数量最多。太白贝母 C3H 成员与拟南芥和水稻表现出较近的亲缘关系,如 FtC3H40 蛋白与拟南芥的 AT1G75340.1 亲缘关系较近,FtC3H23 蛋白与水稻的 ONIVA12G01340.1 较近,说明二者可能与拟南芥和水稻的这两条蛋白具有相似的功能和特点。太白贝母、拟南芥和水稻各自的 C3H 家族成员在各分支中分布不均匀,可能是由于 3 个物种在进化过程中经历不同的基因组进化事件或者在进化过程中朝多个方向发展(图 2)。

2.3 太白贝母 C3H 基因家族保守基序和保守结构域分析

保守基序分析结果显示,FtC3H 蛋白中包含 10 个保守基序(图 3:A),其中 FtC3H10、FtC3H11、FtC3H12、FtC3H13、FtC3H14、FtC3H20、FtC3H44 均含有 Motif 1、Motif 3、Motif 5、Motif 9、Motif 10,数目最多;同一族的 FtC3H14、FtC3H39、FtC3H41、FtC3H53、FtC3H54、FtC3H57、FtC3H58 均含有 Motif 6、Motif 8,其他各亚族内的不同成员也具有相似的基序(motif)组成,除此之外,大部分成员都含有 Motif 1 和 Motif 3,并且 CCCH 基序中 4 个(3 个半胱氨酸和 1 个组氨酸)氨基酸是完全保守的,说明 C3H 家族在遗传进化上还是相对保守,并且 C3H 残基之间氨基酸的种类和数量不同,很可能会导致 C3H 成员功能相似或互补。

保守结构域分析发现,除 C3H 家族的共识序列 zf-CCCH 和 ZnF-C3H1 在 FtC3H 基因家族成员中广泛存在外,还鉴定出 Ank(锚蛋白,Ankyrin)、KH(K-homology)、YTH1(YT521B homology)、RRM(RNA recognition motif)等多个结构域(图 3:B)。这表明 FtC3H 基因家族可能具有多层次的功能协同作用。

2.4 太白贝母种子 C3H 基因家族表达模式分析

为了挖掘太白贝母种子中响应低温胁迫的 *C3H* 基因,本研究对低温和常温 2 种条件下的太白贝母种子中的 *C3H* 基因表达情况进行了分析。转录组分析结果发现,所有的 *C3H* 基因均在种子萌发的第一阶段高表达,只有 *FtC3H22*、*FtC3H35*、*FtC3H36*、*FtC3H40*、*FtC3H46* 在低温条件下的 5 个阶段中,基因表达量均高于常温的 5 个阶段(图 4)。在种子萌发过程中,*FtC3H22*、*FtC3H35*、*FtC3H36*、*FtC3H40* 和 *FtC3H46* 在萌发 A 时期的表达量达到峰值,表明这些基因可能在该阶段具有显著的正向调控功能。

2.5 太白贝母候选 *C3H* 基因在 GA_3 处理下的表达分析

GA_3 是种子萌发过程中最重要的激素,可以打破种子休眠,为研究太白贝母种子的 *FtC3H22*、*FtC3H35*、*FtC3H36*、*FtC3H40* 和 *FtC3H46* 在低温条件下对 GA_3 的响应情况,本研究利用激素处理和实时荧光定量的方法,以在低温条件下分别经过 GA_3 处理后的太白贝母种子作为材料,利用实时荧光定量 PCR 检测 *FtC3H22*、*FtC3H35*、*FtC3H36*、*FtC3H40* 和 *FtC3H46* 的表达量。

GA_3 处理后(图 5),5 个候选基因在种子萌发的各个时期都有不同程度的激素响应。其中,*FtC3H22*、*FtC3H35* 在种子萌发 A、B、C 时期显著

表 4　太白贝母候选基因理化性质及亚细胞定位

Table 4　Physical and chemical properties and subcellular localizations of candidate genes of *Fritillaria taipaiensis*

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	氨基酸数 Number of amino acids (aa)	相对分子质量 Relative molecular mass (kDa)	等电点 pI	不稳定指数 Instability index	脂肪性系数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
*FtC3H*1	cluster28568-TRINITY_DN56336_c0_g2_i1	450	49 076.94	9.44	44.16	63.84	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*2	cluster6672-TRINITY_DN10163_c0_g1_i10	277	31 070.78	5.73	60.79	63.90	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*3	cluster6671-TRINITY_DN10163_c0_g1_i15	462	54 009.84	9.14	67.60	34.87	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*4	cluster57512-TRINITY_DN79127_c0_g1_i1	719	80 283.00	5.85	44.64	78.44	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*5	cluster30919-TRINITY_DN49025_c0_g2_i1	378	42 713.09	7.99	45.87	54.58	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*6	cluster39185-TRINITY_DN37378_c0_g1_i1	238	26 390.51	6.94	77.38	51.30	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*7	cluster21364-TRINITY_DN6175_c0_g1_i2	531	59 392.37	5.63	56.63	56.63	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*8	cluster43122-TRINITY_DN18538_c0_g1_i1	361	41 537.84	5.17	47.04	64.35	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*9	cluster44982-TRINITY_DN18687_c0_g1_i1	253	26 469.1	8.73	58.23	39.41	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*10	cluster7791-TRINITY_DN54952_c0_g1_i1	209	24 398.52	8.22	54.61	57.42	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*11	cluster12446-TRINITY_DN54952_c0_g1_i7	225	26 215.60	8.43	56.86	58.53	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*12	cluster46023-TRINITY_DN54952_c1_g2_i1	207	24 166.16	7.99	54.71	58.45	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*13	cluster46024-TRINITY_DN54952_c1_g3_i1	219	25 416.64	8.24	58.06	61.92	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*14	cluster15858-TRINITY_DN1193_c1_g1_i8	1 451	161 314.06	5.23	50.31	60.52	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*15	cluster46647-TRINITY_DN4171_c0_g1_i3	594	65 212.85	5.97	51.61	56.84	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*16	cluster9046-TRINITY_DN11650_c0_g1_i2	562	60 853.93	5.04	53.20	66.80	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*17	cluster50440-TRINITY_DN23124_c0_g1_i1	352	37 964.55	7.38	57.18	61.36	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*18	cluster51795-TRINITY_DN70421_c0_g1_i1	240	27 469.58	8.27	48.80	62.17	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*19	cluster54319-TRINITY_DN34823_c0_g2_i1	717	77 345.63	5.97	65.27	66.96	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*20	cluster56098-TRINITY_DN7214_c0_g1_i1	308	31 724.78	9.53	39.69	56.59	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*21	cluster56099-TRINITY_DN7214_c0_g1_i2	315	33 190.17	9.54	53.54	53.11	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*22	cluster29704-TRINITY_DN58536_c0_g1_i1	305	32 181.78	9.51	38.25	56.43	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*23	cluster62103-TRINITY_DN6441_c0_g1_i1	427	46 953.41	8.11	29.35	71.01	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*24	cluster65067-TRINITY_DN74175_c0_g1_i1	216	23 497.94	8.79	74.97	65.51	细胞核 Cell nuclear
*FtC3H*25	cluster67330-TRINITY_DN14685_c0_g1_i1	197	21 987.93	8.20	64.48	63.35	细胞核 Cell nuclear

续表 4

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	氨基酸数 Number of amino acids (aa)	相对分子质量 Relative molecular mass (kDa)	等电点 pI	不稳定指数 Instability index	脂肪性系数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
FtC3H26	cluster67331-TRINITY_DN14685_c0_g2_i1	289	31 875.98	6.86	51.95	62.15	细胞核 Cell nuclear
FtC3H27	cluster3198-TRINITY_DN1814_c0_g2_i3	452	50 881.64	9.70	60.56	57.37	细胞核 Cell nuclear
FtC3H28	cluster70663-TRINITY_DN538_c0_g1_i1	631	69 856.33	6.43	67.31	61.66	细胞核 Cell nuclear
FtC3H29	cluster6494-TRINITY_DN538_c0_g1_i3	717	77 345.63	5.97	65.27	66.96	细胞核 Cell nuclear
FtC3H30	cluster9106-TRINITY_DN538_c0_g1_i4	350	38 579.68	9.60	49.22	55.46	细胞核 Cell nuclear
FtC3H31	cluster72579-TRINITY_DN31027_c0_g1_i1	578	62 530.96	4.59	58.63	62.04	细胞核 Cell nuclear
FtC3H32	cluster17046-TRINITY_DN13518_c0_g1_i1	775	84 910.02	6.38	54.31	74.28	细胞核 Cell nuclear
FtC3H33	cluster21582-TRINITY_DN57864_c0_g1_i1	247	28 126.02	8.74	55.11	52.19	细胞核 Cell nuclear
FtC3H34	cluster74498-TRINITY_DN69918_c0_g3_i1	580	61 823.26	8.29	61.99	54.59	细胞核 Cell nuclear
FtC3H35	cluster7141-TRINITY_DN739_c0_g1_i3	366	41 517.07	7.22	50.55	66.34	细胞核 Cell nuclear
FtC3H36	cluster75787-TRINITY_DN83620_c0_g1_i1	547	57 998.92	8.32	45.59	57.55	细胞核 Cell nuclear
FtC3H37	cluster74809-TRINITY_DN29556_c0_g1_i2	401	43 056.17	8.19	45.47	56.56	细胞核 Cell nuclear
FtC3H38	cluster74808-TRINITY_DN29556_c0_g1_i1	444	47 718.36	8.69	53.97	62.75	细胞核 Cell nuclear
FtC3H39	cluster19036-TRINITY_DN4475_c0_g1_i2	474	51 357.58	8.30	65.75	52.55	细胞核 Cell nuclear
FtC3H40	cluster6131-TRINITY_DN8673_c0_g2_i5	403	43 881.26	7.70	48.40	49.16	细胞核 Cell nuclear
FtC3H41	cluster77480-TRINITY_DN16936_c0_g1_i2	453	48 727.54	8.15	63.95	52.12	细胞核 Cell nuclear
FtC3H42	cluster78032-TRINITY_DN1084_c0_g2_i1	290	30 203.35	9.41	40.12	59.07	细胞核 Cell nuclear
FtC3H43	cluster78033-TRINITY_DN1084_c0_g2_i2	211	21 952.00	9.04	39.00	65.88	叶绿体 Chloroplast
FtC3H44	cluster4123-TRINITY_DN2542_c0_g1_i1	334	38 122.88	9.03	64.24	44.40	细胞核 Cell nuclear
FtC3H45	cluster81369-TRINITY_DN3855_c1_g1_i1	663	71 302.72	6.06	56.71	69.26	细胞核 Cell nuclear
FtC3H46	cluster8985-TRINITY_DN2317_c0_g1_i16	344	36 813.05	6.50	43.85	63.63	细胞核 Cell nuclear
FtC3H47	cluster81371-TRINITY_DN3855_c1_g2_i1	568	60 538.17	8.33	61.52	71.29	细胞核 Cell nuclear
FtC3H48	cluster19413-TRINITY_DN17227_c0_g1_i3	327	36 065.53	7.11	68.58	55.50	细胞核 Cell nuclear
FtC3H49	cluster84181-TRINITY_DN83414_c0_g1_i1	326	36 393.35	8.37	49.79	43.01	细胞核 Cell nuclear

续表 4

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	氨基酸数 Number of amino acids (aa)	相对分子质量 Relative molecular mass (kDa)	等电点 pI	不稳定指数 Instability index	脂肪性系数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
FtC3H50	cluster3371-TRINITY_DN34731_c0_g1_i9	620	69 041.45	8.18	39.50	75.40	内质网 Endoplasmic reticulum
FtC3H51	cluster86593-TRINITY_DN20698_c0_g2_i1	372	40 128.84	7.69	41.48	57.55	细胞核 Cell nuclear
FtC3H52	cluster16680-TRINITY_DN817_c0_g2_i2	781	85 403.04	5.06	48.47	64.24	细胞核 Cell nuclear
FtC3H53	cluster88835-TRINITY_DN5123_c0_g1_i1	516	55 157.75	8.45	64.20	45.78	细胞核 Cell nuclear
FtC3H54	cluster92353-TRINITY_DN84390_c0_g1_i1	416	45 204.95	9.18	51.70	52.79	细胞核 Cell nuclear
FtC3H55	cluster95900-TRINITY_DN18845_c0_g1_i4	320	36 069.21	5.88	39.74	53.75	细胞核 Cell nuclear
FtC3H56	cluster95909-TRINITY_DN18875_c0_g1_i1	424	47 571.29	5.50	63.08	56.84	细胞核 Cell nuclear
FtC3H57	cluster20656-TRINITY_DN3136_c0_g1_i3	453	49 358.47	8.09	61.90	53.84	细胞核 Cell nuclear
FtC3H58	cluster98009-TRINITY_DN3136_c0_g2_i1	503	54 738.05	9.08	62.34	61.47	细胞核 Cell nuclear
FtC3H59	cluster16329-TRINITY_DN19288_c0_g1_i6	467	51 259.38	9.00	49.14	43.51	细胞核 Cell nuclear
FtC3H60	cluster102916-TRINITY_DN72647_c0_g1_i1	378	40 730.05	6.78	65.74	58.17	细胞核 Cell nuclear
FtC3H61	cluster105855-TRINITY_DN33257_c0_g1_i1	469	50 324.83	8.60	55.13	71.56	细胞核 Cell nuclear
FtC3H62	cluster106165-TRINITY_DN24007_c0_g1_i1	224	24 738.72	8.27	29.32	58.93	细胞核 Cell nuclear
FtC3H63	cluster81370-TRINITY_DN3855_c1_g1_i6	1 131	124 210.38	8.62	57.54	53.20	细胞核 Cell nuclear
FtC3H64	cluster2261-TRINITY_DN2317_c0_g1_i17	330	35 803.16	8.43	61.41	54.67	细胞核 Cell nuclear
FtC3H65	cluster106427-TRINITY_DN2317_c0_g1_i21	992	108 650.03	8.70	53.40	51.42	细胞核 Cell nuclear

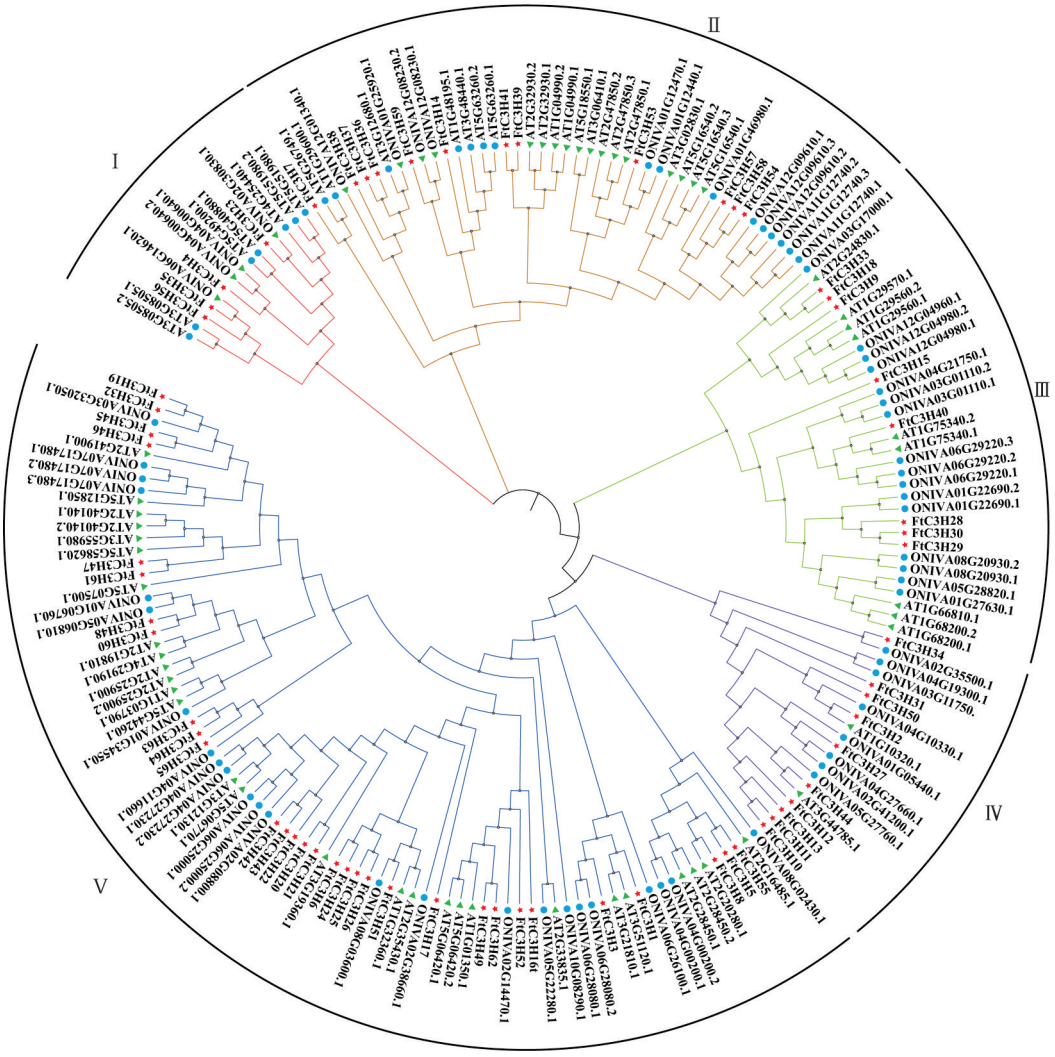
高于对照(较对照上调约 3 倍),说明 *FtC3H22*、*FtC3H35* 在 A、B、C 时期可能通过响应 GA_3信号,正向调控种子早期的萌发进程;*FtC3H36* 在种子萌发的 E 时期表达高于其他时期;*FtC3H40* 在种子萌发 A 时期表达高于其他时期,说明 *FtC3H40* 在 A 时期通过响应激素来促进该时期种子的萌发;*FtC3H46* 在 E 时期高度表达(与对照相比上调约 2.5 倍),说明其主要通过响应 GA_3来参与调控种子后期萌发。

2.6 太白贝母候选 *C3H* 基因在 ABA 处理下的表达分析

在 ABA 处理后(图 6),在种子萌发的 B、C、E 时期, *FtC3H22* 的表达量显著升高,而在 A、D 时期, *FtC3H22* 的表达量则显著降低;种子萌发 B、C 时期, *FtC3H35* 的表达量显著增加,而在 A 时期, *FtC3H35* 的表达量显著低于对照组; *FtC3H36* 只在种子萌发的 C、D 时期显著低于对照组,其他时期无明显变化;*FtC3H40* 在 A、B、D 时期表达量显著高于对照,C 时期显著低于对照; *FtC3H46* 在萌发的 A、B、C 时期表达量显著升高,其他时期无明显变化。

3　讨论与结论

植物 C3H 锌指蛋白是一种转录因子, 可识别



绿色三角表示拟南芥;蓝色圈表示水稻;红色五角星表示太白贝母。下同。

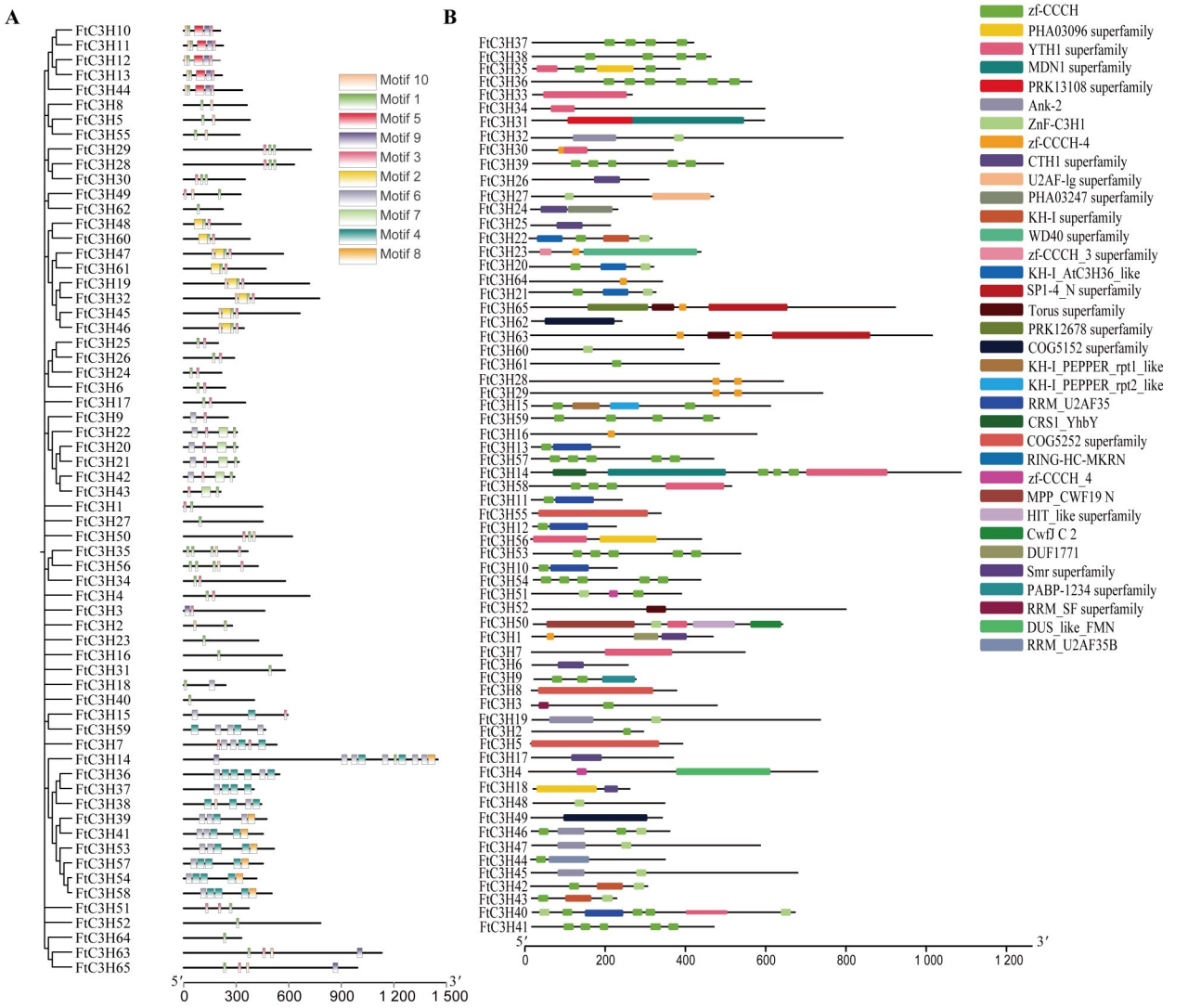
Green triangle indicates *Arabidopsis thaliana*; blue circle indicates *Oryza sativa*; red pentagram indicates *Fritillaria taipaiensis*. The same below.

图 2 太白贝母、拟南芥和水稻 C3H 基因家族蛋白系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of C3H gene family proteins in *Fritillaria taipaiensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*

并结合 mRNA,进而实现对基因表达的调控,在植物生长发育中发挥重要作用(Tian et al.,2023)。本研究从太白贝母中鉴定到 C3H 蛋白 65 个。理化性质分析结果显示,C3H 蛋白的氨基酸数、相对分子质量、等电点、脂肪性系数等均有差异,暗示了不同的 C3H 蛋白发挥生物学功能所需 pH 环境有所差异,65 条太白贝母 C3H 氨基酸序列中有 45 条亲疏水值是负值且小于-0.5,推测大部分太白贝母种子 C3H 蛋白质是亲水蛋白,亚细胞定位预测显示,除 FtC3H43 和 FtC3H50 定位在叶绿体和内质网外,其余 C3H 蛋白均位于细胞核中,该预测结果为后续研究太白种子 C3H 转录因子家族的功能提供了重要的线索和基础。

在太白贝母低温萌发的第 1 个阶段,即种子打破休眠阶段,65 个 *C3H* 基因都显著高表达,这可能与 *C3H* 基因促进植物生长发育和响应低温胁迫的调控作用有关,因此它们可能参与了低温胁迫或种子的萌发。在种子萌发的 5 个阶段中一直保持高表达的 *FtC3H22*、*FtC3H35*、*FtC3H36*、*FtC3H40* 和 *FtC3H46* 被认为是太白贝母中最关键



A. 保守基序；**B**. 结构域。

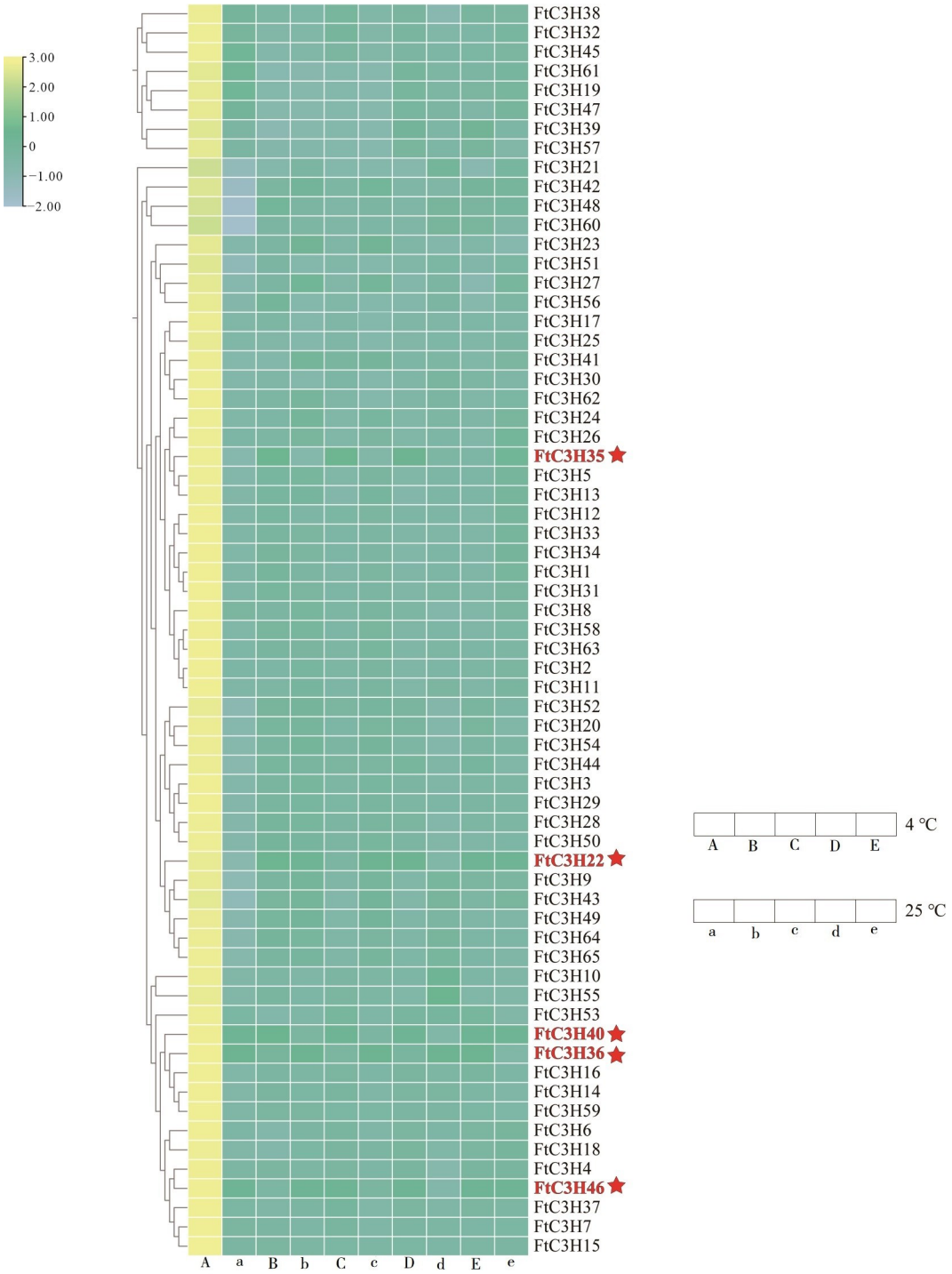
A. Conserved motif; **B**. Domain.

图 3　太白贝母 C3H 家族蛋白保守基序和保守结构域分析

Fig. 3　Conserved motif and domain analysis of C3H family proteins of *Fritillaria taipaiensis*

的 5 个 *C3H* 基因。GA_3是打破种子休眠的植物激素，而与 GA_3 互为拮抗的 ABA 则促进种子休眠，但同时 *C3H* 基因提高植物的抗寒性需要依赖于 ABA 介导的激素途径。外源激素处理实验结果发现，5 个 *FtC3H* 基因在种子萌发的 5 个阶段（A-E）呈现动态表达特征，进一步揭示其功能分工与协同机制。在萌发启动阶段（A 阶段），喷施 GA_3后 *FtC3H46* 表达量无显著变化，而喷施 ABA 后其表达量显著上调；相反，*FtC3H22* 和 *FtC3H35* 仅特异性响应 GA_3信号。这与柳枝稷（*Panicum virgatum*）中 *PvC3H72* 通过 ABA 途径增强抗寒性的分子机制高度保守（Xie et al.，2019）相似，提示 *FtC3H46* 可能主导 ABA 依赖的低温胁迫应答，而 *FtC3H22* 和 *FtC3H35* 则参与 GA_3信号驱动的萌发启动。

随着萌发进程推进（B-C 阶段），*FtC3H22* 和 *FtC3H35* 在 GA_3和 ABA 双处理下均出现显著表达峰值，提示其功能从单一萌发调控向“促萌发-抗逆”双重角色转变。值得注意的是，在胚根发育关键阶段（E 阶段），*FtC3H46* 在 GA_3处理时表达量较 ABA 处理组提升约 3.8 倍，其动态模式与美洲黑杨（*Populus deltoides*）中 *PdC3H17* 通过根发育增

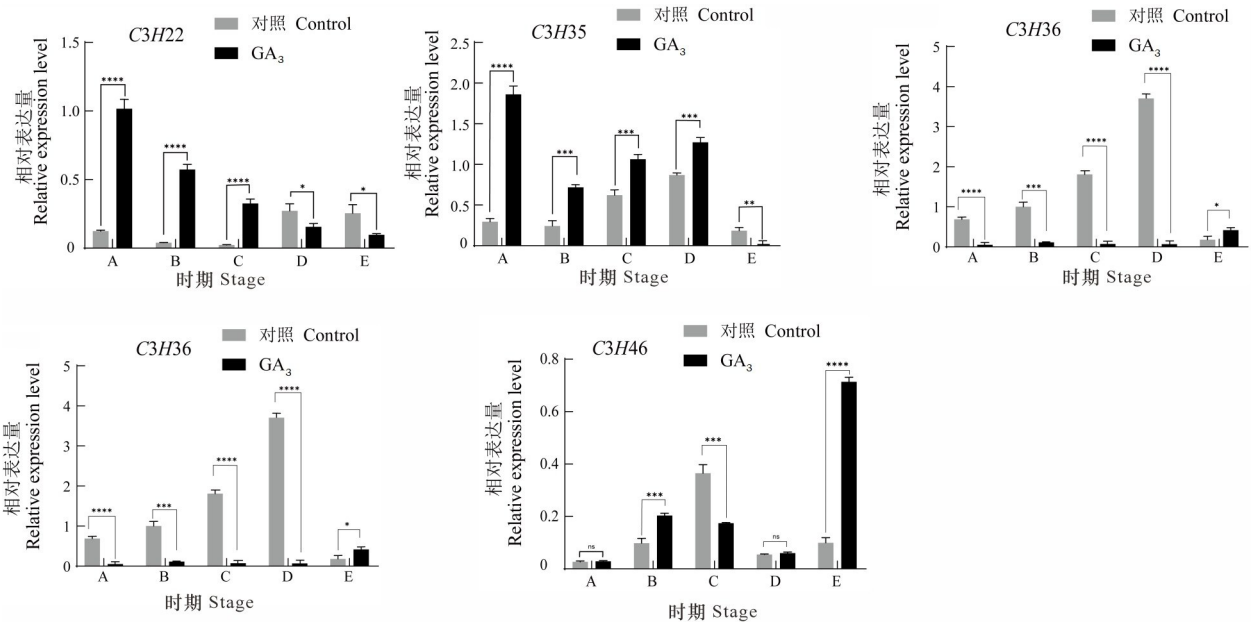


a. 胚率约 12%；**b**. 胚率约 14%；**c**. 胚率约 14%；**d**. 胚率约 20%；**e**. 胚率约 20%。在 25 ℃下，种胚增长趋势较弱，因此在本研究中只关注 4 ℃的萌发。

a. Embryo rate is about 12%; **b**. Embryo rate is about 14%; **c**. Embryo rate is about 14%; **d**. Embryo rate is about 20%; **e**. Embryo rate is about 20%. The growth trend of seed embryo is relatively weak at 25 ℃, so in this study, only the germination at 4 ℃ is focused on.

图 4 C3H 家族成员在种子不同萌发阶段转录组分析

Fig. 4 Transcriptome analysis of C3H family members at different germination stages of seeds



* 表示 $P<0.05$；** 表示 $P<0.01$；*** 表示 $P<0.001$；**** 表示 $P<0.000\ 1$；ns 表示不显著。下同。

* indicates $P<0.05$; ** indicates $P<0.01$; *** indicates $P<0.001$; **** indicates $P<0.000\ 1$; ns indicates not significant. The same below.

图 5　GA_3处理对 C3H 家族成员表达量的影响

Fig. 5　Effects of GA_3 treatment on the expression levels of C3H family members

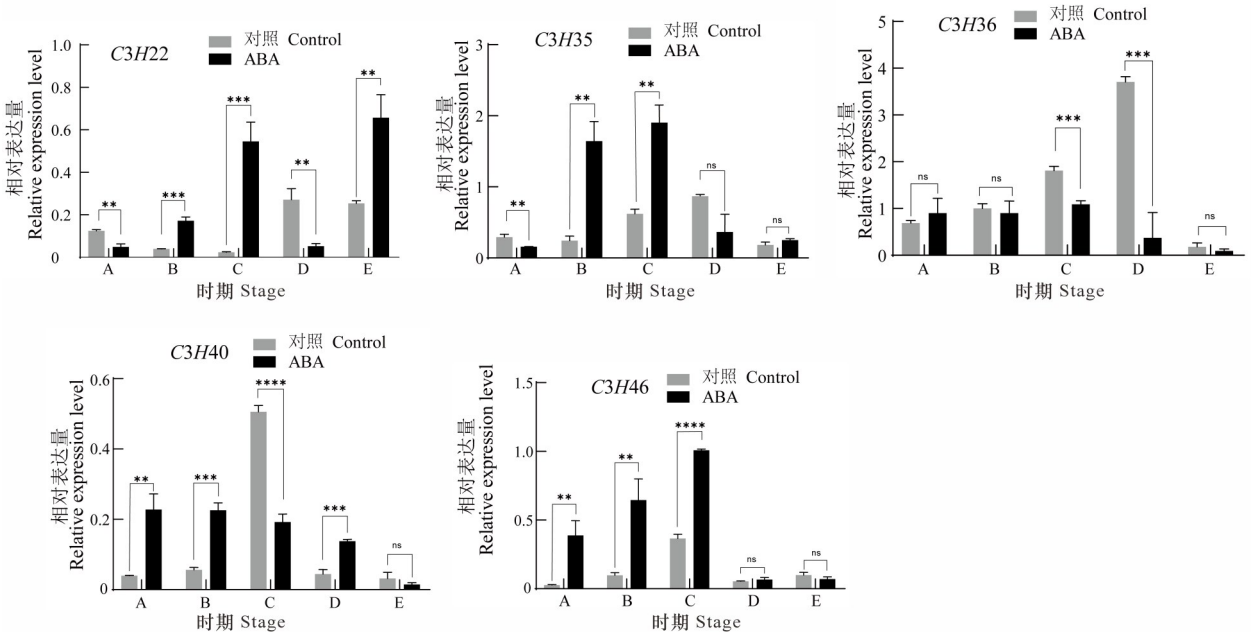


图 6　ABA 处理对 C3H 家族成员表达量的影响

Fig. 6　Effects of ABA treatment on the expression levels of C3H family members

强抗旱性的功能特征相似(Zhuang et al.,2020),提示该基因可能通过调控根系形态建成增强低温适应性。此外,*FtC3H40* 在全程维持 ABA 响应特征,而 *FtC3H22* 特异性在 C、E 阶段激活,分别对应持续抗寒调控和萌发终末阶段的特异性功能。

本研究揭示了 C3H 基因家族成员通过时序性表达重编程实现功能可塑性,在种子萌发过程中动态平衡“生长发育-胁迫应答”双重需求。*FtC3H46* 可能通过阶段特异性功能转换(A 阶段抗寒应答,E 阶段根发育调控)实现多重生物学效应,该发现为解析植物转录因子的时空功能分化提供了新视角。这些结果为药用植物低温萌发调控网络的解析及抗逆分子育种靶标筛选奠定了重要理论基础。

致谢 感谢徐艳姣、李炎、张晓玉、吴靓、陈永生参与部分实验及数据整理;董家帮承担转录组数据分析与基因筛选工作;梁艳丽老师负责项目构思,并指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。谨向上述各位作者表示由衷的感谢。

参考文献:

BAO P G, SUN J S, QU G Z, et al., 2024. Identification and expression analysis of CCCH gene family and screening of key low temperature stress response gene *CbuC3H24* and *CbuC3H58* in *Catalpa bungei* [J]. BMC Genomics, 25: 779.

CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al., 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 13(8): 1194-1202.

Editorial Committee of Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Chinese Academy of Sciences, 1997. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol. 14 [M]. Beijing: Science Press: 107. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1997. 中国植物志: 第十四卷 [M]. 北京: 科学出版社: 107.]

GUO S L, 2020. Review of research on the rare medicinal plant *Fritillaria cirrhosa* [J]. Xizang Science and Technology (12): 19-20. [郭尚磊, 2020. 珍稀药用植物川贝母的研究综述 [J]. 西藏科技(12): 19-20.]

JIANG M, LIU Q E, ZHANG Y R, et al., 2016. Cloning and expression of a C3H-zinc finger protein gene *BoCCCH2* from *Brassian oleracea* [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 42(2): 143-149. [蒋明, 刘青娥, 章燕如, 等, 2016. 青花菜 C3H 型锌指蛋白基因 *BoCCCH2* 的克隆与表达 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 42(2): 143-149.]

KO J H, KIM W C, HAN K H, 2009. Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in Arabidopsis [J]. The Plant Journal, 60 (4): 649-665.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870-1874.

LI D D, YANG J L, PAK S, et al., 2022. PuC3H35 confers drought tolerance by enhancing lignin and proanthocyanidin biosynthesis in the roots of *Populus ussuriensis* [J]. New Phytologist, 233(1): 390-408.

LI Q, LI L H, ZHOU D, et al., 2021. Quality evaluation of seeds from *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 36(6): 655-658. [李庆, 李林宏, 周丹, 等, 2021. 川贝母种子的质量评价 [J]. 华西药学杂志, 36(6): 655-658.]

LIU Z X, ZHANG J Q, WANG Y X, et al., 2022. Research advances on chemical constituents and bioactivities of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* [J]. China Forest Subsidiary Specialties(6): 87-91. [刘梓贤, 张佳奇, 汪雨欣, 等, 2022. 川贝母化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中国林副特产(6): 87-91.]

National Forestry and Grassland Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 2021. Announcement of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the National Forestry and Grassland Administration (No. 15, 2021) (National Key Protected Wild Plant List) [EB/OL]. (2021-09-08). https://www.forestry.gov.cn/c/www/lczc/10746.jhtml. [国家林业和草原局 农业农村部, 2021. 国家林业和草原局 农业农村部公告(2021 年第 15 号)(国家重点保护野生植物名录) [EB/OL]. (2021-09-08). https://www.forestry.gov.cn/c/www/lczc/10746.jhtml.]

TIAN W J, HOU R Z, DU Z G, et al., 2023. Identification and expression analysis of C3H zinc finger protein gene family in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 27(5): 65-75. [田文杰, 侯瑞泽, 杜泽光, 等, 2023. 普通白菜 C3H 类锌指蛋白基因家族鉴定及表达分析 [J]. 河北农业科学, 27(5): 65-75.]

WANG D, GUO Y H, WU C G, et al., 2008. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice [J]. BMC Genomics, 9: 44.

WANG D, XU H, HUANG J Y, et al., 2020. The *Arabidopsis* CCCH protein C3H14 contributes to basal defense against *Botrytis cinerea* mainly through the WRKY33-dependent pathway [J]. Plant, Cell & Environment, 43(7): 1792-1806.

XIE Z N, LIN W J, YU G H, et al., 2019. Improved cold tolerance in switchgrass by a novel CCCH-type zinc finger transcription factor gene, *PvC3H72*, associated with ICE1-CBF-COR regulon and ABA-responsive genes [J]. Biotechnology for Biofuels, 12: 224.

ZHUANG Y M, WANG C P, ZHANG Y, et al., 2020. Overexpression of *PdC3H17* confers tolerance to drought stress depending on its CCCH domain in *Populus* [J]. Frontiers in Plant Science, 10: 1748.

(责任编辑 邓斯丽)