

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201706013

引文格式: 何昌文, 朱丽, 沈珊, 等. 银杏 *bHLH91* 转录因子基因的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(2):202-209  
HE CW, ZHU L, SHEN S, et al. Cloning and expression analysis of a *bHLH91* transcription factor gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Guihaia*, 2018, 38(2):202-209

# 银杏 *bHLH91* 转录因子基因的克隆及表达分析

何昌文<sup>1</sup>, 朱丽<sup>2</sup>, 沈珊<sup>2</sup>, 张威威<sup>2\*</sup>

(1. 湖北省林业科学研究院 荆州分院, 湖北 荆州 434020; 2. 长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

**摘要:** bHLH 转录因子在植物的生长发育、胁迫应答和次生代谢中具有重要的调控作用。该研究通过 PCR 技术从银杏 (*Ginkgo biloba*) 叶中分离得到了一个 *bHLH* 基因的 cDNA 序列, 并将其命名为 *GbbHLH91*。序列分析结果显示扩增的 *GbbHLH91* 基因 cDNA 序列长度为 1 425 bp, 开放阅读框是 1 065 bp, 编码 354 个氨基酸, 分子量为 40.1 kDa, 等电点为 8.20。系统进化分析结果显示, 从用于进化树构建的 bHLH 蛋白质聚类情况来看, 银杏 *GbbHLH91* 蛋白与裸子植物油松 (*Pinus tabulaeformis*) bHLH 蛋白亲缘关系最近, 且与被子植物无油樟 (*Amborella trichopoda*) bHLH 蛋白相似性达到 60%, 表明该基因在进化过程中相对比较保守。实时荧光定量 PCR 分析发现银杏 *bHLH91* 基因在银杏的各个组织中均有表达, 其中在银杏叶中表达量最高, 在根和茎中基因的表达量次之, 在银杏雌花和果中表达量较少, 在雄花中的表达水平最低; *GbbHLH91* 基因在不同发育时期的银杏叶片中, 表达量也存在一定的差异, 其中在 4 月中旬该基因的表达水平达到最高, 而后随着叶片的生长发育, 该基因的表达水平呈现下降趋势。该研究结果为进一步验证 *GbbHLH91* 基因的功能奠定了前期基础。

**关键词:** 银杏, *bHLH*, 转录因子, 基因克隆, 表达分析

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)02-0202-08

## Cloning and expression analysis of a *bHLH91* transcription factor gene from *Ginkgo biloba*

HE Changwen<sup>1</sup>, ZHU Li<sup>2</sup>, SHEN Shan<sup>2</sup>, ZHANG Weiwei<sup>2\*</sup>

(1. Jingzhou Branch, Hubei Academy of Forestry Sciences, Jingzhou 434020, Hubei, China; 2. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 435025, Hubei, China)

**Abstract:** bHLH transcription factor plays an important role in plant growth, stress response and secondary metabolism. In order to study the function of *bHLH* transcription factor gene in *Ginkgo biloba*, we isolated a *bHLH* gene from *G. biloba* and carried out bioinformatics and expression analyses. In this study, a cDNA sequence of *bHLH* gene was isolated from *G. biloba* by PCR, which was designated as *GbbHLH91*. DNA sequencing and sequence analysis showed that the amplified *GbbHLH91* gene was 1 425 bp, *GbbHLH91* gene contained a complete open reading frame, and the

收稿日期: 2017-08-14

基金项目: 长江大学博士基金(801190010127) [Supported by the Doctor Foundation of Yangtze University (801190010127)].

作者简介: 何昌文(1971-), 男, 湖北潜江人, 工程师, 主要从事林业调查规划设计及新品种选育研究, (E-mail) 1464977841@qq.com。

\*通信作者: 张威威, 博士, 讲师, 主要从事林木分子生物学研究, (E-mail) wwzhangchn@163.com。

open reading frame of *GbbHLH91* was 1 065 bp, encoding 354 amino acids. The predicted *GbbHLH91* protein had a molecular mass of 40.1 kDa with isoelectric point value of 8.20. Homology analysis with BLASTP and Align X indicated that the putative *GbbHLH91* share a high identical with other known bHLH proteins from different plant species. Phylogenetic analysis showed that the *GbbHLH91* protein was closely related to bHLH protein from *Pinus tabulaeformis*, and was 60% identity to bHLH from *Amborella trichopoda*, which indicated the *bHLH* gene was relatively conserved during evolution. Real-time PCR assay found that *GbbHLH91* gene was expressed in all tested tissues of *Ginkgo biloba*, while expression level in leaf was the highest, followed by root and stem, the *GbbHLH91* gene was lowly expressed in female flowers and fruits of *G. biloba*, and the lowest in male flower. The expression level of *GbbHLH91* gene in *G. biloba* leaves at different developmental stages was also different. The expression level of *GbbHLH91* gene was the highest in mid-April, and then the expression level of the gene showed a decreasing trend with the growth and development of *G. biloba* leaves. These results provide a preliminary basis for further validation of the *GbbHLH91* gene function.

**Key words:** *Ginkgo biloba*, *bHLH*, transcription factors, gene clone, express analysis

银杏 (*Ginkgo biloba*) 是一种十分古老的珍贵树种, 享有植物界“活化石”的美誉, 银杏用途广泛, 具有重要的观赏、经济和药用等价值。银杏叶活性成分主要是类黄酮和萜内酯。类黄酮作为植物次生代谢主要成分之一, 在植物体内具有保护植物免受紫外线损伤 (Harborne & Williams, 2000)、调节植物的花色或果实颜色 (Lepiniec et al, 2006)、调节生长素运输和防御病原体 and 昆虫 (Dixon et al, 2005), 以及响应外界胁迫等功能 (Cominelli et al, 2005)。银杏类黄酮是预防治疗早期阿尔茨海默病, 心血管疾病和癌症等疾病的有效药用成分 (Diamond et al, 2000)。银杏也是一种童期特别长的中生代孑遗裸子植物, 一般实生苗种植 15~20 a 才能开花结果, 这给银杏优良品种的选育带来了严重的影响。

bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 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极为重要的作用 (王勇等, 2008)。bHLH 蛋白在动物中有 6 大类 (A-F), 其中 A 类含有 20 个家族, B-F 分别含有 12、7、1、3、1 个家族 (Ledent & Vervoort, 2001); 植物中的 bHLH 蛋白大多属于 B 组, 系统发育分析拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、白杨 (*Populus tomentosa*)、苔藓 (*Bryophyta*) 及藻类 (*Algae*) 的 bHLH 转录因子, 可以将这些植物的 *bHLH* 基因细分为 32 个亚家族 (Carreteropaulet et al, 2010)。bHLH 转录因子在不同的植物组织中广

泛存在, 可参与植物的生长发育、胁迫应答以及植物的次生代谢等。例如, 在拟南芥中, 编码 bHLH 蛋白质的雄性不育基因 *DYT1* 能够在绒毡层中高水平表达, 控制绒毡层的分化和发育 (Zhang et al, 2006); 在许多植物中, bHLH 转录因子也可以上调次生代谢途径中酶基因的表达, 调控植物中类黄酮、生物碱、萜类等活性成分生物合成 (张鑫等, 2014)。bHLH 参与调控类黄酮代谢往往和其他转录因子如 MYB, WDR 等形成复合物来实现 (Nakatsuka et al, 2008)。bHLH 转录因子在植物体内也可以响应外界生物胁迫, 将葡萄 *VvbHLH1* 转入拟南芥中表达, 能够促进类黄酮的积累和 ABA 信号传递, 从而提高拟南芥对盐和干旱的抵抗力 (Wang et al, 2016)。bHLH 转录因子是蛋白质的一个超级大家族, 其在不同植物体内的分子机制尚未研究清楚。

目前, 有关 bHLH 转录因子的功能研究在银杏上尚未见报道。本研究以银杏为试材, 首次通过 PCR 技术从银杏叶中分离出目的基因 *GbbHLH91*, 分析了该转录因子结构特点, 以及 *GbbHLH91* 基因在银杏各组织、银杏叶不同发育时期中的表达水平, 为后期验证生物学功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

用于试验的 30 年生银杏种植于长江大学西校区校园, 水肥管理条件相同, 长势一致。随机选取

1株银杏树进行样品采集,在4月中旬,采集用于不同部位分析的根、茎、叶、雄花、雌花,在5月中旬,采集果实;在4月初到7月中旬采集用于不同时间表达分析的银杏叶片,每两周采集一次。样品采集过程中带一次性手套和口罩。采集后立即在液氮中速冻,带回实验室并保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于后续RNA的提取实验。

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA的提取** 将采集的银杏各组织样品在液氮中碾成粉末状,参照Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, MiniBEST)试剂盒说明书提取各组织总RNA。通过使用分光光度计在 $\text{OD}_{260/280}$ 吸光值和1%(w/v)琼脂凝胶电泳,检测总RNA的质量、浓度和纯度。

**1.2.2 *GbbHLH91* 基因 cDNA 合成与克隆测序** 采用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连)试剂盒把提取的银杏RNA反转录得到cDNA。根据课题组前期测序得到的银杏转录组数据,设计***bHLH***基因特异引物,送往上海生工合成。上游引物***GbbHLHF***为5'-GCAGCAGCAG-CAACAACAACAACAT-3',下游引物***GbbHLHR***为5'-TATTGCTCTAAAAACCTTTAAGGGACG-3'。以cDNA为模板扩增银杏***bHLH***基因。PCR反应体系50  $\mu\text{L}$ :包括 $\text{ddH}_2\text{O}$  40.5  $\mu\text{L}$ ,  $10\times\text{Buffer}(\text{Mg}^{2+})$  5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{dNTP}(10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1})$  1  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各1  $\mu\text{L}$ , 模板1  $\mu\text{L}$ , Taq DNA polymerase ( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 。PCR扩增条件:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性5 min;94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸90 s,共32个循环;最后72  $^{\circ}\text{C}$  延伸10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  结束。PCR扩增产物经1%凝胶电泳检测,利用凝胶回收试剂盒切胶回收预期目的基因产物,纯化后连接到pMD18-T (TaKaRa, 大连)载体上,并转化到DH5 $\alpha$ 大肠杆菌感受态细胞中,转化后的菌液均匀涂抹在平板上进行蓝白斑筛选,挑选白色菌落做菌液PCR,将检测含有目的基因的菌液送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

**1.2.3 生物信息学分析** 利用在线生物信息学工具 blastx 和 blastp (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),对PCR扩增的核苷酸序列和氨基酸序列进行了比对。使用 Vector NTI Suite v11.5

和 DNAMAN 8 来分析 *GbbHLH91* 基因的 cDNA 序列,进行 ORF 的查找和蛋白质的翻译。利用在线工具 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)对 *GbbHLH91* 氨基酸的分子量、等电点等理化性质进行分析。利用软件 Align X (Vector NTI Suite V 11.5)对多种植物的 bHLH 蛋白质进行多重比对分析;在用 Clustal X 2.0 软件进行多重序列比对的基础上,借助 MEGA 6.0 软件采用邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树,使用 Bootstrap 对系统树可信性进行检验,重复1 000次。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析** 使用 Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, MiniBEST) 试剂盒分别提取银杏根、茎、叶、雄花、雌花、果的总 RNA,以及不同发育时期叶片的总 RNA。按照试剂盒 Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书把提取的 RNA 反转录成 cDNA。根据 *GbbHLH91* 的 cDNA 序列设计实时荧光定量引物,上游引物 *GbbHLHRTS* 为 5'-CGTGAAGGTGCCTTGGCTGAT-3', 下游引物 *GbbHLHRTA* 为 5'-TGCGACGTTTCCTTT-GAATGAGT-3'。qRT-PCR 内参基因选用的是 *GAPDH*,其上游引物序列 *GAPDH-F*:5'-CTGGCG-TAGAGTATGTGTTGAAT-3',下游引物序列 *GAPDH-R*:5'-CACGCCAACAACGAACATG-3'。实时荧光定量 PCR 在 Bio-Rad 公司的 PCR 仪 Mini Opticon™ Real-Time PCR system 上进行,用 SYBR Green 荧光染料法进行实时定量表达分析,具体操作步骤参照 TaKaRa 公司的 SYBR® Premix Ex Taq II (TliRNase H Plus) 试剂盒说明书。每种实验样品进行定量 PCR 扩增时均进行三次技术重复,*bHLH91* 和内参基因 *GAPDH* 以三次重复的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增,并分别设置一个阴性对照(模板为  $\text{ddH}_2\text{O}$ )。反应程序为 95  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 s;60  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,共 40 个循环。用 Microsoft Excel 2013 分析输出结果,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 *GbbHLH91* 基因相对表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GbbHLH91* 基因全长 cDNA 克隆和序列分析

利用试剂盒提取银杏叶总 RNA,其  $\text{OD}_{260/280}$  吸

光值在 1.8~2.1 之间, 琼脂糖凝胶电泳检测显示质量较好(图 1), 可用于反转录实验。利用 *GbbHLH* 基因特异性引物, 从反转录获得的银杏 cDNA 中 PCR 扩增得到一条 *GbbHLH* 基因序列。经 NCBI 网站的 Blastx 在线程序比对分析显示该 cDNA 序列与无油樟的 *bHLH91* 序列具有 60% 相似性; 在转录因子数据库中 PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 运行 Blast 工具比对拟南芥转录因子数据库, 比对结果为拟南芥 *bHLH* 转录因子家族的 *bHLH91*。两次比对结果表明从银杏中克隆的 *bHLH* 基因应为 *bHLH91* 基因, 因此命名为 *GbbHLH91*。该序列长度为 1 425 bp, 包含 1 065 bp 的开放阅读框, 编码 354 个氨基酸(图 2)。

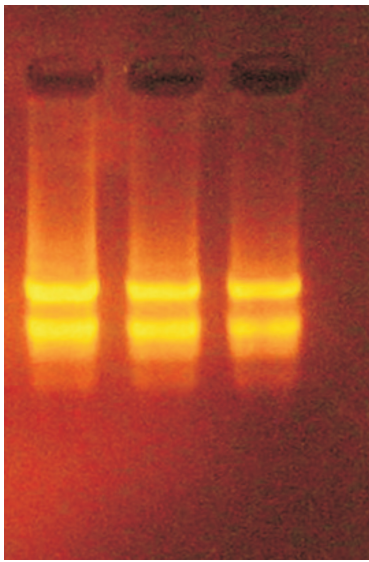


图 1 银杏叶 RNA 琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA from *G. biloba* leaves

## 2.2 银杏 *GbbHLH91* 编码蛋白质特征性分析

*GbbHLH91* 基因编码 354 个氨基酸, 在线工具 ExPASy 分析结果显示, *GbbHLH91* 基因编码的蛋白质分子量为 40.1 kDa, 等电点为 8.20。蛋白质序列同源比对分析借助在线工具 BLASTP (NCBI) 和 Align X (Vetector NTI 11.5) 完成。同源比对结果发现, *GbbHLH91* 蛋白质与其他植物的 *bHLH* 蛋白质具有一定的相似性(图 3)。其中, 和无油樟 (*Amborella trichopoda*, XP\_006854151)、油松 (*Pinus*

*tabuliformis*, AJP\_06244)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*, XP\_016753830)、可可 (*Thebroma cacao*, EOY17565)、核桃 (*Juglans regia*, EOY17565)、葡萄 (*Vitis vinifera*, CAN77001)、蓖麻 (*Ricinus communis*, XP\_008347044)、苹果 (*Malus domestic*, XP\_002534354) 的 *bHLH* 蛋白质之间的一致性分别为 60%、51%、51%、52%、51%、52%、50%、50%。比对结果显示银杏 *GbbHLH91* 与其它植物的 *bHLH* 蛋白质具有共同的保守域 Helix-Loop-Helix, 表明银杏 *GbbHLH91* 属于 *bHLH* 转录因子家族成员。

## 2.3 *GbbHLH91* 基因系统进化分析

为了研究 *GbbHLH91* 基因的系统进化, 本研究选取来自不同科属的 10 个物种的 *bHLH* 氨基酸序列, 利用软件 ClustalX 2.0 和 MEGA 6.0 通过邻接法 (Neighbor-joining) 构建了系统进化树。系统进化树结果显示, 进化树分为裸子植物、被子植物门两大分支(图 4)。其中, 银杏 *GbbHLH91* 与同为裸子植物的松科植物油松 (*Pinus tabuliformis*, AJP\_06244) *bHLH* 聚类在一个分支, 表明在这些用于进化树构建的蛋白质中, 二者亲缘关系相对更近。单子叶植物禾本科的玉米 (*Zea May*, NP\_001149299)、水稻 (*Oryza brachyantha*, AA000687)、节节麦 (*Aegilops tausc*, EMT07628) 亲缘关系相对较近, 聚类在同一个进化分支上; 而双子叶植物, 如大戟科的麻风树 (*Jatropha curcas*, XP\_012065727)、蓖麻 (*Ricinus communis*, XP\_002534354)、蔷薇科的苹果 (*Malus domestic*, XP\_008347044)、白梨 (*Pyrus bretschneideri*, XP\_009373855)、豆科的野生大豆 (*Glycine soja*, KHN25939)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*, XP\_013457399) 聚在另一大类。这些结果表明在基因的进化中, 同科植物的 *bHLH* 基因进化关系较近, 与植物本身之间的亲缘关系一致, 表明 *bHLH* 基因在进化过程中比较保守。

## 2.4 *GbbHLH91* 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 测定了银杏各组织和不同发育时期银杏叶中 *GbbHLH91* 基因的表达水平。结果表明, *GbbHLH91* 基因在银杏各个组织中都有表达(图 5:A), 其中 *GbbHLH91* 基因在银杏叶中表达量最高, 根中表达

```

10      20      30      40      50      60      70
1      gcagcagcagcaacaacaacaacatctccttcaggttcaagatccacaacaccacATGTCATCCTTTACTTCAGC
                                     M S S F T S A
76     TTTTACTGGTAATAATACTAGTAATAATAGTACCGCTTATCCTGCTCCAGAGCTCTTGAACCTTATTGCAGCTCCC
      F T G N N T S N N S T A Y P A P E L L N L L Q L P
151    TAGATGTTTCAGTGCCAGCACAACCAACATCTCATTGGTTCCAAAAAACACTTGCACTCATTGAAAATGTTTCC
      R C S V P S T T N I S F G S K K H L H S L E M F P
226    AATTCTAAACAGTGAATGGGTGATCATGATTCAACACTAGTTTATGATCCCCAAATCTCATTTCCTCCACAACC
      I L N S E M G D H D S T L V Y D P Q I S F P P Q P
301    GCCCTTACTGAGAGATCTGTTTCATTCCTCCTCACAATTATCAACTCCCATCCAAATCATACTTCGGCATAGA
      P L L R D L F H S L P H N Y Q L P S K S Y F G I D
376    TGATAAAGAAGCAGCCTTGCGAGGAAGCTGAAGGAAGGCAGTTTACTAATTCATCCTTGACTTCAAACGTGACAT
      D K E A A L Q E A E G R Q F T N S I L D F K R D I
451    CTCTTTATCCAAAGGAGAGATCCGGGGAACCAATCATTTTGTACAGAAAGGCAGAGAAGAGAGATTGTAATGA
      S L S K G E I R G T N H F A T E R Q R R E Y L N E
526    GAAGTATCAGACTCTTCGGACTCTGTTCCTAATCCTACCAAGGCTGACAGGGCTTCCATAGTCGGAGATGCCAT
      K Y Q T L R T L V P N P T K A D R A S I V G D A I
601    AGACTACATAAAAGAGTTACTGCGCACAGTTGAAGAACTAAAAATATTGGTAGAACAGAAGAGATGTGGGAGTGG
      D Y I K E L L R T V E E L K I L V E Q K R C G S G
676    GCGAAGTAAAAGACTGAGAATTGATCGTGAAGGTGCCCTTGGCTGATATGGAGAGTTCATCCCAACAACCTCTGTT
      R S K R L R I D R E G A L A D M E S S S Q Q P L L
751    ACAGAACGGACAGGATCAGAAATCCTTACAAATGGGTCTCTAAGAAGCTCCTGGCTACAGAGAACTCAAAAGA
      Q N G Q D Q K F L T N G S L R S S W L Q R T S K D
826    TGGAACACAGGTTGATGTTGCGATTGTCGATAATGAAGTAAACATCAAACCTATTCAAAGGAAACGTCGCAATTG
      G T Q V D V R I V D N E V N I K L I Q R K R R N C
901    CTTACTCTGTGTCTCGCATCCTTCATGAGCTTACCTTGAGATTCTTCATGCAAATGGTCCCAACATTGGCGA
      L L C V S R I L H E L H L E I L H A N G A N I G E
976    GCATTATATCTTCATGTTCAATACTAAGATCTATGAAGGTTTCATGCATATATGCAGGATCCATTGCTACGAAGTT
      H Y I F M F N T K I Y E G S C I Y A G S I A T K L
1051   GATAGACGCTGTGGATCGGCCTAACCCCTAATCAACTTATAACTCCACTTCTTTTCAAATTCACAACTAGtggat
      I D A V D R P N P N S T Y N S T S F Q I H N *
1126   tttcaacgttatatatattgactctgaggcagggatatttgtagctacctagtgtgaagatgagatgatcaattt
1201   cttccaagactagaagaacaatttcaattttgcttgcattggaacagttacattatctggaacttaaaaa
1276   gccatgatcagctcttcatgttgaatcaaaatgtgggcaggcatgatgattettacaagctcattcattggaagg
1351   caggtcagtagtatgttgaattatattctttcaccacaatatgtaacgtcccttaaagggttttttagaccaata

```

注：起始密码子和终止密码子加粗表示，下划线为引物。

Note: Initial codon and the stop codon are in bold, and primer sequences are underlined.

图 2 银杏 *GbbHLH91* 序列及预测氨基酸序列

Fig. 2 *GbbHLH91* cDNA and deduced amino acid sequence of *G. biloba*

量次之,在雄花、雌花和果中表达量较低,该结果说明 *GbbHLH91* 基因在银杏各个组织中的表达量具有较大的差异性。*GbbHLH91* 基因在不同发育时期的银杏叶片中表达量也有差异(图 5:B),其中 *GbbHLH91* 基因的表达量在 4 月、5 月表达量较高,并在 4 月中旬达到最大值,而后表达水平呈现逐渐下降趋势。*GbbHLH91* 基因表达量的差异可能与该蛋白质在银杏中的分子功能有关。

### 3 讨论与结论

bHLH 转录因子是植物中的一大重要转录因子家族。本研究从银杏中分离得到了 *GbbHLH91* 转录因子基因。前期研究表明,*bHLH* 基因在植物体内可参与植物的生长发育、胁迫应答和次生代谢。目前,有关 *bHLH91* 转录因子的研究报道较

银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	(140)	RGTNHFATERQRREVLNEKYQTLRLTVLPNPKADRASVGDADYIKELLRTVBEKILVEQKRCG--SGRSKRLRTDRE
无油樟 <i>Amborella trichopoda</i>	(271)	RGTKPFATERDRREVLNKKFSTLRSVLPNPKADRASVGDADYIKELLRTVDELKILVEKKRCG--GDRSKVKVTDGE
油松 <i>Pinus tabuliformis</i>	(284)	RGANHFATERQRREVLNDRYQILRSLVPNPKADRASVGDADYIKELLQRTVDELKTLVWHKRSVSGIISKLRVDNS
陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	(224)	KTITKHFATERRRRVHLNDKYQALRMTVMPSPKNDRASVGDADYIKELLGTVRELQTLVDDKRCG--QERSKRLKTEDA
可可 <i>Theobroma cacao</i>	(224)	KTITKHFATERRRRVHLNDKYKALRNVMPNPKIDRASVGDADYIKELVMTVNELKLLVEKKRCG--QGRSKRLKTEDA
核桃 <i>Juglans regia</i>	(296)	-ETKHFATERRRRQVHLNDKYKALRSLVLPNPKADRASVGDADYIKELLRTVNELKLLVEKKRCG--RERGRKQKTEGE
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	(248)	KGTKSFATEKQRREVLNDKYNALRSLVLPNPKSDRASVGDADYIYRELLRTVNELKLLVEKKRCG--RERSKRHKTEDE
苹果 <i>Malus domestica</i>	(302)	KRTKHFATERQRRLNKKFDILKDLVLPNPKNDRASVGDADYIYNELLRTVBEKILVEKNRCG--RERIKKYKTEHD
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	(265)	KKTKPFATERQRRLNNDKYKALQNLVLPNPKADRASVGDADYIKELLRTVNELKLLVEKKRCA--RERSKRQKTEED
Consensus	(348)	K T KHFATERQRRLNDKY ALRSLVLPNPKADRASVGDADYIKELLRTV ELKLLVEKKRCG RERSKRLKTE E
<b>Helix-loop-helix domain</b>		
银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	(218)	GALADMESSSQVPLLNQCQDQKFLTNLSLRSSWLQRISKDGTVDVRIVDNEVNIKLIQRKRNCCLLQVSRILLDELQLEI
无油樟 <i>Amborella trichopoda</i>	(349)	SCVNIENSSSKVDDQDTRERK--FNGSLRSSWLQRISKEGTLVDVRIVDDEANKLIQRKRNCCLLVSKILDELQLEI
油松 <i>Pinus tabuliformis</i>	(364)	--AADMESSCQSWWQIKDKINKFMINBSLRSSWLQRISKCGTEVDVRIVDDEVTIKVVKRCKPNILOMATELQDLQLHI
陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	(302)	--ASAADGDVEIKSLGDP--EQCYNTSLRSSWLQRISK--DSEVDVRIVDDEVTIKLVQRKKINCLLFVSRLLDELQDL
可可 <i>Theobroma cacao</i>	(302)	--GSAADGDVECKPLGDP--DQCYNBSLRSSWLQRISK--DTEVDVRIIDDEVTIKLVQRKKINCLLFVSRLLDELQDL
核桃 <i>Juglans regia</i>	(373)	--DTAGDVENYVTKHVGDPHDGQSYNBSLRSSWLQRISK--DTEVDVRIIDDEVTIKLVQRK--NCLLFVSKALDELQDL
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	(326)	--STGDVKSSSSIK----PEPDQSYNBSLRSSWLQRISK--DTEVDVRIIDDEVTIKLVQRKKINCLLFVSKILDELQDL
苹果 <i>Malus domestica</i>	(380)	GAAAAGDDESCNIQPLGEPHDQSYNBSLRSSWLQRISK--DTEVDVRIIDDEVTIKLVQRKKINCLLFVSRLLDELQDL
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	(343)	-SITGNCHDSSCTIKPLGDP--DQSFNNBSLRSSWLQRISK--DTEVDVRIIDDEVTIKLVQRKKINCLLFVSKVDELQDL
Consensus	(428)	AAGDSS N K LGDP YNGLRSSWLQRISK DTEVDVRIIDDEVTIKLVQRKKINCLLFVSKILDELQDL
银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	(298)	LHANGANTGEHYVFNFTKIIEGSGVYASAIANKLIDAVDRPNPNTYNSTSFQIHN-
无油樟 <i>Amborella trichopoda</i>	(427)	IHYTGANTGDNYVFNFTKIEGSGVYASAIANKLMEVVDQRQPPFSPFP-----
油松 <i>Pinus tabuliformis</i>	(443)	LHANGANTGDHYVFNFTKIEGWNVYGESIANKLIEALDRKPTL-----
陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	(377)	LHVAGNIGDYYSFLFNFTKIEGSSVYASAIANKLIDVVDKQYAAAPPTSSTSL----
可可 <i>Theobroma cacao</i>	(377)	HHVAGNIGDYYSFLFNFTKIEGSSVYASAIANKLIEGVDQRQYAAAPPTSSTCL----
核桃 <i>Juglans regia</i>	(449)	HHVAGGCGDYYSFLFNFTKIEGSSVYASSIANKLIEVVDRCQAAMNIN--QPTSSY
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	(399)	HHVAGNIGDYYSFLFNFTKIEGSSVYASAIANKLIEVVDQRQYAAIPIPIPIPTSSSF
苹果 <i>Malus domestica</i>	(459)	HHVAGGQIGNSYSFLFNFTKMVEGSLYASAIANKLIEVLDQRQYAAVLPPTNS----
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	(420)	HHVAGNIGDYYSFLFNFTKIEGSSVYASAIANKLIEVVDRIYASTPSTN-----
Consensus	(508)	HHVAGNIGDYYSFLFNFTKIEGSSVYASAIANKLIEVVDQRQYAAA

注: 完全相同的氨基酸用白色前景和黑色背景显示; 相对保守的氨基酸用白色前景和灰色背景表示; 不相似氨基酸用黑色前景和白色背景表示。

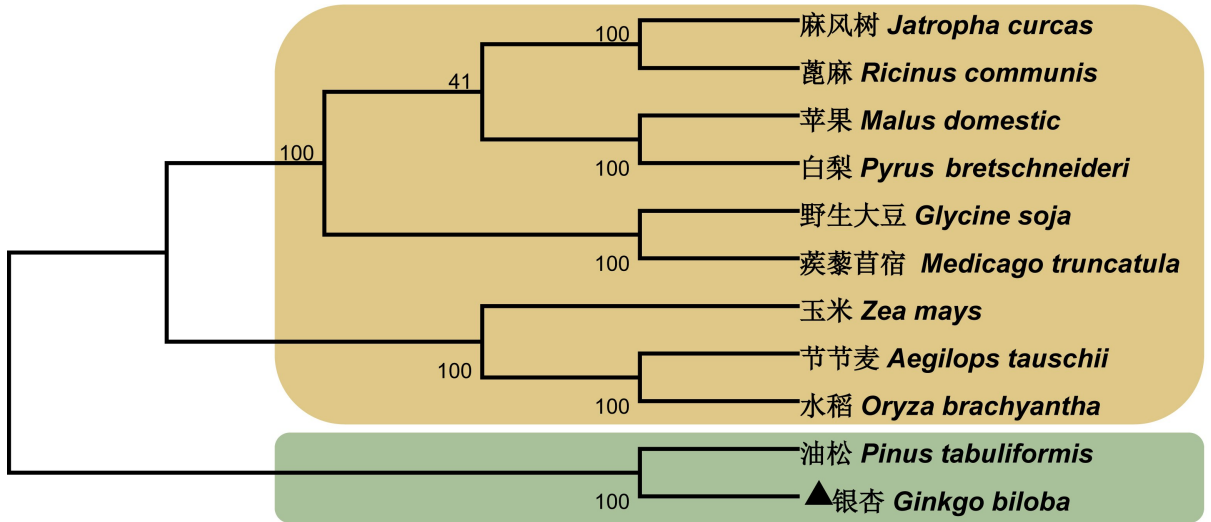
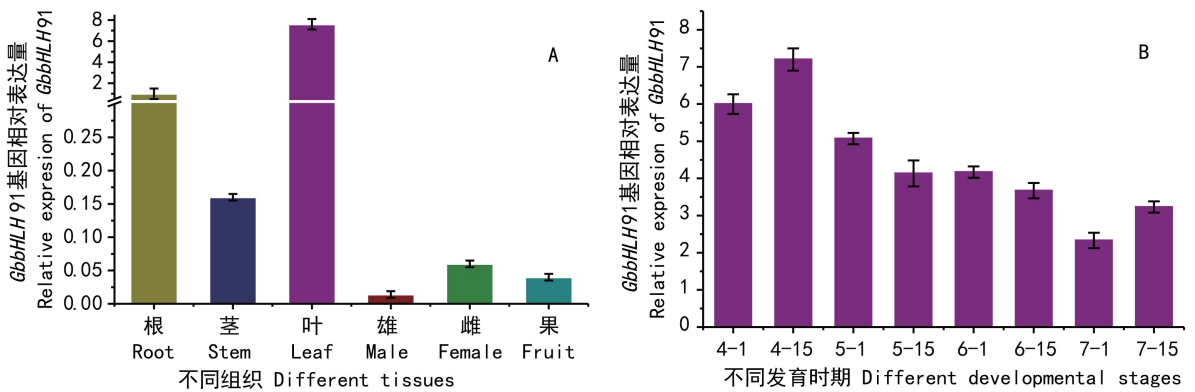
Note: Completely identical amino acids are indicated with white foreground and black background; Conserved amino acids are indicated with white foreground and grey background; Dissimilar amino acids are indicated with black foreground and white background.

图 3 GbbHLH91 氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of amino acid sequences of GbbHLH91

少, 拟南芥 bHLH091 在花药中大量表达, 可以与 bHLH010、bHLH089 结合, 一起参与拟南芥花药的生长发育 (Zhu et al, 2015)。bHLH010/bHLH089/bHLH091 主要通过 DYT1 相互作用的反馈调节来调控拟南芥花药的发育转录过程 (Cui et al, 2016)。与拟南芥 bHLH091 基因的表达模式不同, 本研究中, GbbHLH91 基因在雄花中的表达量最低, 而在叶中、茎中表达量相对较高。在不同发育时期的银杏叶中, 4 月该基因的表达量较高, 而此时也是银杏雄花的发育时期。银杏是童期非常长的一种植物, 其开花调控机制可能存在着物种的特异性, 推测 bHLH91 基因在银杏和拟

南芥中的具体调控功能或者调控方式可能不同。Bai et al(2011) 研究发现, 烟草 bHLH 基因 *NtAn1a* 和 *NtAn1b* 的异位表达能显著提高烟草中花青素含量。在本研究中, GbbHLH91 基因在银杏的叶片中表达量最高, 雄花中最低。另外, 相对于其他组织而言, 黄酮类化合物在银杏叶中含量最高 (高丽雅等, 2007); 因此, GbbHLH91 基因在银杏叶片中表达量最高, 推测该基因在银杏中也可能与类黄酮的代谢合成有关。转录因子在植物抵抗逆境胁迫信号传导过程中发挥着重要的作用。研究发现, 一些植物 bHLH 转录因子不但参与植物的次生代谢, 同时还参与响应植物的非生物胁迫。比如拟

图 4 不同植物物种的 *bHLH* 基因系统进化树Fig. 4 Phylogenetic tree of *bHLH* genes from different plant species图 5 *GbbHLH91* 基因在银杏不同器官(A)和不同发育期叶(B)中的表达水平Fig. 5 Expression level of *GbbHLH91* gene in different tissues(A) and different developmental stages(B) of *G. biloba*

南芥 *AtbHLH61/93/122* (Zhao et al, 2013; Liu et al, 2014) 转录因子、水稻 *OrbHLH2* (Zhou et al, 2009)、水稻 *OsbHLH148* (Seo et al, 2011) 转录因子等。在刚毛柞柳中, *ThbHLH1* 转录因子可以提高胁迫相关基因的表达从而提高植物的抗性(Ji et al, 2016)。苦荞 *FibHLH3* 基因在拟南芥中表达, 可以通过 ABA 信号途径提高拟南芥抵御干旱胁迫的能力(Yao et al, 2017)。*GbbHLH91* 基因在银杏叶片、根中表达量较高, 推测 *GbbHLH91* 转录因子可能在银杏根部也参与响应了外界逆境

胁迫。

总之, 本研究克隆获得了银杏一个 *GbbHLH91* 转录因子基因, 对该转录因子结构特点进行了分析, 并分析了 *GbbHLH91* 基因在银杏不同组织、不同发育时期银杏叶中的表达情况, 为进一步弄清 *GbbHLH91* 转录基因在银杏中的调控功能奠定了基础。

#### 参考文献:

BAI Y, PATTANAIK S, PATRA B, et al, 2011. Flavonoid-re-

- lated basic helix-loop-helix regulators, NtAn1a and NtAn1b, of tobacco have originated from two ancestors and are functionally active [J]. *Planta*, 234(2): 363.
- CARRETEROPAULET L, GALSTYAN A, ROIGVILLANOVA I, et al, 2010. Genome wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss and algae [J]. *Plant Physiol*, 153(3): 1398–1412.
- COMINELLI E, GALBIATI M, VAVASSEUR A, et al, 2005. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance [J]. *Curr Biol*, 15(13): 1196–1200.
- CUI J, YOU C, ZHU E, et al, 2016. Feedback regulation of *dyt1* by interactions with downstream bHLH factors promotes DYT1 nuclear localization and anther development [J]. *Plant Cell*, 28(5): 1078–1093.
- DIAMOND BJ, SHIFLETT SC, FEIWEL N, et al, 2000. *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 81(5): 668–678.
- DIXON RA, XIE DY, SHARMA SB, 2005. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? [J]. *New Phytol*, 165(1): 9–28.
- GAO LY, LI WH, HAN F, et al, 2007. A study on the rule of content distribution on the flavonoid compounds in different parts of *Ginkgo biloba* L. [J]. *J NW Univ (Nat Sci Ed)*, 37(2): 225–227. [高丽雅, 李稳宏, 韩枫, 等, 2007. 黄酮类化合物在银杏不同部位含量的分布 [J]. 西北大学学报(自然科学版), 37(2): 225–227.]
- HARBORNE JB, WILLIAMS CA, 2000. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. *Phytochemistry*, 55(6): 481–504.
- JI X, NIE X, LIU Y, et al, 2016. A *bHLH* gene from *Tamarix hispida* improves abiotic stress tolerance by enhancing osmotic potential and decreasing reactive oxygen species accumulation [J]. *Tree Physiol*, 36(2): 193–207.
- LEDENT V, VERVOORT M, 2001. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis [J]. *Genome Res*, 11(5): 754–770.
- LEPINIEC L, DEBEAUJON I, ROUTABOUL JM, et al, 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 57: 405–430.
- LIU W, TAI H, LI S, et al, 2014. bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism [J]. *New Phytol*, 201(4): 1192–1204.
- NAKATSUKA T, HARUTA KS, PITAKSUTHEEPONG C, et al, 2008. Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers [J]. *Plant Cell Physiol*, 49(12): 1818–1829.
- SEO JS, JOO J, KIM MJ, et al, 2011. 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*, 65(6): 907–921.
- WANG F, ZHU H, CHEN D, et al, 2016. 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 Organ Cult*, 125(2): 387–398.
- WANG Y, CHEN KP, YAO Q, 2008. Progress of studies on bHLH transcription factor families [J]. *Hereditas*, 30(7): 821–830. [王勇, 陈克平, 姚勤, 2008. bHLH 转录因子家族研究进展 [J]. 遗传, 30(7): 821–830.]
- YAO PF, LI CL, ZHAO XR, et al, 2017. Overexpression of a tartary buckwheat gene, *FtbHLH3*, enhances drought/oxidative stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 8: 625.
- ZHANG W, SUN Y, TIMOFEJEVA L, et al, 2006. Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1) encoding a putative bHLH transcription factor [J]. *Development*, 133(16): 3085–3095.
- ZHANG X, SONG JY, HU YL, et al, 2014. Research progress of the regulation on active compound biosynthesis by the bHLH transcription factors in plants [J]. *Acta Pharm Sin*, 49(4): 435–442. [张鑫, 宋经元, 胡鸢雷, 等, 2014. bHLH 转录因子调控植物活性成分生物合成的研究进展 [J]. 药学学报, 49(4): 435–442.]
- ZHAO L, GAO L, WANG H, et al, 2013. The R2R3-MYB, bHLH, WD40, and related transcription factors in flavonoid biosynthesis [J]. *Funct Integr Genomics*, 13(1): 75–98.
- ZHOU J, LI F, WANG J, et al, 2009. Basic helix-loop-helix transcription factor from wild rice (OrbHLH2) improves tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Physiol*, 166(12): 1296–1306.
- ZHU E, YOU C, WANG S, et al, 2015. The DYT1-interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome [J]. *Plant J*, 83(6): 976–990.