

藜芦 bHLH 转录因子分析鉴定

寇呈熹^{1,2}, 佟金泉³, 马 瑞⁴, 孙 伟⁵, 薛哲勇^{1,2*}, 麻鹏达^{3*}

1. 东北林业大学 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 东北林业大学 黑龙江省植物天然活性物质的合成与利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040
3. 西北农林科技大学生命学院, 甘肃 杨凌 712100
4. 吉林省农业科学院 生物技术研究所 吉林省农业生物技术重点实验室, 吉林 长春 130033
5. 中国中医科学院中药研究所 中药鉴定与安全性评估北京市重点实验室, 北京 100700

摘要: 目的 基于转录组数据, 利用生物信息学方法鉴定藜芦 *Veratrum nigrum* bHLH 转录因子基因家族, 并作初步分析。方法 通过隐马尔可夫模型从藜芦转录组序列中筛选 bHLH 基因, 并使用 ExPASy、MEME 等在线网站及 MEGA、TBtools 等软件对藜芦 bHLH 进行理化性质、保守基序等可视化分析。结果 在藜芦转录组中共鉴定到 72 条 bHLH 转录因子, VnbHLH 转录因子氨基酸数目为 105~692, 等电点介于 4.69~11.47, 相对分子质量为 11 071.2~77 795.3, 亚细胞定位分析显示 VnbHLH 均定位于细胞核中; 系统发育分析将 VnbHLH 转录因子分为 6 个亚族, VnbHLH 在不同组织中表达差异显著, Vn_54312、Vn_14037 在根中表达较高, 推测其可能参与了藜芦植物根部某些生物碱的合成。结论 根据转录组数据分析了药用植物藜芦中的 bHLH 转录因子基因家族, 有助于下一步对藜芦 bHLH 转录因子家族功能预测及验证。

关键词: 藜芦; 转录组; bHLH 转录因子; 系统进化; 基因表达

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4476-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.026

Analysis of *Veratrum nigrum* bHLH transcription factor based on transcriptome

KOU Cheng-xi^{1,2}, TONG Jin-quan³, MA Rui⁴, SUN Wei⁵, XUE Zhe-yong^{1,2}, MA Peng-da³

1. Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
2. Heilongjiang Key Laboratory of Plant Bioactive Substance Biosynthesis and Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
3. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China
4. Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China
5. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To identify and analyze the *Veratrum* (*Veratrum nigrum*) bHLH transcription factor gene family of *Veratrum veratrum* by bioinformatics based on transcriptome data. **Methods** The bHLH gene was screened from the transcriptional sequence of *Veratrum* by hidden Markov model, and the physical and chemical properties and conserved motif of *Veratrum* bHLH were visually analyzed by online websites such as ExPASy and MEME and software such as MEGA and TBtools. **Results** A total of 72 bHLH transcription factors were identified in *Veratrum* transcriptome. The amino acid number of VnbHLH transcription factors was 105—692, the isoelectric point was 4.69—11.47, and the relative molecular weight was 11 071.2—77 795.3. Subcellular localization analysis showed that VnbHLH were all located in the nucleus. According to phylogenetic analysis, VnbHLH transcription factors were divided into six subgroups. The expression of VnbHLH was significantly different in different tissues, while Vn_54312 and

收稿日期: 2021-12-02

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目 (CXGC2017ZY029)

作者简介: 寇呈熹, 硕士研究生, 从事中药活性物质代谢途径解析。E-mail: 905546738@qq.com

*通信作者: 薛哲勇, 教授。E-mail: xuezhhy@126.com

麻鹏达, 副教授。E-mail: mapengda@163.com

Vn_14037 were highly expressed in roots. It is speculated that they may be involved in the synthesis of some alkaloids in the roots of *Chenopodium*. **Conclusion** The analysis of bHLH transcription factor gene family in *V. nigrum* based on transcriptome data is helpful to predict and verify the function of bHLH transcription factor family in *V. nigrum*.

Key words: *Veratrum nigrum* L.; transcriptome; bHLH transcription factor; phylogenetic evolution; gene expression

藜芦 *Veratrum nigrum* L. 为百合科 (Liliaceae) 多年生单子叶植物, 全世界约有 40 种, 分布于亚洲、北美和欧洲, 中国约有 17 种, 常见于高海拔、潮湿、酸性的土壤环境^[1]。藜芦植物的大部分组织均可供药用, 可内服治疗中风痰壅、喉痹不通、癫痫、头痛、黄疸、疟疾、骨折^[2-3], 外用治疥癣、灭蝇蛆^[4-5]。其本品作为中医药物收载于《本草纲目》中已有一千多年历史, 在当代仍作为涌吐风痰药物使用, 但藜芦自身被列为中药配伍禁忌中的十八反^[6], 在临床应用中存在一定限制。藜芦属植物的化学活性成分包括甾体生物碱类、肽类、黄酮类等, 起主要作用的是甾体类生物碱。目前, 已经从藜芦植物中分离出 184 种^[1]甾体类生物碱, 如环靶明、藜芦胺、介藜芦碱等, 具有抗肿瘤、抗炎镇痛、抗血栓、降血压等多种药理活性。

环靶明 (环巴胺, 11-去氧芥芬胺, cyclopamine) 是藜芦植物中的一种甾体类生物碱, 主要存在于百合科藜芦属植物的根系中。环靶明的发现源于其致畸作用, 20 世纪中期, Keeler 等^[7]研究了美国爱达荷州 (Idaho) 高概率的羔羊头部单眼畸形现象后, 发现藜芦属植物加州藜芦 *V. californicum* L. 中的一种甾体类生物碱为致畸主要成分并确定了其结构, 即环靶明。直到 20 世纪 90 年代, 环靶明才被发现在 Hedgehog 信号通路^[8]有特定的抑制作用^[9], 并从原理上解释了它的致畸性。由于 Hedgehog 信号通路与多种肿瘤的生长有关联^[10], 故环靶明可作为一种潜在的抗癌药物。

作为第二大类转录因子, bHLH 转录因子基因家族广泛存在于动物、植物及微生物中。其家族成员在植物生长发育、次生代谢、环境胁迫应答中起调控作用^[11], 由碱性螺旋-环-螺旋特征结构而得名。有关 bHLH 转录因子的研究多以动物为对象, 而在植物中主要为水稻及拟南芥等少数植物。bHLH 转录因子的主要结构是一段贯穿真核生物生命的高度保守的肽序列, 它为转录因子提供了 2 个关键的分子作用——DNA 结合及转录调控^[12]。bHLH 结构域包含大约 60 个氨基酸, 有 2 个功能不同的区域, 基本区域和 HLH^[13]区域。碱基区有 15 个氨基酸长,

通常包括 6 个碱基残基。它位于该结构域的 N 端, 功能为 DNA 结合基序^[14]。HLH 区包含 2 个两亲 α 螺旋, 中间由一个变长环区隔开。HLH 区域作为二聚体区域, 可以形成同型二聚体或异型二聚体。通过对拟南芥基因组序列的分析, 共鉴定出 162 个编码 bHLH 的基因, 根据其系统发育关系将其分为 21 个亚家族^[15]。在水稻 *Oryza sativa* L. 和大白菜 *Brassica rapa* var. *glabra* Regel 基因组中分别鉴定出 167 和 230 个 bHLH 转录因子^[16-17]。它们分别被分为 22 亚科和 24 亚科。系统发育分析表明, 植物 bHLH 蛋白包含 26 个亚家族, 到目前为止, 大多数 bHLH 蛋白在拟南芥中已经被鉴定出功能特征, 它们的作用包括调节果实开裂、花药和表皮细胞发育、激素信号和应激反应^[18]。而目前对中药植物藜芦相关转录因子分析甚少, 本实验将以藜芦转录组数据为基础, 对藜芦 bHLH 转录因子基因家族进行分析鉴定, 为进一步藜芦 bHLH 转录因子功能研究奠定基础。

1 材料

藜芦植物样品为 2017 年 4 月 26 日吉林省磐石市烟筒山镇的海拔 700 m 山坡林下的苗期植株, 经东北林业大学薛哲勇教授鉴定为藜芦 *V. nigrum* L., 采集其根、茎和叶 3 个部位, 并做 3 次生物学重复, 备用。

2 方法

2.1 藜芦二代、全长转录组数据库获得

将植物样品进行总 RNA 提取, 以完成二代测序; 将提取的总 RNA 进行混合, 以完成全长转录组测序。其中二代测序由 Illumina 平台完成, 全长测序由 PacBio 平台完成。利用 BUSCO 对去冗余后的转录组进行完整性评估。

2.2 藜芦 bHLH 基因家族鉴定

通过 NCBI 在线网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载拟南芥 bHLH 序列。藜芦转录组数据由本课题组对藜芦测序获得。使用 perl 程序提取藜芦所有蛋白序列, 利用 PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 网站进行转录因子预测。将预测获得的藜芦 bHLH 基因家族成员进行筛选, 去除重复转录本。在 Pfam (<http://pfam>

xfam.org/) 网站下载得到 bHLH 转录因子基因家族隐马可夫模型 (PF00010), 利用 HMMER search 搜索预测的藜芦 bHLH 基因家族。冗余序列及无 bHLH 结构域序列通过 NCBI 数据库完成, 最终筛选到 72 个藜芦 bHLH 基因家族成员。藜芦 bHLH 蛋白相对分子质量、等电点及氨基酸数目等理化性质利用 ExPASy 网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行分析。采用 WoLF PSORT 在线网站 (<http://www.gen-script.com/wolfpsort.html>), 对藜芦 bHLH 转录因子家族成员进行亚细胞定位预测。

2.3 藜芦 bHLH 蛋白系统发育树的构建及 Motif 和保守结构域分析

利用 MEGA 7.0 软件内置的 Clustal W 程序对藜芦 bHLH 家族蛋白的氨基酸序列进行多序列比对分析, 将比对结果采用邻接法 (neigh-joining, NJ) 构建系统发育树, 并进行自举评估 (Bootstrap), 重复 1000 次, 缺失值处理方式配为状态删除 (pairwise deletion), 其他参数使用默认值^[19]。通过 Evolview 在线工具 (<https://www.evolgenius.info/>) 对系统发育树进行美化^[20], 运用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 网站分析藜芦 bHLH 家族蛋白的基序, 基序数量为 10, 其余参数为默认值^[21]。

2.4 藜芦 bHLH 蛋白组织表达模式分析

通过 Illumina 平台对藜芦的根、茎和叶 3 个组织进行了二代转录组测序, 通过 RSEM 软件^[22]按照

公式 $FPKM = \frac{cDNA \text{ Fragments}}{\{ \text{Mapped Fragments (Millions)} * \text{Transcript Length (kb)} \}}$ 计算衡量出各个基因绝对表达量的 FPKM 值。其中 cDNA Fragments 表示比对到某一转录本上的片段数目, 即双端 Reads 数目; Mapped Fragments (Millions) 表示比对到转录本上的片段总数, 以 10^6 为单位; Transcript Length (kb): 转录本长度, 以 10^3 个碱基为单位。对藜芦 bHLH 成员基因表达量 (FPKM) 使用 $\log_2 (FPKM) + 1$ 对数转化处理, 利用 TBtools 绘制藜芦 bHLH 表达模式图。

3 结果与分析

3.1 藜芦转录组测序结果分析

通过对藜芦植物样品的全长转录组测序, 共获得 circular consensus (CCS) read 352 009 条, 其中全长非嵌合 (full length readsnon-chimeric, FLNC) 序列 308 650 条。对全长非嵌合序列进行聚类得到一致序列 93 217 个, 对一致序列进行 polish 得到高质量一致序列共 90 756 个, 用二代转录组数据对低质量一致序列进行校正, 校正后与高质量一致序列合并进行去冗余分析得到 54 048 转录本序列。利用 BUSCO 对去冗余后的转录组进行完整性评估, 使用 OrthoDB 作为参考数据库, 其完整覆盖率 (C, complete) 达到植物基因库的 73.16% (图 1)。将全长转录组上传到 SRA 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), 获得转录组数据库登录号 (PRJNA734486)。

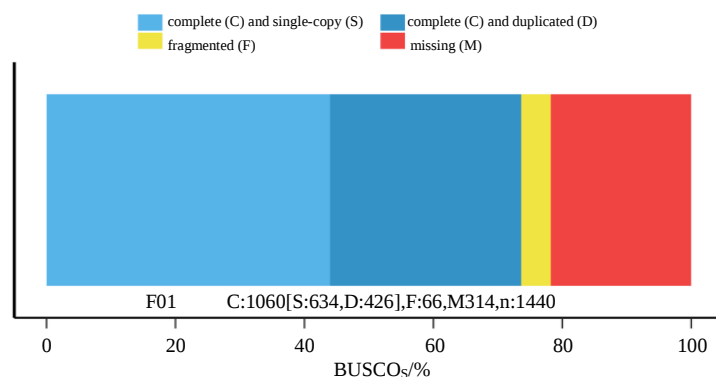


图 1 转录组完整性评估

Fig. 1 Transcriptome integrity assessment results

3.2 藜芦 bHLH 转录因子家族成员鉴定

通过 2 次 HMMER search 搜索, 去除差异较大序列 ($1e-20$) 共计获得 80 个注释为 bHLH 的转录因子, 经过 CDD 和 Pfam 数据库对其保守结构域进行验证, 去除冗余及未获得结构域验证的 8 条序列, 最终获得 72 个具有典型 bHLH 结构域的转录因子基因家族成员 (表

1)。将所得序列依次标号为 VnbHLH1~VnbHLH72, 最长的 bHLH 蛋白有 692 个氨基酸残基 (VnbHLH70), 最短的有 105 个氨基酸残基 (VnbHLH60), 等电点为 4.69~11.47, 相对分子质量为 11 071.2~77 795.3。72 个 VnbHLH 蛋白均定位于细胞核, 推测藜芦 bHLH 转录因子在细胞核发挥调控功能。

表 1 藜芦 bHLH 转录因子基因家族基本信息

Table 1 Basic information of Veratrum bHLH transcription factor gene family

编号	序列名称	长度/aa	相对分子质量	等电点	亚细胞定位
VnbHLH1	Vn_10231	503	55 088	6.23	细胞核
VnbHLH2	Vn_10572	503	54 892	6.20	细胞核
VnbHLH3	Vn_10916	503	55 088	6.23	细胞核
VnbHLH4	Vn_11088	406	44 164	6.45	细胞核
VnbHLH5	Vn_12175	552	61 523	7.22	细胞核
VnbHLH6	Vn_13231	514	55 921	6.36	细胞核
VnbHLH7	Vn_14037	337	37 436	7.13	细胞核
VnbHLH8	Vn_14552	405	43 744	8.48	细胞核
VnbHLH9	Vn_14687	359	40 041	6.38	细胞核
VnbHLH10	Vn_14902	405	43 744	8.48	细胞核
VnbHLH11	Vn_15147	439	47 910	5.09	细胞核
VnbHLH12	Vn_18990	446	48 040	4.77	细胞核
VnbHLH13	Vn_20081	437	47 911	5.64	细胞核
VnbHLH14	Vn_20369	313	34 270	7.92	细胞核
VnbHLH15	Vn_20408	318	34 753	6.17	细胞核
VnbHLH16	Vn_20693	347	36 369	6.31	细胞核
VnbHLH17	Vn_20800	191	20 942	10.69	细胞核
VnbHLH18	Vn_20905	274	30 190	6.31	细胞核
VnbHLH19	Vn_21728	324	35 858	6.19	细胞核
VnbHLH20	Vn_22537	256	27 735	6.80	细胞核
VnbHLH21	Vn_23633	242	26 689	5.82	细胞核
VnbHLH22	Vn_32574	394	42 996	8.14	细胞核
VnbHLH23	Vn_34786	182	19 804	9.67	细胞核
VnbHLH24	Vn_34924	439	48 548	6.30	细胞核
VnbHLH25	Vn_37717	577	63 849	7.35	细胞核
VnbHLH26	Vn_39017	652	71 076	5.05	细胞核
VnbHLH27	Vn_39132	200	22 746	11.47	细胞核
VnbHLH28	Vn_40032	312	34 299	5.92	细胞核
VnbHLH29	Vn_40743	419	46 005	5.31	细胞核
VnbHLH30	Vn_40917	327	35 906	7.32	细胞核
VnbHLH31	Vn_43577	641	69 727	6.96	细胞核
VnbHLH32	Vn_45161	159	17 982	10.51	细胞核
VnbHLH33	Vn_45520	328	36 240	6.38	细胞核
VnbHLH34	Vn_46265	331	36 130	6.19	细胞核
VnbHLH35	Vn_46408	278	30 549	6.31	细胞核
VnbHLH36	Vn_4672	252	27 233	9.25	细胞核
VnbHLH37	Vn_47177	236	25 602	8.52	细胞核
VnbHLH38	Vn_47588	300	32 079	6.72	细胞核
VnbHLH39	Vn_47840	379	41 720	7.15	细胞核
VnbHLH40	Vn_4879	641	69 727	6.96	细胞核
VnbHLH41	Vn_51499	124	14 185	10.08	细胞核
VnbHLH42	Vn_51512	552	61 509	7.22	细胞核
VnbHLH43	Vn_53654	490	53 100	5.91	细胞核
VnbHLH44	Vn_53888	186	20 213	8.65	细胞核
VnbHLH45	Vn_54312	327	36 308	7.41	细胞核
VnbHLH46	Vn_56440	317	34 682	6.17	细胞核
VnbHLH47	Vn_5883	693	77 795	6.40	细胞核
VnbHLH48	Vn_59550	278	31 111	6.07	细胞核

续表 1

编号	序列名称	长度	相对分子质量	等电点	亚细胞定位
VnbHLH49	Vn_59788	214	23 230	9.40	细胞核
VnbHLH50	Vn_60907	397	42 706	4.69	细胞核
VnbHLH51	Vn_61749	317	34 705	6.31	细胞核
VnbHLH52	Vn_62915	393	43 076	6.61	细胞核
VnbHLH53	Vn_64148	407	45 379	11.16	细胞核
VnbHLH54	Vn_64157	567	63 102	6.56	细胞核
VnbHLH55	Vn_69802	393	43 076	6.61	细胞核
VnbHLH56	Vn_71970	367	39 892	6.89	细胞核
VnbHLH57	Vn_73204	282	31 497	6.38	细胞核
VnbHLH58	Vn_73693	300	32 663	8.24	细胞核
VnbHLH59	Vn_74175	443	47 864	6.36	细胞核
VnbHLH60	Vn_75001	105	11 071	10.82	细胞核
VnbHLH61	Vn_78073	315	34 784	8.33	细胞核
VnbHLH62	Vn_79078	319	35 668	6.18	细胞核
VnbHLH63	Vn_80854	368	40 008	6.76	细胞核
VnbHLH64	Vn_8116	450	49 936	6.45	细胞核
VnbHLH65	Vn_83368	287	31 800	5.99	细胞核
VnbHLH66	Vn_84575	273	29 073	7.25	细胞核
VnbHLH67	Vn_86232	298	33 248	5.99	细胞核
VnbHLH68	Vn_86410	484	52 832	6.39	细胞核
VnbHLH69	Vn_87271	693	77 795	6.40	细胞核
VnbHLH70	Vn_88214	449	49 185	6.26	细胞核
VnbHLH71	Vn_91010	196	21 308	8.70	细胞核
VnbHLH72	Vn_91478	254	27 980	9.06	细胞核

3.3 藜芦 bHLH 转录因子蛋白保守基序分析

对藜芦 bHLH 转录因子保守氨基酸 Motif 进行 MEME SUITE 分析 (图 2), 共获得 10 个 Motif: Motif 1 (YIHVRARRGQATDSHSLAERVRRERKIS-ERMKYLLQELVPGCNK)、Motif 2 (TGKASMLD-EIINYVQSLQRQVEFLSMKLA) 及 Motif 3 (LNHVEAERQRREKLNQRFYALRAVVPNISKMDKASLLGDAISYIKELQRKIKELESE) 等。结果 (图 3、4) 表明 50 个转录因子都含有 Motif 1, 49

个转录因子包含 Motif 2, 在 17 个转录因子中发现了 Motif 3, 有 7 个转录因子蛋白含有 Motif 4, 有 6 个转录因子蛋白含有 Motif 5, 有 5 个转录因子蛋白含有 Motif 6, 有 5 个转录因子蛋白含有 Motif 7, 10 个转录因子蛋白含有 Motif 8, 仅有 4 个转录因子包含 Motif 9, 5 个转录因子包含 Motif 10。

利用 clustal W 对所有的藜芦 bHLH 结构域进行多序列比对, 然后采用 WebLogo 3 作图 (图 3),



图 2 MEME 预测的藜芦 bHLH 10 个 Motifs Logo

Fig. 2 Logos of 10 motifs predicted by MEME online software

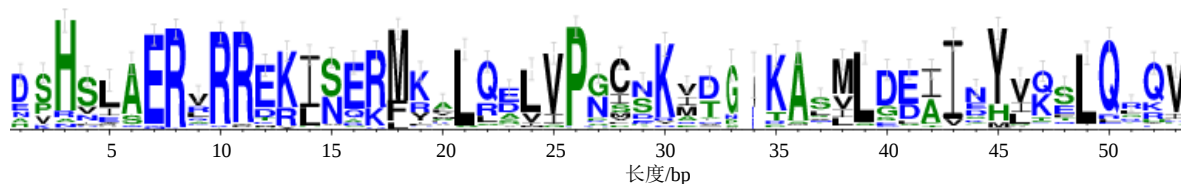


图 3 藜芦 bHLH 转录因子家族的保守结构域

Fig. 3 Conserved domain of Veratrum bHLH transcription factor family

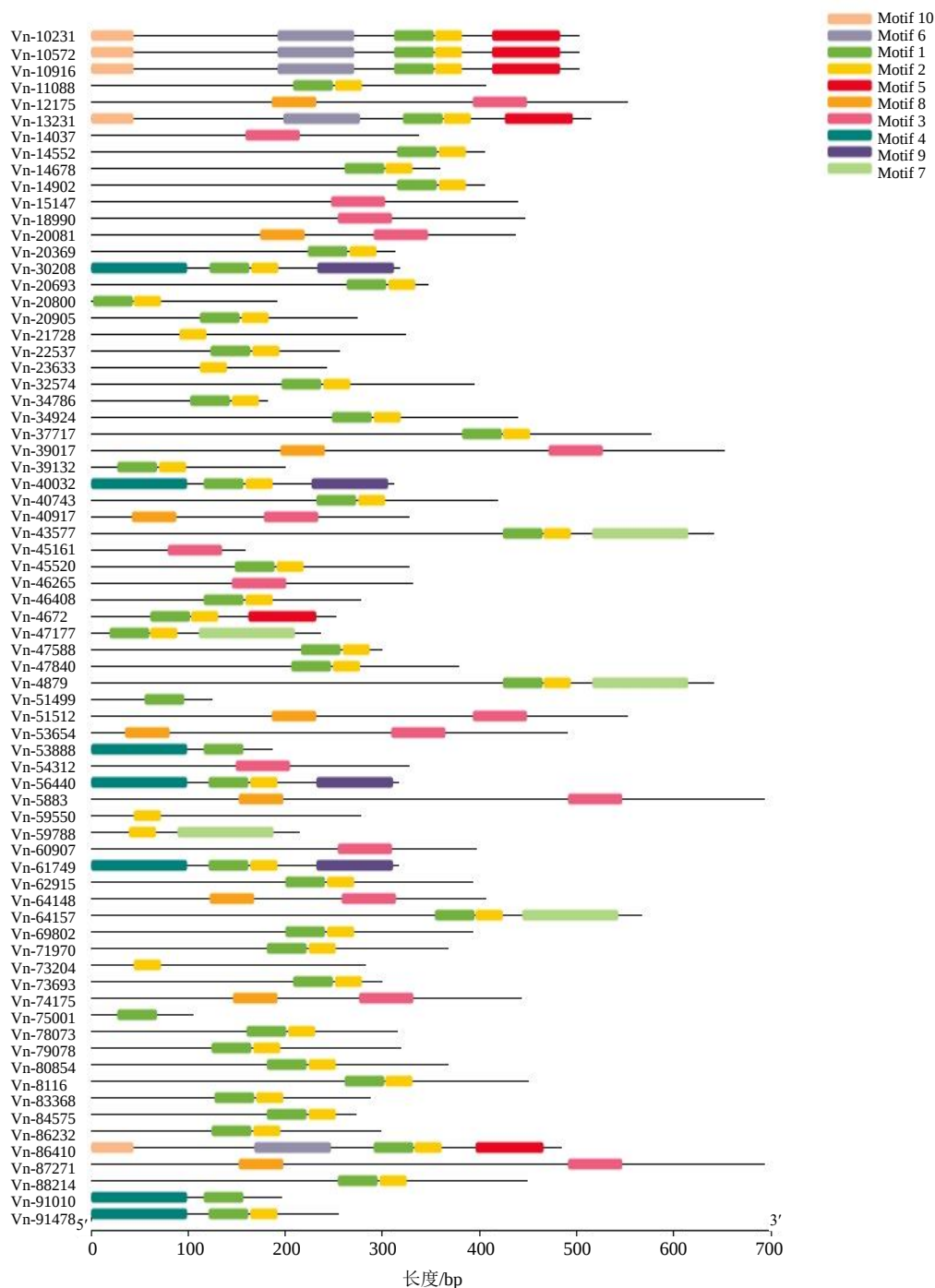


图 4 藜芦 bHLH 转录因子保守基序分布

Fig. 4 Distribution of conserved motifs of Veratrum bHLH transcription factor

藜芦的 bHLH 结构域由 53 个氨基酸组成, 包含 2 个不同的功能区域其 N 端的 Basic 区该区域氨基酸数量较少 (13 个氨基酸), 第 10、11 位的精氨酸高度保守, 碱性区域是转录因子的 DNA 结合区域, 其作用可能是识别 DNA 的顺式作用位点, 该序列对靶基因启动子上游的 E-box 识别结合必不可少; 在 C 端的 HLH 区域第 21、49 位的亮氨酸保守度很高, 第 39、43 位的亮氨酸、异亮氨酸也非常保守, 这些氨基酸残基对于二聚体的形成和功能非常重要。

3.4 藜芦 bHLH 转录因子蛋白家族系统进化分析

使用 MEGA 7.0 软件对 72 个藜芦 bHLH 转录因子和部分拟南芥 bHLH 转录因子蛋白进行建树 (图

5)。经比对发现, bHLH 转录因子和同源性最近的拟南芥 bHLH 序列交错分布。依据拟南芥 bHLH 蛋白家族分类^[23], 藜芦 bHLH 蛋白被分为 6 个大族, 分别为 III、IV、VII、VIII、IX 和 XII。其中 III 族包含 12 个成员, IV 族包含 9 个成员、VII 族包含 9 个成员, VIII 族包含 5 个成员, IX 族包含 6 个成员, XII 族最多, 含有 31 个成员, 共计 72 个。根据进化树分类结果, 可将 III 组与 IV 组细分为 IIIb、IIIc、IIId、IIIf、IVa、IVb 和 IVc 几个亚族, 分别含有 3、6、3、3、5 和 1 个成员。几乎所有藜芦 bHLH 蛋白都与拟南芥 bHLH 蛋白聚在相同亚组上, 同一亚族的藜芦 bHLH 蛋白与拟南芥 bHLH 蛋白具有较高的相似性, 藜芦 bHLH 蛋白与相近的拟南芥 bHLH 蛋白可能具

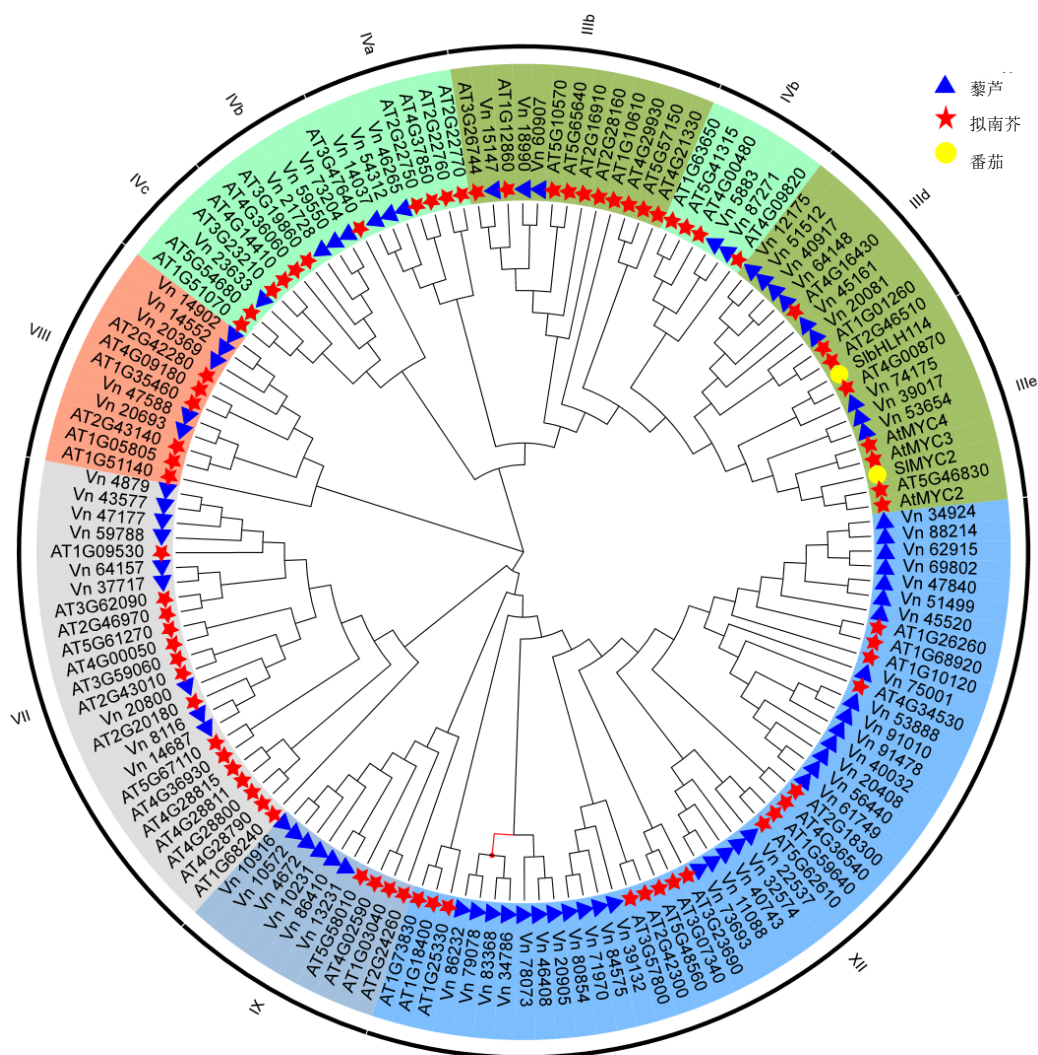


图 5 藜芦与拟南芥 bHLH 系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic Analysis of Veratrum and Arabidopsis bHLH

有相同或相似的功能。

3.5 不同组织藜芦 bHLH 表达模式分析

对藜芦 bHLH 转录因子基因在藜芦转录组数据上的表达模式进行分析发现, 72 个基因在根、茎和叶 3 个不同组织中表达模式有差异 (图 6), 大部分 bHLH 转录因子都参与表达, 少部分未表达或部分表达: 5 条 bHLH (Vn_20080、Vn_14687、Vn_8116、Vn_40032、Vn_43577) 在根中未达; 2 条 bHLH (Vn_54312、Vn_14037) 在根中表达较高, 而在叶中表达量极低, 结合藜芦内的生物碱集中在根部, 推测其可能参与了藜芦植物根部某些生物碱的合成; 还有些基因未参与表达, 如 Vn_79078。Vn_78073、Vn_83368 2 条基因在茎中表达量明显高于根部和叶片, 可能在茎的发育过程中起重要作用; Vn_20800、Vn_14687 和 Vn_8116

在叶片中表达显著, 可能参与叶的生长发育调控。此外一些 bHLH (如 Vn_53654、Vn_23633 等) 在藜芦 3 个不同组织部位均有较高表达, 说明其可能参与藜芦整个生长发育周期中多种生理生化转变的转录调控。总体上看, 藜芦 bHLH 的基因表达具有多样性, 一些基因能够在某一或多种组织中发挥特定作用。

4 讨论

目前对基因家族的鉴定分析普遍使用基因组或基因组与转录组结合的方式, 但藜芦基因组尚未被报导, 本实验通过二代转录组测序完成转录本定量分析, 使用全长转录组测序获得一致性转录本。在此基础上完成了对 bHLH 转录因子基因家族的模型筛选、结构预测和表达分析。在没有参考基因组的情况下, 二代、全长转录组联合测序可作为替代策略进行基因挖掘^[24], 完成对基因家族的鉴定及部分分析。转录组测序停留在组织表达层面, 缺少对基因的结构及染色体定位、对蛋白及代谢物的调控也需要代谢组学提供帮助。因此, 对基因的完整鉴定及功能挖掘需要基因组、转录组及代谢组的联合分析来完成。

bHLH 是真核生物中一类广泛存在且数量众多的转录因子, 因具有螺旋-环-螺旋结构而得名, 其通过特定的氨基酸残基与靶基因结合来调节相关基因的表达^[25]。与其他植物相比, 藜芦属植物由于含有特殊的甾体类生物碱, 成为该方向的研究热点。SlbHLH114 参与了番茄甾体生物碱的合成, 可被甾体生物碱合成关键调控因子 SIMYC2 激活, 从而显著提高番茄内甾体生物碱代谢途径基因的表达^[26-27]。Vn_39017、Vn_53654 和 Vn_74175 3 个基因与 SlbHLH114、SIMYC2 关系较近, 在根中表达较高, 且与甾体生物碱的聚集部位吻合, 可能参与了藜芦甾体生物碱环靶明的生物合成。植物 bHLH 转录因子参与各种信号转导及合成代谢途径的调控, 如光信号转导、激素合成、腺毛和根毛发育及逆境胁迫及枝条分枝等^[28-30], 而且越来越多的研究表明 bHLH 转录因子对调节植物逆境具有重要作用。在拟南芥中, AtbHLH122 对干旱、盐胁迫和渗透胁迫具有正向调控作用^[31], 此外, bHLH115 可参与调节铁的稳态^[32]。根据与其他已验证功能的 bHLH 基因建树结果, 可初步推测藜 bHLH 在信号转导或代谢途径调控中发挥的作用。

bHLH 在不同组织部位的表达模式预示着

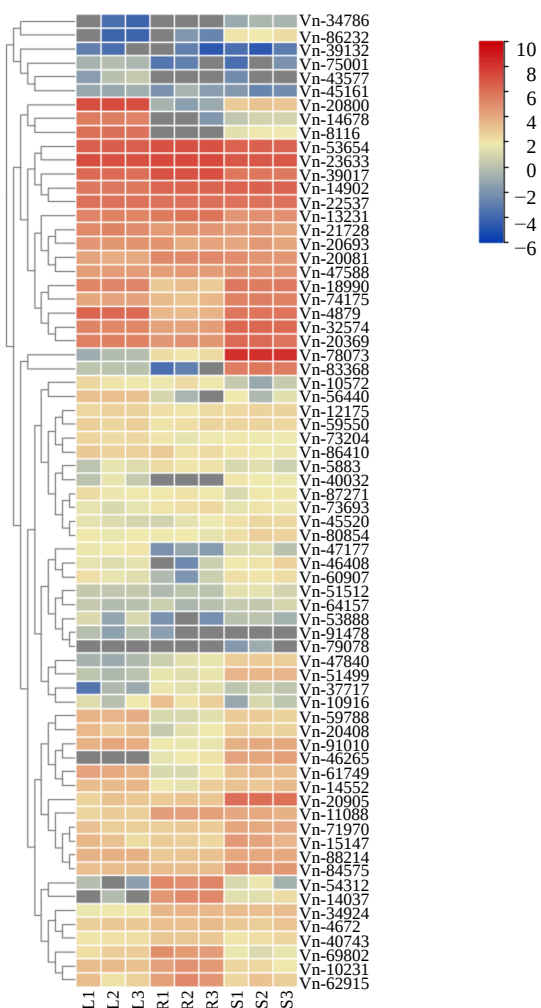


图 6 不同组织中藜芦 bHLH 基因表达模式

Fig. 6 Expression pattern of Veratrum bHLH gene in different tissue

bHLH 蛋白功能的多样性。烟草 bHLH93 具有明显的组织特异表达^[33]，在不同生长阶段的侧根和花期子房中有较高表达，这与植物甾醇合成的集中性特征相吻合；银杏 bHLH91 的表达存在季节与组织性差异^[34]。作为 *miR396* 的靶基因，bHLH74 能调控拟南芥根部的生长发育^[35]。这些表达差异在 72 个藜芦 bHLH 中也有体现，在根中表达量高或特异表达的 bHLH 对甾体生物碱的代谢可能具有调控作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张蒙珍, 高丽娟, 徐世芳, 等. 藜芦属植物甾体生物碱及其药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5129-5142.
- [2] Zheng B J, Wang C H, Song W W, et al. Pharmacokinetics and enterohepatic circulation of jervine, an antitumor steroidal alkaloid from *Veratrum nigrum* in rats [J]. *J Pharm Anal*, 2019, 9(5): 367-372.
- [3] Li W, Wang L S, Zhao D Q, et al. Steroidal alkaloids from *Veratrum nigrum* [J]. *Chem Nat Compd*, 2012, 48(5): 919-920.
- [4] 王冬梅, 戴爱梅, 刘新兰, 等. 藜芦碱对棉蚜防治效果分析 [J]. 新疆农业科学, 2019, 56(1): 46-51.
- [5] 章斌. 基于化学物质基础和代谢组学方法的中药藜芦毒性及藜芦与人参配伍禁忌机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [6] 张娴. 中药“十八反”: 白芍、丹参与藜芦配伍相互作用及药理作用研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2015.
- [7] Keeler R F, Binns W. Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). I. Preparation and characterization of fractions and alkaloids for biologic testing [J]. *Can J Biochem*, 1966, 44(6): 819-828.
- [8] 王凡, 徐凌, 郭传勇. Hedgehog 信号通路在肝癌发生中的作用 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2013, 34(2): 120-124.
- [9] Cooper M K, Porter J A, Young K E, et al. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling [J]. *Science*, 1998, 280(5369): 1603-1607.
- [10] Hammerschmidt M, Brook A, McMahon A P. The world according to hedgehog [J]. *Trends Genet*, 1997, 13(1): 14-21.
- [11] Lu J, Webb R, Richardson J A, et al. MyoR: A muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(2): 552-557.
- [12] Sailsbery J K, Dean R A. Accurate discrimination of bHLH domains in plants, animals, and fungi using biologically meaningful sites [J]. *BMC Evol Biol*, 2012, 12: 154.
- [13] Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(6): 226.
- [14] Atchley W R, Terhalle W, Dress A. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain [J]. *J Mol Evol*, 1999, 48(5): 501-516.
- [15] Bailey P C, Martin C, Toledo-Ortiz G, et al. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2497-2502.
- [16] Li X X, Duan X P, Jiang H X, et al. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [17] Song X M, Huang Z N, Duan W K, et al. Genome-wide analysis of the bHLH transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. *Mol Genet Genom*, 2014, 289(1): 77-91.
- [18] Feller A, Machemer K, Braun E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 94-116.
- [19] Hall B G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(5): 1229-1235.
- [20] He Z L, Zhang H K, Gao S H, et al. Evolvview v2: An online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1): W236-W241.
- [21] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, et al. The MEME suite [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W39-W49.
- [22] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [23] Heim M A, Jakoby M, Werber M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(5): 735-747.
- [24] 郑志琴. 青海钩虾细胞色素 P450 家族成员的鉴定及主要水体污染物的诱导表达 [D]. 西宁: 青海大学, 2020.
- [25] Massari M E, Murre C. Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2): 429-440.
- [26] Li Y, Chen Y, Zhou L, et al. MicroTommetabolic

- network: Rewiring tomato metabolic regulatory network throughout the growth cycle [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1203-1218.
- [27] Cárdenas P D, Sonawane P D, Pollier J, *et al.* GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10654.
- [28] Roig-Villanova I, Bou-Torrent J, Galstyan A, *et al.* Interaction of shade avoidance and auxin responses: A role for two novel atypical bHLH proteins [J]. *EMBO J*, 2007, 26(22): 4756-4767.
- [29] Friedrichsen D M, Nemhauser J, Muramitsu T, *et al.* Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth [J]. *Genetics*, 2002, 162(3): 1445-1456.
- [30] Ohashi-Ito K, Bergmann D C. Regulation of the *Arabidopsis* root vascular initial population by LONESOME HIGHWAY [J]. *Development*, 2007, 134(16): 2959-2968.
- [31] Liu W W, Tai H H, Li S 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(4): 1192-1204.
- [32] Liang G, Zhang H M, Li X L, *et al.* bHLH transcription factor bHLH115 regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(7): 1743-1755.
- [33] 武明珠, 李锋, 王燃, 等. 烟草转录因子 bHLH93 基因的克隆及表达分析 [J]. 烟草科技, 2015, 48(3): 1-7.
- [34] 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.
- [35] Bao M. miR3 96 a Mediated basic Helix-Loop-Helix transcription factor bHLH74 repression acts as a Regulator for Root Growth in *Arabidopsis* Seedlings [J]. *Plant Cell Physiology*, 2014, 55(7): 1343-1353.

[责任编辑 时圣明]