

连翘 bHLH 转录因子家族成员的鉴定与表达分析

闫雪娇^{1,2}, 原 梦^{1,2#}, 李文文^{1,2}, 张力予^{1,2}, 许高龙^{1,2}, 杨 崇^{1,2}, 吕淑芳^{1,2}, 马占强^{1,2}, 张红晓^{1,2}, 王 婷^{1,2}, 侯典云^{1,2*}

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023

2. 河南省药食兼用资源评价与创新利用工程研究中心, 河南 洛阳 471023

摘要:目的 基于连翘 *Forsythia suspensa* 基因组数据筛选鉴定 bHLH 转录因子家族成员并进行特征与功能分析。方法 利用连翘基因组数据筛选鉴定连翘 bHLH 转录因子家族, 分析其蛋白理化性质、系统进化关系, 并对 bHLH 基因进行染色体定位、基因结构、功能注释、顺式作用元件分析等特征分析。此外, 采用外源茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理连翘叶片, 通过 qRT-PCR 检测 *FsbHLHs* 在处理 48 h 内的表达模式, 并结合连翘脂素含量变化进行相关性分析。结果 筛选出 170 条具有完整 HLH 保守结构域的 bHLH 转录因子, 分布在 14 条染色体上, 编码氨基酸长度在 67~885 个 aa, 相对分子质量在 7 910.58~98 854.78, 理论等电点 (pI) 为 4.71~10.44, 系统发育分析将其划分为 13 个亚家族, 其中第 III 亚家族成员最多。通过顺式作用元件分析, *FsbHLHs* 具有多种光调控、激素响应和胁迫响应相关的元件。对筛选获得的 8 个 *FsbHLH* 基因在 MeJA 处理下的表达模式与连翘脂素含量变化进行相关性分析, 结果表明 *FsbHLH26* 和 *FsbHLH139* 2 个基因极有可能在连翘脂素的合成与积累中发挥关键调控作用。结论 筛选鉴定了 170 个 *FsbHLH* 基因家族成员, 对其进行系统的生物信息学分析和 MeJA 处理下基因表达模式分析, 筛选到 *FsbHLH26* 和 *FsbHLH139* 可能是参与到连翘脂素生物合成的关键转录因子, 为探究连翘脂素生物合成的分子机制奠定基础。

关键词: 连翘; bHLH 转录因子; 连翘脂素; 生物信息学分析; 激素处理

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)16-6521-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.024

Identification and expression analysis of bHLH transcription factors family members in *Forsythia suspensa*

YAN Xuejiao^{1,2}, YUAN Meng^{1,2}, LI Wenwen^{1,2}, ZHANG Liyu^{1,2}, XU Gaolong^{1,2}, YANG Chong^{1,2}, LYU Shufang^{1,2}, MA Zhanqiang^{1,2}, ZHANG Hongxiao^{1,2}, WANG Ting^{1,2}, HOU Dianyun^{1,2}

1. College of Agricultural, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

2. Henan Engineering Research Center for Evaluation and Innovative Utilization of Homology of Medicine and Food, Luoyang 471023, China

Abstract: Objective To screen and identify members of the bHLH transcription factor family based on genomic data from *Forsythia suspensa* and characterize their features and functions. **Methods** Using the genomic data of *F. suspensa*, the bHLH transcription factor family was screened and identified, analysing their physicochemical properties and phylogenetic relationships, and characterizing the bHLH genes by analysing their chromosomal locations, gene structures, functional annotations, and cis-acting elements. In addition, *F. suspensa* leaves were treated with exogenous methyl jasmonate (MeJA) and expression pattern of *FsbHLHs* within 48 h after treatment was detected by qRT-PCR. Correlation analysis was conducted in combination with the changes in phillygenin content. **Results** A total of 170 bHLH transcription factors with complete HLH conserved domains were identified, and these factors were distributed across 14 chromosomes. Their amino acid lengths ranged from 67 to 885 aa, relative molecular masses from 7 910.58 to 98 854.78, and theoretical isoelectric points (pI) from 4.71 to 10.44. Based on phylogenetic analysis, *FsbHLHs* were grouped into 13 subfamilies, with subfamily

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 河南省中央引导地方科技发展资金项目 (Z20241471030); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 河南省科技攻关项目 (242102110325, 262102110326); 河南省中药材产业科技特派员服务团项目

作者简介: 闫雪娇 (2001—), 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: yuki10242025@163.com

#共同第一作者: 原 梦 (2000—), 博士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: ym107107@163.com

*通信作者: 侯典云 (1975—), 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源评价与利用。Tel: (0379)64282340 E-mail: dianyun518@163.com

III being the largest. Through *cis*-acting element analysis, it was found that *FsbHLHs* contained multiple elements associated with light regulation, hormone response, and stress response. Subsequently, the correlation between MeJA-induced expression of eight *FsbHLH* genes and phillygenin content was analysed, and these results suggested that *FsbHLH26* and *FsbHLH139* were potentially critical regulators of phillygenin biosynthesis and accumulation. **Conclusion** This study identified 170 members of the *FsbHLH* gene family. Through systematic bioinformatics analysis and gene expression pattern analysis following MeJA treatment, *FsbHLH26* and *FsbHLH139* may be the key transcription factors involved in the biosynthesis of phillygenin, laying the foundation for future research into the molecular mechanisms underlying phillygenin biosynthesis.

Key words: *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl; bHLH transcription factors; phillygenin; bioinformatics analysis; hormone treatment

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科连翘属落叶灌木, 广泛分布于我国山西、河南、陕西等地区^[1], 在北方地区兼具重要的早春观赏价值与生态防护功能^[2]。连翘气微香、味苦^[3], 其果实入药, 具有清热解毒、消肿散结、疏散风热等功效^[4]。连翘的化学成分主要包括苯乙醇苷类、木脂素类、五环三萜类、黄酮类等化合物^[5], 是银翘散、连翘消毒饮、双黄连口服液、清热解毒口服液等制剂的主要原料^[6]。木脂素类化合物是连翘中重要的特征性成分之一, 具有显著的抗炎、抗氧化、抗病毒及保肝活性^[7]。苯丙烷途径是连翘次生代谢的核心代谢通路, 为木脂素、苯乙醇苷等特征性成分的合成与积累提供关键前体与代谢基础^[8]。

bHLH 基因家族是植物中最大的转录因子家族之一, 所有成员都具有 50~60 个氨基酸组成的保守结构域, 其 N 端含有可特异性识别并结合 DNA 的碱性区域, C 端具有介导与其他转录因子形成同源二聚体/异源二聚体的 HLH 区^[9]。根据系统进化关系, 植物 *bHLH* 转录因子可划分为多个亚家族, 不同亚家族成员的功能呈现多样化, 广泛参与调控植物生长发育、光形态建成、逆境响应以及次生代谢等生物学过程^[10-11]。目前, 大量研究都聚焦于 *bHLH* 基因家族在次级代谢, 如在苯丙素类化合物 (类黄酮、木质素、阿魏酸) 生物合成中的调控作用^[12-14]。

茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 是重要的逆境信号分子与生长调控激素, 不仅参与调控植物抗病、抗虫等防御反应^[15], MeJA 作为诱导子可以影响多种植物苯丙烷途径次生代谢产物的积累, 如连翘中的木脂素类、苯乙醇苷类^[16], 甘草、黄芪中的黄酮类^[17-18]等。

本研究基于连翘基因组数据筛选出 170 个连翘 *bHLH* 家族成员, 并进行了理化性质分析和染色体定位、蛋白互作预测等一系列生物信息学分析。利用实时荧光定量 PCR 对 MeJA 处理不同时间的连翘叶片中的 *FsbHLHs* 的时空表达模式进行了分析,

并同步测定连翘脂素含量, 最终通过相关性分析, 筛选获得可能参与连翘脂素生物合成的 *FsbHLH* 候选转录因子, 研究结果为解析连翘脂素生物合成途径提供分子基础。

1 材料

研究所用连翘种子取自河南科技大学农学院材料培养室, 由侯典云教授鉴定为木犀科连翘属植物连翘 *F. suspensa* (Thunb.) Vahl。选取饱满成熟的连翘种子用清水浸泡 6 h 后, 转移至营养土中培育。选取生长状况一致的 3 月龄连翘幼苗, 分别喷施 0 (对照)、0.2 mmol/L MeJA 溶液, 于处理后 6、12、24、48 h 取样。每个时间点选取 3 株连翘幼苗混样, 经液氮速冻后放置于 -80 °C 冰箱保存备用。

2 方法

2.1 连翘 *bHLH* 家族的筛选与鉴定

从 National Genomics Data Center 数据库中获得连翘全基因组数据 (NGDC ID: PRJCA023056), 以 Pfam 数据库中 *bHLH* 家族的隐马尔可夫模型 (HMM) PF00010 为检索模型, 利用 TBtools-II 的 Simple HMM Search 工具对连翘全基因组蛋白序列进行保守结构域检索。设置阈值为 $E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$, 初步获得候选序列。通过 SMART (<http://smart.embl.de/>) 和 NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 在线平台预测保守结构域, 筛选出具有完整 *bHLH* 结构域的蛋白序列。

2.2 连翘 *bHLH* 家族的染色体定位及理化性质分析

基于连翘基因组数据对 *FsbHLHs* 进行染色体定位, 使用 TBtools-II 软件绘制定位图。*FsbHLHs* 的理化性质通过在线工具 ExPASy ProtParam Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 计算。利用 Cellular Localization Prediction 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 进行家族成员的亚细胞定位预测。

2.3 连翘 bHLH 家族保守基序和基因结构分析

连翘 bHLH 家族蛋白的保守基序通过 MEME 工具 (<https://meme-suite.org/meme>) 进行分析, 基序检出数目设为 10。利用 TBtools-II 软件的 Gene Structure View (advanced) 工具对保守基序、保守结构域和基因结构进行可视化。

2.4 连翘 bHLH 家族系统进化分析

连翘和拟南芥及其他物种 bHLH 氨基酸序列的 ClustalW 比对通过 MEGA12 软件完成, 根据多序列比对结果, 采用邻接法构建系统发育树, Bootstrap 重抽样设为 1 000 次, 其余参数保持默认^[19]。利用 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 在线网站对系统发育树进一步美化^[20]。拟南芥的基因组数据来源于 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>)。

2.5 连翘 bHLH 家族顺式作用元件分析

将连翘 bHLH 基因起始密码子(ATG)上游 2 000 bp 的基因组序列作为启动子区域, 将这些序列提交至 PlantCARE 在线分析工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行顺式作用元件预测。选取总数量排名在前 22 的顺式作用元件, 利用 TBtools-II 软件对元件的分布特征绘制热图, 呈现各类元件在连翘 bHLH 家族基因启动子中的分布差异及富集特征。

2.6 连翘与苯丙烷途径相关 bHLH 转录因子的筛选

从已有文献中获得相关物种中参与苯丙烷途径的 bHLH 蛋白序列, 将收集到的蛋白序列与连翘 bHLH 蛋白进行系统发育分析, 根据进化分支关系确定了 8 个候选基因进行后续实验。通过 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 网站预测筛选出的 bHLH 蛋白可能的相互作用关系, 参考植物为拟南芥。

2.7 MeJA 处理下连翘 bHLH 转录因子的表达分析

使用多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒(RC411-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取 MeJA 处理不同时间的连翘叶片的 RNA, 利用 RT ProMix For qPCR (+gDNA clearer) (E0107S, 广州吉格生物科技有限公司)将 RNA 反转录成 cDNA, 引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计(表 1)。荧光定量 PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s; 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。反应体系 10 μ L: 2 $\times$ Ultra SYBR Green qPCR Mix 5 μ L, 上、下游引物各 0.25 μ L, cDNA 4 μ L, ddH₂O 0.5 μ L。内参基因为 *FsUNK1*。

2.8 数据分析

利用 Microsoft Excel 2019 统计 qRT-PCR 数据, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达水平情况, 通过 GraphPad 软件进行单因素方差分析并绘制柱形图。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

基因 ID	引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>FsbHLH26</i>	<i>FsbHLH26-F</i>	GCAAACATCCAAGAGGACGATAATG
	<i>FsbHLH26-R</i>	CAAAGCCTGGATACCTCTCTCATC
<i>FsbHLH29</i>	<i>FsbHLH29-F</i>	GAAAGGAAGCGCAGAGAGAA
	<i>FsbHLH29-R</i>	CTCAACGGACGTCGACTATTT
<i>FsbHLH33</i>	<i>FsbHLH33-F</i>	TGGAGCAAGAGAACAGAAAGAA
	<i>FsbHLH33-R</i>	GAGCCATGGAGATGAGAAAGAA
<i>FsbHLH42</i>	<i>FsbHLH42-F</i>	GGAAGTGCCAGAGAACCTAAAG
	<i>FsbHLH42-R</i>	CCTGCAGATAAGGACGCATAAA
<i>FsbHLH79</i>	<i>FsbHLH79-F</i>	ACGATGGTTTGTGTACCTACTT
	<i>FsbHLH79-R</i>	CTCTCTTCTTGGGTGCTTTCT
<i>FsbHLH128</i>	<i>FsbHLH128-F</i>	GACGAGAGAAGATCAGCGAAAG
	<i>FsbHLH128-R</i>	TGTCCTGGTTGAGATTGGAAG
<i>FsbHLH139</i>	<i>FsbHLH139-F</i>	AACCACTTGAATGGAGTGAA
	<i>FsbHLH139-R</i>	GAGTTTGAGGGCGTGCTATAA
<i>FsbHLH152</i>	<i>FsbHLH152-F</i>	CTGAAAGAGTCCGAAGAGAGAAG
	<i>FsbHLH152-R</i>	GAATCGCTCCACGAGATTGA
<i>FsUNK1</i>	<i>FsUNK1-F</i>	CAGACCAGCTTTGAGGAGTATC
	<i>FsUNK1-R</i>	GGCCAGAAACCAGTAGTCAATA

3 结果与分析

3.1 连翘 bHLH 转录因子的筛选鉴定及基本特征分析

在连翘中共鉴定出 170 个 *FsbHLHs*, 将它们命名为 *FsbHLH1*~*FsbHLH170*。染色体定位分析显示(图 1), 170 条 *FsbHLHs* 不均匀地分布在 14 条染色体上。4 号染色体上分布的 *FsbHLHs* 最多(24 条), 约占总 *FsbHLHs* 的 14%, 其中 *FsbHLH57/83*、*FsbHLH34/36* 以及 *FsbHLH1/59/110/113* 分别形成基因簇。1 号染色体分布的 *FsbHLHs* 最少(5 条), 约占总 *FsbHLHs* 的 3%。理化性质分析结果显示, 连翘 bHLH 成员氨基酸数在 67~885 个, 相对分子质

量介于 7 910.58~98 854.78, 蛋白质之间差异较大, 等电点范围为 4.71~10.44, 67% 的蛋白质等电点小于 7.00, 且除 *FsbHLH166* 亲水系数为 0.013, 其他家族成员的亲水系数均小于 0, 说明大多数连翘 bHLH 家族成员为酸性、亲水蛋白。连翘 bHLH 成员不稳定性系数在 35.35~92.98, 稳定性存在显著差异, 意味着连翘 bHLH 蛋白有高度的功能分化。对连翘 bHLH 家族成员进行亚细胞定位预测可知, *FsbHLH110/163/168* 可定位在叶绿体、细胞核, *FsbHLH117* 可定位在叶绿体、高尔基体、细胞核, *FsbHLH133* 可定位在高尔基体、细胞核, 其余成员均定位在细胞核。

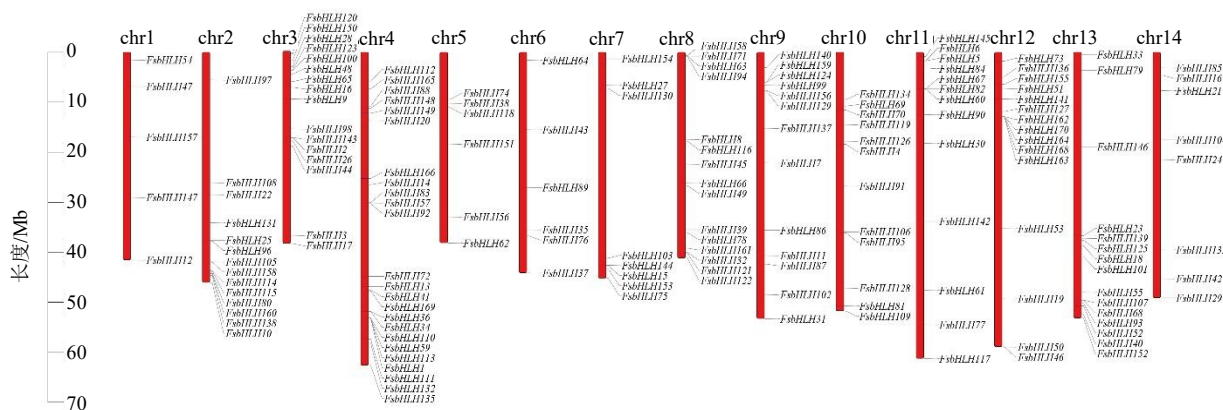


图 1 *FsbHLH* 的染色体分布分析

Fig. 1 Chromosome distribution analysis of *FsbHLH*

3.2 连翘 bHLH 蛋白系统发育分析

将连翘 170 个 bHLH 家族成员与随机挑选的拟南芥亚家族成员进行多序列比对, 并用 MEGA12.0 软件构建系统发育树(图 2)。参考拟南芥 bHLH 家族成员分类标准^[21]并做了调整, 将连翘 bHLH 家族成员分为 13 个亚家族, 其中 I 亚家族 19 个成员; II 亚家族最少 2 个成员; III 亚家族最多 46 个成员; IV 亚家族 19 个成员; V 亚家族 10 个成员; VI 亚家族 7 个成员; VII 亚家族 3 个成员; VIII 亚家族 17 个成员; IX 亚家族 7 个成员; XI 亚家族 8 个成员; XII 亚家族 17 个成员; XV 亚家族 5 个成员; XVIIa 亚家族 10 个成员, 共计 170 个。进化树显示, I、III、IV、V、VII、VIII 族又进一步划分为 Ia、Ib、IIIa、IIIb、IIIc、IIId、IIIe、IIIf、IVa、IVb、IVc、IVd、Va、Vb、VIIa、VIIb、VIIIa、VIIIb 几个小家族。部分亚家族仅在拟南芥中存在, 绝大多数分支上都包含有连翘 bHLH 蛋白和拟南芥蛋白, 表明其具有同源性。蛋白序列相似度越高, 表明其亲缘关系越近,

同一类群成员的功能往往更为保守。推测同一进化分支的连翘与拟南芥 bHLH 蛋白可能功能相似或相同。

3.3 连翘 bHLH 转录因子保守基序、蛋白结构域及基因结构分析

通过 bHLH 家族蛋白保守基序预测分析, 共得到 10 个保守基序(图 3)。所有序列都至少含有 motif 1、motif 2 或 motif 3 中的一个, 其中 motif 1 和 motif 3 两个基序富含参与 DNA 结合的关键碱性氨基酸残基, 构成了 bHLH 蛋白的碱性区域, 负责特异性识别并与 DNA 结合, 它们可能同时或者单独出现在 1 个基因上, 在转录调控方面发挥协同功能; motif 2 为 HLH 区域, 负责与自身以外的蛋白形成同源或异源二聚体进而发挥特定功能。170 个成员除了含有经典的 bHLH 结构域, 还有 EIN3 superfamily 结构域、bHLH-MYC_N superfamily 结构域、ACT superfamily 结构域、植物信号传导相关的 PLN03217 superfamily 结构域、与跨膜相关的

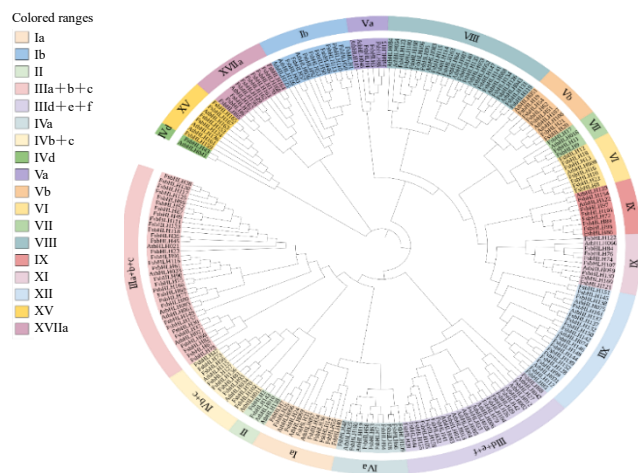


图 2 FsbHLHs 的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of FsbHLHs

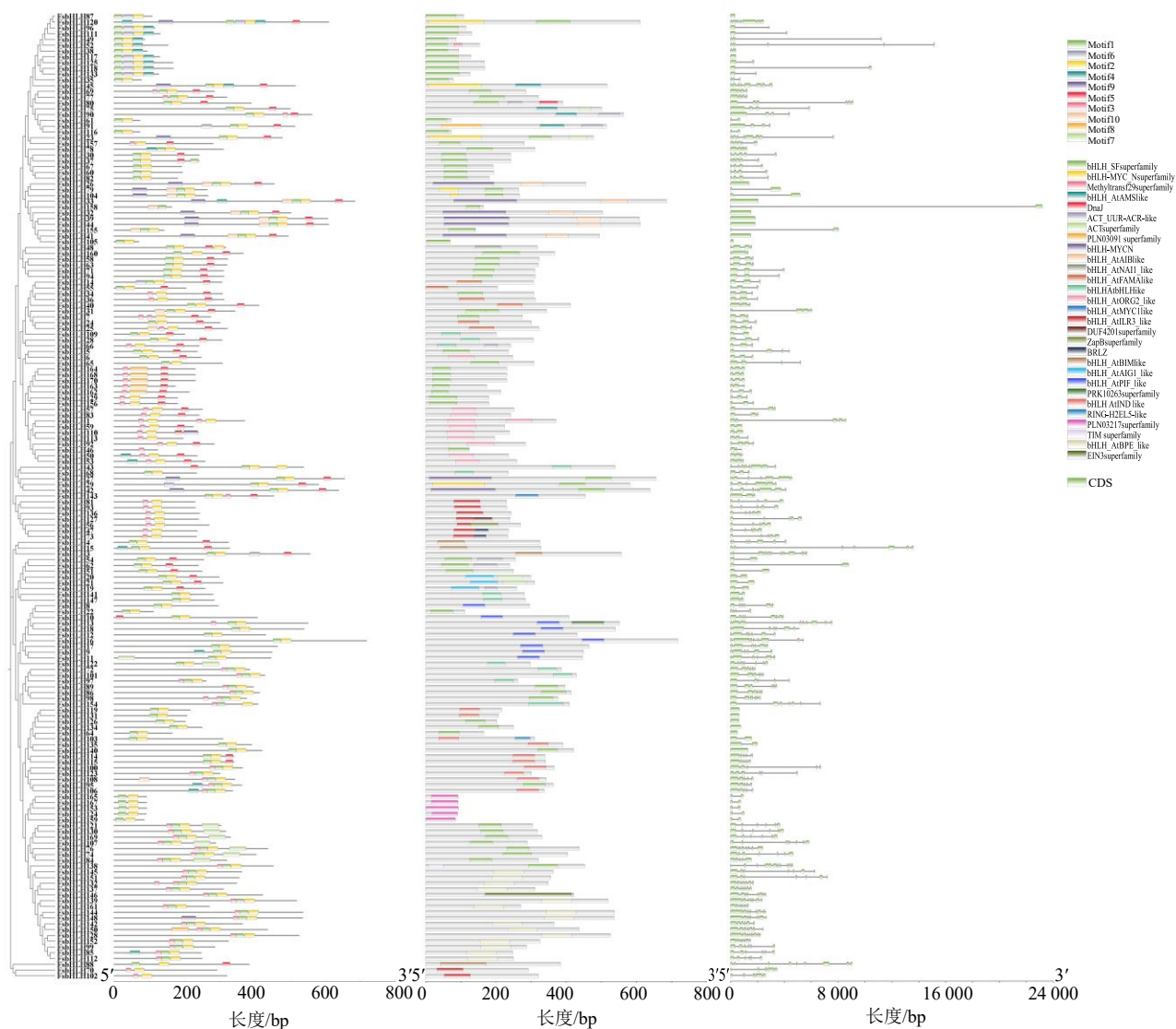


图 3 *FsbHLHs* 的保守基序、保守结构域和基因结构
Fig. 3 Conserved motif, conserved domain and gene structure of *FsbHLHs*

PLN03091superfamily 结构域等,不同亚家族呈现出特征性的结构域组成模式。对基因结构的分析显示,*FsbHLHs* 的外显子数量为 1~11 个,仅有 6.47%的 *FsbHLHs* 只含 1 个外显子,大多数基因含有多数外显子。连翘 *FsbHLHs* 结构相对复杂,仅有部分亲缘关系较近的 *FsbHLHs* 基因,其 CDS 序列高度保守。

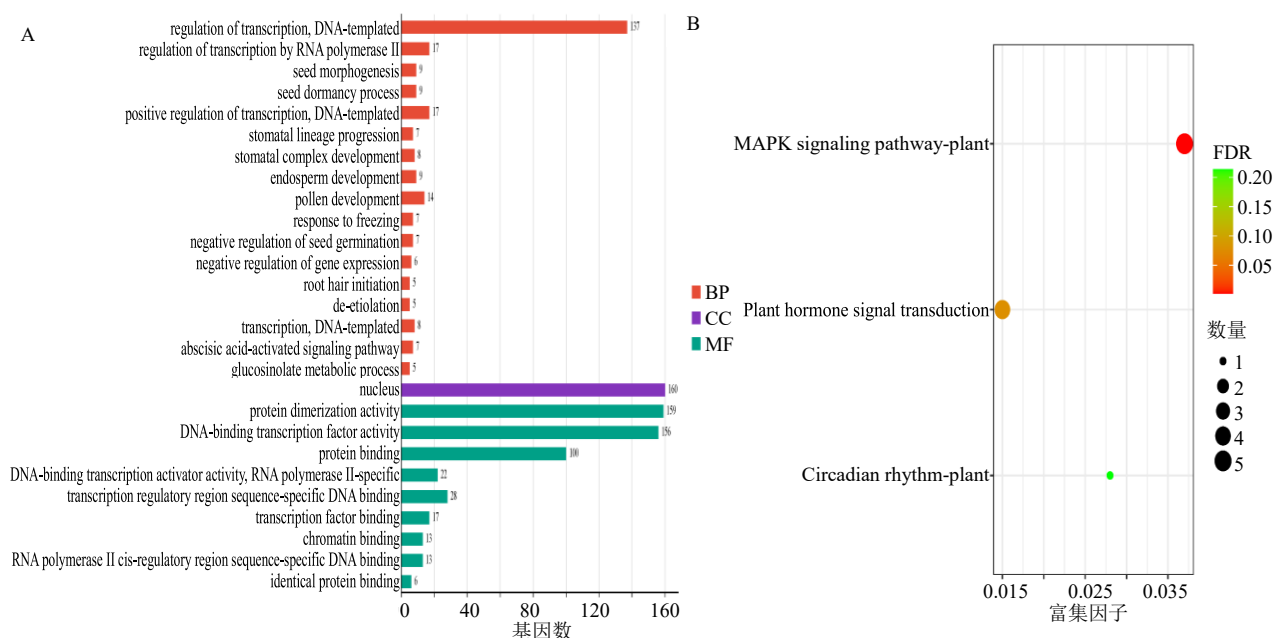
3.4 连翘 bHLH 转录因子功能注释与分析

对连翘 *FsbHLHs* 进行 GO 功能注释(图 4-A),结果显示, bHLH 转录因子共获得 277 次生物学过程(biological process, BP)注释、160 次细胞组分(cellular component, CC)注释、588 次分子功能(molecular function, MF)注释,由于单个蛋白可同

时参与多个生物学过程、执行多种分子功能并定位于不同细胞组分,因此注释次数多于蛋白序列总数,体现了连翘 bHLH 家族基因功能的多样性与冗余性。对连翘 *FsbHLHs* 进行 KEGG 功能富集分析(图 4-B),结果显示,有 5 条富集到植物 MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway-plant)中,4 条富集到植物激素信号转导(plant hormone signal transduction)中,1 条富集到植物昼夜节律(circadian rhythm-plant)中。

3.5 连翘 bHLH 基因的顺式作用元件分析

筛选并绘制了连翘 bHLH 高频顺式作用元件(图 5),共 22 个。依据其已知生物学功能,将其划



A-GO 功能注释; B-KEGG 富集分析。
A-GO functional annotation; B-KEGG enrichment analysis.

图 4 连翘 bHLH 家族的功能富集分析

Fig. 4 Functional enrichment analysis of bHLH family in *F. suspensa*

分为光响应、植物激素响应、胁迫响应 3 大类。Box 4、G-box、CAT-box、GT1-motif、I-box、TGT-motif 与光响应有关; ARE、LTR、MBS、TC-rich repeats、W-box、WRE3、WUN-motif、as-1 与胁迫与防御响应相关; ABRE、ERE、CGTCA-motif、TGACG-motif、P-box、TCA-element 与激素响应相关。此外, 170 个连翘 *bHLH* 基因的启动子序列中分别含有 542 个 MYB 元件, 737 个 MYC 元件, 表明该家族基因受到 MYB 转录因子的广泛调控, 并存在显著的自身调控与家族间交叉调控, 提示其在复杂转录网络中发挥重要作用。

3.6 连翘苯丙烷合成途径相关 bHLH 转录因子功能分析

选取其他物种中参与苯丙烷生物合成途径的 bHLH 蛋白与连翘 bHLH 家族蛋白构建系统进化树(图 6), 结果表明, *FsbHLH29/42*、*FsbHLH26/33/79*、*FsbHLH128/139/152* 共 8 个 *FsbHLH* 转录因子分别与 *TabHLH1*、*SmbHLH59*、*AtbHLH62*/*PpbHLH133*/*AcHLH144* 聚为一支, 将这些基因确定为候选基因, 推测连翘 bHLH 蛋白同样具有参与苯丙烷代谢通路并调节次级产物积累的潜在功能。

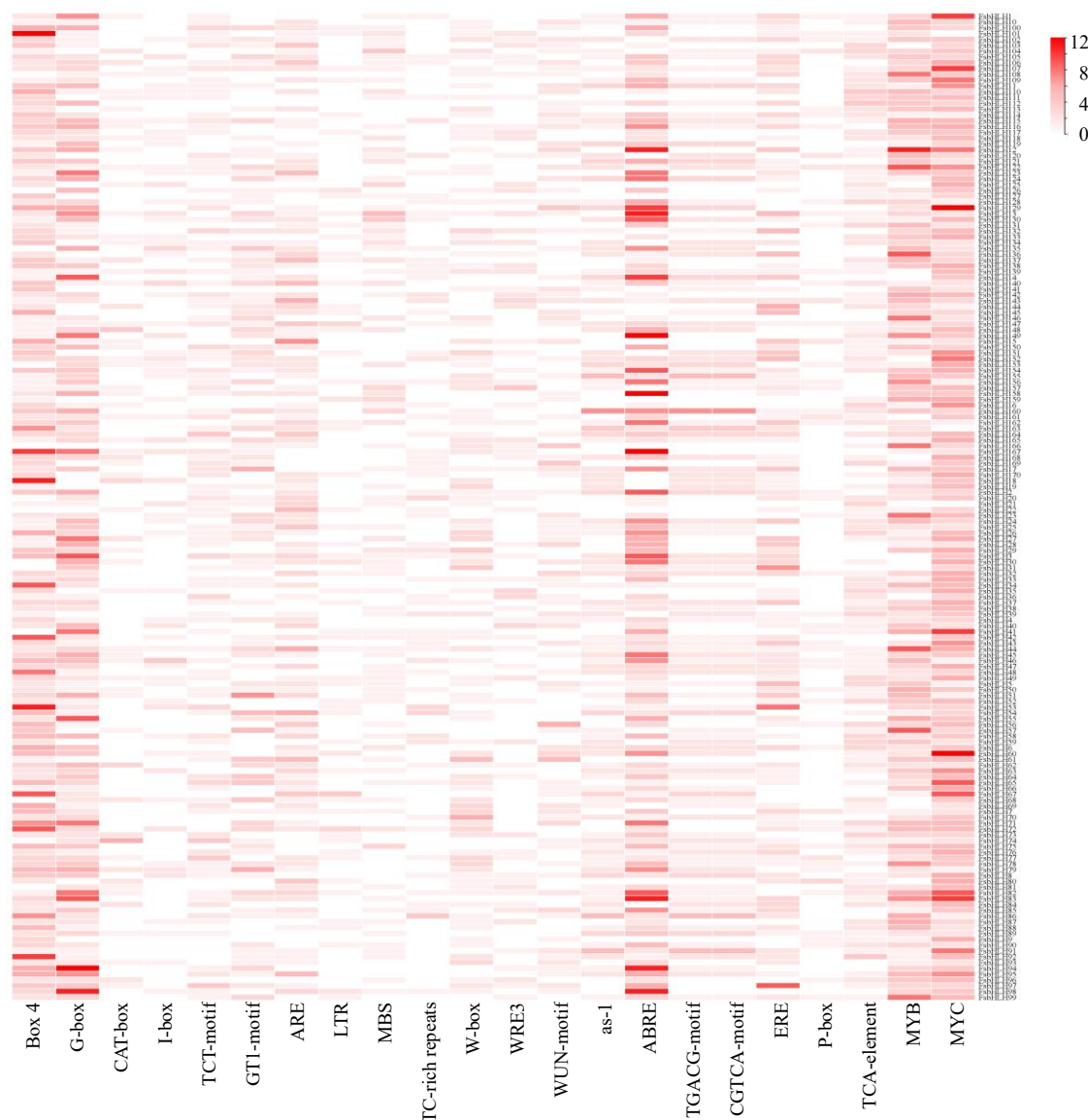


图 5 *FsbHLHs* 启动子中的顺式作用元件

Fig. 5 Cis-acting elements in promoter of *FsbHLHs*

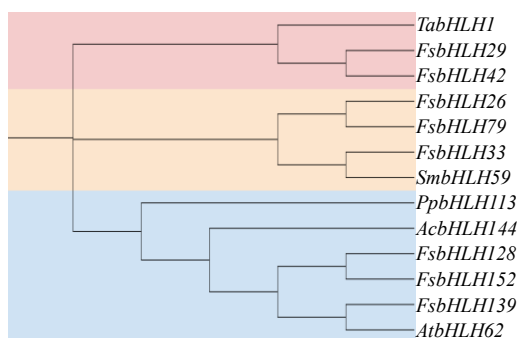


图 6 基于同源比对的连翘苯丙烷途径相关 bHLH 转录因子筛选

Fig. 6 Screening of bHLH transcription factors related to phenylpropanoid pathway of *F. suspensa* based on homologous alignment

3.7 连翘 bHLH 蛋白互作分析

为预测 8 个连翘 *FsbHLHs* 蛋白的潜在互作网络，将序列提交至 STRING 数据库，以拟南芥为参考物种进行跨物种互作分析。对筛选出的连翘 bHLH 蛋白进行相互作用分析的结果表明（图 7），与其互作的蛋白主要为 MYB 家族转录因子、TIFY/JAZ 蛋白，此外还与 PUB10、AFPH2、F4J108_ARATH 存在互作。

3.8 MeJA 处理下连翘 *bHLH* 基因表达与连翘脂素含量的动态变化及相关性

为了验证可能参与连翘苯丙烷途径的 bHLH 转录因子，研究了其在 MeJA 处理后 48 h 内叶片中的表达情况（图 8-A）。结果显示，茉莉酸处理下，叶片中的 *FsbHLH26*、*FsbHLH33*、*FsbHLH42*、*FsbHLH79*、

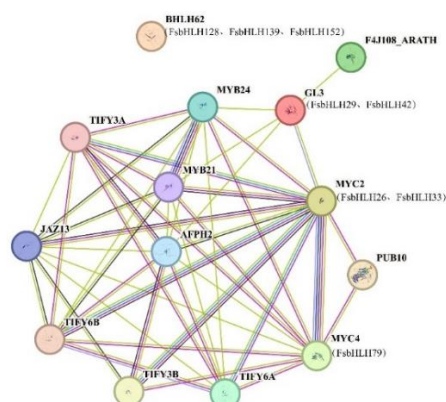
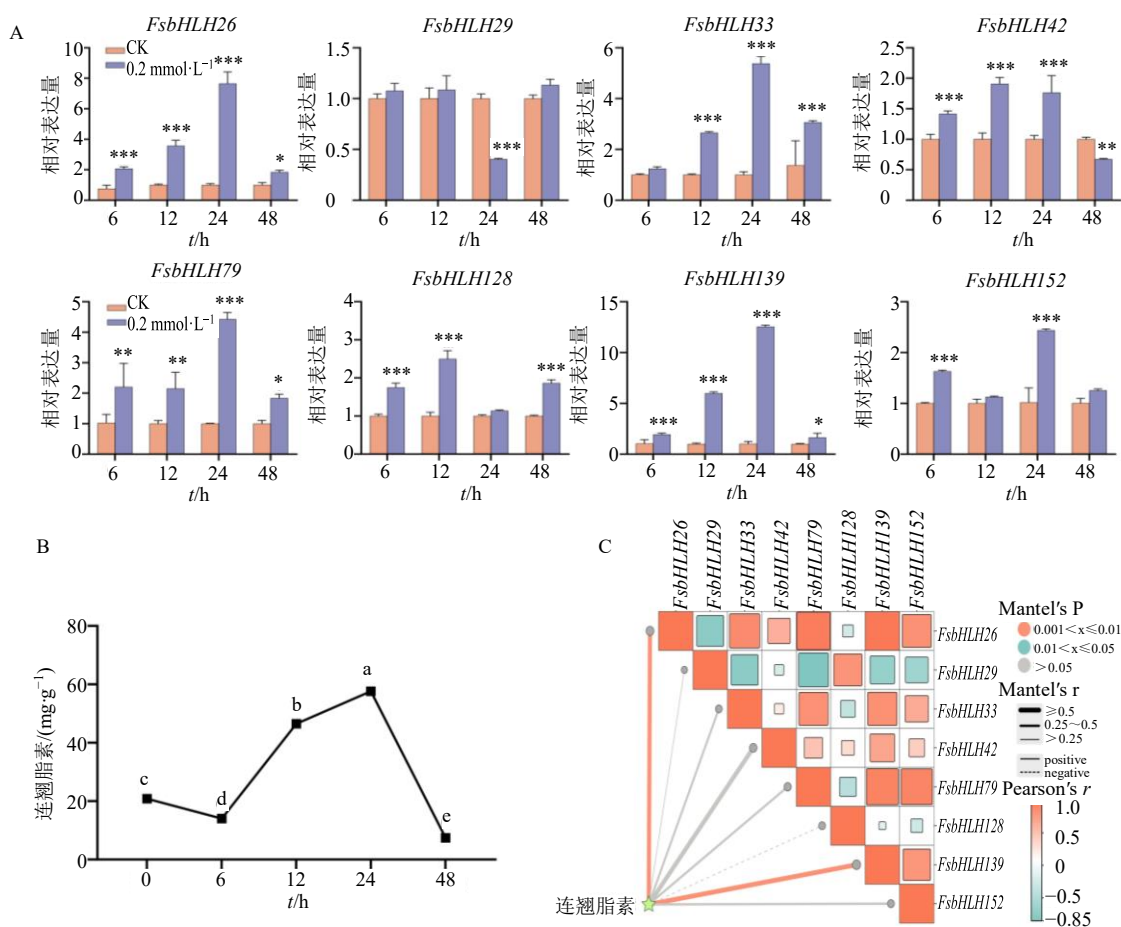


图7 连翘8个bHLH转录因子的互作蛋白分析

Fig. 7 Analysis of interaction proteins of eight bHLH transcription factors in *F. suspensa*

FsbHLH128、*FsbHLH139*、*FsbHLH152* 表达量相较于对照组有显著变化, *FsbHLH42*、*FsbHLH128* 在处理 12 h 时表达量达到峰值, 2 个基因表达量分别相较于对照组上调 1.91、2.50 倍, *FsbHLH26*、*FsbHLH33*、*FsbHLH79*、*FsbHLH139*、*FsbHLH152* 在 MeJA 处理 24 h 时表达量达到峰值, 5 个基因表达量分别相较于对照组上调 7.65、5.38、4.43、12.54、2.44 倍, 受 MeJA 显著诱导; 而 *FsbHLH29* 在前 12 h 表达量较对照组无显著变化, 在 24 h 显著下降至最低, 48 h 时又回升至与对照一样的水平, 受 MeJA 抑制。MeJA 处理后, 8 个基因均呈现差异表达 (部分上调, 部分下调), 因此推断其可能参与连翘苯丙烷代谢通路。



A-叶片中 *FsbHLHs* 基因在 MeJA 处理下的相对表达水平, 与 CK 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; B-不同处理时间连翘脂素含量变化, 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$; C-相关性分析。

A-relative expression level of *FsbHLHs* genes in leaves under MeJA treatment, comparison with CK: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; B-changes of phillygenin content in different treatment time, different letters show significant difference, $P < 0.05$; C-correlation analysis.

图8 MeJA 处理下连翘 bHLH 基因表达与连翘脂素含量的动态变化及相关性

Fig. 8 Dynamic changes and correlation between bHLH gene expression and phillygenin content in *F. suspensa* under MeJA treatment

同时,利用高效液相色谱法(HPLC)测定茉莉酸处理后连翘叶片连翘脂素的含量变化(图 8-B)。结果显示,在 MeJA 处理下,连翘脂素含量变化呈现先波动后骤降的特征,处理 6 h 时缓慢下降,为 14.06 mg/g,随后在 12 h 和 24 h 时显著上升并在 24 h 达到最高,为 57.65 mg/g,最终于 48 h 快速降低到整个处理时期的最低值。进一步进行相关性分析,结果表明(图 8-C),*FsbHHLH26* 和 *FsbHHLH139* 基因的表达水平与连翘脂素的含量呈显著相关,表明这 2 个基因可能在连翘脂素的合成与积累过程中发挥重要的调控作用。此外,连翘 *bHLH* 成员部分基因对呈现出显著的共表达趋势,如 *FsbHHLH26*、*FsbHHLH79* 分别与 *FsbHHLH79/139*、*FsbHHLH139* 呈显著相关。以上结果说明连翘 *bHLH* 可能在响应茉莉酸信号时存在协同调控或功能关联。

4 讨论

植物次级代谢产物的合成与积累,是其适应复杂环境、抵御生物与非生物胁迫、维持正常生长发育及提升生态竞争能力的重要物质基础^[22]。转录因子作为关键调控因子,在次级代谢产物生物合成的转录调控网络中发挥着核心开关作用^[23],其中,*bHLH* 转录因子家族在植物中广泛参与次级代谢物的合成调控,如苹果^[24]、黄花蒿^[25]、丹参^[26]、菠萝^[27]。本研究首次鉴定了 *FsbHHLHs* 并对其进行了生物信息学分析,并初步探究了 *FsbHHLHs* 在 MeJA 处理下的表达模式及连翘中重要活性物质连翘脂素的含量变化。

本研究基于连翘基因组数据共鉴定出 170 个 *FsbHHLHs*,比大麦(103 个)、拟南芥(162 个)数量多,比美洲狼尾草(196 个)、烟草(309 个)少,*bHLH* 家族成员数量的差异,可能与各物种基因组大小、进化历程以及对特定生境的适应策略有关。对 *FsbHHLHs* 进行亚细胞定位预测,发现所有 *bHLH* 成员均被预测定位于细胞核,部分成员同时被预测定位于叶绿体或高尔基体等非核细胞器,这类多定位现象在植物转录因子中并非特例^[28-29],可能是部分 *bHLH* 在进化过程中除了核定位信号外,还获得了叶绿体转运肽等相关结构域^[30],使得生物信息学软件同时分析出多种靶向信号。保守基序分析表明所有 *FsbHHLH* 蛋白序列均至少包含 Motif 1、Motif 2 与 Motif 3 中的一种,提示上述 3 个基序在维持 *bHLH* 行使生物学功能过程中具有不可或缺的重要作用。顺式作用元件分析表明,*FsbHHLHs* 启动子区域的顺式作用元件类型主要包括光响应、植物激素

响应、胁迫响应 3 大类,与猕猴桃^[31]、小果白刺^[32]、生姜^[33]的研究相似,这提示了 *bHLH* 家族在光信号、激素调控及逆境胁迫响应等方面的调控机制具有跨物种保守性。

系统进化分析将连翘 *bHLH* 划分为 13 个亚家族,第 III 亚家族成员数量多余其他物种^[31, 34],表明 *FsbHHLH* 家族在进化过程中呈现出明显的亚家族扩张偏好性。III 族大多数蛋白表达为 MYC 样和 FIT (fer-like iron deficiency-induced transcription factor),已有研究显示,MYC2/3/4 可直接与靶基因结合,参与茉莉酸介导的植物生长和发育过程^[35-37];FIT 的转录调控能够影响许多铁缺乏诱导基因的表达从而影响植物对铁元素的获取^[38]。第 III 亚家族多参与胁迫响应、激素信号传导及次级代谢产物合成等重要生物学过程,提示连翘 *bHLH* 的第 III 亚家族成员扩张是连翘在长期进化中为适应复杂生活环境、提升抗逆能力而形成的适应性进化策略。

研究表明,MeJA 作为重要的信号分子,能显著影响连翘叶片中次级代谢产物的生物合成与积累水平^[16]。本研究对连翘 *FsbHHLHs* 进行了 MeJA 处理下的表达模式分析,并测定了连翘中连翘脂素的含量,经过相关性分析发现,MeJA 处理下 *FsbHHLH26*、*FsbHHLH139* 的表达量与连翘脂素含量变化显著相关。蛋白互作预测显示 *FsbHHLH26* 编码的蛋白可与 TIFY/JAZ 蛋白发生相互作用,而 TIFY/JAZ 蛋白是茉莉酸信号通路的关键调控因子,因此推测 *FsbHHLH26* 可能通过参与茉莉酸依赖的信号传导途径,在转录水平直接或间接影响连翘脂素的合成与积累,类似的调控模式在丹参等药用植物中已有相关研究报道^[26]。

本研究对连翘 *bHLH* 基因家族进行全基因组鉴定,系统分析了其基本理化性质、染色体定位、保守基序、蛋白结构域、基因结构、顺式作用元件、系统进化关系、蛋白互作情况,同时分析了苯丙烷途径相关 *FsbHHLHs* 在 MeJA 处理下的表达模式,测定连翘脂素含量变化,并对其相关性进行了研究,筛选出可能参与连翘脂素合成的关键转录因子,为后续解析连翘次生代谢转录调控网络提供了分子靶点。随着多组学联合分析、基因功能沉默与过表达等分子生物学技术在药用植物研究中的不断应用,后续可依托本研究锁定的候选基因,系统解析连翘脂素合成的转录调控网络,进而借助分子育种实现连翘种质改良,推动连翘脂素等活性成分的靶向性高效累积。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈佳茜, 郭广洋, 谭新杰, 等. 连翘多胺氧化酶基因家族的鉴定及干旱和盐胁迫下的表达分析 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 3077-3084.
- [2] 郭佳佳, 张雷廷, 车建芳, 等. 太行山南段连翘群落结构及其影响因子研究 [J]. 生态学报, 2021, 41(21): 8589-8601.
- [3] 牛群. 连翘的丰产栽培技术及其药用价值分析 [J]. 农业与技术, 2016, 36(12): 101.
- [4] 李文文, 闫雪娇, 许家齐, 等. 连翘 *FsUGTs* 基因家族鉴定与分析 [J]. 中草药, 2026, 57(5): 1853-1863.
- [5] 杨雪艳, 刘成伦. 连翘的研究现状与展望 [J]. 贵州农业科学, 2012(9): 33-36.
- [6] 白映伟, 胡宏. 连翘的多种利用 [J]. 甘肃科技, 2012, 28(9): 147-148.
- [7] 吴永娜, 薛怡萌, 李亚鹏, 等. 连翘化学成分及抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国现代中药, 2025, 27(7): 1354-1364.
- [8] 齐丽娜, 陈炫好, 金华, 等. 中药连翘化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(2): 168-175.
- [9] 安昌, 陆琳, 沈梦千, 等. 植物 *bHLH* 基因家族研究进展及在药用植物中的应用前景 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(10): 1-16.
- [10] Fu N N, Wang L, Sun Q L, *et al.* Genome-wide identification of the bHLH transcription factor family and the regulatory roles of PbbHLH74 in response to drought stress in *Phoebe bournei* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 283: 137760.
- [11] Zuo Z F, Lee H Y, Kang H G. Basic helix-loop-helix transcription factors: Regulators for plant growth development and abiotic stress responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1419.
- [12] Sharma A, Shahzad B, Rehman A, *et al.* Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress [J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2452.
- [13] Hao Y Q, Zong X M, Ren P, *et al.* Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors regulate a wide range of functions in *Arabidopsis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 7152.
- [14] Arshad K T, Li C H, Li L S, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of bHLH transcription factors associated with ferulic acid biosynthesis in *Angelica sinensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1718585.
- [15] Wang X P, You Y Q, Wang J M, *et al.* Metabolomic and transcriptomic analyses provide insights into the role of MiMYB114 and MiMYC₂ in the MeJA-induced regulatory network for mango pericarp coloration [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 311: 143713.
- [16] 陶娟, 宋小锋, 周圆圆. MeJA 对连翘叶片光合作用及次生代谢的影响 [J]. 河南农业科学, 2021, 50(6): 54-60.
- [17] Xu H, Park N I, Li X H, *et al.* Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(24): 9715-9722.
- [18] Shabani L, Ehsanpour A A, Asghari G, *et al.* Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2009, 56(5): 621-626.
- [19] 莫仁连, 洪杰生, 闫晋强, 等. 冬瓜蜡质合成相关基因 BhCER1 的克隆与表达分析 [J]. 中国瓜菜, 2025, 38(2): 32-39.
- [20] Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [21] Gao F, Dubos C. The *Arabidopsis* bHLH transcription factor family [J]. *Trends Plant Sci*, 2024, 29(6): 668-680.
- [22] Khan A, Kanwal F, Ullah S, *et al.* Plant secondary metabolites: Central regulators against abiotic and biotic stresses [J]. *Metabolites*, 2025, 15(4): 276.
- [23] Li H W, Chen N N, Zhang H B, *et al.* Multidimensional regulation of transcription factors: Decoding the comprehensive signals of plant secondary metabolism [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1522278.
- [24] An J P, Xu R R, Wang X N, *et al.* MdbHLH162 connects the gibberellin and jasmonic acid signals to regulate anthocyanin biosynthesis in apple [J]. *J Integr Plant Biol*, 2024, 66(2): 265-284.
- [25] Xiang L E, Jian D Q, Zhang F Y, *et al.* The cold-induced transcription factor bHLH112 promotes artemisinin biosynthesis indirectly via ERF1 in *Artemisia annua* [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(18): 4835-4848.
- [26] Xue X S, Li L, Wang D H, *et al.* SmJAZ1/8 inhibits the stimulation of SmbHLH59, which limits the accumulation of salvianolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 285: 138348.
- [27] Li Q, Wang G, Zhang L, *et al.* AcbHLH144 transcription factor negatively regulates phenolic biosynthesis to modulate pineapple internal browning [J]. *Hortic Res*, 2023, 10(10): uhad185.
- [28] Yu Q B, Huang C, Yang Z N. Nuclear-encoded factors associated with the chloroplast transcription machinery of higher plants [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 316.
- [29] Chen X Y, Yao C M, Liu J H, *et al.* Basic helix-loop-helix (bHLH) gene family in rye (*Secale cereale* L.): Genome-wide identification, phylogeny, evolutionary expansion and expression analyses [J]. *BMC Genom*, 2024, 25(1): 67.
- [30] Kodama Y, Sano H. Evolution of a basic helix-loop-helix

- protein from a transcriptional repressor to a plastid-resident regulatory factor [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(46): 35369-35380.
- [31] 张诗颖, 周靓, 毛甲绪, 等. 猕猴桃 *bHLH* 基因家族鉴定及其在果实贮藏条件下的表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2026, 34(1): 47-65.
- [32] 张建军, 吴京乡, 方昊, 等. 小果白刺 *bHLH* 基因家族鉴定与表达分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2025, 49(6): 102-114.
- [33] Liu D Q, Zhang P, Zhou T T, *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of the *bHLH* gene family in response to abiotic stresses in *Zingiber officinale* Roscoe [J]. *BMC Genom*, 2025, 26(1): 143.
- [34] Dong B M, Lang S Y, Gu Y M, *et al.* Identification of the *bHLH* gene family and functional analysis of ChMYC₂ in drought stress of *Cerasus humilis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2025, 220: 109519.
- [35] Zhu X Y, Chen J Y, Xie Z K, *et al.* Jasmonic acid promotes degreening via MYC₂/3/4- and ANAC019/055/072-mediated regulation of major chlorophyll catabolic genes [J]. *Plant J*, 2015, 84(3): 597-610.
- [36] Chen Q, Sun J Q, Zhai Q Z, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor MYC₂ directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3335-3352.
- [37] Schweizer F, Fernández-Calvo P, Zander M, *et al.* *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC₂, MYC₃, and MYC₄ regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(8): 3117-3132.
- [38] Mai H J, Pateyron S, Bauer P. Iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*: Transcriptomic analyses reveal novel FIT-regulated genes, iron deficiency marker genes and functional gene networks [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16(1): 211.

[责任编辑 时圣明]