

## 金钱草全长转录组测序及 *bHLH* 基因家族分析

韩蓉蓉<sup>1,3</sup>, 赵鑫<sup>2</sup>, 唐祥友<sup>2,3</sup>, 刘燕琴<sup>3</sup>, 曹敏<sup>3</sup>, 张瀚月<sup>3</sup>, 胡开治<sup>1,3\*</sup>, 杨小玉<sup>1,3\*</sup>

1. 重庆中医药学院中药学院, 重庆 402760

2. 重庆中医药学院基础医学院, 重庆 402760

3. 重庆市药物种植研究所, 重庆 408435

**摘要:** 目的 *bHLH* 转录因子家族在植物生长发育、环境胁迫以及次生代谢调控等过程中发挥重要作用, 初步筛选金钱草 *Lysimachia christinae* 与黄酮类物质合成相关的 *bHLH* 基因, 为后续深入研究金钱草黄酮类物质合成代谢提供基础。方法 基于 PacBio 平台开展金钱草全长转录组测序分析, 系统筛选鉴定金钱草 *LcbHLHs* 基因家族成员, 对其蛋白序列特征、跨膜结构域、信号肽、亚细胞定位、系统进化等进行预测分析, 并检测部分 *LcbHLHs* 基因在不同器官和不同透光率下的表达模式, 利用烟草瞬时表达系统验证 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 的功能。结果 金钱草全长转录组测序共获得 37.29 Gb 数据量, 去冗余后得到 15 045 条转录本序列, 平均长度为 2 288 bp, *N*<sub>50</sub> 长度为 2 463 bp。基于金钱草全长转录组数据共筛选得到 45 个 *LcbHLHs* 基因家族成员, 氨基酸数目为 214~777 aa, 相对分子质量为 22 634.57~85 044.11, 等电点 4.58~9.36, 均为亲水蛋白, 均定位在细胞核上。与拟南芥 *AtbHLHs* 蛋白序列进行聚类分析发现, 金钱草 *LcbHLHs* 家族成员聚在 14 个亚族上。基于金钱草不同器官及不同透光率处理的 RNA-Seq 转录组数据, 分别检测到 23 和 4 个差异表达的 *LcbHLHs* 基因, qRT-PCR 验证部分 *LcbHLHs* 基因的差异表达与转录组数据结果基本一致。过表达金钱草 *LcbHLH26*、*LcbHLH27* 可以显著提高烟草叶片总黄酮含量。结论 获得金钱草全长转录组信息, 鉴定分析了金钱草 *LcbHLHs* 基因家族, 为深入研究 *bHLH* 基因在金钱草黄酮类物质合成调控中的功能奠定基础。

**关键词:** 金钱草; 全长转录组; *bHLH* 基因家族; 不同透光率; 总黄酮; 合成调控

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)20-7526-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.20.022

## Full-length transcriptome sequencing and *bHLH* gene family analysis of *Lysimachia christinae*

HAN Rongrong<sup>1,3</sup>, ZHAO Xin<sup>2</sup>, TANG Xiangyou<sup>2,3</sup>, LIU Yanqin<sup>3</sup>, CAO Min<sup>3</sup>, ZHANG Hanyue<sup>3</sup>, HU Kaizhi<sup>1,3</sup>, YANG Xiaoyu<sup>1,3</sup>

1. College of Chinese Materia Medica, Chongqing University of Chinese Medicine, Chongqing 402760, China

2. College of Basic Medicine Science, Chongqing University of Chinese Medicine, Chongqing 402760, China

3. Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing 408435, China

**Abstract: Objective** The *bHLH* transcription factor family plays a crucial role in plant growth and development, environmental stress responses, and secondary metabolite regulation. The research preliminarily screens *LcbHLHs* genes related to flavonoid synthesis establishes a foundation for further exploration into the metabolic synthesis of flavonoids in *Lysimachia christinae*. **Methods** In this study, full-length transcriptome sequencing was performed based on the PacBio platform. Bioinformatic tools were employed to identify and analyze the protein sequence characteristics, physicochemical properties, transmembrane domains, signal peptides, subcellular localization and phylogenetic relationship of the *L. christinae* *LcbHLHs* gene family members. The expression patterns of certain *LcbHLHs* genes in different tissues and under different light transmittance were examined. Additionally, overexpression vectors

收稿日期: 2025-04-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1601000); 重庆市基本科研业务经费 (2023jbky-018); 重庆市教委科学技术研究计划项目 (KJQN2022215114, KJQN202315114); 重庆英才计划创新创业团队 (CQYC202203091179)

作者简介: 韩蓉蓉 (1988—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为药用植物逆境胁迫、活性成分合成代谢调控。

E-mail: 19891214rong@163.com

\*通信作者: 胡开治, 男, 硕士, 研究员, 从事中药材良种选育、质量评价。E-mail: 402632144@qq.com

杨小玉, 女, 硕士, 助理研究员, 从事中药材良种选育、质量评价。E-mail: yxy1190@163.com

of *LcbHLH26* and *LcbHLH27* were constructed for transient expression in tobacco to assess their functionality. **Results** A total of 37.29 Gb data were obtained from the full-length transcriptome sequencing of *L. christinae*. After removing redundancy, 15 045 transcript sequences were obtained, with an average length of 2 288 bp and an  $N_{50}$  length of 2 463 bp. Based on the full-length transcriptome sequencing data, 45 members of the *LcbHLHs* transcription factor gene family were identified, with the protein size of 214 to 777 aa, the relative molecular weights of 22 634.57 to 85 044.11, and isoelectric points of 4.58 to 9.36. All proteins belonged to hydrophilic proteins and located in the nucleus. Cluster analysis with the Arabidopsis AtbHLH proteins revealed that the *L. christinae* LcbHLHs members grouped into 14 subfamilies. RNA-Seq transcriptome data from samples of different tissues, and samples under different light transmittance identified 23 and four differentially expressed *LcbHLH* genes, respectively. qRT-PCR validation confirmed that for most *LcbHLH* genes, the change in expression was consistent with that of RNA-seq data. Transient overexpression of *LcbHLH26* and *LcbHLH27* significantly increased the total flavonoid content in tobacco leaves. **Conclusion** The systematic identification and analysis of the bHLH family provide a foundation for further exploring functions and possible regulatory mechanisms of *LcbHLH* members in flavonoid synthesis in *L. christinae*.

**Key words:** *Lysimachia christinae* Hance; full-length transcriptome; bHLH gene family; different light transmittance; total flavonoid; regulatory mechanisms

金钱草是报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干燥全草, 含有黄酮类、酚酸类、苷类、鞣质类、生物碱类等活性成分, 具有祛湿利尿、解毒消肿<sup>[1]</sup>、增强记忆<sup>[2]</sup>及抗乳腺癌<sup>[3]</sup>等药理作用, 常用于治疗胆结石、肾炎及高尿酸血症等疾病<sup>[4-5]</sup>。黄酮类物质是金钱草发挥药效的主要活性成分, 然而在实际种植生产中, 不同来源金钱草的总黄酮含量存在显著差异, 导致药效不均一。因此, 探究金钱草中黄酮类化合物的合成与积累机制对于金钱草产业的发展至关重要, 目前关于金钱草的研究主要集中在化学成分、药理作用<sup>[6]</sup>、种质评价<sup>[7]</sup>、病原菌鉴定<sup>[8]</sup>等方面, 而黄酮类化合物合成与积累机制的研究鲜有报道。

碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 蛋白作为植物体内最丰富的转录因子家族之一, 在植物生长、发育、次生代谢以及响应逆境等过程中发挥着重要的转录调控作用<sup>[9]</sup>。目前, 已在黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi<sup>[10]</sup>、绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Tunb.) Makino<sup>[11]</sup>、穿心莲 *Andrographis paniculata*<sup>[12]</sup>等多种药用植物中鉴定到 *bHLH* 基因。bHLH 转录因子参与植物的发育过程, CtbHLH41 可延缓红花 *Carthamus tinctorius* L. 叶片衰老<sup>[13]</sup>, 而 CmbHLH110 可与 CmERF110 互作加速菊花 *Chrysanthemum mummorifolium* (Ramat.) Hemsl.开花<sup>[14]</sup>。此外, bHLH 转录因子还参与植物中的多种代谢过程, DlbHLH68 促进龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 蔗糖的生物合成<sup>[15]</sup>; AabHLH112 促进青蒿 *Artemisia annua* L.  $\beta$ -石竹烯、表-雪松醇和  $\beta$ -法尼烯的生物合成<sup>[16]</sup>; bHLH 转录因

子 BIS3 调节长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 萜类吲哚生物碱的生物合成<sup>[17]</sup>。bHLH 蛋白不仅直接调控参与花青素合成途径的结构基因<sup>[18]</sup>, 还与 MYB 和 WD40 蛋白形成复合物调控植物花青素的生物合成<sup>[19]</sup>, DcbHLH5 可直接上调 DcCHS1、DcCHS2 和 DcCHI 的表达以增强龙血树 *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep 黄酮类化合物的生物合成<sup>[20]</sup>, FtbHLH3 调控苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.类黄酮生物合成<sup>[21]</sup>。此外, bHLH 转录因子在调控植物响应非生物胁迫方面也发挥着关键作用, 过表达 PlbHLH87 可增强牡丹 *Paeonia lactiflora* Pall.对高温的耐受性<sup>[22]</sup>; bHLH 转录因子 RrUNE12 可提高刺梨 *Rosa roxburghii* Tratt.抗坏血酸含量和抗氧化能力来抵抗盐胁迫<sup>[23]</sup>。然而, bHLH 转录因子家族在金钱草中的功能尚不清楚。

随着高通量测序技术的快速发展, 基于第三代测序平台的全长转录组测序具有长读长、高准确度等优势<sup>[24]</sup>, 被广泛应用于缺乏遗传信息的药用植物, 研究其响应非生物胁迫机制<sup>[25]</sup>和解析次生代谢产物生物合成途径<sup>[26]</sup>。基于全长转录组数据, 已鉴定掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. RpGRAS17、RpGRAS18、RpGRAS20 可能参与了抗逆反应过程<sup>[27]</sup>, 芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. OLE 和 DGAT 基因可能参与了脂质代谢生物合成途径<sup>[28]</sup>, 西红柿 *Crocus sativus* L. CsbZIP44、CsbZIP54、CsbZIP55、CsbZIP62、CsbZIP64 基因可能参与西红柿花苷生物合成的转录调控<sup>[29]</sup>。然而, 目前尚未见金钱草的全长转录组及 *bHLH* 基因相关研究。本研究利用 PacBio 平台对金钱草进行了全长转录组测序, 从中共鉴定出 45 个

*LcbHLHs* 基因, 并利用在线软件进行了理化性质、系统发育等生物信息学分析。同时, 基于转录组数据结合 qRT-PCR 分析了 *LcbHLHs* 在不同组织和不同透光率下的表达模式。此外, 在本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* L. 叶片中瞬时过表达 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27*, 为 *LcbHLH* 基因在金钱草黄酮类生物合成中的功能鉴定奠定基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

金钱草优良品种“渝金 1 号”组培苗, 开盖炼苗 3 d 后移至 1/2 霍格兰营养液中, 于人工气候室培养, 光周期为 16 h (光照)/8 h (黑暗), 温度为 25 °C。长至 8~9 对叶时, 分别采集根、茎、叶, 等量混匀后在液氮中速冻, 置于 -80 °C 保存用于单分子实时测序 (SMRT)。另外, 分别采集根、茎、叶, 液氮速冻后置于 -80 °C 保存, 后续用于总黄酮含量、RNA-seq 和 qRT-PCR 检测, 每个处理 3 个生物学重复。SMRT 及 RNA-seq 由迈维代谢生物科技股份有限公司测序完成。

2022 年 9 月将金钱草种于重庆市南川区鸣玉镇金光村金钱草种植基地, 于 2023 年 3 月搭建透光率分别为 50%、25% 的遮阳网, 以全光照 (100%) 为对照, 处理 2 个月后采集叶片于 -80 °C 保存备用, 后续用于 RNA-seq 和 qRT-PCR 检测, 每个处理 3 个生物学重复。

### 1.2 仪器

NanoDrop One 超微量紫外分光光度计 (Thermo Fisher 公司); CFX Duet 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司); CKX53 倒置荧光显微镜 (Olympus 公司); Synergy H1 多功能酶标仪 (Agilent 公司); 梯度 PCR 仪和水平电泳系统 (北京百晶有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取及全长转录组文库的建立

利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根) 提取金钱草组织的总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳、Nanodrop、Qubit、Agilent 2100 检测 RNA 的质量及浓度。RNA 检测合格后利用 Oligo (dT) 磁珠法富集含有 polyA 的 mRNA, 使用 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Takara 公司) 将 mRNA 反转录为 cDNA, 对 PCR 最佳条件优化后进行大规模 PCR 获得足量 cDNA, 再经损伤修复、末端修复、连接 SMRT 哑铃型接头构建全长转录组文库。

### 2.2 全长转录组测序及简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 分析

利用 PacBio Sequel 平台对金钱草全长转录组文库进行测序。利用 SMRTlink 分析原始数据, 校正 Subreads 序列获得 CCS 序列, 将 CCS 分为全长序列与非全长序列, 使用 CD-HIT 软件对高质量的转录本序列去冗余后得到全长转录本。利用 ANGEL 2.4 软件进行 CDS 预测分析。利用 MISA (micro Satellite identification tool, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>) 对全长转录本进行 SSR 位点搜索, 并对其统计分类。

### 2.3 功能注释

利用蛋白及核酸数据库非冗余蛋白质数据库 (non-redundant protein, NR)、蛋白质序列数据库 (Swiss-Prot)、基因本体论 (gene ontology, GO)、真核生物直系同源群 (eukaryotic orthologous groups, KOG)、核苷酸数据库 (nucleotide, NT)、蛋白质家族数据库 (protein families, Pfam) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 比对获得转录本功能注释信息。

### 2.4 转录因子预测、bHLH 转录因子鉴定

使用 iTAK 软件进行植物转录因子预测, 利用 HMMER3.0 软件中的 Hmmssearch 程序对 bHLH 转录因子家族的隐马尔可夫模型 (PF00010) 进行筛选, 利用 NCBI Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 和 Batch Web CD-Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 检验 *bHLH* 基因的完整性及蛋白的保守结构域, 剔除重复和不完整的 *bHLH* 基因从而确定金钱草 *LcbHLHs* 基因家族成员。

### 2.5 bHLH 转录因子基因家族的生物信息分析

利用在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 分析金钱草 bHLH 转录因子家族成员的理化性质, 利用在线软件 TMHMM Server v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测跨膜结构域, 利用通过在线软件 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 预测蛋白信号肽, 利用在线软件 NetNES 1.1 (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位, 利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)

org/interactive) 预测蛋白三级结构, 利用在线软件 MEME (<https://meme-suite.org/meme/> tools/meme) 分析保守基序, 并用 TBtools 进行可视化作图。

2.6 bHLH 转录因子基因家族的系统进化分析

在 TAIR 数据库中共下载到 132 条拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. AtbHLH 转录因子蛋白序列, 利用软件 MEGA7 (maximum likelihood, Bootstrap 设为 1 000) 对金钱草 LcbHLH 蛋白序列和拟南芥 AtbHLH 蛋白序列进行系统发育树分析, 利用 iTOL 进行进化树美化。

2.7 基因表达模式分析及 qRT-PCR 验证

基于金钱草不同器官及不同透光率处理的

RNA-Seq 转录组测序数据, 从中筛选具有显著差异的 *LcbHLHs* 基因, 使用迈维云平台 (<https://cloud.metware.cn>) 绘制金钱草 *LcbHLHs* 基因的表达热图; 以  $\beta$ -Tublin6 为内参基因, 利用 Primer 5 设计引物对部分差异表达的 *LcbHLHs* 基因表达进行 qRT-PCR 验证, 其中对金钱草不同透光率处理下的 4 个差异表达 *LcbHLHs* 进行全部验证, 除了与不同透光率处理下共有的 3 个 *LcbHLHs*, 再随机选择 5 个金钱草不同器官中的差异表达 *LcbHLHs* 进行验证, 引物序列见表 1。利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因的相对表达量。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

| 引物用途    | 基因ID             | 正向引物 (5'→3')                  | 反向引物 (5'→3')                      |
|---------|------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| qRT-PCR | <i>LcbHLH10</i>  | TACTCGGATCTATTTCGACCCTC       | CTGCAACTGCTGGCGTTACAC             |
|         | <i>LcbHLH15</i>  | CCTAATCGACGGAGCTACCAAG        | TTCTCCTTTGTAGTATCCATCGC           |
|         | <i>LcbHLH19</i>  | CAACATTGGCGAATTAGAGGACG       | CGAGAGCATACCATCTGTGTTC            |
|         | <i>LcbHLH23</i>  | GAAAAGTCATAGCGAGGCGGAG        | CCTTGGCTTGTTTCGAGAGCTG            |
|         | <i>LcbHLH26</i>  | AGAGACCAGCAATCCTTCCACG        | CATGCTGCTCCACTCCTGTTG             |
|         | <i>LcbHLH27</i>  | TAGCTCTCGCACGTCCCAATAC        | CTCCCCAACCCTTTACTCGC              |
|         | <i>LcbHLH28</i>  | GTCGGAGCAGATCCAAGGTGAA        | TGACGTAGCTGCCTTTGTGTTT            |
|         | <i>LcbHLH32</i>  | TGGTGTGGGGAATAATCAGGTG        | TTTCCCATGTCACCCATCGCAG            |
|         | <i>LcbHLH37</i>  | AAGAGGCGGAGTATCGTAGGTG        | CATTCAATAGTTTTCTGCGGTTC           |
|         | $\beta$ -Tublin6 | GGAATAACTGGGCGAAGGGTC         | TCCTCCAAGTGAATGGCAGAC             |
| 过表达载体   | <i>LcbHLH26</i>  | GGAATTCATGCCTTTATCTCATTTGCAGG | GCTCTAGATTATTTGGAACATGTGCACTTAGCT |
|         | <i>LcbHLH27</i>  | GGAATTCATGTATGCAATGGGAGCCTCAG | GCTCTAGATTATTTGGAACAAGAGCACTTTGC  |

2.8 金钱草 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 基因的克隆及过表达载体构建

设计 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 过表达引物 (表 1), 以金钱草 cDNA 为模板扩增 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 基因, 分别与 pESI-Blunt (翌圣生物有限公司) 载体连接转化 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆测序。将测序正确的质粒与 pBin35S-Red3 质粒进行 *EcoR* I 和 *Xba* I (翌圣生物有限公司) 双酶切, 回收目的条带后进行连接转化 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆提取重组质粒。用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切重组质粒进行检测。

2.9 烟草瞬时表达

将 pBin35S-Red3 质粒与重组质粒分别转化 GV3101 农杆菌感受态, 挑取阳性单菌落进行过夜摇菌培养 (28  $^{\circ}$ C、200 r/min), 当菌液在 600 nm 吸光度 ( $A_{600}$ ) 值为 1.0 左右时取 3 mL 菌液置于 50 mL LB 培养液中进行 2 次摇菌活化, 培养至  $A_{600}$  值为 0.5~0.8 时 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 洗涤菌体 1 次, 用侵染液 (10

mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L MES, 150  $\mu$ mol/L As, pH=5.6) 悬浮菌体至  $A_{600}$  值为 0.1~0.2, 于 25  $^{\circ}$ C 避光静置 3 h。用不带针头的注射器吸取菌液注射烟草叶片, 避光培养烟草 12 h 后正常培养, 3 d 后收集烟草叶片用于总黄酮含量检测, 用倒置荧光显微镜观察标签蛋白的表达情况。

2.10 总黄酮含量测定

用总黄酮含量检测试剂盒 (艾迪生) 测定金钱草不同器官、不同透光率处理下的叶片以及烟草叶片总黄酮含量。

2.11 数据处理

使用 SPSS 23 软件进行数据分析,  $P<0.05$  表明差异显著; 使用软件 GraphPad Prism 8 进行图形绘制。

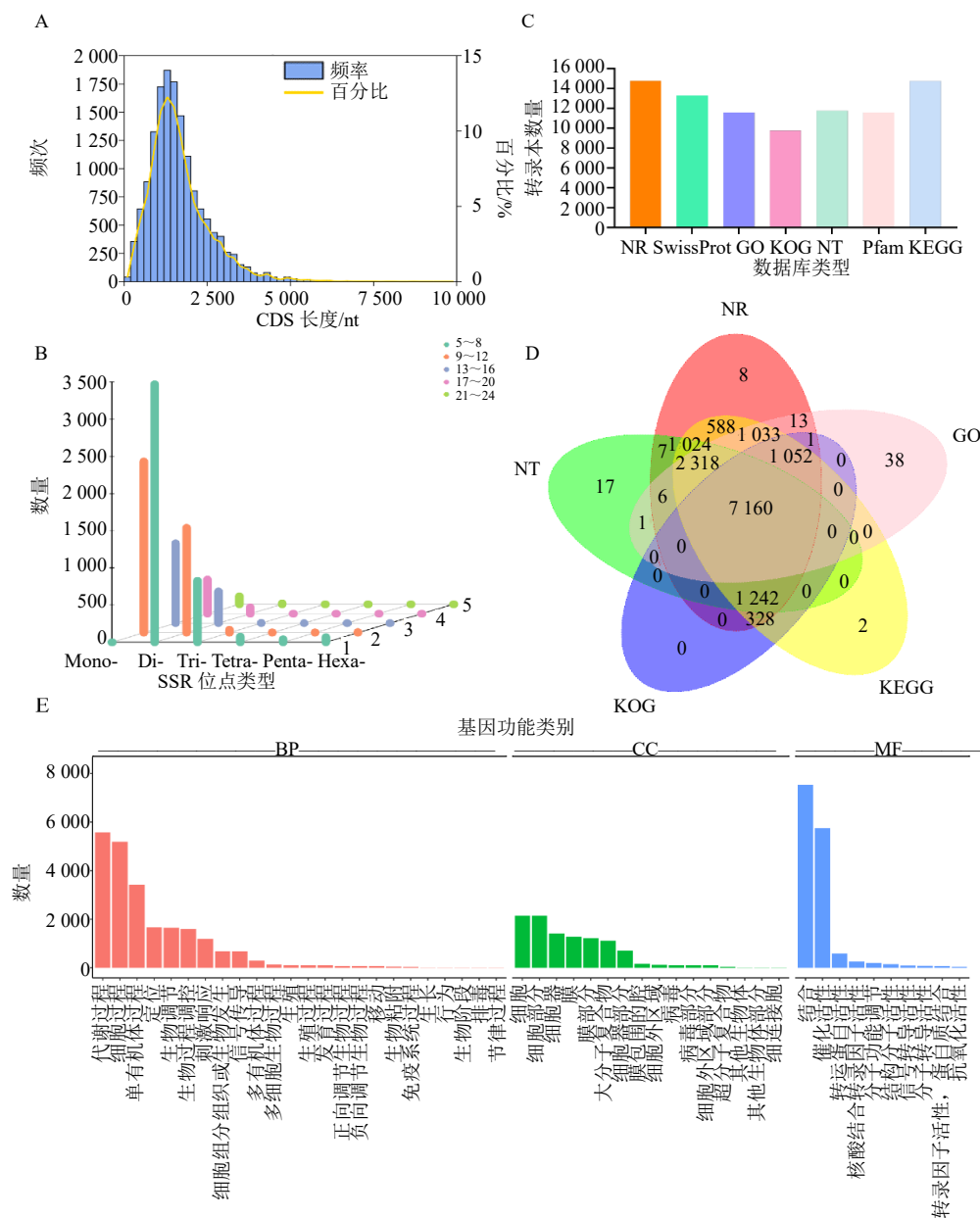
3 结果与分析

3.1 全长转录组测序数据统计分析

基于 PacBio 测序的原始数据经质控后获得 37.29 Gb 数据, 从中提取了 323 261 条 CCS 序列, 其中最

长度为 55 bp, 最长长度为 14 985 bp, 平均长度为 2 539 bp, 多集中于 1 500~2 500 bp。全长非嵌合序列 (full-length non-chimeric, FLNC) 共有 282 439 条, 最小长度为 61 bp, 最长长度为 14 862 bp, 平均序列长度为 2 405

bp, FLNC 数目占 CCS 数目比例为 87.37%。对转录本序列进行聚类去冗余, 共得到 15 405 条转录本序列。金钱草的完整 CDS 序列长度分布在 0~3 000 bp (图 1-A), 平均长度为 2 288 bp,  $N_{50}$  长度为 2 463 bp。



A-CDS 序列长度分布; B-SSR 类型和数量分布; C-不同数据库中的转录本注释数量; D-转录本在 NR、GO、KEGG、KOG 和 NT 数据库功能注释韦恩图; E-GO 数据库功能注释分类。

A-CDS length distribution; B-SSR motif type and distribution; C-summary of functional annotation results; D-Venn diagram between NR, GO, KEGG, KOG and NT; E-classification diagram of GO annotation.

图 1 金钱草全长转录组测序数据

Fig. 1 Full length transcriptome sequencing data of *L. christinae*

### 3.2 金钱草全长转录本 SSR 分析

利用 MISA 对金钱草全长转录本进行 SSR 位点搜索, 共检测到 10 423 个 SSR 位点, 包括 6 种

核苷酸类型, 其中最多的是二核苷酸重复基序, 达到 5 404 个, 占全部 SSR 位点的 51.85%; 核苷酸重复基序数量为 3 945 个, 占全部 SSR 位点的 37.85%;

三核苷酸重复基序数量为 871 个, 占全部 SSR 位点的 8.36%; 最少的是无核苷酸重复基序, 只有 46 个, 占全部 SSR 位点的 0.4%(图 1-B)。可为金钱草 SSR 分子标记辅助育种提供依据。

### 3.3 金钱草基因功能注释及功能分类

利用 NR、Swiss-Prot、GO、KOG、NT、Pfam 和 KEGG 7 个蛋白及核酸数据库比对获得的 15 405 个转录本的功能注释信息(图 1-C)。其中在 NR 数据库中检索到的转录本数量最多(14 780 个), 占 95.94%; 在 KOG 数据库中检索到的转录本最少(9 782 个), 占 63.51%; 在 Swiss-Prot 数据库中检索到 13 303 个转录本, 占 86.36%; 在 GO 和 Pfam 数据库中检索到的转录本数量一致, 均为 11 622 个, 占 75.44%; 在 KEGG 数据库中检索到 14 747 个转录本, 占 95.73%。在其中 NR、GO、KEGG、KOG、NT 5 个数据库中共同检索到 7 160 个转录本(图 1-D), 在 NR 中单独检索到 8 个转录本, 在 GO 中单独检索到 38 个转录本, 在 KEGG 中单独检索到 2 个转录本, 在 NT 中单独检索到 17 个转录本。在 GO 数据库中金钱草所有转录本被聚类为生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF) 3 个主要类别(图 1-E)。生物过程类别的转录本主要涉及代谢过程、细胞过程和单生物体过程; 细胞组分类别的转录本主要涉及细胞、细胞部分、细胞器、膜以及膜部分; 分子功能类别的转录本主要富集在结合和催化活性。

### 3.4 金钱草转录因子家族预测

金钱草全长转录本共预测到 28 个转录因子家族中的 796 个转录因子, 注释到转录本数目最多的前 10 个转录因子家族如图 2 所示, 包括 50 个 MYB、50 个 SNF2、48 个 bHLH、44 个 SET、44 个 C3H、37 个 bZIP、35 个 GRAS、35 个 TRAF、34 个 C2H2 和 32 个 PHD 转录因子家族。

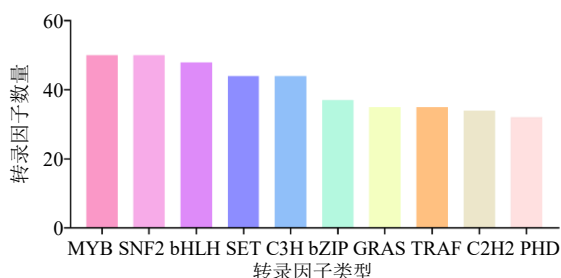


图 2 金钱草转录因子家族分类

Fig. 2 Classification of transcription factor families in *L. christinae*

### 3.5 金钱草 *LcbHLHs* 基因家族筛选及序列信息

对基于金钱草全长转录组比对出的 *LcbHLH* 基因序列进行比对分析, 剔除重复及不完整序列, 共筛选到 45 个具有全长完整结构域的 *LcbHLHs* 基因(表 2), 根据全长转录组数据中 ID 顺序依次命名为 *LcbHLH1*~*LcbHLH45* (GenBank ID: PV426664~PV426708), 其 CDS 长度为 645 (*LcbHLH39*)~2 334 bp (*LcbHLH1*), 编码蛋白序列长度为 214~777 aa, 相对分子质量为 22 634.57~85 044.11, 等电点为 4.58 (*LcbHLH4*)~9.36 (*LcbHLH39*), 其中 34 个酸性蛋白和 11 个碱性蛋白。所有 *LcbHLHs* 转录因子亲水性都是负值, 均为亲水性蛋白。*LcbHLH16* 和 *LcbHLH29* 转录因子的不稳定系数分别为 32.67 和 37.5, 为稳定蛋白; 其余 *LcbHLHs* 转录因子不稳定系数为 41.49~73.57, 均为不稳定蛋白。金钱草所有 *LcbHLHs* 转录因子均由  $\alpha$  螺旋、延伸链、 $\beta$  转角和无规卷曲结构组成, 且以  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲为主。跨膜结构域和信号肽预测结果显示金钱草 *LcbHLHs* 转录因子均不存在跨膜结构域和信号肽, 核定位信号预测结果显示所有 *LcbHLHs* 转录因子均定位在细胞核上。

### 3.6 金钱草 *LcbHLHs* 基因家族系统进化分析

利用 MEGA7 对金钱草 45 个 *LcbHLHs* 转录因子和拟南芥 132 个 *AtbHLHs* 转录因子构建系统发育树, 根据拟南芥 *bHLH* 转录因子家族分类, 进化树分为 21 个亚家族(图 3), 金钱草 *LcbHLHs* 转录因子聚集在拟南芥 Ia (1 个)、II (1 个)、III (d+e) (7 个)、III f (5 个)、IVa (1 个)、IVc (2 个)、Va (5 个)、Vb (1 个)、VIIa (4 个)、VIIb (3 个)、VIIIa (2 个)、IX (3 个)、XI (2 个)、XII (8 个) 共 14 个亚族上, 其中 XII 亚族中 *LcbHLHs* 基因数目最多。而拟南芥 Ib、IVb、XIV、VIIIb、VIIIc、X、III (a+b+c) 亚族中未发现金钱草 *LcbHLHs* 家族成员。Va 亚家族中有 4 个金钱草 *LcbHLHs* 转录因子 (*LcbHLH3*、*LcbHLH4*、*LcbHLH21* 和 *LcbHLH35*) 是单独存在的, 没有和拟南芥 *AtbHLH* 转录因子聚在一起。

### 3.7 金钱草 *LcbHLHs* 转录因子三级结构预测

通过金钱草 *LcbHLHs* 蛋白三级结构(图 4)可以发现, 所有 *LcbHLHs* 蛋白都具有 *bHLH* 高度保守的特征结构, 也可见  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  转角、无规则卷曲等蛋白二级结构基本空间构象。此外, 具有结构相似度的 *LcbHLHs* 转录因子和系统进化树中的亚家族分布基本相同。III (d+e) 亚家族中, *LcbHLH15*

表 2 金钱草 LcbHLHs 转录因子家族成员序列特征

Table 2 Sequence features of LcbHLHs transcription factor family members in *L. christinae*

| 基因名      | CDS长度/bp | 氨基酸数量/aa | 相对分子质量    | 等电点  | 亲水性    | 不稳定系数 | $\alpha$ 螺旋/% | 延伸链/% | $\beta$ 转角/% | 无规则卷曲/% |
|----------|----------|----------|-----------|------|--------|-------|---------------|-------|--------------|---------|
| LcbHLH1  | 2 334    | 777      | 85 044.11 | 5.84 | -0.360 | 41.49 | 32.69         | 9.78  | 6.56         | 50.97   |
| LcbHLH2  | 2 190    | 729      | 79 522.61 | 5.32 | -0.337 | 44.70 | 35.39         | 13.17 | 6.58         | 44.86   |
| LcbHLH3  | 912      | 303      | 33 877.68 | 4.70 | -0.678 | 47.31 | 18.81         | 8.25  | 1.98         | 70.96   |
| LcbHLH4  | 879      | 292      | 32 694.89 | 4.58 | -0.841 | 48.49 | 28.42         | 7.19  | 1.37         | 63.01   |
| LcbHLH5  | 2 106    | 701      | 77 969.49 | 5.22 | -0.572 | 62.41 | 36.80         | 9.56  | 3.00         | 50.64   |
| LcbHLH6  | 1 932    | 643      | 72 679.28 | 5.39 | -0.457 | 45.35 | 36.70         | 9.95  | 3.42         | 49.92   |
| LcbHLH7  | 1 641    | 546      | 60 295.17 | 8.95 | -0.855 | 56.60 | 24.36         | 12.64 | 1.10         | 61.90   |
| LcbHLH8  | 1 731    | 576      | 63 821.66 | 6.06 | -0.380 | 45.77 | 34.20         | 10.76 | 2.43         | 52.60   |
| LcbHLH9  | 1 038    | 345      | 38 187.67 | 5.95 | -0.764 | 55.03 | 27.25         | 7.25  | 4.35         | 61.16   |
| LcbHLH10 | 1 431    | 476      | 52 483.60 | 5.61 | -0.703 | 73.57 | 27.31         | 3.99  | 2.10         | 66.60   |
| LcbHLH11 | 1 509    | 502      | 54 846.16 | 5.82 | -0.719 | 67.26 | 26.89         | 3.39  | 2.59         | 67.13   |
| LcbHLH12 | 1 422    | 473      | 52 338.12 | 5.74 | -0.777 | 46.75 | 23.47         | 5.07  | 1.48         | 69.98   |
| LcbHLH13 | 1 515    | 504      | 54 902.18 | 5.73 | -0.678 | 47.67 | 19.05         | 7.14  | 2.18         | 71.63   |
| LcbHLH14 | 1 932    | 643      | 72 721.25 | 5.35 | -0.470 | 45.00 | 35.61         | 9.80  | 3.42         | 51.17   |
| LcbHLH15 | 1 794    | 597      | 66 381.67 | 5.33 | -0.536 | 45.41 | 34.34         | 12.40 | 1.84         | 51.42   |
| LcbHLH16 | 1 428    | 475      | 52 818.82 | 8.00 | -0.571 | 32.67 | 38.53         | 14.32 | 3.58         | 43.58   |
| LcbHLH17 | 1 920    | 639      | 72 112.92 | 5.43 | -0.442 | 52.29 | 38.50         | 10.49 | 4.23         | 46.79   |
| LcbHLH18 | 1 707    | 568      | 63 556.85 | 5.59 | -0.489 | 45.08 | 36.09         | 12.68 | 1.23         | 50.00   |
| LcbHLH19 | 1 779    | 592      | 67 453.33 | 5.95 | -0.469 | 55.98 | 39.86         | 9.97  | 3.55         | 46.62   |
| LcbHLH20 | 1 215    | 404      | 45 551.51 | 7.65 | -0.880 | 73.23 | 34.90         | 6.19  | 2.48         | 56.44   |
| LcbHLH21 | 822      | 273      | 30 783.91 | 4.64 | -0.755 | 57.98 | 27.11         | 12.82 | 2.20         | 57.88   |
| LcbHLH22 | 1 242    | 413      | 45 513.71 | 5.73 | -0.697 | 45.50 | 26.15         | 5.81  | 1.94         | 66.10   |
| LcbHLH23 | 771      | 256      | 28 912.95 | 8.27 | -0.484 | 65.24 | 47.27         | 12.11 | 3.12         | 37.50   |
| LcbHLH24 | 1 512    | 503      | 55 949.84 | 5.89 | -0.517 | 49.10 | 38.77         | 11.13 | 2.19         | 47.91   |
| LcbHLH25 | 1 620    | 539      | 60 178.36 | 6.15 | -0.574 | 53.41 | 37.11         | 10.39 | 2.23         | 50.28   |
| LcbHLH26 | 1 401    | 466      | 50 624.07 | 8.48 | -0.585 | 50.42 | 30.04         | 3.43  | 0.86         | 65.67   |
| LcbHLH27 | 1 218    | 405      | 44 860.65 | 6.54 | -0.649 | 56.52 | 21.73         | 9.38  | 3.21         | 65.68   |
| LcbHLH28 | 1 224    | 407      | 45 251.50 | 5.89 | -0.714 | 44.46 | 28.01         | 5.16  | 2.70         | 64.13   |
| LcbHLH29 | 1 323    | 440      | 49 602.52 | 5.15 | -0.560 | 37.50 | 34.55         | 7.50  | 1.82         | 56.14   |
| LcbHLH30 | 1 224    | 407      | 45 423.80 | 8.99 | -0.818 | 47.03 | 30.47         | 3.44  | 1.23         | 64.86   |
| LcbHLH31 | 1 029    | 342      | 38 202.98 | 5.82 | -0.543 | 52.42 | 37.43         | 9.36  | 1.75         | 51.46   |
| LcbHLH32 | 1 164    | 387      | 42 423.88 | 6.67 | -0.731 | 49.60 | 37.47         | 6.98  | 3.62         | 51.94   |
| LcbHLH33 | 1 143    | 380      | 41 907.46 | 7.02 | -0.716 | 48.76 | 28.95         | 7.37  | 2.37         | 61.32   |
| LcbHLH34 | 1 368    | 455      | 50 229.10 | 5.19 | -0.207 | 46.45 | 37.14         | 14.07 | 1.98         | 46.81   |
| LcbHLH35 | 1 152    | 383      | 42 625.62 | 5.60 | -0.713 | 58.66 | 38.38         | 5.74  | 4.44         | 51.44   |
| LcbHLH36 | 858      | 285      | 31 360.34 | 5.13 | -0.513 | 62.49 | 35.09         | 8.07  | 1.40         | 55.44   |
| LcbHLH37 | 1 014    | 337      | 37 751.81 | 6.68 | -0.346 | 57.03 | 45.70         | 12.76 | 2.08         | 39.47   |
| LcbHLH38 | 1 233    | 410      | 46 091.52 | 8.67 | -0.831 | 57.17 | 34.88         | 3.41  | 0.98         | 60.73   |
| LcbHLH39 | 645      | 214      | 22 634.57 | 9.36 | -0.336 | 52.88 | 33.18         | 13.08 | 5.14         | 48.60   |
| LcbHLH40 | 732      | 243      | 26 673.45 | 8.34 | -0.572 | 46.41 | 35.80         | 4.94  | 2.47         | 56.79   |
| LcbHLH41 | 813      | 270      | 29 343.84 | 5.92 | -0.574 | 54.82 | 30.74         | 8.15  | 3.33         | 57.78   |
| LcbHLH42 | 813      | 270      | 29 332.79 | 5.92 | -0.604 | 53.82 | 28.15         | 7.78  | 3.33         | 60.74   |
| LcbHLH43 | 708      | 235      | 25 815.61 | 7.69 | -0.485 | 55.28 | 38.30         | 4.26  | 1.28         | 56.17   |
| LcbHLH44 | 753      | 250      | 27 744.80 | 5.78 | -0.932 | 47.33 | 28.00         | 6.80  | 4.80         | 60.40   |
| LcbHLH45 | 681      | 226      | 30,783.91 | 4.64 | -0.755 | 57.98 | 46.53         | 6.44  | 0.99         | 46.04   |



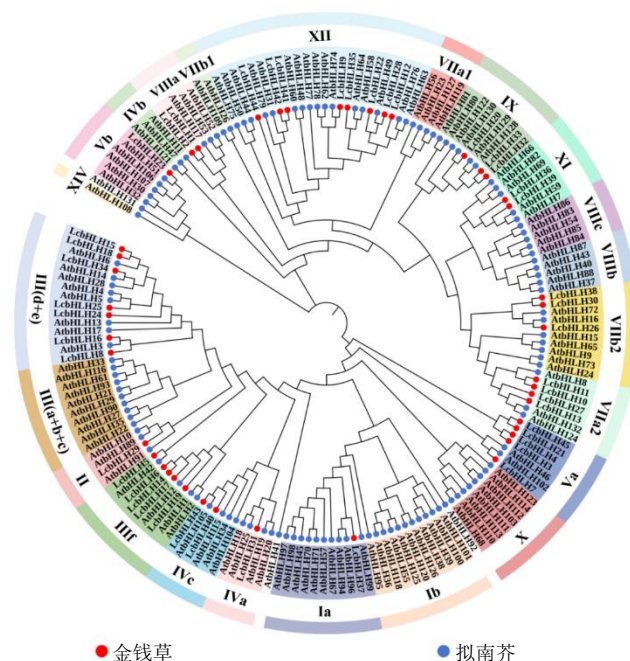


图 3 金钱草与拟南芥 bHLH 转录因子系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of bHLH transcription factors family from *L. christinae* and *A. thaliana*

和 LcbHLH16 三级结构相似, LcbHLH18、LcbHLH24 和 LcbHLH25 三级结构相似; IIIf 亚家族中, LcbHLH6 和 LcbHLH14 三级结构相似, LcbHLH5、LcbHLH17 和 LcbHLH19 不具备相似结构; Va 亚家族中, LcbHLH3 和 LcbHLH4 三级结构相似, LcbHLH21 和 LcbHLH45 三级结构相似; VIIa 亚家族中, LcbHLH10 和 LcbHLH11 三级结构相似, LcbHLH13 和 LcbHLH27 三级结构相似; XII 亚家族中, LcbHLH9、LcbHLH12、LcbHLH22 和 LcbHLH28 三级结构相似, LcbHLH41 和 LcbHLH42 三级结构相似。

### 3.8 金钱草 LcbHLHs 转录因子保守基序及保守结构域分析

基于蛋白氨基酸序列构建金钱草 LcbHLHs 的系统进化树, 探究金钱草 LcbHLHs 转录因子家族的进化关系 (图 5-A); 利用在线软件 MEME 进行保守基序分析, 发现除了 LcbHLH1 和 LcbHLH2 外, 其余 LcbHLHs 均含有 motif1 和 motif2, 且 motif1 和 motif2 紧密相连, 推测 motif1 和 motif2 共同构成金钱草 LcbHLH 的特征保守基序 (图 5-B); 利用 Batch Web CD-Search Tool 进行保守结构域分析, 发现金钱草 LcbHLHs 转录因子家族含有 bHLH\_SF superfamily、DUF4140 superfamily、bHLH\_MYC\_N

superfamily、ACT superfamily 共 4 种保守结构域, 所有的 LcbHLHs 转录因子均含有 bHLH\_SF superfamily 保守结构域, 其中同时含有 bHLH-MYC\_N superfamily 保守结构域的有 III (d+e) 亚家族 (LcbHLH8、LcbHLH15、LcbHLH16、LcbHLH18、LcbHLH24、LcbHLH25、LcbHLH34)、IIIf 亚家族 (LcbHLH5、LcbHLH6、LcbHLH14、LcbHLH17、LcbHLH19) 和 VIIa 亚家族 (LcbHLH1、LcbHLH2), 而 LcbHLH40 还含有 DUF4140 superfamily 保守结构域、LcbHLH23 还含有 ACT superfamily 保守结构域 (图 5-C)。

### 3.9 金钱草 LcbHLHs 基因表达模式分析

基于金钱草不同器官及不同透光率处理的 RNA-Seq 转录组测序数据, 绘制 LcbHLHs 差异表达基因热图。金钱草根、茎、叶 3 个器官之间共有 23 个 LcbHLHs 差异表达基因 (图 6-A), 其中在叶中高表达的有 LcbHLH1、LcbHLH4、LcbHLH15、LcbHLH20、LcbHLH21、LcbHLH26、LcbHLH27、LcbHLH28、LcbHLH29、LcbHLH31 和 LcbHLH32; 金钱草在不同透光率处理下仅检测到 4 个 LcbHLHs 差异表达基因 (图 6-B), 其中 LcbHLH26 和 LcbHLH27 在 100% 透光率处理下表达量高, 而 LcbHLH28 和 LcbHLH37 在 25% 透光率处理下表达量高。



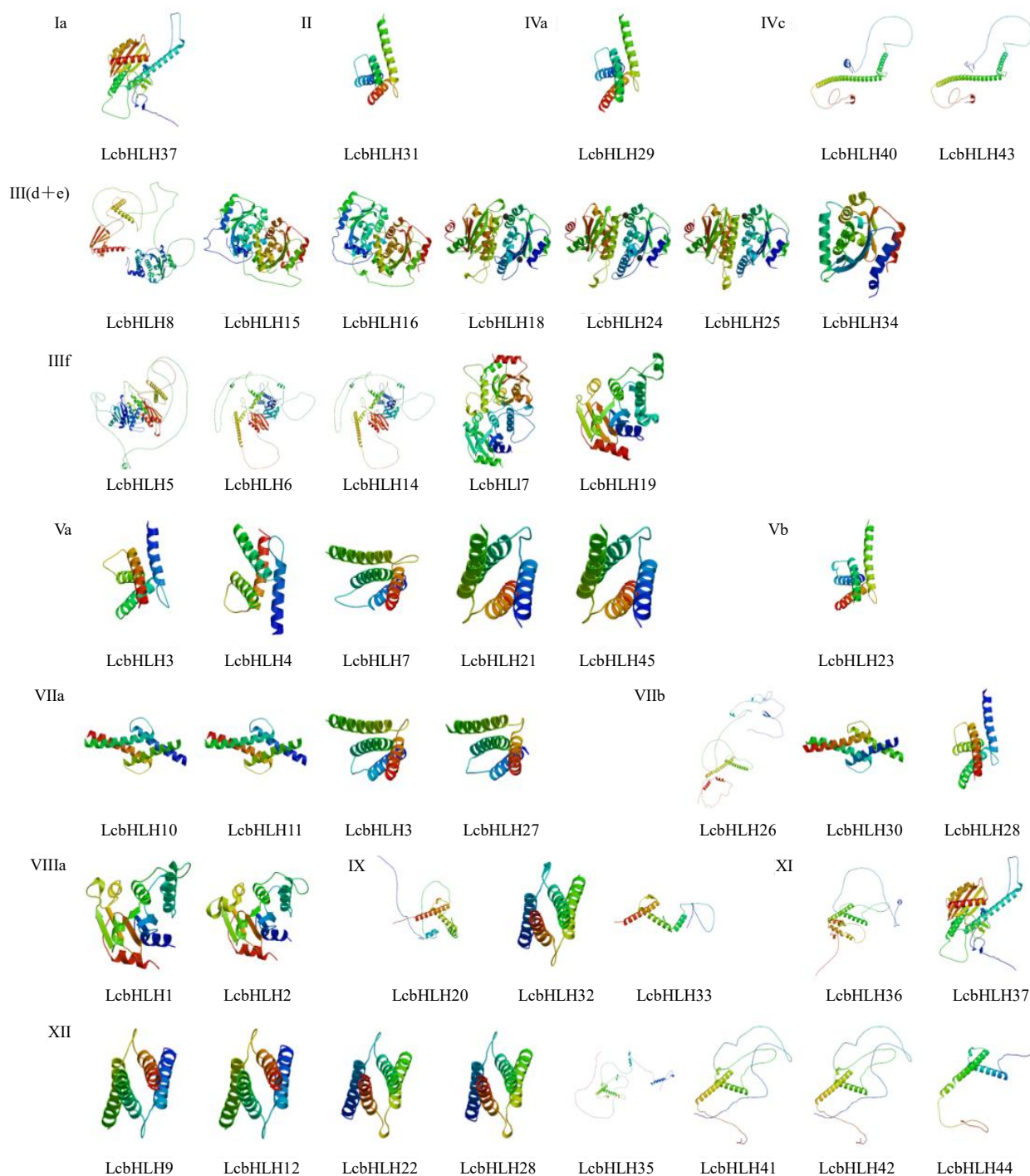


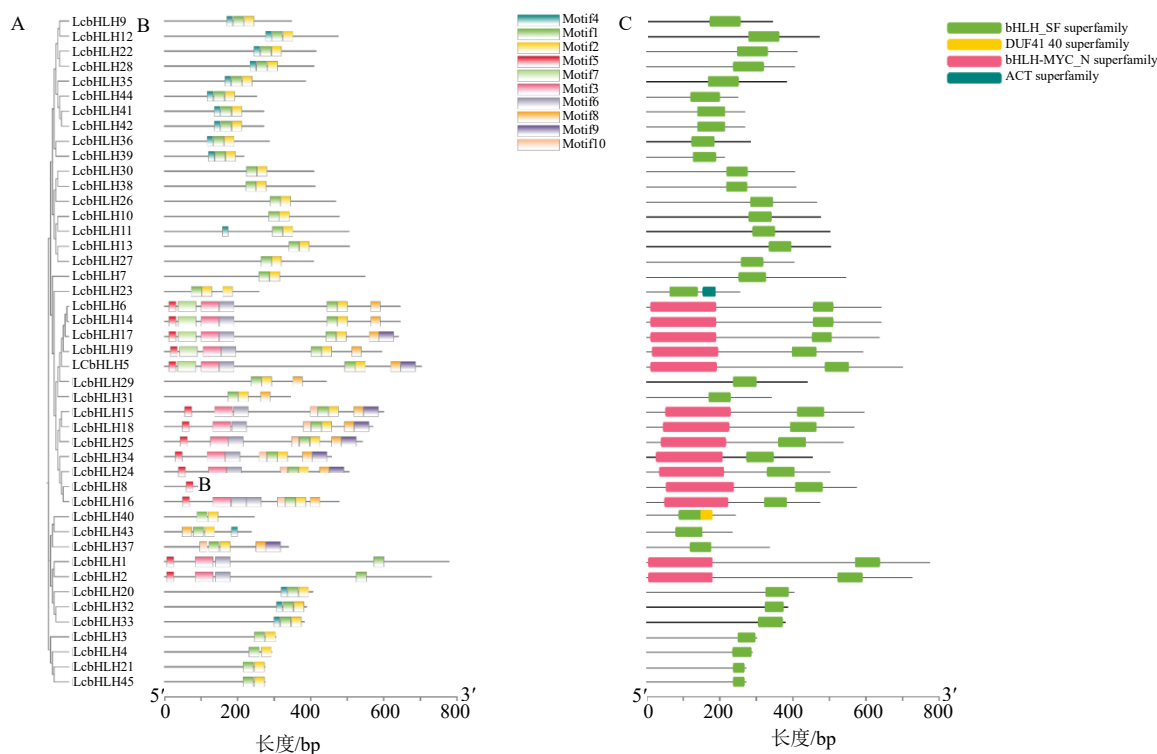
图 4 金钱草 LcbHLHs 转录因子三级结构

Fig. 4 Tertiary structure of LcbHLH transcription factors in *L. christinae*

### 3.10 金钱草部分 *LcbHLHs* 候选基因 qRT-PCR 分析

利用 qRT-PCR 进一步验证金钱草部分 *LcbHLHs* 候选基因的表达模式,发现 *LcbHLH10*、*LcbHLH15*、*LcbHLH23*、*LcbHLH26*、*LcbHLH27*、*LcbHLH32* 在叶中的表达量显著高于在根和茎中的

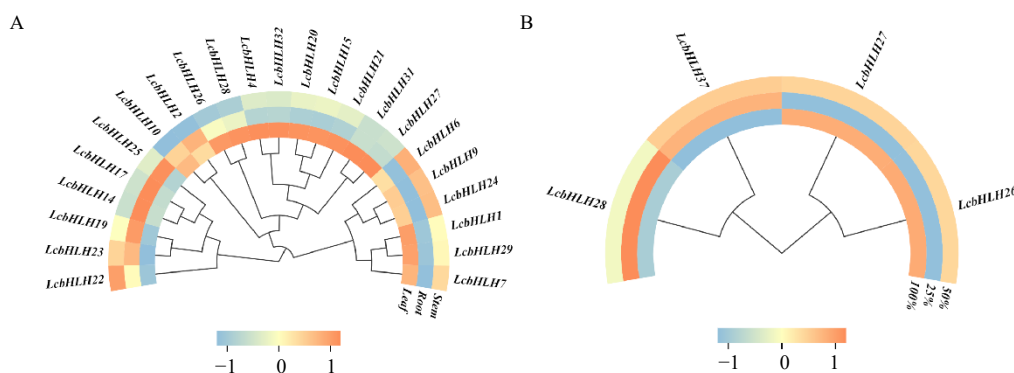
表达量, *LcbHLH19* 在根中的表达量显著高于在茎和叶中的表达量,与转录组测序结果基本一致(图 7-A); *LcbHLH27* 在透光率为 50% 和 25% 处理下的表达量显著低于 100% 透光率下的表达量,而 *LcbHLH37* 呈相反趋势,与转录组测序结果基本一致(图 7-B)。



A-金钱草 LcbHLHs 蛋白聚类分析; B-金钱草 LcbHLHs 蛋白的保守基序; C-金钱草 LcbHLHs 蛋白的保守结构域。  
A-cluster analysis of LcbHLHs of *L. christinae*; B-conserved domain of the LcbHLHs of *L. christinae*; C-conserved motif of the LcbHLHs of *L. christinae*.

图 5 金钱草 LcbHLHs 蛋白保守基序和保守结构域

Fig. 5 Conserved motifs and conserved domains of LcbHLH proteins of *L. christinae*



A-金钱草不同组织; B-金钱草不同透光率处理。  
A-different tissues of *L. christinae*; B-different light transmission treatments of *L. christinae*.

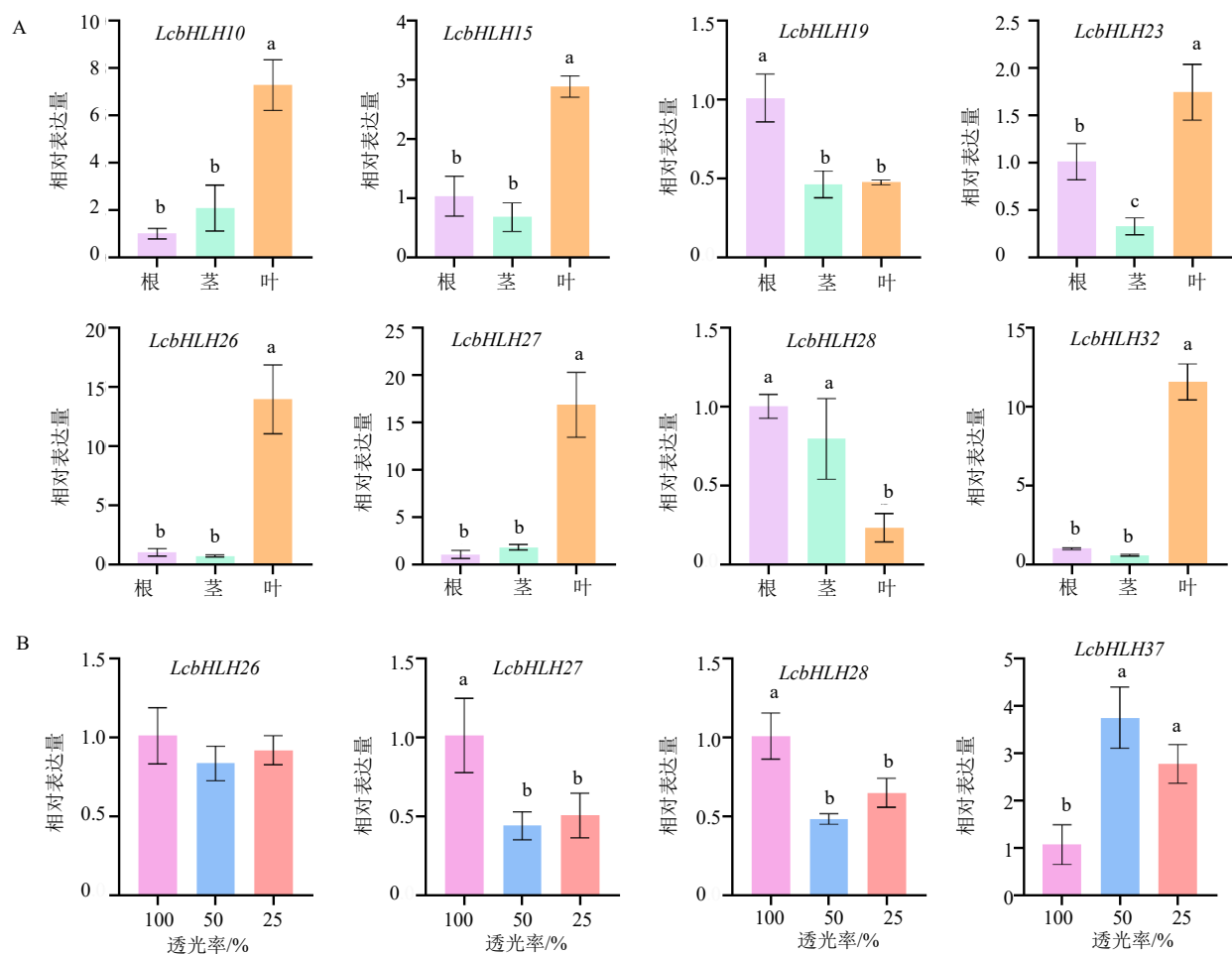
图 6 金钱草 LcbHLHs 差异表达基因热图

Fig. 6 Heatmap of differentially expressed LcbHLHs genes in *L. christinae*

### 3.11 金钱草 LcbHLH26 和 LcbHLH27 过表达载体构建及瞬时表达

根据金钱草 *LcbHLHs* 基因表达模式, 验证 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 基因的功能。利用酶切连接法构建 pBin35S-Red3-LcbHLH26、pBin35S-Red3-LcbHLH27 过表达载体, 对构建好的重组质粒进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切, 酶

切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 *LcbHLH26*、*LcbHLH27* 基因片段长度位置可观察到目的片段 (图 8-A), 载体构建成功。带有目的质粒的 GV3101 农杆菌侵染烟草叶片, 3 d 后利用倒置荧光显微镜观察标签蛋白的表达情况, 从图 8-B 中可以观察到标签蛋白均在烟草叶片中表达。



A-金钱草不同组织；B-金钱草不同透光率处理，不同小写字母代表在  $P < 0.05$  水平下具有显著差异。  
A-different tissues of *L. christinae*; B-different light transmission treatments of *L. christinae*; Bars presented by the different lowercase letters are significantly different at the  $P < 0.05$ .

图 7 金钱草部分 *LcbHLHs* 基因表达模式分析

Fig. 7 Analysis of expression patterns of partial *LcbHLHs* genes in *L. christinae*

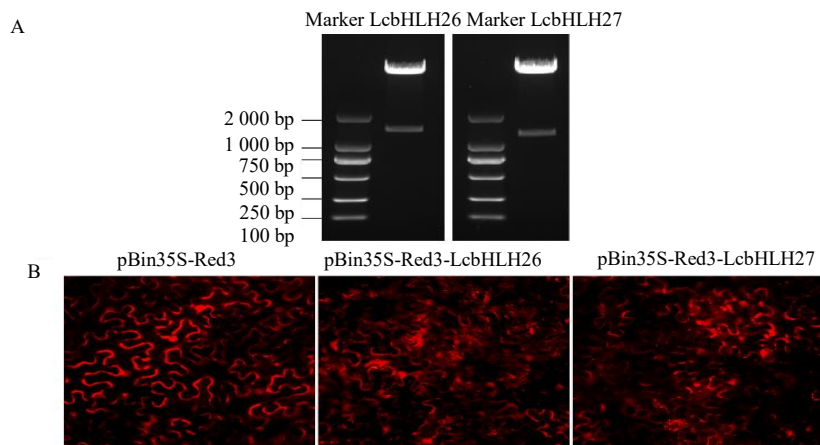


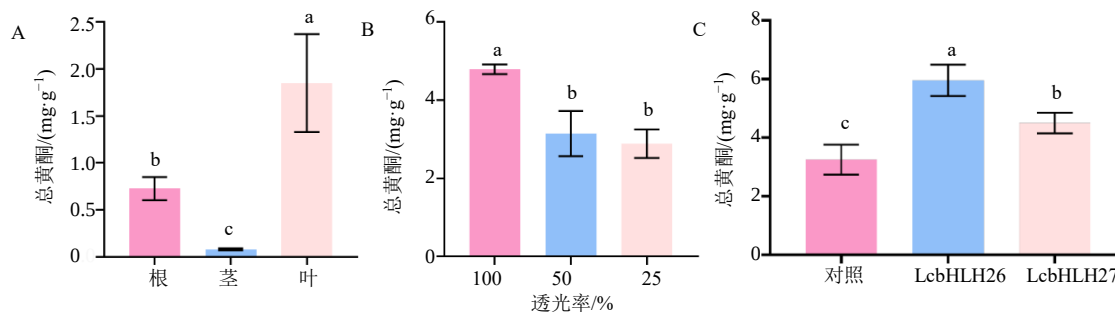
图 8 金钱草 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 过表达载体酶切电泳结果 (A) 和烟草叶片瞬时表达检测 (B)

Fig. 8 Restriction enzyme digestion electrophoresis results of *LcbHLH26* and *LcbHLH27* overexpressed vectors from *L. christinae* (A) and transient expression detection in tobacco leaves (B)

### 3.12 金钱草及烟草叶片总黄酮含量检测

黄酮类化合物是金钱草的主要活性成分,其含量在金钱草不同器官中存在显著差异,其中叶片中含量最高(图 9-A)。为了揭示光照对金钱草品质的影响,测定了不同透光率下金钱草的总黄酮含量。结果表明,与全光照相比,金钱草总黄酮含量在 50%和 25%的透光率下显著降低(图 9-B)。

利用烟草瞬时表达系统,验证 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 基因的功能。收集分别注射转化 pBin35S-Red3、pBin35S-Red3-LcbHLH26、pBin35S-Red3-LcbHLH27 菌液的烟草叶片,测定其总黄酮含量,结果显示分别过表达金钱草 *LcbHLH26*、*LcbHLH27* 的烟草叶片中总黄酮含量均显著高于对照(图 9-C),说明 *LcbHLH26*、*LcbHLH27* 转录因子可以促进黄酮的合成积累。



A-金钱草不同器官黄酮含量; B-金钱草不同透光率处理; C-烟草叶片黄酮含量; 不同小写字母代表在  $P < 0.05$  水平下具有显著差异。

A-different organs of *L. christinae*; B-different light transmittance treatment of *L. christinae*; C-tobacco leaves. Bars presented by the different lowercase letters are significantly different at the  $P < 0.05$ .

图 9 金钱草和烟草总黄酮含量检测

Fig. 9 Detection of total flavonoid content in *L. christinae* and tobacco

## 4 讨论

基于第二代高通量测序平台的传统转录组测序技术在植物研究中得到了广泛应用,但是仍存在诸多不足,如转录信息不完整、基因表达和选择性剪接分析准确性降低等<sup>[30]</sup>。因此,对于缺乏完整且可靠参考基因组序列的物种来说,通过第 2 代高通量测序平台获得的序列准确性不高,而第 3 代测序技术的发展解决了这些问题<sup>[24]</sup>。基于 PacBio 测序平台,已在多种植物中开展全长转录组测序,其中侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco、无芒雀麦 *Bromus inermis* L. 和扇穗茅 *Littledalea racemosa* Keng 通过全长转录组各检测到 37 111、355 836、62 018 条高质量转录本<sup>[31-33]</sup>,丰富各物种的遗传信息。目前,金钱草的基因组信息尚未解析,本研究首次对金钱草进行了全长转录组测序,在去除冗余后共获得 15 405 条转录本,与之前研究中转录本数量的差异可能是由测序深度和物种差异所致。利用 NR、Swiss-Prot、GO、KOG、NT、Pfam 和 KEGG 7 个公共数据库获得转录本的功能注释,为分析金钱草活性成分的生物合成途径提供了重要的遗传信息。另外,本研究共检测到 10 423 个 SSR 位点,

为金钱草利用 SSR 分子标记进行优良品种选育提供了丰富的遗传信息位点。

作为植物中重要的转录因子家族, bHLH 不仅参与植物的生长、发育和次生代谢,而且在植物适应非生物胁迫和信号转导中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。随着植物分子生物学的进步,药用植物中的 bHLH 家族转录因子不断被鉴定出来。基于转录组数据,在药用植物板蓝根 *Isatis indigotica* 中鉴定到 78 个 *RibHLHs* 基因<sup>[34]</sup>,在石蒜 *Lycoris radiata* (L' Her.) Herb. 中鉴定到 50 个 *LrbHLHs* 基因<sup>[35]</sup>,在鸢尾 *Iris domestica* (L.) Goldblatt & Mabb. 中鉴定到 39 个 *SbbHLHs* 基因<sup>[36]</sup>。本研究从金钱草全长转录组数据中共鉴定出 45 个 *LcbHLHs* 基因,与以往药用植物研究中的数量相似,表明 bHLH 基因家族在进化过程中并未发生显著扩张。金钱草大多数 *LcbHLHs* 转录因子是酸性不稳定蛋白,这与鸢尾 bHLH 基因家族蛋白一致<sup>[36]</sup>。通过系统发育树分析,本实验将 45 个 *LcbHLHs* 蛋白与拟南芥 *AtbHLHs* 蛋白进行比较,发现它们可分为 14 个亚家族。此外, *LcbHLHs* 蛋白的保守基序和保守结构域与其他植物相似,说明基于系统发育分析的 *LcbHLHs* 分类具有可靠性。

在植物中, *bHLH* 基因的表达具有组织特异性, 如黄芩 *Salvia miltiorrhiza* Bunge *SmbHLH92* 在韧皮部中的表达量最高, 而在茎中的表达量最低<sup>[37]</sup>; 银杏 *Ginkgo biloba* L. *GbbHLH13* 在叶片中的表达量最丰富, 而在根中几乎不表达<sup>[38]</sup>。*bHLH* 转录因子是药用植物中黄酮类化合物生物合成的重要调控因子<sup>[20]</sup>。研究发现, 金钱草叶片中的总黄酮含量显著高于茎中的含量(图 9-A), 这一结果与之前报道结果一致<sup>[39]</sup>。另外, 金钱草叶片中的总黄酮含量在 100%透光率下显著高于 50%和 25%透光率, 同时 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 在金钱草叶片中的表达量最高, 明显高于茎和根中的表达量(图 6、7)。基于这些结果, 推测 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 基因参与了金钱草黄酮类化合物的生物合成。本氏烟草是研究药用植物次生代谢产物合成途径的重要模式生物之一<sup>[40]</sup>, 因此通过在烟草叶片中开展瞬时表达验证 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 的功能, 发现过表达 *LcbHLH26* 和 *LcbHLH27* 的烟草中总黄酮含量显著高于对照组。综上所述, *bHLH* 基因家族在金钱草黄酮类化合物的生物合成及对不同光照强度的响应中发挥着关键作用, 但具体的分子调控机制仍需进一步阐明。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Wu X H, Wang J M, Li B Y, *et al.* Chlorogenic acid, rutin, and quercetin from *Lysimachia christinae* alleviate triptolide-induced multi-organ injury *in vivo* by modulating immunity and AKT/mTOR signal pathway to inhibit ferroptosis and apoptosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023, 467: 116479.
- [2] Ma C J. Cognitive enhancing activity of cynaroside isolated from *Lysimachia christinae* on memory impairment insulted by scopolamine [J]. *Nps*, 2024, 30(3): 175-181.
- [3] Kim H A, Lee D S, Lee H, *et al.* *Lysimachia christinae* Hance as an anticancer agent against breast cancer cells [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(10): 5717-5728.
- [4] Liu S J, Luorong Q J, Hu K Z, *et al.* Aqueous extract of *Lysimachia christinae* Hance prevents cholesterol gallstone in mice by affecting the intestinal microflora [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(9): 1272-1280.
- [5] Yang X, Wang B C, Zhang X, *et al.* Evaluation of *Lysimachia christinae* Hance extracts as anticholecystitis and cholagogic agents in animals [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 57-63.
- [6] 陈佳婷, 林腊子, 刘函纤, 等. 金钱草的化学成分、药理作用及相关应用研究进展 [J]. *现代中医药*, 2025, 45(2): 38-48.
- [7] Luo Rong Q J, Tan L H, Yu B, *et al.* Comprehensive quality evaluation of *Lysimachia christinae* Hance via fingerprint, spectrum-effect relationship, and quantitative analyses of multiple components by single marker [J]. *Phytochem Anal*, 2024, 35(6): 1527-1536.
- [8] Wei Y M, Luo X M. First report of *Phoma herbarum* causing leaf blight on *Lysimachia christinae* in southwestern China [J]. *J Plant Pathol*, 2023, 105(2): 627-628.
- [9] 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.
- [10] Sun Y X, Wang B E, Zhang L C, *et al.* Genome-wide identification of the bHLH gene family in *Scutellaria baicalensis* and their relationship with baicalin biosynthesis under drought stress [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 15: 1506805.
- [11] Qin Y H, Li J M, Chen J H, *et al.* Genome-wide characterization of the bHLH gene family in *Gynostemma pentaphyllum* reveals its potential role in the regulation of gypenoside biosynthesis [J]. *BMC Plant Biol*, 2024, 24(1): 205.
- [12] Xu J H, Xu H L, Zhao H G, *et al.* Genome-wide investigation of bHLH genes and expression analysis under salt and hormonal treatments in *Andrographis paniculata* [J]. *Ind Crops Prod*, 2022, 183: 114928.
- [13] Hong Y Q, Zhang J Y, Lv Y X, *et al.* The safflower bHLH transcription factor CtbHLH41 negatively regulates SA-induced leaf senescence through interaction with CtCP1 [J]. *Environ Exp Bot*, 2022, 199: 104883.
- [14] Huang Y Y, Xing X J, Jin J Y, *et al.* CmbHLH110, a novel bHLH transcription factor, accelerates flowering in *Chrysanthemum* [J]. *Hortic Plant J*, 2024, 10(6): 1437-1448.
- [15] Fang T, Li Y, Xie T, *et al.* The bHLH transcription factor DlbHLH68 positively regulates DISPS1 expression to promote sucrose biosynthesis in Longan [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 296: 139594.
- [16] Xiang L E, He P, Shu G P, *et al.* AabHLH112, a bHLH transcription factor, positively regulates sesquiterpenes biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 973591.
- [17] Singh S K, Patra B, Paul P, *et al.* BHLH IRIDOID SYNTHESIS 3 is a member of a bHLH gene cluster

- regulating terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Direct*, 2021, 5(1): e00305.
- [18] Li X J, Cao L J, Jiao B B, *et al.* The bHLH transcription factor AcB2 regulates anthocyanin biosynthesis in onion (*Allium cepa* L.) [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac128.
- [19] Qi M X, Tian X Y, Chen Y Q, *et al.* WD40 proteins PaTTG1 interact with both bHLH and MYB to regulate trichome formation and anthocyanin biosynthesis in *Platanus acerifolia* [J]. *Plant Sci*, 2025, 352: 112385.
- [20] Zhu J H, Xia D N, Xu J, *et al.* Identification of the bHLH gene family in *Dracaena cambodiana* reveals candidate genes involved in flavonoid biosynthesis [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 150: 112407.
- [21] 杨朝结, 张兰, 陈红, 等. 苦荞转录因子基因 FtbHLH3 调控类黄酮生物合成的功能鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2025, 41(4): 134-144.
- [22] Qian Y, Hu Z A, Tang Y H, *et al.* Isolation and function analysis of herbaceous peony bHLH transcription factor PlbHLH87 in response to high-temperature stress [J]. *Sci Hortic*, 2024, 329: 112993.
- [23] Yang Z Y, Lin L, Lu M, *et al.* A bHLH transcription factor RrUNE12 regulates salt tolerance and promotes ascorbate synthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2025, 44(2): 42.
- [24] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7): 644-652.
- [25] Xin Y, Rong H, Han X, *et al.* Full-length transcriptome sequencing of the short-rotation woody crop *Salix in tegra* reveals a time series response to Pb stress [J]. *Ind Crops Prod*, 2023, 200: 116771.
- [26] 米琪, 赵艳丽, 徐萍, 等. 滇黄精全长转录组测序及生物信息学分析 [J]. *药学学报*, 2024, 59(6): 1864-1872.
- [27] 杜桥, 唐璟, 李依民, 等. 基于全长转录组测序的掌叶大黄 *GRAS* 基因家族鉴定 [J]. *中草药*, 2025, 56(2): 617-625.
- [28] Xu H J, Li M, Ma D, *et al.* Identification of key genes for triacylglycerol biosynthesis and storage in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) seeds based on full-length transcriptome [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 601.
- [29] 高广春, 李军, 钱纯节, 等. 西红花柱头全长转录组测序及 bZIP 转录因子家族鉴定分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(24): 8526-8537.
- [30] Zhang H, He L, Cai L. *Transcriptome sequencing: RNA-seq* [M]. New York: Springer New York, 2018: 15-27.
- [31] Liao T, Zhang L Y, Wang Y, *et al.* Full-length transcriptome characterization of *Platycladus orientalis* based on the PacBio platform [J]. *Front Genet*, 2024, 15: 1345039.
- [32] Li Q, Song J X, Zhou Y, *et al.* Full-length transcriptomics reveals complex molecular mechanism of salt tolerance in *Bromus inermis* L. [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 917338.
- [33] 曲荣举, 刘玉萍, 苏旭, 等. 基于 PacBio 平台的扇穗茅全长转录组测序及热激转录因子家族 (HSFs) 分析 [J]. *草地学报*, 2025, 33(2): 370-381.
- [34] Zhang L, Chen J F, Li Q, *et al.* Transcriptome-wide analysis of basic helix-loop-helix transcription factors in *Isatis indigotica* and their methyl jasmonate responsive expression profiling [J]. *Gene*, 2016, 576(1): 150-159.
- [35] Wang N, Shu X C, Zhang F J, *et al.* Transcriptome-wide characterization of bHLH transcription factor genes in *Lycoris radiata* and functional analysis of their response to MeJA [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 13: 975530.
- [36] Ai Q, Han M, Liu C J, *et al.* Transcriptome-wide identification and expression analysis of bHLH family genes in *Iris domestica* under drought and Cu stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1773.
- [37] Zhang J H, Lv H Z, Liu W J, *et al.* bHLH transcription factor SmbHLH92 negatively regulates biosynthesis of phenolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(3): 237-246.
- [38] Li Y. Ginkgo biloba GbbHLH13 transcription factor regulates flavonoid biosynthesis [J]. *J Plant Molecul Breed*, 2024, 12(2): 1-12.
- [39] 文晶晶, 黄桂红, 韦奕, 等. 广金钱草和金钱草不同部位总黄酮含量研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2019, 28(8): 58-60.
- [40] Yang C Q, Halitschke R, O'Connor S E. Oxidosqualene CYCLASE 1 and 2 influence triterpene biosynthesis and defense in *Nicotiana attenuata* [J]. *Plant Physiol*, 2024, 194(4): 2580-2599.

[责任编辑 时圣明]