

# 牡丹 bHLH 类转录因子基因的分离与序列分析

张超, 董丽

(北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

**摘要:** 利用 RT-PCR 技术, 将牡丹花瓣转录组数据库中 7 个 Unigene 序列进行拼接, 得到 3 个 bHLH 基因, 分别命名为 PsbHLH1、PsbHLH2 和 PsbHLH3。设计特异性引物对 3 个基因最大阅读框 (ORF) 序列进行扩增, 测序结果表明 PsbHLH1 序列包含一个 2076 bp 的 ORF, 编码一个 691 aa 的肽链; PsbHLH2 序列包含一个 1830 bp 的 ORF, 编码一个 609 aa 的肽链; PsbHLH3 序列包含一个 1938 bp 的 ORF, 编码一个 645 aa 的肽链。这 3 个基因推测所编码蛋白序列均具有典型的碱性-螺旋-环-螺旋结构域。PsbHLH1 和 PsbHLH3 基因编码的蛋白与拟南芥已知的类黄酮调控转录因子 III f 亚族成员蛋白同源性较高; PsbHLH2 基因编码的蛋白与拟南芥 AtbHLH3 蛋白同源性最高。将 PsbHLH1 和 PsbHLH3 与其他物种类黄酮代谢调控的 bHLH 蛋白构建进化树分析发现, PsbHLH1 与 MdbHLH3、VvMYC1 等聚为一支, 而 PsbHLH3 与 AmDelila、PhJAF13 聚为另一支。

**关键词:** 园林植物与观赏园艺; 花青素苷合成; 调节基因; 牡丹

**中图分类号:** S685.11

## Isolation and Sequence Analysis of bHLH Transcription Factor Genes in Tree Peony

ZHANG Chao, DONG Li

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, National Flower Engineering Technology Research Center, Beijing 100083)

**Abstract:** In this study, two Unigene sequences that share high homology with WD40 protein involved in plant anthocyanin biosynthesis were obtained from previous-constructed tree peony (*Paeonia suffruticosa* 'Luoyang Hong') petal transcriptome database and named as PsWD40-1 and PsWD40-2. Sequences of Open Reading Frame (ORF) in PsWD40-1 and PsWD40-2 were amplified with designed specific primers using RT-PCR technology and sequenced. Results showed that PsWD40-1 contains a 1035 bp ORF encoding 344 amino acid residues, and PsWD40-2 contains a 1032 bp ORF encoding 343 amino acid residues. The predicted protein sequences of PsWD40-1 and PsWD40-2 genes both contain the typical WD40 structural domain. PsWD40-1 shares high similarity (96%) with VvWDR2 of *Vitis vinifera*, and PsWD40-2 shares 87% similarity with VvWDR1 of *Vitis vinifera*. Phylogenetic tree analysis showed that PsWD40-1 is grouped into the MP1 clade with VvWDR2 of *Vitis vinifera*, AtAN11 of *Arabidopsis thaliana*, and GhTTG2 of *Gossypium hirsutum*, while PsWD40-2 is grouped into the other clade, TTG1/PAC1 clade, with VvWDR1 of *Vitis vinifera*, PhAN11 of *Petunia hybrida*, and PfWD40 of *Perilla frutescens*.

**Key words:** Landscape plant and ornamental horticulture; anthocyanin biosynthesis; regulatory gene; *Paeonia suffruticosa*

## 0 引言

植物呈现五彩缤纷的颜色主要原因是植物细胞内色素物质的存在, 包括类黄酮化合物、类胡萝卜素、叶绿素和甜菜碱<sup>[1]</sup>。花青素苷 (anthocyanins) 是一类水溶性的类黄酮化合物,

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20130014110014)

作者简介: 张超 (1987-), 男, 博士生, 主要研究方向: 切花采后保鲜

通信联系人: 董丽 (1965-), 女, 教授, 主要研究方向: 切花采后保鲜. E-mail: dongli@bjfu.edu.cn

45 广泛分布于植物细胞液泡中,它决定了大部分观赏植物花瓣呈现出粉色、红色、橙色、紫色、蓝色等不同颜色<sup>[2]</sup>。已有研究表明植物花青素苷的生物合成受结构基因和调节基因的共同调控<sup>[3]</sup>,目前已分离和鉴定了3大类花青素苷合成的转录因子:MYB蛋白、bHLH蛋白和WD40蛋白<sup>[4]</sup>。

bHLH蛋白具有典型的碱性螺旋-环-螺旋(basic Helix-Loop-Helix, HLH)结构域,以二聚体的形式结合到特异的DNA序列上,调控下游基因的表达<sup>[5]</sup>。bHLH基因是以多基因家族形式存在植物体内,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有162个bHLH基因家族成员<sup>[6]</sup>,水稻(*Oryza sativa*)中有167个成员<sup>[7]</sup>,葡萄(*Vitis vinifera*)中至少有119个成员<sup>[6]</sup>。目前,菊花(*Chrysanthemum* × *morifolium*)、矮牵牛(*Eustoma grandiflorum*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)等多种观赏植物bHLH基因已被分离<sup>[8-11]</sup>。但是牡丹(*Paeonia suffruticosa*)上未见bHLH基因的相关研究报道。本研究利用已构建的牡丹花瓣转录组数据库,结合RT-PCR技术,获得3个bHLH基因*PsbHLH1*、*PsbHLH2*和*PsbHLH3*的cDNA全长,同时分析了这些基因推定的蛋白序列,为揭示牡丹花青素苷生物合成奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

60 牡丹‘洛阳红’(*P. suffruticosa* ‘Luoyang Hong’)1级<sup>[12]</sup>花朵取自河南省洛阳花木公司牡丹苗圃地,采后运回北京林业大学园林学院花卉生理和应用实验室。用锡箔纸将花朵中瓣包好后液氮速冻,并保存于-80℃冰箱用于后续试验。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总RNA的提取及cDNA第一链合成

65 采用CTAB法<sup>[13]</sup>提取牡丹花瓣总RNA反转录反应参照Promega公司的M-MLV反转录酶说明书,以提取的总RNA为模板,Oligo(dT)<sub>15</sub>为引物合成cDNA第一链。

#### 1.2.2 RT-PCR扩增、PCR产物回收及测序

已构建的牡丹花瓣转录组数据库bHLH基因相关Unigene序列,设计特异性引物F1和R1、F2和R2、F3和R3、F4和R4(表1),以合成的cDNA第一链为模板分别对*PsbHLH1*、*PsbHLH2*和*PsbHLH3*基因的中间片段进行扩增。25 μL反应体系:10 × buffer(含Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL, dNTP(10 mmol/μL)0.5 μL,上下游引物(10 mmol/μL)各1 μL, cDNA 1 μL, Taq DNA聚合酶(5U/μL)0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.6 μL。PCR反应产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后回收,与pGEM-T载体连接,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,经PCR和酶切鉴定后送北京奥科生物技术有限责任公司测序。将测序所获得的序列和已知Unigene序列进行拼接,所得基因序列分别命名为*PsbHLH1*、*PsbHLH2*和*PsbHLH3*,并设计特异性引物F5和R5、F6和R6、F7和R7(表1)分别对*PsbHLH1*、*PsbHLH2*和*PsbHLH3*全长序列进行扩增,PCR反应产物回收、连接、转化和测序方法同中间片段克隆与测序。

#### 1.2.3 序列分析

80 测序获得的序列通过NCBI提供的ORF Finder进行ORF查找,序列翻译、氨基酸序列比对采用DNAMAN 6.0软件进行。通过ExPASy ProtParam(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)预测所编码蛋白的分子量、理论等电点。使用

MEGA 5.05 软件中的 Neighbor-Joining（邻位相连法，NJ）法建立系统进化树。

表 1 牡丹 *bHLHs* 基因分离所用引物  
Tab. 1 Primers for the isolation of tree peony *bHLHs* genes

引物	引物序列	用途
F1	TGGGGCAATAAAGACCCGAAAAA	<i>PsbHLH1</i> 中间片段扩增
R1	TGGAAGTGATGGTGAGTGGAAGC	
F2	AAACTGAGGTGGGTATGGAAAC	<i>PsbHLH2</i> 中间片段扩增
R2	AGAGAAGTACATCGAGGCAAGGA	
F3	CTCGATGTACTTCTCTTTTCTCTC	<i>PsbHLH2</i> 中间片段扩增
R3	CAAACTCGTGTCTATTATTGCT	
F4	GTATTACTTGGTGTGCATGTCGT	<i>PsbHLH3</i> 中间片段扩增
R4	ATCTTTCGTTTCATTTTTTCCTTT	
F5	AATCCCGGACCTCACGTATATCTC	<i>PsbHLH1</i> 全长扩增
R5	CCATTACTGCTGAATCCACCCTTT	
F6	TTCATTGGGTATTGTTATTTTGT	<i>PsbHLH2</i> 全长扩增
R6	CTACTTCTAGCTGACCTTGTCCTT	
F7	ATGGCTCTGGGACCTGATT	<i>PsbHLH3</i> 全长扩增
R7	ATTATCTTTGAGAAATAGGGCTCT	

## 2 结果与分析

### 2.1 牡丹 *PsbHLHs* 基因的全长分离

本课题组前期构建的牡丹‘洛阳红’花瓣转录组数据库进行分析，发现其中有 49 个 Unigene 与 *bHLH* 基因同源性较高（表 2）。其中 CL3055.Contig2 和 Unigene884 经 Blastx 比对得到的结果均为“bHLH transcriptional factor AN1 homolog [*Rosa hybrid cultivar*]”，Unigene18036、Unigene18037 和 Unigene21070 经 Blastx 比对得到的结果均为“transcription factor bHLH13 [*Vitis vinifera*]”，Unigene27739 和 Unigene27740 经 Blastx 比对得到的结果均为“bHLH transcriptional factor AN1 homolog [*Rosa hybrid cultivar*]”，利用 RT-PCR 技术对其中 7 个 Unigene 序列的中间片段进行分离（图 1A, B），测序拼接后得到 3 个 *bHLH* 基因序列，分别命名为 *PsbHLH1*、*PsbHLH2* 和 *PsbHLH3*（图 2）。利用特异性引物 F5 和 R5、F6 和 R6、F7 和 R7 分别对 *PsbHLH1*、*PsbHLH2* 和 *PsbHLH3* 基因 ORF 序列扩增，获得预期大小 2200 bp、2000 bp 和 2000 bp 左右的条带（图 1C）。

表 2 与 *bHLH* 基因相关的 49 个 Unigene 基本信息

Tab.2 Information of 49 Unigenes related with *bHLH*

Unigene 编号	Unigene 长度	FPKM
CL1183.Contig1	2251	transcription factor MYC2-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL1183.Contig2	2212	transcription factor MYC2-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL1720.Contig1	1070	transcription factor bHLH128 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL1720.Contig2	791	transcription factor bHLH128 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL2105.Contig2	905	transcription factor bHLH35 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL3055.Contig2	521	bHLH transcriptional factor AN1 homolog [ <i>Rosa hybrid cultivar</i> ]
CL4748.Contig1	258	transcription factor bHLH49-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL5790.Contig1	1559	transcription factor bHLH63-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL5790.Contig2	1306	transcription factor bHLH63-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL6897.Contig1	878	transcription factor bHLH47-like isoform 1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]

表 2 (续)

Tab.2 (Continued)

Unigene 编号	Unigene 长度	FPKM
CL6897.Contig2	423	transcription factor bHLH47-like isoform 1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL7435.Contig2	649	transcription factor bHLH113 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene13845	259	transcription factor bHLH91-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene14254	284	transcription factor bHLH49-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene14769	616	BHLH domain class transcription factor [ <i>Malus × domestica</i> ]
Unigene15159	372	transcription factor bHLH137 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene1665	837	putative basic helix-loop-helix protein BHLH3 [ <i>Lotus japonicus</i> ]
Unigene16981	234	transcription factor bHLH68 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene17711	343	BHLH domain class transcription factor [ <i>Malus × domestica</i> ]
Unigene18036	519	transcription factor bHLH13 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene18037	403	transcription factor bHLH13 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene18342	268	transcription factor bHLH79 isoform 2 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene18616	722	transcription factor bHLH123-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene19660	774	transcription factor bHLH147 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene20329	762	transcription factor bHLH145-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene21070	1128	transcription factor bHLH13 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene21597	1129	transcription factor bHLH147 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene21785	994	transcription factor bHLH140-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene22350	628	transcription factor bHLH135 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene22813	528	transcription factor bHLH144 isoform 2 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene24276	871	transcription factor bHLH3-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene25868	972	transcription factor bHLH135 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene2622	256	transcription factor bHLH123-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene26879	1861	transcription factor bHLH145-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene2739	302	transcription factor bHLH130-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene27739	987	transcription factor GLABRA 3-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene27740	1090	transcription factor GLABRA 3-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene28042	1531	transcription factor bHLH60 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene31605	222	transcription factor bHLH123-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene31954	234	transcription factor bHLH51-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene33005	281	transcription factor bHLH30 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene33633	275	transcription factor bHLH25-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene3540	308	transcription factor bHLH104-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene5576	277	transcription factor bHLH140-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene7201	294	transcription factor bHLH74 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
Unigene8053	634	BHLH domain class transcription factor [ <i>Malus × domestica</i> ]
Unigene884	2114	bHLH transcriptional factor AN1 homolog [ <i>Rosa hybrid cultivar</i> ]
Unigene8916	441	bHLH transcriptional factor [ <i>Coptis japonica</i> ]
Unigene9678	289	transcription factor bHLH25-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL1183.Contig1	2251	transcription factor MYC2-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL1183.Contig2	2212	transcription factor MYC2-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL1720.Contig1	1070	transcription factor bHLH128 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL1720.Contig2	791	transcription factor bHLH128 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL2105.Contig2	905	transcription factor bHLH35 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
CL3055.Contig2	521	bHLH transcriptional factor AN1 homolog [ <i>Rosa hybrid cultivar</i> ]
CL4748.Contig1	258	transcription factor bHLH49-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]

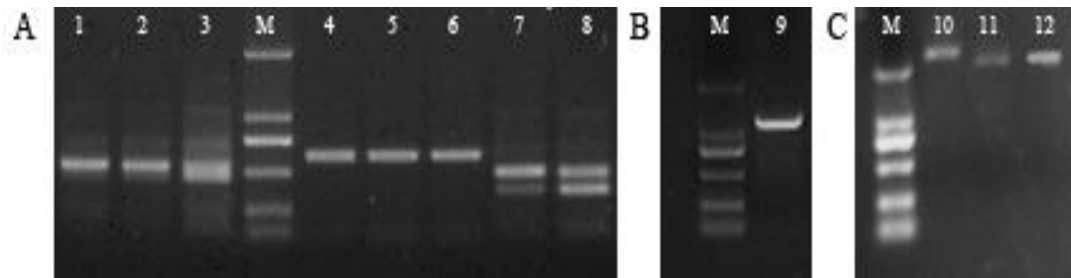


图 1 牡丹‘洛阳红’*PsbHLHs* 基因中间片段序列 (A 和 B) 和 ORF 序列 (C) 的 PCR 扩增产物电泳图。M: DL2000 marker; 1 ~ 3: *PsbHLH1* 中间片段; 4 ~ 6: *PsbHLH2* 中间片段; 7 ~ 8: *PsbHLH2* 中间片段; 9: *PsbHLH3* 中间片段; 10: *PsbHLH1* ORF 序列; 11: *PsbHLH2* ORF 序列; 12: *PsbHLH3* ORF 序列

Fig. 1 PCR amplification of partial sequences (A and B) and ORF sequences (C) of *PsbHLHs* of *P. suffruticosa* ‘Luoyang Hong’. M: DL2000 marker; 1 ~ 3: Partial sequence of *PsbHLH1*; 4 ~ 6: Partial sequence of *PsbHLH2*; 7 ~ 8: Partial sequence of *PsbHLH2*; 9: Partial sequence of *PsbHLH3*; 10: ORF sequence of *PsbHLH1*; 11: ORF sequence of *PsbHLH2*; 12: ORF sequence of *PsbHLH3*

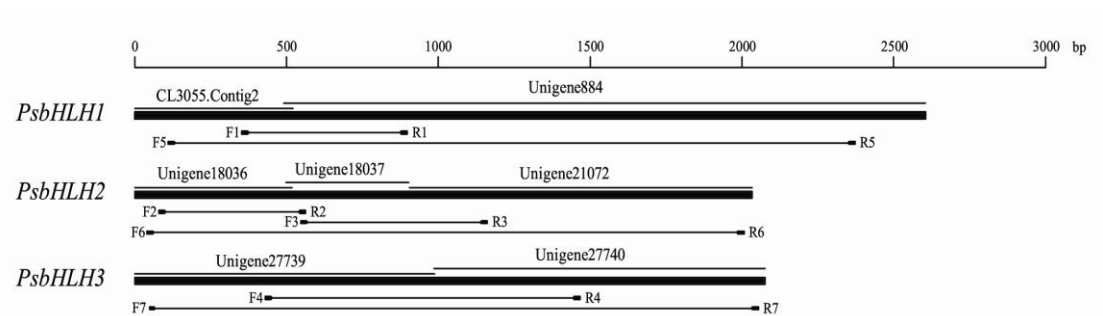


图 2 Unigenes 和引物序列在牡丹‘洛阳红’*PsbHLHs* 基因序列中的分布

Fig. 2 Distribution of unigenes and primers sequences on *PsbHLHs* sequences of *P. suffruticosa* ‘Luoyang Hong’

## 2.2 牡丹 *PsbHLHs* 基因核苷酸和推测所编码蛋白的分析

测序结果 (表 3) 表明, *PsbHLH1* 序列包含一个 2076 bp 的 ORF, 编码一个 691 aa 的肽链, 理论分子量为 77.22 kD, 等电点为 5.59; *PsbHLH2* 序列包含一个 1830 bp 的 ORF, 编码一个 609 aa 的肽链, 理论分子量为 67.12 kD, 等电点为 6.23; *PsbHLH3* 序列包含一个 1938 bp 的 ORF, 编码一个 645 aa 的肽链, 理论分子量为 72.18 kD, 等电点为 5.41。牡丹 *PsbHLHs* 基因推测所编码蛋白序列对比结果显示 3 个蛋白均具有典型的碱性-螺旋-环-螺旋 (basic Helix1-Loop-Helix) 结构域<sup>[14]</sup> (图 3)。

表 3 牡丹 *bHLHs* 基因信息

Tab. 3 Information of tree peony *bHLHs* genes

基因	5'UTR 长度 (bp)	ORF 长度 (bp)	3'UTR 长度 (bp)	编码的氨基酸残基数 (aa)	理论分子量 (kD)	等电点
<i>PsbHLH1</i>	216	2076	313	691	77.22	5.59
<i>PsbHLH2</i>	77	1830	126	609	67.12	6.23
<i>PsbHLH3</i>	95	1938	29	645	72.18	5.41



A

217 atgctgcggccgcacgaataaacgccgttacagatattgttgcag  
M A A P P V N S R L Q N M L Q  
262 tgcggcggtaaatgttcgatcaaggatcacagtcttttgtcaa  
S A V Q S V Q W T Y S L F W Q  
307 ctttgcccacaacagcgacttatgtttggcgaccagaattatg  
L C P Q Q G I L V W G D G Y Y  
352 asf gggcgcaataaagaccggaanaacagttcaccaatgaagto  
N G A I K T R K T V P M M E V  
397 agt actgaagaaagcatcacccagaagaagtcacagctcagaaa  
S T E E A S L Q R S Q Q L R E  
442 ctatatgtacctttcagcagaagagaacaacagccagcagagg  
L Y D S L S A G E T T N Q P A R  
487 ccgctcgtgtcgtgcttgcgcggcgaagacttaaacgacaatag  
R P C A A L S P E D L T E S E  
532 tggttttatctcattcgtctcattctcattctcgttgggtta  
W F Y L M C V S F S F P P G V  
577 ggctccgcgaagaacatcmtcaagaagacacatctatgcttag  
C L P G G A Y A R R R Q H V W L  
622 acgctgtccaattgagttgtagcaaaagttttacaagacgatt  
T G A N E V D S K V F T R A I  
667 cttganeagtcgtgctatcagacggtgttcgactctotc  
L A K S A R I Q T V C I P L  
712 atgtgatgttgttgtaaatttggaacagctgagctgacgaaga  
M D G V V E F G C A G G T T D R M Q E  
757 gctcaagctccacaactcgtcagaactctcttctgcaaac  
D L S L I Q H V K I F F V D H  
802 cacacactccacaacaaacacgctctctcgtcagaacact  
H H H P P P K P A L S E H S T  
847 tcaaacctcgcagaacacgaactcgtctcgtccactcacatca  
S N P A A T D N P R F H S P S  
892 cttccacacgcttgacgacgttaaacccacgactgaatgaac  
L P P M Y A A A N P P V N A N  
937 cagaagacagagaagacagagaagaaagagatgaatgaagat  
G E D E E E E E E E E D E D E  
982 caagagctgtgacgaactcagaagctgaacacgacgctcaggtt  
E E G E S D S E G E T A R Q V  
1027 ttgatgtttaattatctccggcagacgtcgcgctctatggcca  
L I S N I P P G T A A G H M A  
1072 aaagacagagtgactgaactcagcaactggagatgctcgtgat  
T E P S E L M Q L E M S E D I  
1117 cgcctcgtctctcgtcagcgtccacaanattgctctagat  
R L G S P D D A S C N N L D S D  
1162 tttcattatcgtcgcgtgagcagaagggtagaacctgctgat  
F H M L A G O C G G N P A D  
1207 cacacgagaagagctatctgctatggcctgagtcagcagagg  
H Q R R A D S Y R A E S T R  
1252 tggcaaatgattgacatcagctatgaatgattgctccaoca  
W P M I V H D P M S S G L Q P  
1297 cocacagcagcgtctctctagagggaattgacacaagaagac  
P P C P P S L E E E L T Q E D  
1342 accactactcccaactgtccacactctccacacacacac  
T H Y S Q T V S T I L H H Q P  
1387 agcagctgctgaggaactctctccgcagactgctctcacaoc  
S R W S E S S A S Y V L T Y  
1432 tcccaactcgtctcccaactgagagctcgtccacactcgt  
S Q S A F S K W S I R S D H H  
1477 cactccctctaacacactgagggcagctcgtcagtgctctcaa  
H L P V P L E G T S Q W L L K  
1522 tacattctatttgctgctcatttctcacaanaagtcaggaa  
Y I L F S V P F L H N K Y R E  
1567 taagactcccaaaactccgagaacacacacgcacacagact  
E T S P C K S R D T T A D P A S  
1612 cgctttgtgaagcacaacccagacagagtcagagcgcacac  
R F R K G N T P Q D E L S A N  
1657 cagctcgtcgcggagccgcgcgtcgcgagaaagctcagaagc  
H V L A E R R R R R E K L N E R  
1702 ttcattattatgcttcttgactccgtccgtgcaccaaatggd  
F I I L R S L V P C V T M M D  
1747 asgctgtcaattatggagtcacaaagtgtatgtcaaaagtgc  
K A S I L G D T E I Y V K Q L  
1792 aggaanaaatacaagactcagacaaggaacacagctcagatga  
R R K I Q D L E T R T R M E  
1837 actgacacacagcttgagctcagcggacaacgcagaagcagct  
I D N Q R L R S A E P Q R T T  
1882 agtcttcacagacgcagcagcggttaacgctcttgtagcagg  
S G S K E Q R S V T A L E R  
1927 ccagcgtgtttgtctcctccggctcagaaaaaggaagtcggc  
A R V L C P P G S E K R K M  
1972 atttgctgagagatgattgctgtccagacctaagaatgattgd  
I V E G S S V A K P K V V D  
2017 agttgcgctccataggccggaaacgctctgcaggtgaagatgc  
S L P T A G N A V Q V E V S  
2062 ataattgagatgagctgctggtgaggtgcactgcaccaagc  
I I E S D A L V L E L C P N R  
2107 saaggtgtttttgttactatgatgacgtccggagctctcgc  
E G L L A C D T M M T L R E L R  
2152 gtgacacacacgcgcttcagcttctcgtcagtaaaagcatttt  
V E T T A V Q S S S T G A V F  
2197 gttgctgaattaggcccaaggttaaggaanaaagtgaattggga  
V A E L R A K V K E N V N G K  
2242 aaagcagaatataagaattaagcagacatcaacaaatatt  
K A S I E V K R A I H Q I I  
2287 cotta 2292

B

78 atgaanaactgaggtgctatgaanaactggtgtcggaatgatg  
M K T E V G M T G V W N D E  
123 gtaagacacatcagctgactgtttggcgactcgcgtccagac  
D K A I V T A V L G T R A F D  
168 tactgatctcagactcgtatcgcctgacgaacgttaattgct  
Y L I S S V S A E G L M M E  
213 cttggcagctgactgatatttgcasaatgaagcttctgactcgt  
L G T D D D T L Q N K L S D L V  
258 gaagcccaaatgctccaaattcagttggaaactcagctttc  
E R P N A S N F S W N Y A V F  
303 tgcagattgttcagctcaagctccgggatttggtttgtgctg  
W Q I L Q S K S G D W V L V W  
348 gggtaggctcagcagcgcgaagagagctgaagcactagct  
G D G S C R E P K E V A S V  
393 gctcagactccaaattgactgctgtagatgaactacaagata  
A R I L N I G V V D E T Q Q I  
438 atgagaaaggcccttcgaanaactcagactgtttgggtat  
M R K R A L Q K L H L T F G D  
483 acgagcagagctgcttactgcttoggatgtagagctcactgat  
T D E D A Y A F G L D R V T  
528 agggacatttctctcgtcagctgacttctctttctotcca  
T E M F F L A S M Y F S F P P  
573 gcgagagctgcagccgcgaagttttgtagctcgaagactga  
G E G G P G K C F G S G K H V  
618 tggctctcaaatctgaactcagactgattactgcgtccgg  
W L S N A L K S Q A D Y C V R  
663 tctattcgtccaactcgtcggaactcagacactcgtgata  
S F L A K S A G I Q T I V L I  
708 cqcacagctttggaagttagaattggzgtctgtagatcagta  
P T D V G V E L G S V I S V  
753 cgcgaaggttgtgaactttgcagactgaagtcgtctctctgc  
P E S F E L Q C T L R S S F S  
798 ataactcctccaactagacacaacagctgcagctcgcgt  
I N S S P I R A K P V A A L P  
843 gctcagagcagaagaatacaaataccottctttgtagctg  
V M S D K R N Q N T P F V R L  
888 gggatgtgtgagcagacggagattggagattttggcag  
G I G E R T E G I G R V F G Q  
933 gdtgtagcagccactccatttggagggaanaactcgtgt  
D W N S G H S H L R E K L P V  
978 tgagagcagtggaacagactcggcagctctccacaagagg  
W K A V D K S W A V F P N G  
1023 anaagctccctccaactcagctggaagaagcttccaagagct  
N R L P P P N A R N G V Q A G  
1068 tngltaggtcctcaaatcactgtgcasaacaggcgaacotcga  
S S W A Q I P V A K G G S P A  
1113 gaaattttggagctctcgcacccagcaaanatagacaagag  
E N F G A S P T P A N N R H E  
1158 ttgtgtaagggttagaagattccgcctgaatcaaatcag  
F V N G V K E D F R L N Q Y Q  
1203 cctcagactcgaactcgttttgagcggaggtctctcagcga  
P Q T M Q I D F A G G S S R P  
1248 tcogggatgctcgcgcctcagaagtgttagcactcagactcagat  
S G I V R P T S V D S E L S D  
1293 gttgagctctcagcagagagaagaagtagccagcagagact  
V E A S C K E E R S S P A A D  
1338 gaagagcgcctccgaacaggcccggaagctgcaaatgtaga  
E R R P R K R G R K P A N G R  
1383 gaagacaacotcaactcagtcagcaggcggagagcagacgcgtag  
E E P L N H V E A E R Q R R E  
1428 aagctaaacacgagctttacgtctgcaggttgttgcacact  
K L N Q R F Y A L R A V V P N  
1473 atctcnaagattggaanaagctctgctggcagactcgcctgt  
I S K M D K A S L L G D A I A  
1518 tatcactcagctcagaaaaactcaggaagtcgaagacag  
Y I T D L Q K K L K M E A E  
1563 aaggaagaactggggagcactctagagatgcagtttttggtat  
K E K I G S T S R D A V F L D  
1608 cagcgtctcaactcaaatcagaatacccaaacgcattacgc  
Q A A N S N P E I Q N R L T  
1653 gdtgctgtactcagctcagactgtagtctctcaggtat  
D V D I Q A N H D E V I V R V  
1698 actcgttccttgtagtcacacccgtgatacaaatcagacaaga  
T C P L N A H P V S K V I A  
1743 tcaaaagtcagaggttaacattgtgattccaactatgcgc  
F K V A E V N I V D S K L A A  
1788 gggtagtactgtttttctacattgtgatactcagga  
G N D T V F H T F V I K S Q  
1833 ttgtagcgtctgcacaaaagaatttagtcagctcgtcttctcgt  
L D Q L T K E K L M T A F S A  
1878 gatcccaactccttgcgtgcgttggttaa 1907  
E S N P L L R V G \*

C

96 atgcacactggcctcaaatcaggagggtatgcacaaactata  
M A T G L Q I Q E G M P E N L  
141 aggcacacactcgtgactcgttagaagatataagtaggattat  
R Q Q L A V A G R S I Q W S Y  
186 gctactatgcttgcattccaattagcacaacacaggtactgaa  
A I L W S I S I R P G V L E  
231 tggcttggggtactacaatggagatattagaacaggaacaca  
W S D G Y Y N G D I K T R K T  
276 gttcaactatagaacttaagctgatacaataggtttacagagg  
V Q S I E L N A G C D M G L Q R  
321 agtgacgaattaggagactctcagactccctgcacgcgtgaa  
S E Q L R E L Y E S L A A G E  
366 agtaacccaactataaagcccaacgctgcatactccotcga

图3 牡丹‘洛阳红’*PsbHLH1* (A)、*PsbHLH2* (B)和*PsbHLH3* (C)基因ORF序列及其翻译的氨基酸序

列。下划线部分为碱性-螺旋-环-螺旋结构域。

Fig. 3 ORF sequences and deduced amino acid sequences of *PsbHLH1* (A), *PsbHLH2* (B) and *PsbHLH3* (C) of *P. suffruticosa* ‘Luoyang Hong’. Underlines represent basic Helix-Loop-Helix structural domains.

2.3 牡丹 *PsbHLHs* 基因编码蛋白的同源性分析

应用 MEGA 软件将 *PsbHLH1*、*PsbHLH2* 和 *PsbHLH3* 基因推导的蛋白氨基酸序列与已报道的 70 个拟南芥 bHLH 蛋白 AtbHLH1~AtbHLH70<sup>[14]</sup> 相应序列进行多序列比较，并构建系统树（图 4）。结果显示，在所列的 bHLH 类蛋白中，*PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 基因编码的蛋白与拟南芥已知的类黄酮调控转录因子 III f 亚族 AtbHLH1、AtbHLH2、AtbHLH12 和 AtbHLH42 蛋白<sup>[15]</sup> 同源性较高，聚为一支，说明本研究克隆得到的 *PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 有可能参与牡丹花瓣花青素合成的调控。*PsbHLH3* 编码的蛋白与拟南芥 AtbHLH12（AtMYC1）编码的蛋白同源性最高，这说明 *PsbHLH3* 是 AtMYC1 在牡丹中的一个同源基因。而 *PsbHLH2* 基因编码的蛋白与拟南芥 AtbHLH3 蛋白同源性最高。



图4 牡丹‘洛阳红’*PsbHLHs*基因编码蛋白与拟南芥bHLH蛋白AtbHLH1 ~ AtbHLH70的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of deduced amino acid sequences of *PsbHLHs* genes in *P. suffruticosa* ‘Luoyang Hong’ with AtbHLH1 ~ AtbHLH70

根据拟南芥 bHLH 进化树的结果,将 PsbHLH1 和 PsbHLH3 与其他物种参与类黄酮代谢调控的 13 个 bHLH 转录因子成员: 拟南芥 AtGL3 (NP\_680372)、AtEGL3 (NP\_176552)、AtMYC1 (NP\_191957)、AtTT8 (CAC14865), 苹果 (*Malus × domestica*) MdbHLH3 (ADL36597)、MdbHLH33 (DQ266451), 葡萄 VvMYC1 (ACC68685)、VvMYCA1 (ABM92332), 矮牵牛 (*Petunia hybrida*) PhAN1 (AAG25928)、PhJAF13 (AAC39455), 金鱼草 (*Antirrhinum majus*) AmDelila (AAA32663), 云南红梨 (*Pyrus pyrifolia*) PybHLH (ADN52335), 牵牛 (*Ipomoea nil*) InbHLH (BAE94394) 进行多序列比较, 并构建系统树 (图 5)。结果显示, 所有序列被分为两大支。其中, PsbHLH1 与 MdbHLH3、VvMYC1 等聚为一支, 而 PsbHLH3 与 AmDelila、PhJAF13 聚为另一支。

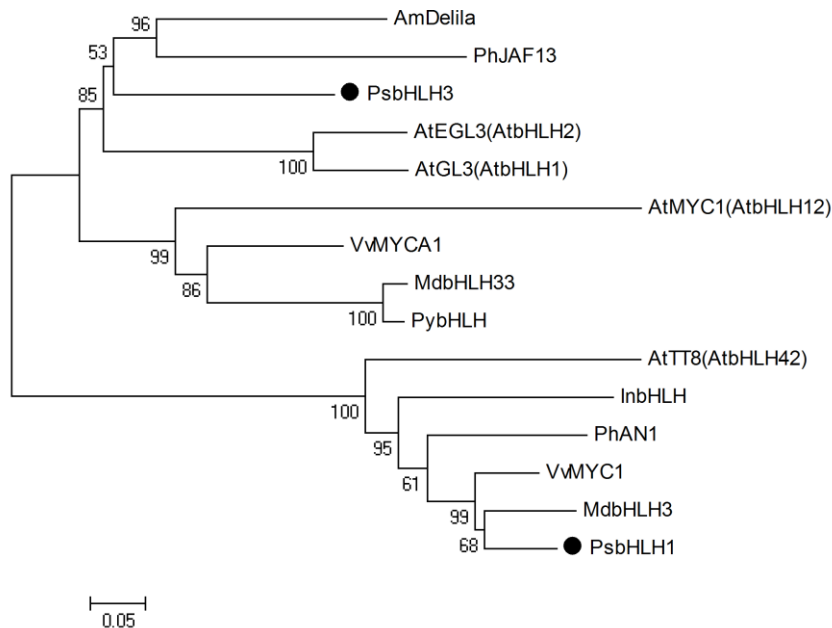


图 5 PsbHLH1 和 PsbHLH3 与其他花青素苷合成 bHLH 转录因子系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of PsbHLH1 and PsbHLH3 with other bHLH transcription factors involved in anthocyanin biosynthesis

### 3 讨论

bHLH 转录因子因含有 bHLH 结构域而得名, 是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重要的作用<sup>[16]</sup>。bHLH 结构域约含 60 个氨基酸, 由一个能与 DNA 结合的碱性区域 (Basic region) 和  $\alpha$  螺旋 1-环- $\alpha$  螺旋 2 (Helix1-Loop-Helix2) 组成<sup>[17]</sup>。本研究分离得到的 *PsbHLH1*、*PsbHLH2* 和 *PsbHLH3* 基因所推测编码的蛋白序列也具有 bHLH 结构域 (图 3), 表明牡丹 *PsbHLH1*、*PsbHLH2* 和 *PsbHLH3* 基因为 bHLH 类转录因子基因。

bHLH 转录因子家族成员众多, 各成员功能复杂多样, 目前植物中该家族的研究不是特别深入, 相关研究报道主要集中于拟南芥和水稻这两个模式植物中。bHLH 转录因子参与多种植物生命活动, 如植物逆境胁迫响应<sup>[18-19]</sup>、油菜素类固醇信号转导<sup>[20]</sup>、雄蕊和花粉粒发育<sup>[21-22]</sup>、类黄酮生物合成<sup>[23]</sup>等, 其中调节类黄酮和花青素合成是植物 bHLH 转录因子最重要的功能之一。本研究分离得到 3 个 bHLH 基因中, *PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 基因所翻译的蛋



白序列分别与调控花青素苷合成的 bHLH 蛋白同源性较高, 如苹果 MdbHLH3<sup>[24]</sup>、葡萄 VvMYC1<sup>[25]</sup>、金鱼草 AmDelila<sup>[26]</sup>和矮牵牛 PhJAF13<sup>[27]</sup>, 推测 *PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 基因可能参与调控牡丹花青素的生物合成。本研究分离得到 3 个 *bHLH* 基因生物学功能还需后续工作进行阐明, 如探究其表达规律、转化模式植物研究基因功能等。

## 4 结论

本研究利用已构建的牡丹花瓣转录组数据库, 结合 RT-PCR 技术, 获得 3 个 *bHLH* 基因 *PsbHLH1*、*PsbHLH2* 和 *PsbHLH3* 的 cDNA 序列。根据牡丹 *PsbHLH1*、*PsbHLH2* 和 *PsbHLH3* 基因所编码蛋白的序列和同源性分析, 推测 *PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 基因可能参与调控牡丹花青素的生物合成。

## [参考文献] (References)

- [1] Mol J, Grotewold E, Koes R. How genes paint flowers and seeds [J]. Trends Plant Sci, 1998, 3(6): 212-217.
- [2] Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways [J]. Curr Opin Biotech, 2008, 19(2): 190-197.
- [3] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 1071-1083.
- [4] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(2): 63-70.
- [5] Fan C, Purugganan M D, Thomas D T, Wiegmann B M. Heterogeneous evolution of the Myc-like Anthocyanin regulatory gene and its phylogenetic utility in Cornus L.(Cornaceae) [J]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 33(3): 580-594.
- [6] Bailey P C, Martin C, Toledo-Ortiz G, Quail P H, Huq E, Heim M A, Jakoby M, Werber M, Weisshaar B. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in Arabidopsis thaliana [J]. Plant Cell, 2003, 15(11): 2497-2502.
- [7] Li X, Duan X, Jiang H, Sun Y, Tang Y, Yuan Z, Guo J, Liang W, Chen L, Yin J. Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [8] Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, Koes R. anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes [J]. Plant Cell, 2000, 12(9): 1619-1631.
- [9] Quattrocchio F, Wing J F, Leppen H T, Mol J N, Koes R E. Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes [J]. Plant Cell, 1993, 5(11): 1497-1512.
- [10] Goodrich J, Carpenter R, Coen E S. A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species [J]. Cell, 1992, 68(5): 955-964.
- [11] 赵莉. bHLH 同源基因的表达对菊花花色的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [12] 郭闻文, 董丽, 王莲英, 陈瑞修, 刘爱青. 几个牡丹切花品种的采后衰老特征与水分平衡研究 [J]. 林业科学, 2004, 40(4): 89-93.
- [13] 孟丽, 周琳, 张明姝, 戴思兰. 一种有效的花瓣总 RNA 的提取方法 [J]. 生物技术, 2006, 16(1): 38-40.
- [14] Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail P H. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. Plant Cell, 2003, 15(8): 1749-1770.
- [15] Heim M A, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey P C. 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.
- [16] 王勇, 陈克平, 姚勤. bHLH 转录因子家族研究进展 [J]. 遗传, 2008, 30(7): 821-830.
- [17] Ma P, Rould M A, Weintraub H, Pabo C O. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation [J]. Cell, 1994, 77(3): 451-459.
- [18] Jiang Y, Yang B, Deyholos M K. Functional characterization of the Arabidopsis bHLH92 transcription factor in abiotic stress [J]. Mol Genet Genomics, 2009, 282(5): 503-516.
- [19] Jiang Y, Deyholos M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes [J]. BMC Plant Biol, 2006, 6(1): 25.
- [20] Friedrichsen D M, Nemhauser J, Muramitsu T, Maloof J N, Alonso J, Ecker J R, Furuya M, Chory J. Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth [J]. Genetics, 2002, 162(3): 1445-1456.
- [21] Heisler M, Atkinson A, Bylstra Y H, Walsh R, Smyth D R. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein [J]. Development, 2001, 128(7): 1089-1098.
- [22] Sorensen A M, Kr ber S, Unte U S, Huijser P, Dekker K, Saedler H. The Arabidopsis ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor [J]. Plant J, 2003, 33(2): 413-423.

- 235 [23] Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L. The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(10): 1863-1878.
- [24] Xie X B, Li S, Zhang R F, Zhao J, CHEN Y C, Zhao Q, Yao Y X, You C X, Zhang X S, Hao Y J. The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low
- 240 temperature in apples [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(11): 1884-1897.
- [25] Hichri I, Heppel S C, Pillet J, L6on C, Czemmel S, Delrot S, Lauvergeat V, Bogs J. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine [J]. *Mol Plant*, 2010, 3(3): 509-523.
- [26] Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. *Plant J*, 1991, 1(1): 37-49.
- 245 [27] Quattrocchio F, Wing J F, Va K, Mol J N, Koes R. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes [J]. *Plant J*, 1998, 13(4): 475-488.