



引用格式: 王悦, 王梦迪, 晁跃辉. 蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 基因克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 西北植物学报, 2024, 44(6): 0920-0929.
[WANG Y, WANG M D, CHAO Y H. Cloning, subcellular localization, and expression analysis of *MtbHLH25* gene in *Medicago truncatula* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(6): 0920-0929.] DOI: 10.7606/j.issn.1000-4025.20230787

蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 基因克隆、 亚细胞定位及表达分析

王悦, 王梦迪, 晁跃辉*

(北京林业大学 草业与草原学院, 北京 100083)

摘要 【目的】bHLH 转录因子数量众多, 能够广泛参与植物的生长发育和逆境胁迫等过程。试验以蒺藜苜蓿 R108 为材料, 克隆 *MtbHLH25* 基因并探究其功能, 为研究蒺藜苜蓿 bHLH 转录因子的功能提供帮助。【方法】通过 PCR 扩增技术从蒺藜苜蓿中克隆 *MtbHLH25* 基因和启动子, 构建酵母表达载体, 并用 LiAc 转化法转移到 Y2H Gold 酵母菌株中进行酵母自激活检测, 构建亚细胞定位载体, 并通过冻融法转入农杆菌 EHA105, 菌液注射到烟草下表皮细胞后, 用 SP8 激光共聚焦显微镜观察, 通过实时荧光定量 PCR 技术研究 *MtbHLH25* 基因的时空表达水平。【结果】(1) 从蒺藜苜蓿中克隆出 *MtbHLH25* 基因和启动子, 该基因总长 882 bp, 共编码 293 个氨基酸。启动子序列分析表明其包含 ABA、MeJA、GA 和 SA 等响应元件。(2) *MtbHLH25* 蛋白与蚕豆和长柔毛野豌豆中 bHLH 蛋白高度同源。(3) *MtbHLH25* 蛋白定位于细胞核。(4) 酵母自激活检测结果显示 *MtbHLH25* 蛋白具有自激活活性。(5) *MtbHLH25* 在蒺藜苜蓿根、茎、叶、花和果实中均有表达, 其中在根中表达水平最高; 外源 SA、MeJA、ABA、GA 以及盐胁迫使 *MtbHLH25* 基因表达量都呈下降趋势, 表明 SA、MeJA、ABA、GA 以及盐胁迫对 *MtbHLH25* 基因表达起负调控作用。干旱胁迫能够显著诱导 *MtbHLH25* 基因表达量上调, 说明该转录因子在干旱胁迫中起正调控作用。【结论】*MtbHLH25* 基因对盐胁迫敏感, 在干旱胁迫中发挥正调控作用; *MtbHLH25* 蛋白具有自激活活性, 对下游启动子调控的报告基因具有激活作用。

关键词 *MtbHLH25*; 蒺藜苜蓿; 激素调节; 转录自激活

中图分类号 Q781; Q786; S541 **文献标志码** A

Cloning, subcellular localization, and expression analysis of *MtbHLH25* gene in *Medicago truncatula*

WANG Yue, WANG Mengdi, CHAO Yuehui*

(College of Grassland Industry and Grassland, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract [Objective] bHLH transcription factors are numerous and widely participate in plant growth, development, and stress responses. The experiment used *Medicago truncatula* R108 as the material to clone the *MtbHLH25* gene and preliminarily explored its function, which will help to further study the function of *M. truncatula* bHLH transcription factors. [Methods] *MtbHLH25* gene and its promoter

收稿日期: 2023-12-08; 修改稿收到日期: 2024-01-12

基金项目: 内蒙古草业技术创新中心有限公司项目 (CCPTZX2023B04)

作者简介: 王悦 (1999—), 女, 在读硕士生, 主要从事草类植物遗传育种研究。E-mail: wxdwang2022@163.com

* 通信作者: 晁跃辉, 副教授, 硕士生导师, 主要从事草类植物遗传育种研究。E-mail: chaoyuehui@bjfu.edu.cn

were cloned from *M. truncatula* using PCR technology. Yeast expression vector was constructed and transferred to Y2H Gold yeast strain using LiAc transformation method. Vectors for subcellular localization assays were constructed and transferred into *Agrobacterium* EHA105 through freeze-thaw method. The *Agrobacterium* was injected into tobacco epidermal cells and gene expression was observed using SP8 laser confocal microscopy. The spatiotemporal expression of *MtbHLH25* in *M. truncatula* was observed using fluorescence quantitative PCR technology. [Results] The *MtbHLH25* gene and its promoter were cloned from *M. truncatula* with 882 bp, encoding 293 amino acids. Promoter analysis revealed that it contains ABA response elements, MeJA response elements, GA response elements, and SA response elements. (2) The evolutionary tree showed that the *MtbHLH25* protein was highly homologous with the bHLH proteins in *Vicia faba* and *V. villosa* Roth. (3) The *MtbHLH25* protein was localized in the nucleus. (4) The yeast self-activation test showed that the *MtbHLH25* protein has self-activation activity. (5) *MtbHLH25* was expressed in roots, stems, leaves, flowers, and fruits of *M. truncatula*, with the highest expression in roots. Exogenous SA, MeJA, ABA, GA, and salt stress decreased the expression of *MtbHLH25*, indicating that SA, MeJA, ABA, GA, and salt stress had a negative regulatory effect on the expression of *MtbHLH25*. Drought stress increased the expression of *MtbHLH25*, indicating that this transcription factor might play a positive role in drought stress. [Conclusion] The *MtbHLH25* gene may be sensitive to salt stress and play a positive regulatory role in drought stress. The *MtbHLH25* protein has self-activating activity and may have an activating effect on the downstream reporter genes.

Key words *MtbHLH25*; *Medicago truncatula*; hormonal regulation; transcription of autoactivation

bHLH(basic helix-loop-helix, bHLH)蛋白属于由碱性氨基酸区域(basic region)和螺旋-环-螺旋区域(helix-loop-helix region)2个相连的基本亚区构成(约60个氨基酸残基)的转录因子超家族^[1]。碱性氨基酸区域位于结构域的N端,主要负责识别DNA上的顺式作用元件E-box和G-box,可以调控基因的转录。HLH区域位于结构域的C端,主要负责蛋白与蛋白之间的互作,促进形成同型或异型二聚体,进而调控下游靶基因的表达^[2-3]。

bHLH蛋白在真核生物中分布广泛,对其生长发育和代谢起到重要的调控作用^[4]。在植物体内, bHLH转录因子能够参与生长发育相关的信号转导及各种代谢合成途径,并在特定的时间发挥重要作用^[5]。

现有研究表明, bHLH转录因子能够参与茉莉酸信号转导^[6]、脱落酸信号转导^[7]、花青素合成以及赤霉素合成等过程^[8]。例如, Hong等^[9]发现拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) bHLH类转录因子MYC2能够诱导茉莉酸的表达。Xu等^[10]发现bHLH转录因子可以协同MYB转录因子和WD40转录因子调控花青素的合成。

另有研究表明, bHLH转录因子在植物的逆境响应方面也具有重要作用。例如, 张子佳等^[11]根据水稻(*Oryza sativa*)抗旱全基因组基因芯片分析, 筛选出了22个与干旱胁迫相关的bHLH基因。Liang等^[12]发现三叶橙(trifoliate orange) *PtrbHLH66*基

因可以通过介导根系生长和清除ROS增强植物的抗旱性。Zhao等^[13]通过*AhbHLH121*基因在拟南芥中过表达和基因沉默, 证明*AhbHLH121*基因可以提高拟南芥耐盐性。

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)属于豆科1年生牧草植物。因其倍性小($2n=16$), 基因组较小(454~526 Mb), 且自花授粉、生育周期短(80~100 d), 已经成为研究豆科的模式植物^[14]。研究表明, bHLH转录因子在蒺藜苜蓿生长发育、逆境胁迫及代谢合成等方面同样发挥重要作用。例如, 陈云等^[15]通过处理干旱条件下以及恢复浇水后蒺藜苜蓿根与芽中的bHLH基因表达情况, 证明*MtbHLH6*、*MtbHLH32*等6个基因具有一定的抗旱能力。干旱和盐胁迫等逆境胁迫是影响草本植物生长发育的重要影响因素, 植物在应对逆境胁迫过程中会产生各种次生代谢物, 这些次生代谢物的合成往往与植物激素密切相关^[16-17]。

陈景鲜等^[18]发现*PqbHLH25*可能参与MeJA反应机制, 并在人参(*Panax quinquefolius*)皂苷Re生物合成途径发挥正调控作用。目前, 在蒺藜苜蓿中鲜见关于*MtbHLH25*基因的报道, 因此本试验对蒺藜苜蓿*MtbHLH25*基因和启动子进行克隆、生物信息学分析、亚细胞定位、转录自激活检测并结合实时荧光定量表达分析, 初步探讨*MtbHLH25*基因的功能, 为进一步探究蒺藜苜蓿bHLH转录因子的功能提供帮助。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所需材料为野生型蒺藜苜蓿 R108,保存于北京林业大学草业与草原学院分子实验室;Master Assembly 无缝连接酶、克隆载体 pMD19-T、大肠杆菌感受态 DH5 α 和限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sma* I 于 TAKARA 公司购买;DNA marker DL 5000 于北京艾克瑞生物技术有限公司购买;植物总 RNA、DNA 和质粒提取试剂盒、DNA 凝胶电泳纯化试剂盒于 OMEGA 公司购买;ABA、MeJA、GA、SA、利福平和卡那霉素于 Sigma 公司购买;2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 购于诺唯赞公司;荧光定量 UltraSYBR

Mixture 订购于康为公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计

用 Primer Premier 5.0 软件设计所需要的引物,其中引物 *bHLH25*-F/R 和 *bHLH25p*-F/R 分别用于克隆 *MtbHLH25* 基因和 *MtbHLH25* 启动子,通用引物 M13-F/R 用于检测构建的克隆载体。引物 3302Y-*bHLH25*-F/R 和 BD-*bHLH25*-F/R 用于 3302Y-*bHLH25* 和 BD-*bHLH25* 表达载体构建,3302Y-F/R 和 T7 promoter、3'BD 分别用于检测上述植物表达载体的构建。引物 RT-*Mtact*-F/R 和 RT-*bHLH25*-F/R 分别用于内参基因 *MtActin* 及目标基因 *Mt-bHLH25* 荧光定量 PCR 检测,引物序列见表 1。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Primer names and sequences

引物名称 Prime name	序列 Sequence (5'→3')
<i>bHLH25</i> -F	GCTCCTCTAGTTCCCATCAAAGA
<i>bHLH25</i> -R	TATGACGAAATTCTAACCCTGAC
<i>bHLH25p</i> -F	GGGCTACCATAGATAGCAGAGCA
<i>bHLH25p</i> -R	TGTTGATGATGACAAAGGCAAAG
3302Y- <i>bHLH25</i> -F	GAACACGGGGGACTCTTGACCATGGAGGAGAATCCATGGGG
3302Y- <i>bHLH25</i> -R	ACGCGTACTAGTCAGATCTACGATATGAAATTGCACATTAT
BD- <i>bHLH25</i> -F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCGAGGAGAATCCATGGGGCAA
BD- <i>bHLH25</i> -R	CTGCAGGTCGACGGATCCCCTTAGATATGAAATTGCACAT
RT- <i>Mtact</i> -F	TGATCTGGCTGGTCGTGACCTTA
RT- <i>Mtact</i> -R	ATGCCTGCTGCTTCCATTCTTAT
RT- <i>bHLH25</i> -F	CCTCGAAACACTTCGGATACACT
RT- <i>bHLH25</i> -R	CAATGATCCTGCATCTTTCTTCTTA
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGG
3'BD	TTTTCGTTTAAAACCTAAGAGTC
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC

1.2.2 *MtbHLH25* 基因和启动子的克隆

选取在盆栽中种植的长势优良的蒺藜苜蓿植株叶片,按照 RNA 提取试剂盒步骤提取叶片总 RNA,将其反转录为 cDNA,用引物 *bHLH25*-F/R 扩增 *Mt-bHLH25* 基因。反应产物经凝胶成像后用 DNA 电泳纯化试剂盒回收。将纯化产物与克隆载体 pMD19-T 连接,并将其转化至大肠杆菌感受态 DH5 α 中,吸取转化后的菌液涂布于 LB 固体培养基(含 50 mg/L 氨苄青霉素)上,倒置培养于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 12 h。挑取单克隆菌落,菌落富集后进行 PCR 菌体检测并将

菌液测序验证。同样选取盆栽中长势优良的蒺藜苜蓿植株叶片,提取蒺藜苜蓿 DNA。利用引物 *bHLH25p*-F/R 对 *MtbHLH25* 基因启动子进行扩增,后续反应同上述 *MtbHLH25* 基因克隆。

1.2.3 表达载体构建

通过试剂盒提取测序结果正确的上述菌液质粒 pMD19-*MtbHLH25*,用 3302Y-*bHLH25*-F/R 和 BD-*bHLH25*-F/R 为引物分别对目的基因进行扩增,将 PCR 产物经琼脂糖电泳进行条带鉴别,符合预期条带的 PCR 产物采用 DNA 电泳纯化试剂盒回收。

用 *Nco* I 和 *Sma* I 分别在 37 ℃, 15 min 和 30 ℃, 15 min 条件下将表达载体 3302Y 和 pGBKT7 进行酶切, 通过 2×Master Assembly 无缝连接酶连接纯化后的 PCR 产物与酶切产物, 进行大肠杆菌转化后将菌液涂布于 LB 固体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)上, 于 37 ℃ 培养箱中倒置培养 12 h。挑取单克隆菌落进行 PCR 菌体检测并测序验证。

1.2.4 *MtbHLH25* 基因的生物信息学分析

在 https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html 网站预测 *MtbHLH25* 蛋白二级结构, 在 SOPMA(<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 *MtbHLH25* 蛋白三级结构, 用 Cell-PLoc 软件预测 *MtbHLH25* 蛋白胞内定位。在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 数据库中查询与蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 蛋白同源序列, 在 MEGA11 软件上用最大似然法构建蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 同源蛋白系统进化树。

1.2.5 亚细胞定位

将 3302Y-*bHLH25* 质粒通过冻融法转入农杆菌 EHA105^[19], 将转化后的菌液分别涂布于含 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 于 28 ℃ 培养箱中倒置培养 2 d。挑取单克隆菌落, 摇菌后将菌液进行 PCR 检测并测序验证。将测序结果正确的 3302Y-*bHLH25* 农杆菌菌液加入 50 mL LB 溶液(含 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素), 在培养箱中避光振荡 1~2 d, 测其 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 将其用重悬液重悬后, 用注射器将菌液注射到在花盆中健康生长 1 个月左右的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 叶片下表皮细胞中, 注射后将烟草避光培养 48 h, 将注射菌液的叶片制作玻片, 将玻片倒置在 SP8 激光共聚焦显微镜下, 调节激发光波长为 488 nm, 根据烟草叶片中 GFP 荧光信号的分布情况确定目的基因所在位置。

1.2.6 酵母的转化及自激活检测

对已测序正确的大肠杆菌菌液进行质粒提取, 得到 pGBKT7-*bHLH25* 质粒, 用 LiAc 转化法, 将 pGBKT7-*bHLH25* 转移到 Y2H Gold 酵母菌株中, 将 pGBKT7-*bHLH25* 在 SD/-Trp 培养基上涂布均匀, 于 30 ℃ 的酵母培养箱中培养 2~3 d, 挑取单克隆菌落并进行验证。将测序结果正确的 pGBKT7-*bHLH25* 单克隆酵母菌落在 SD/-Trp 液体培养基中进行菌落富集, 然后稀释 10 倍、100 倍, 分别在

SD/-Trp、SD/-Trp/X-α-Gal 和 SD/-Trp/X-α-Gal/AbA 3 种固体培养基上滴入 10 μL 酵母菌液, 在 30 ℃ 培养箱中培养 2~3 d, 观察酵母菌的生长状况。

1.2.7 表达分析

选择在花盆中生长良好的 2 个月大的蒺藜苜蓿, 取其根、茎、叶、花和果实并立即经液氮速冻。以谢宏的方法为参考^[20], 用 10 μmol/L ABA、0.5 mmol/L SA、10 μmol/L GA 和 10 μmol/L MeJA 分别均匀地喷洒在叶片表面, 用 200 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L PEG6000 溶液分别浇灌蒺藜苜蓿进行诱导, 在处理第 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 h 采集植株叶片, 并立即将叶片经液氮速冻, 按照 RNA 提取试剂盒方法提取各组织和处理后叶片的 RNA, 将其反转录为 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 反应, 用 2^{-ΔΔC_T} 法处理所得到的数据。

2 结果与分析

2.1 *MtbHLH25* 基因和启动子克隆

以蒺藜苜蓿 R108 cDNA 为模板进行扩增, 连接克隆载体 pMD19-T 后转入大肠杆菌, 经 PCR 菌体检测, 然后验证其序列与目的基因序列一致, 说明该基因已被成功克隆。以蒺藜苜蓿 R108 DNA 作为模板进行扩增, 将其进行大肠杆菌转化, 经 PCR 菌体检测并测序, 发现与目标基因 *MtbHLH25* 启动子序列相同, 表明启动子克隆成功。

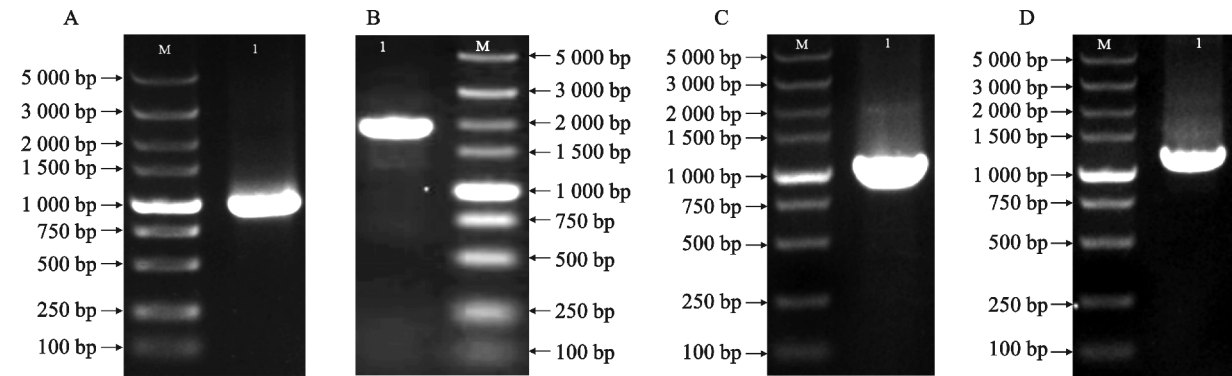
2.2 亚细胞定位载体和酵母表达载体构建

以 pMD19-*MtbHLH25* 质粒为模板进行 PCR 扩增, 将其分别与表达载体 3302Y 和 pGBKT7 连接后转入大肠杆菌, 进行 PCR 菌体检测后(图 1, C、D) 测序, 其序列与目标基因序列相同, 表明亚细胞定位载体 3302Y-*bHLH25* 和酵母表达载体 pGBKT7-*bHLH25* 构建成功。

2.3 *MtbHLH25* 生物信息学分析

通过 PCR 扩增技术得到 *MtbHLH25* 基因开放阅读框为 882 bp, 其编码序列为 293 个氨基酸。通过对 *MtbHLH25* 蛋白二级结构和三级结构预测, 结果(图 2, A、B) 显示, *MtbHLH25* 蛋白包括无规则卷曲、α-螺旋、延伸链和 β-转角 4 个部分, 其中, 无规则卷曲和 α-螺旋的比例最多, 分别达到了 45.73% 和 42.66%。

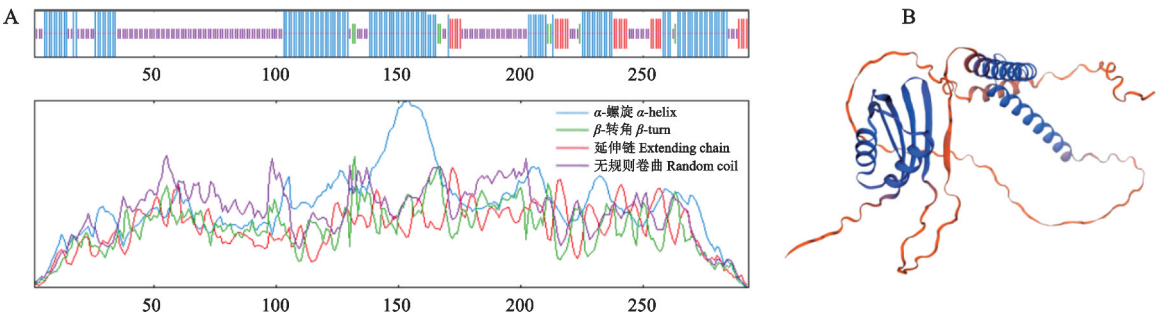
进化树结果分析(图 3) 显示, 蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 蛋白与蚕豆 (*Vicia faba*) 和长柔毛野豌豆 (*Vicia villosa* Roth) 中 bHLH 蛋白高度同源。



A. 蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 基因;B. 蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 启动子;C. 亚细胞定位载体;D. 酵母表达载体。

图 1 目的基因克隆及载体构建 PCR 产物检测

A. *MtbHLH25* gene from *M. truncatula*. B. *MtbHLH25* promoter from *M. truncatula*. C. Subcellular localization vector. D. Yeast expression vector.
Fig. 1 PCR products for target gene cloning and vector construction



A. *MtbHLH25* 蛋白的二级结构;B. *MtbHLH25* 蛋白的三级结构

图 2 *MtbHLH25* 蛋白的结构

A. Secondary structure of the *MtbHLH25* protein. B. Tertiary structure of the *MtbHLH25* protein.

Fig. 2 Structure of the *MtbHLH25* protein

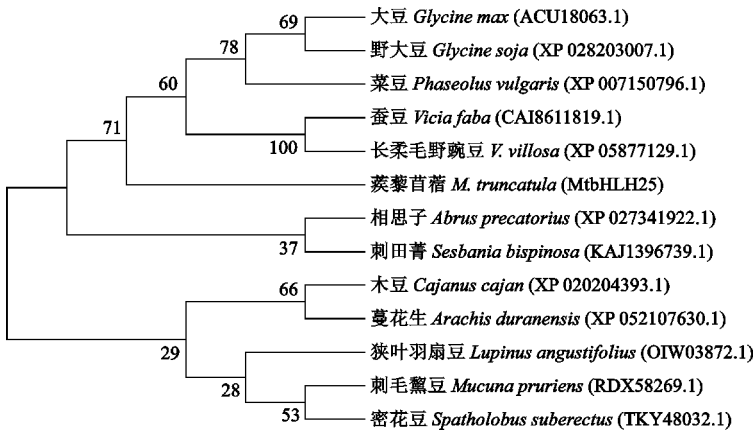


图 3 *MtbHLH25* 蛋白的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of the *MtbHLH25* protein

2.4 亚细胞定位

将 3302Y 空载和构建好的 3302Y-*bHLH25* 载体分别转入农杆菌 EHA105 后注射到烟草中,用 SP8 激光聚焦显微镜观察瞬时转化后的烟草表皮细

胞。结果显示,注射 3302Y 空载的烟草整个细胞都分布绿色荧光,而注射 3302Y-*bHLH25* 载体的烟草只在细胞核中显示绿色荧光,说明 *MtbHLH25* 蛋白定位在细胞核中(图 4)。

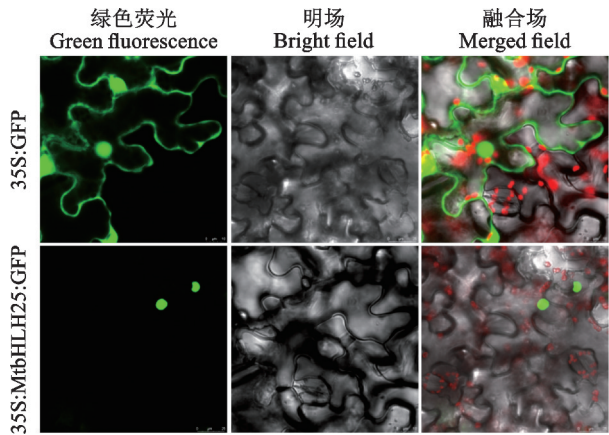


图4 MtbHLH25 蛋白的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization assays of MtbHLH25 protein

2.5 自激活检测

将 pGBKT7-*bHLH25* 转入 Y2H Gold 酵母菌后进行摇菌,将其按不同稀释倍数点板于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 3 种培养基上,结果(图 5)表明,酵母菌在 SD/-Trp 培养基上正常生长,表明 MtbHLH25 蛋白无毒;在 SD/-Trp/X- α -Gal 培养基上,酵母菌变蓝且能够正常生长;在 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 培养基上也变蓝但抑制了酵母菌的正常生长,表明 MtbHLH25 蛋白存在转录自激活活性。

2.6 启动子顺式作用元件预测及表达分析

通过荧光定量技术测定蒺藜苜蓿各组织中 *Mt-bHLH25* 基因的表达量。结果(图 6)表明,*Mt-bHLH25* 基因在蒺藜苜蓿的根、茎、叶、花和果实中均能表达,其中,在蒺藜苜蓿的根和叶中的表达量最高,根中的表达量分别是果实中的 6 251 倍,花中的 2 702 倍,茎中的 2 592 倍,叶中的 630 倍。

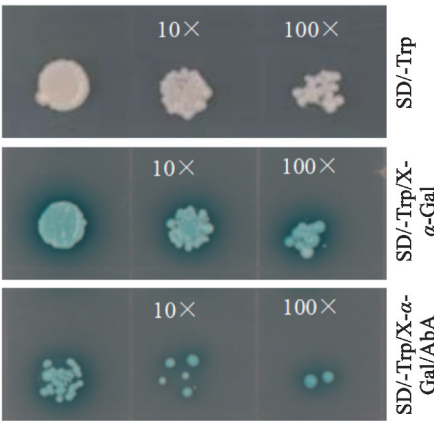
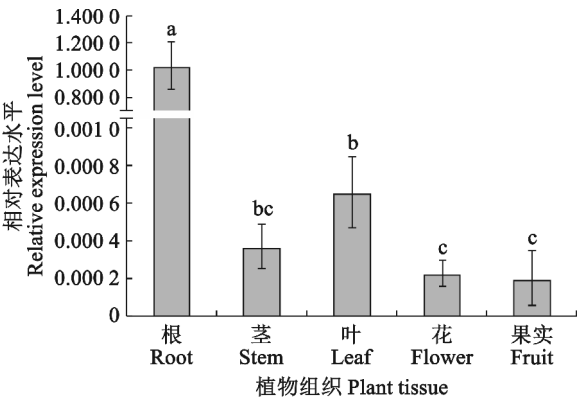


图5 MtbHLH25 蛋白自激活结构域分析

Fig. 5 Activation domain analysis of MtbHLH25 protein

对 *MtbHLH25* 基因启动子区序列预测,并对其功能进行初步分析。发现其包含 ABA、MeJA、GA、SA 等应答元件(表 2)。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

图6 *MtbHLH25* 基因的组织表达分析

Different lowercase letters indicates a significant difference ($P<0.05$). The same as below.

Fig. 6 Tissue expression analysis of *MtbHLH25* gene

表2 *MtbHLH25* 启动子的主要顺式作用元件和功能

Table 2 Main *cis*-acting elements and functions of *MtbHLH25* promoter

元件名称 Element name	基序序列 Motif sequence	数量 Number	功能 Function
ABRE	ACGTG	5	参与脱落酸反应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting elements involved in the abscisic acid reactivity
CGTCA motif	CGTCA	5	参与 MeJA 响应的顺式作用调节元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA responsiveness
G-Box	CACGTT	6	参与光反应的顺式作用调节元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
TCA element	CCATCTTTTT	9	参与水杨酸反应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness
P-Box	CCTTTTG	7	赤霉素反应元件 Gibberellin-responsive element

为探究其对 *MtbHLH25* 基因的作用以及对非生物胁迫的敏感性,对野生型蒺藜苜蓿进行 SA、MeJA、GA、ABA、盐胁迫和干旱胁迫处理,对处理后 0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、9 h 和 12 h 的 *MtbHLH25* 的表达水平进行了检测。图 7 表明,SA 处理后,*Mt-bHLH25* 基因的表达量与 0 h 相比总体呈现下降的趋势,在 6 h 的表达水平最低,仅为 0 h 的 27.28%,说明 SA 可以抑制 *MtbHLH25* 的表达。MeJA 处理后,*MtbHLH25* 基因表达量在 0~12 h 内逐渐降低,在 12 h 达到最低值,是 0 h 的 4.84%。ABA 处

理后,*MtbHLH25* 基因在 12 h 表达量最低,是 0 h 的 7.13%。GA 处理后,*MtbHLH25* 基因在 3 h 表达量最低,是 0 h 的 5.91%,以上结果说明外源激素 MeJA、ABA 及 GA 对 *MtbHLH25* 基因的表达都具有明显的抑制作用。盐胁迫处理后,*MtbHLH25* 基因的表达量迅速下降,在 12 h 表达量达到最低水平,为 0 h 的 1.95%,表明 *MtbHLH25* 基因对盐胁迫敏感。干旱胁迫处理后,*MtbHLH25* 基因表达量在 1 h 表达量最高,是 0 h 的 72 倍,推测 *MtbHLH25* 基因可能在干旱胁迫中发挥积极响应。

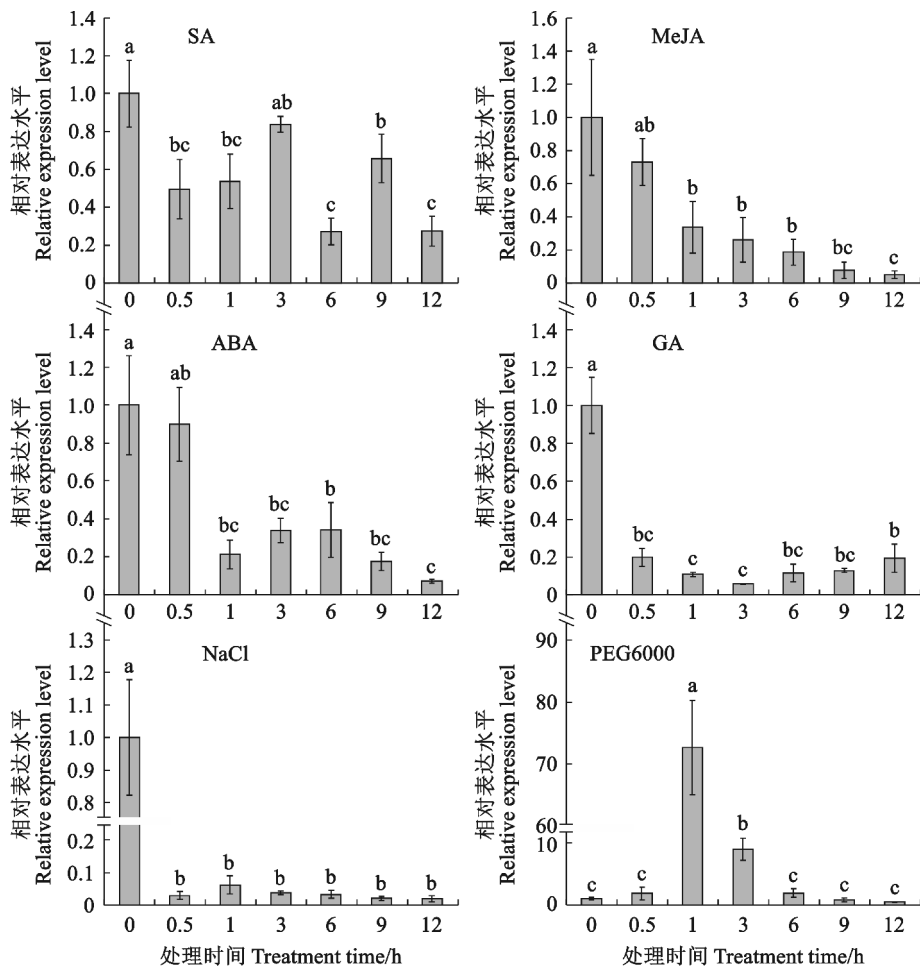


图 7 *MtbHLH25* 基因的表达分析

Fig. 7 Analysis of *MtbHLH25* gene expression

3 讨论

3.1 *MtbHLH25* 基因克隆及生物信息学分析

在本试验中,通过 PCR 扩增技术,成功克隆出蒺藜苜蓿 *MtbHLH25* 基因和启动子,该基因开放阅读框 882 bp,编码序列为 293 个氨基酸。进化树

结果表明,*MtbHLH25* 蛋白与蚕豆和长柔毛野豌豆中 bHLH 蛋白高度同源。亚细胞定位可以确定蛋白质在细胞中的具体存在部位,前人关于 bHLH 转录因子家族的研究结果表明多数 bHLH 转录因子定位于细胞核,如在蒺藜苜蓿、青蒿 (*Artemisia annua*) 以及茶树 (*Camellia sinensis*) 中发现的 Mt-

bHLH148、AabHLH113 和 CsHLH71 等蛋白都定位于细胞核^[16,21-22],在本试验中,亚细胞定位显示 MtHHLH25 蛋白定位于细胞核,此结果与前人的研究结果相同。

3.2 MtHHLH25 蛋白的转录自激活分析

酵母双杂交技术常用于研究蛋白质之间的相互作用,利用诱饵蛋白筛选 cDNA 文库,可以获得与诱饵蛋白互作的候选蛋白^[23-24]。研究表明,诱饵蛋白自身具有转录激活能力,可能会激活其下游启动子调控的报告基因,从而导致假阳性的结果^[23]。通过酵母双杂交自激活实验表明,MtHHLH25 蛋白具有转录自激活活性,因此在利用 MtHHLH25 蛋白进行筛选前,还需对 MtHHLH25 蛋白自激活结构域进行分析。而吕秋谕等^[25]在苦荞(*Fagopyrum tataricum*)中发现 FtbHLH3 蛋白不具有转录激活活性,因此可能通过与其他具有转录激活作用的转录因子互作来调控下游靶基因的表达。

3.3 MtHHLH25 对激素和非生物胁迫的响应

本研究采用实时荧光定量 PCR 技术分析 *Mt-bHLH25* 基因在蒺藜苜蓿组织中的表达量,结果表明 *MtHHLH25* 基因在根、茎、叶、花和果实中均能够表达,但具有组织表达水平的差异性。陈云等^[15]通过从蒺藜苜蓿基因表达芯片中筛选出 109 个 bHLH 的组织表达数据,结果显示 15 个基因在根中优势表达。刘福等^[26]通过 qRT-PCR 分析发现 *LjbHLH34* 基因在日本百脉根(*Lotus japonicus*)的根中表达量最高,使其在转基因拟南芥中过表达,发现转基因拟南芥的根明显增长。吕秋谕等^[25]发现苦荞 *FtbHLH3* 基因在叶中表达量最高,进一步研究发现,*FtbHLH3* 基因在各组织中的表达量与总黄酮含量间表现出极高的正相关。在本试验中,qRT-PCR 结果显示 *Mt-bHLH25* 基因在根和叶中的表达量最高,因此推测 *MtHHLH25* 基因可能在根和叶中发挥作用最大。此外,徐学蕾等^[3]发现 *VvbHLH93* 基因在酿酒葡萄‘赤霞珠’(‘Cabernet Sauvignon’)中的表达同样具有组织表达特异性,但在茎中的表达量最高。可见,不同基因在不同物种组织中的表达同样存在特异性,需要针对物种进行具体分析,本试验结果可以为后续研究 *MtHHLH25* 基因在蒺藜苜蓿中行使的

具体功能提供参考。

植物在应对逆境胁迫过程中,植物激素的变化对其抗逆性起到重要作用^[16-17]。例如,张红瑞等^[27]发现低温、干旱和 ABA 处理对铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)*DobHLH96* 基因的表达均具有明显的诱导作用,并且其表达模式具有相似性,证明 *DobHLH96* 基因可能在 ABA 介导的低温、干旱胁迫响应中发挥重要作用。本试验分别对野生型蒺藜苜蓿进行外源 SA、MeJA、ABA 及 GA 激素诱导,发现 *MtHHLH25* 基因表达量总体都呈现下降趋势,因此推测 *MtHHLH25* 基因可能负向参与 SA、MeJA、ABA 及 GA 信号通路,并可通过相关激素调节影响蒺藜苜蓿的生长发育,但其影响机制还需进一步试验证明。在盐胁迫处理后,*Mt-bHLH25* 基因表达量急剧下降,说明 *MtHHLH25* 基因可能对盐胁迫敏感,而干旱胁迫处理后,*Mt-bHLH25* 基因表达量在 1 h 迅速升高,是 0 h 的 72 倍。研究表明,bHLH 转录因子能够参与植物对干旱胁迫的反应^[12]。例如,鄢梦雨等^[28]将 *SabHLH169* 基因转入拟南芥,在干旱胁迫下 3 个与干旱胁迫相关的基因表达量迅速升高,推测 *SabHLH169* 基因可能具有响应干旱胁迫的功能。在本试验中,干旱胁迫处理后,*MtHHLH25* 基因表达量同样升高,因此推测 *MtHHLH25* 基因可能具有抗旱能力。

4 结 论

(1)从蒺藜苜蓿中成功克隆出 *MtHHLH25* 基因和 MtHHLH25 启动子,*MtHHLH25* 基因长 882 bp,共编码 293 个氨基酸。

(2)亚细胞定位结果显示 MtHHLH25 蛋白定位于细胞核。

(3)酵母双杂交自激活实验表明 MtHHLH25 蛋白具有转录自激活活性。

(4)表达分析结果显示,蒺藜苜蓿 *MtHHLH25* 基因在根中的表达量最高;在 SA、ABA、MeJA 和 GA 诱导下,*MtHHLH25* 基因表达量总体呈现降低的趋势,说明对 *MtHHLH25* 的表达存在抑制作用。盐胁迫和干旱胁迫均能显著诱导 *MtHHLH25* 基因表达,说明该转录因子参与盐胁迫和干旱胁迫响应途径。

参考文献：

- [1] 于冰, 田烨, 李海英, 等. 植物 bHLH 转录因子的研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35(9): 75-80.
- YU B, TIAN Y, LI H Y, *et al.* Research progress of plant bHLH transcription factor[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(9): 75-80.
- [2] 张凯伦, 罗祖良, 郭玉华, 等. bHLH 转录因子调控药用植物萜类化合物生物合成的研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(1): 142-147.
- ZHANG K L, LUO Z L, GUO Y H, *et al.* Research progress on regulation of bHLH transcription factors on biosynthetic pathway of terpenoids in medicinal plants[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2017, 19(1): 142-147.
- [3] 徐学蕾, 鞠延仑, 王婉妮, 等. 酿酒葡萄‘赤霞珠’*Vv*bHLH93 基因的克隆及分析[J]. 西北植物学报, 2022, 42(11): 1844-1850.
- XU X L, JU Y L, WANG W N, *et al.* Cloning and analysis of *Vv*bHLH93 gene in cabernet sauvignon[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(11): 1844-1850.
- [4] SUN X, WANG Y, SUI N. Transcriptional regulation of bHLH during plant response to stress[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(2): 397-401.
- [5] 杜家欢. 紫花苜蓿(*Medicago sativa*) 缺铁相关 bHLH 转录因子的克隆及遗传转化[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2019.
- [6] TAMAOKI M, FREEMAN J L, PILON-SMITS E A H. Co-operative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenium resistance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(3): 1219-1230.
- [7] 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]. *The New Phytologist*, 2014, 201(4): 1192-1204.
- [8] 王翠, 兰海燕. 植物 bHLH 转录因子在非生物胁迫中的功能研究进展[J]. 生命科学研究, 2016, 20(4): 358-364.
- WANG C, LAN H Y. Research progresses on functions of plant bHLH transcription factors involved in abiotic stresses[J]. *Life Science Research*, 2016, 20(4): 358-364.
- [9] HONG G, XUE X, MAO Y, *et al.* *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2635-2648.
- [10] XU W, DUBOS C, LEPINIEC L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(3): 176-185.
- [11] 张子佳, 王迪, 傅彬英. 水稻转录因子 bHLH 家族基因响应环境胁迫表达谱分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 425-431.
- ZHANG Z J, WANG D, FU B Y. Expression patterns of rice bHLH genes responsive to environmental stresses[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(3): 425-431.
- [12] LIANG B B, WAN S G, MA Q L, *et al.* A novel bHLH transcription factor *PtrbHLH66* from trifoliate orange positively regulates plant drought tolerance by mediating root growth and ROS scavenging[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 15053.
- [13] ZHAO X B, WANG Q, YAN C X, *et al.* The bHLH transcription factor *AhbHLH121* improves salt tolerance in peanut[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 256: 128492.
- [14] KANG Y, LI M, SINHAROY S, *et al.* A snapshot of functional genetic studies in *Medicago truncatula*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1175.
- [15] 陈云, 肖春梅, 彭程, 等. 蒺藜苜蓿 bHLH 家族基因进化及干旱胁迫应答分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(9): 2916-2932.
- CHEN Y, XIAO C M, PENG C, *et al.* Evolution and drought stress-responsive analysis of bHLH family gene in *Medicago truncatula*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(9): 2916-2932.
- [16] 袁铭远. *AabHLH113* 整合 JA 和 ABA 信号调控青蒿素生物合成的功能研究[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- [17] ASHAPKIN V V, KUTUEVA L I, ALEKSANDRUSHKINA N I, *et al.* Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(20): 7457.
- [18] 陈景鲜, 卢超, 郑钧屏, 等. 西洋参中 8 个 bHLH 类转录因子的克隆及表达分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(14): 3756-3764.
- CHEN J X, LU C, ZHENG J P, *et al.* Cloning and expression analysis of 8 bHLH transcription factors in *Panax quinquefolius*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, 47(14): 3756-3764.
- [19] 杨浩, 朱延明. 耐碱 *GsCHX19* 基因的克隆及对苜蓿的遗传转化[J]. 作物杂志, 2016(3): 37-44.
- YANG H, ZHU Y M. Isolation of a alkali stress responsive gene *GsCHX19* and transformation into *Medicago sativa* L. [J]. *Crops*, 2016(3): 37-44.
- [20] 谢宏, 周丽莹, 李舒文, 等. 蒺藜苜蓿 *MtCIM* 基因结构和功能分析[J]. 生物技术通报, 2024, 40(1): 262-269.
- XIE H, ZHOU L Y, LI S W, *et al.* Structural and functional analysis of *MtCIM* gene in *Medicago truncatula*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(1): 262-269.
- [21] 王菊萍, 王珍, 张铁军, 等. 蒺藜苜蓿 *MtbHLH148* 转录因

子的克隆与转化及其功能分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39 (6): 963-973.

WANG J P, WANG Z, ZHANG T J, *et al.* Cloning and analysis of a basic Helix-loop-Helix (bHLH) transcription factor MtHLLH148 from *Medicago truncatula* L. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39 (6): 963-973.

[22] 吴应奇, 宋小凤, 邓见田烨, 等. 茶树 *CsbHLH71* 基因克隆及转录活性分析[J]. 西北植物学报, 2023, 43(1): 37-44.

WU Y Q, SONG X F, DENG J T Y, *et al.* Isolation and transcription activation analysis of *CsbHLH71* gene in *Camellia sinensis*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(1): 37-44.

[23] 吕欣, 尹文, 雷迎峰, 等. HCV 截短型 E2 蛋白在酵母双杂交系统中的表达及自激活作用检测[J]. 生物技术, 2008, 18 (5): 9-11.

LÜ X, YIN W, LEI Y F, *et al.* Expression of truncated form of HCV glycoprotein E2 and assay of activation of reporter genes in yeast two-hybrid system[J]. *Biotechnology*, 2008, 18(5): 9-11.

[24] 樊锦涛, 贾娇, 蒋琛茜, 等. 拟南芥转录因子 AtMYB73 转录活性区域分析及互作蛋白的筛选[J]. 中国农业科学, 2014, 47(23): 4754-4762.

FAN J T, JIA J, JIANG C X, *et al.* Regional analysis of transcription activity and screening of interaction proteins of AtMYB73 transcription factor in *Arabidopsis* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(23): 4754-4762.

[25] 吕秋谕, 孙培媛, 冉彬, 等. 苦荞转录因子基因 *FtbHLH3* 的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 生物技术通报, 2023, 39 (8): 194-203.

LÜ Q Y, SUN P Y, RAN B, *et al.* Cloning, subcellular localization and expression analysis of the transcription factor gene *FtbHLH3* in *Fagopyrum tataricum*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(8): 194-203.

[26] 刘福, 陈诚, 张凯旋, 等. 日本百脉根 *LjbHLH34* 基因克隆及耐旱功能鉴定[J]. 草业学报, 2023, 32(1): 178-191.

LIU F, CHEN C, ZHANG K X, *et al.* Cloning and identification of drought tolerance function of the *LjbHLH34* gene in *Lotus japonicus*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32 (1): 178-191.

[27] 张红瑞, 理雅, 于白音, 等. 铁皮石斛 *DobHLH96* 基因克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(1): 63-70.

ZHANG H R, LI Y, YU B Y, *et al.* Cloning and expression analysis of *DobHLH96* gene from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(1): 63-70.

[28] 鄢梦雨, 韦晓薇, 曹婧, 等. 异子蓬 *SabHLH169* 基因的克隆及抗旱功能分析[J]. 生物技术通报, 2023, 39(11): 328-339.

YAN M Y, WEI X W, CAO J, *et al.* Cloning of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor gene *SabHLH169* in *Suaeda aralocaspica* and analysis of its resistances to drought stress[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(11): 328-339.