

小麦 bHLH 家族转录因子的鉴定及其在盐胁迫条件下的表达分析

吕宝莲^{1,2} 杨宇昕² 崔立操² 史峰³ 马亮³ 孔秀英² 张立超² 倪志勇¹

(¹新疆农业大学生命科学学院, 830052, 新疆乌鲁木齐; ²中国农业科学院作物科学研究所, 100081, 北京; ³石家庄市农林科学研究院, 050041, 河北石家庄)

摘要 碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子作为植物中第二大类转录因子家族, 在植物生长发育、信号传导、生物合成以及响应非生物胁迫等方面发挥重要功能。为了探讨小麦 bHLH 转录因子在盐胁迫应答中的功能, 以冬性小麦科农 199 为试验材料, 通过转录组测序和生物信息学分析的方法对小麦 bHLH 转录因子在盐胁迫下的表达特性进行系统分析。结果表明, 小麦中共有 489 个 bHLH 转录因子, 分布在 21 条染色体上; 构建系统进化树将 bHLH 家族进一步划分为 9 个亚族, 其中 VI 亚族成员最多, IV 亚族成员最少; 盐胁迫下小麦根转录组测序结果表明, 在盐胁迫处理后 1 和 6h 差异表达基因 (DEG) 共有 44 个, 其中上调表达的基因有 17 个, 下调表达的有 27 个; GO 分析表明, DEG 富集在水、盐胁迫、生长素调节等方面; KEGG 注释分析表明, DEGs 主要富集在淀粉和蔗糖代谢途径以及氨基酸和核苷酸糖代谢等信号通路; 对部分 DEG 进行 qRT-PCR 验证, 结果表明 DEG 的表达模式与转录组测序结果一致, 证明了 RNA-Seq 结果的准确性。

关键词 小麦; bHLH 转录因子; 盐胁迫; 生物信息学分析

植物在生长过程中经常受到非生物胁迫, 如干旱、热、冷、营养缺乏和土壤中过量盐或有毒金属, 这些非生物胁迫限制了世界范围内耕地的利用, 并对作物生产力产生了负面影响^[1]。土壤盐渍化是现代农业面临的主要问题之一, 不仅会引起离子毒性和渗透胁迫, 还会导致植物缺乏养分, 严重影响植物生长发育, 进而影响品质及产量。与其他仅影响作物某一特定时期的胁迫不同, 盐胁迫会贯穿作物的整个生命周期^[2]。因此, 了解植物如何感知盐胁迫信号并适应不利环境条件至关重要。在植物长期进化过程中, 已形成一套响应盐胁迫的调控机制。当受到盐胁迫时, 植物首先在基因转录水平上进行调控, 然后通过控制代谢合成进行调节, 应对逆境带来的损伤。随着高通量测序技术的快速发展, 转录组测序已成为研究基因差异表达的重要手段^[3], 对在转录水平揭示植物响应盐胁迫的调控机制具有重要意义。

转录因子是真核生物中广泛存在的一类功能蛋白因子, 在植物响应盐胁迫过程中发挥重要作用。转录因子可以识别并结合基因启动子区域中的顺式作用元件, 并通过调控下游基因的表达来发挥

功能^[4]。碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子含有 2 个高度保守但功能不同的结构域, 分别是碱性结构域和螺旋-环-螺旋结构域, 其中位于 bHLH 结构域 N 端的碱性结构域通过结合下游基因启动子上的 G-box 或 E-box 基序直接调控下游基因的表达; 而位于 C 端的螺旋-环-螺旋结构域则依赖疏水氨基酸的相互作用, 促进蛋白质形成同源或异源二聚体来行使功能^[5]。

研究表明, bHLH 转录因子在响应盐胁迫方面发挥重要功能。在盐胁迫下, 甜菜 *BvbHLH93* 基因在根和叶中的表达量显著上调^[6]; 高盐下, 水稻 *OsbHLH148* 的转录水平会迅速提高^[7]。除此之外, bHLH 转录因子是植物盐胁迫的正调控因子。对转基因烟草进行表型分析发现, 过表达 *NtbHLH123* 基因可增强烟草对盐胁迫的抗性, 而 *NtbHLH123* 沉默则植株对盐胁迫的耐受性降低, 表明 *NtbHLH123* 正调控烟草耐盐性^[8]; 对 *ZmbHLH91* 过表达植株进行高盐处理, 发现转基因植株具有更好的生长状态和绿叶率, 另外, 在胁迫处理后, 转基因植株过氧化物酶 (POD) 具有更高的活性, 说明 *ZmbHLH91* 在高盐以及渗透胁迫中可能是一个

作者简介: 吕宝莲, 主要从事小麦基因资源挖掘与利用, E-mail: 18099270656@163.com

倪志勇为通信作者, 主要从事植物逆境分子生物学, E-mail: nizhiyong@126.com; 张立超为共同通信作者, 主要从事小麦基因资源挖掘与利用, E-mail: zhanglichao@caas.cn

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (2021A02001-3)

收稿日期: 2022-11-07; 修回日期: 2023-11-23; 网络出版日期: 2023-12-07

正向的胁迫响应因子，可能通过提高 POD 活性，清除植物体内过氧化物来提高抗逆性^[9]；在小麦中，过表达 *TabHLH39* 可提高植物对高盐处理的抗性^[10]。盐胁迫下，葡萄 *VvbHLH1* 的过表达会导致类黄酮生物合成路径、脱落酸信号通路和胁迫反应等相关基因的上调表达，推测 *VvbHLH1* 可能通过调控黄酮类化合物含量来增强植株耐盐性^[11]；拟南芥 *AtbHLH112* 通过与 E-box 和 GCG-box 基序结合，调控非生物胁迫相关基因的表达，以增加脯氨酸含量、减少活性氧积累和水分流失来提高抗盐能力^[12]。

本研究利用 RNA-Seq 方法对盐胁迫处理前后的科农 199 幼苗根系进行转录组测序，鉴定小麦根系响应盐胁迫应答基因，并分别对差异表达基因（differentially expressed gene, DEG）进行 GO 分析和 KEGG 注释和富集分析，从转录水平揭示小麦 bHLH 转录因子响应盐胁迫的分子机制，进一步筛选小麦 bHLH 转录因子耐盐相关基因，为解析小麦耐盐性状的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以中国农业科学院作物科学研究所提供的冬小麦品种科农 199 为材料，其根系发达，尤其生育后期根系活力强，具有较强吸收深层土壤水分养分的能力，适应性强，抗逆能力强。采用水培法进行培养，培养条件为光照 16 h、黑暗 8 h、22 °C 下水培养 4 d。用花无缺营养液培养至两叶一心时期后改用 200 mmol/L 的 NaCl 溶液处理。分别在 0、1 和 6 h 采集根组织样本，设 3 个重复，取样后立即于液氮中速冻，存于 -80 °C 冰箱用于后续提取 RNA^[13]，并对每个重复进行 RNA-Seq 分析。

1.2 小麦 bHLH 转录因子家族在染色体上的定位

从 Pfam 数据库（<http://pfam.xfam.org/>）下载

bHLH 转录因子特有的保守结构域模型(PF00010)，将含有 bHLH 的 Pfam 文件 PF00010 用 Wheat Omics1.0 数据库工具中的 PfamSearch 打开，得到小麦 bHLH 家族成员及其在染色体上的位置，在 Excel 中绘制直方图。

1.3 小麦 bHLH 转录因子家族系统进化树的构建

从 Wheat Omics1.0 数据库（<http://202.194.139.32/>）下载小麦 bHLH 家族氨基酸序列，采用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树，利用 iTOL 网站（<https://itol.embl.de/>）对进化树进行展示。

1.4 小麦 bHLH 转录因子差异基因表达分析

在盐胁迫处理科农 199 得到的转录组数据中筛选到小麦 489 个 bHLH 转录因子，以 $|\log_2\text{Fold-change}| \geq 2$ 且 $\text{FDR} < 0.01$ 为筛选标准，比对得到差异表达基因后进行分析。

1.5 差异表达基因的 GO 富集分析

将筛选后的小麦 bHLH 转录因子家族的差异表达基因提交到 Agrigo（GO analysis Toolkit and Database for Agricultural Community）（<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php>）在线分析工具，采用差异富集分析法进行分析，参考小麦基因组数据库，进行显著 GO 注释。

1.6 差异表达基因的 KEGG 通路分析

使用 KOBAS 网站（Kobas.cbi.pku.edu.cn/in）对 KEGG 代谢途径进行富集分析，默认参数，利用 R 包展示结果。

1.7 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

为了验证转录组数据得到的 DEG 可靠性，分别选择盐处理 1 和 6 h 后都上调的 4 个 DEG 和都下调的 4 个 DEG 进行 qRT-PCR 验证，根据小麦数据库下载的序列，用网站中的 PrimerServer (BETA): PCRPrimersBatch Design&SpecificityCheck 工具设计荧光定量 PCR 特异引物（表 1）。以盐胁

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (3'-5') Reverse primer
<i>TraesCS5B01G518800</i>	GATCATGGTAGCCCGTCACC	TTCACCATCACGTTCCCCCTC
<i>TraesCS1A01G110400</i>	CACCTTGTTAGCTTGTGTGGTG	GCAATGGACGGTGATCTCGTTA
<i>TraesCS4A01G408800</i>	GAGGCAAAGCTCTCGGAGG	TCTTCCACCTTTGCCATGGT
<i>TraesCS5D01G244000</i>	CCTTTCCTTCCGTTTCTGTGTCG	ATGCGGTAACAACGACGACA
<i>TraesCS2B01G543800</i>	TCGACTTCCTGCACCTTTGG	CTGCAGATATAGTCCCGCCG
<i>TraesCS1A01G345200</i>	GCAATCTGTGACGAGTCGGA	TACCGCTCTTCTTGCAGTC
<i>TraesCS7B01G074900</i>	GGATATGACGAACCAAGAACAGC	CATCGATGGAGTAACAGCACTG
<i>TraesCS1B01G359000</i>	TGCATCTCGTGATCTCCAAGT	TAACCACTCTTCTTAGCGGC
<i>TraesCS6D02G196300 (TaGAPDH)</i>	TTAGACTTGCGAAGCCAGCA	AAATGCCCTTGAGGTTTCCC

胁迫处理后 0、1、6 h 的根部组织为样本，以处理 0 h 为对照，使用罗氏荧光定量 PCR 仪分析差异表达基因的相对表达水平。反应程序设置为 95 °C, 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 10 s, 40 个循环。每组试验设置 3 个生物学样本，每个生物学样本设置 3 个技术重复，数据为 3 个生物学重复平均值±标准误差。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达量，选择 *TaGAPDH* 作为内参基因。采用 SPSS 软件进行数据分析。

1.8 共同差异表达基因的表达聚类分析

从 2 组差异表达基因中筛选出公共的差异表达基因，利用 R 软件的 Pheatmap 包 ([https://www.](https://www.rdocumentation.org/packages/pheatmap/versions/1.0.12/topics/pheatmap)

[rdocumentation.org/packages/pheatmap/versions/1.0.12/topics/pheatmap](https://www.rdocumentation.org/packages/pheatmap/versions/1.0.12/topics/pheatmap)) 对筛选的共同差异表达基因进行表达聚类分析和结果展示。

2 结果与分析

2.1 小麦 bHLH 家族转录因子染色体分布

通过对 bHLH 保守结构域进行比对分析，在小麦基因组上共鉴定到 489 个 bHLH 转录因子。染色体定位分析结果 (图 1) 显示，这些基因分布在 21 条染色体上，其中 3A、3B、4B 以及 5A 染色体上的 bHLH 转录因子数目较多，而在 1A、1B 和 1D 染色体上的分布则相对较少。

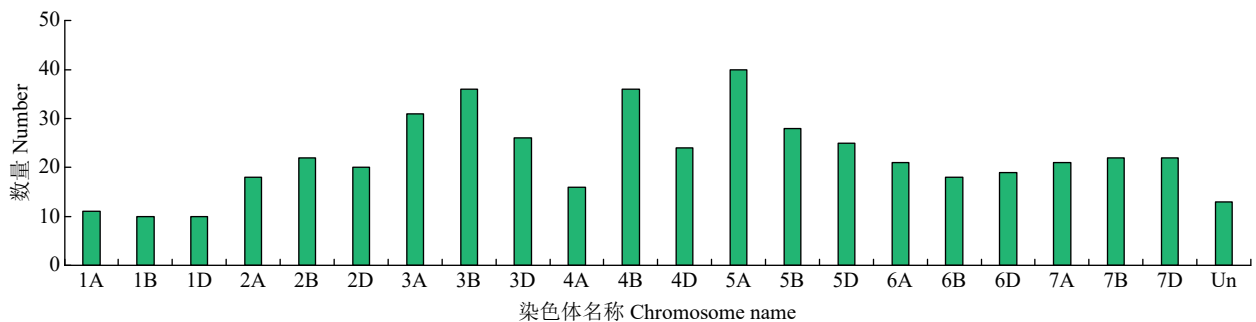


图 1 小麦 bHLH 家族转录因子在染色体上分布

Fig.1 The distribution of the wheat bHLH family transcription factors in the chromosomes

2.2 小麦 bHLH 家族转录因子进化树分析

利用 MEGA 7.0 软件对鉴定出的 489 个小麦 bHLH 转录因子家族蛋白的 bHLH 结构域序列构建系统进化树，将 bHLH 家族划分为 9 个亚家族，其中 VI 亚族成员最多，IV 亚族成员最少。在拟南芥中，162 个 bHLH 转录因子家族成员按照亲缘关系可划分为 12 个亚族^[14]；并且 bHLH 转录因子在水稻中已被鉴定到 167 个，可划分为 22 个亚族^[15]。

2.3 基因表达差异分析

为了挖掘响应盐胁迫的小麦 bHLH 转录因子基因，对盐处理 1 h 及 6 h 后的 DEG 分析 (表 2) 表明，小麦 bHLH 转录因子在盐处理 1 h 后的 DEG 数目为 100，其中 63 个基因表现为上调趋势，37 个下调表达；而在盐处理 6 h 后有 148 个 DEG，其中 91 个基因上调表达，57 个下调表达；经筛选后发现，共有 44 个 DEG 同时存在于盐胁迫 1 h 和 6 h

表 2 44 个共同差异表达基因的调控模式

Table 2 Regulation patterns of 44 common differential expression genes

基因号 Gene ID	染色体位置 Chromosome location	调控模式 Regulation pattern	基因号 Gene ID	染色体位置 Chromosome location	调控模式 Regulation pattern
<i>TraesCS4A01G408800</i>	681653116~681658841	上调	<i>TraesCS4B01G308300</i>	599168078~599170653	上调
<i>TraesCS4B01G308200</i>	598910941~598914019	上调	<i>TraesCS5A01G237500</i>	453519135~453519842	上调
<i>TraesCS5D01G244000</i>	352453691~352454917	上调	<i>TraesCS5A01G401300</i>	594132650~594134217	上调
<i>TraesCS2D01G270300</i>	334040936~334043454	上调	<i>TraesCS4D01G306400</i>	474700560~474701269	上调
<i>TraesCS5B01G518800</i>	681737539~681740186	上调	<i>TraesCS1A01G110400</i>	110072873~110073869	上调
<i>TraesCS2B01G289900</i>	402217632~402220229	上调	<i>TraesCS4B01G304500</i>	592819415~592821925	下调
<i>TraesCS7B01G211600</i>	387160478~387163988	上调	<i>TraesCS2B01G463800</i>	657790256~657793959	下调
<i>TraesCS3B01G002700</i>	2169304~2172368	上调	<i>TraesCS7A01G229900</i>	200230140~200231461	下调
<i>TraesCS5B01G235200</i>	415127011~415128223	上调	<i>TraesCS6B01G244800</i>	437162916~437168918	下调
<i>TraesCS5D01G411600</i>	475000589~475001987	上调	<i>TraesCS4A01G292800</i>	595294248~595297051	下调
<i>TraesCS4D01G306300</i>	474598568~474603146	上调	<i>TraesCS4A01G404700</i>	678217690~678220066	下调
<i>TraesCS2A01G271700</i>	444623265~444626004	上调	<i>TraesCS4D01G328800</i>	487119229~487120910	下调

续表 2 Table 2 (continued)

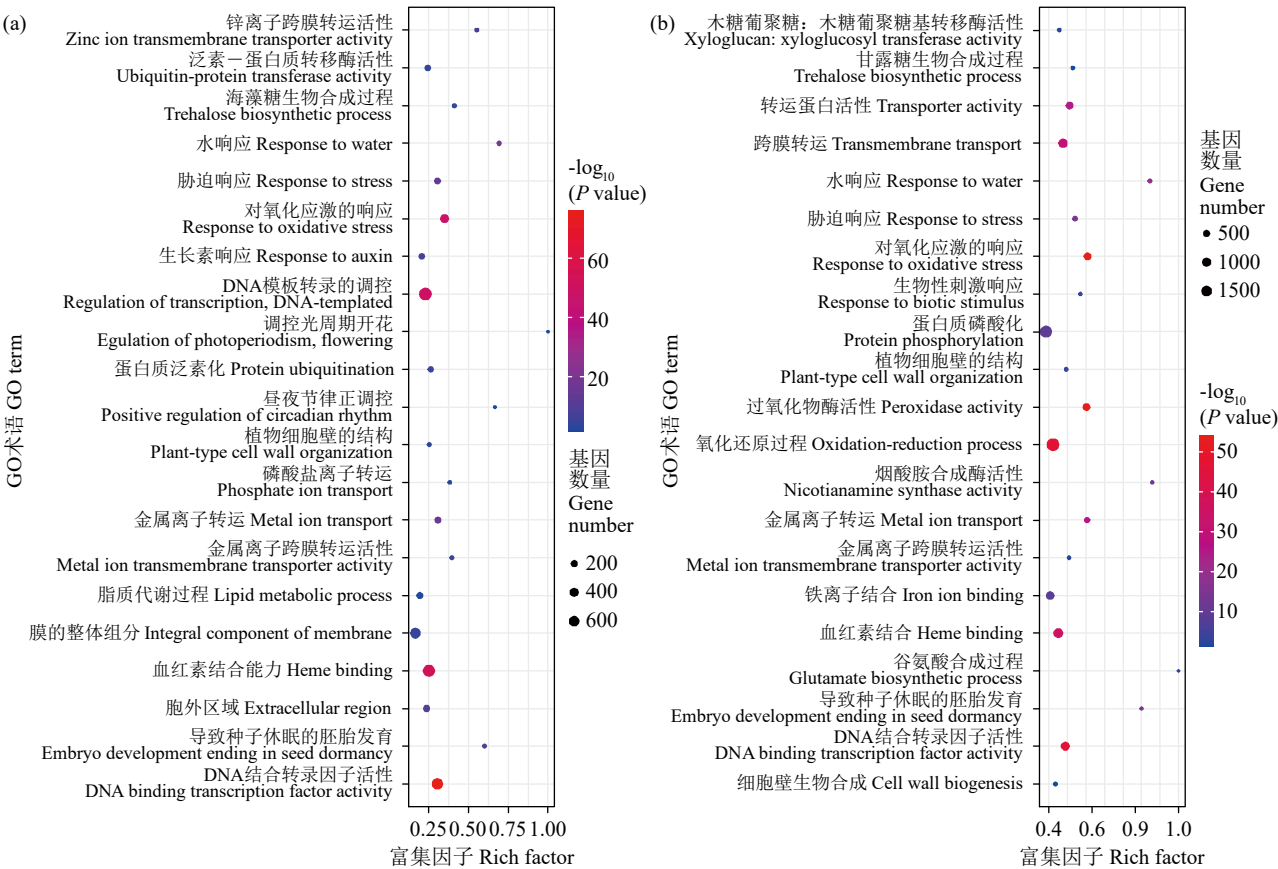
基因号 Gene ID	染色体位置 Chromosome location	调控模式 Regulation pattern	基因号 Gene ID	染色体位置 Chromosome location	调控模式 Regulation pattern
TraesCS6D01G197500	275152959~275163740	下调	TraesCS2D01G517000	607986836~607997092	下调
TraesCS4D01G302700	470506568~470509154	下调	TraesCS2B01G543800	741241659~741248415	下调
TraesCS6A01G190600	254936294~254937809	下调	TraesCS1A01G345200	532672290~532673440	下调
TraesCS6A01G214900	394613029~394618337	下调	TraesCS2B01G298600	418276647~418278407	下调
TraesCS3B01G550000	785039358~785043172	下调	TraesCS2A01G281200	469810800~469812561	下调
TraesCS4D01G018700	7992189~7995548	下调	TraesCS2D01G280100	351981513~351983269	下调
TraesCS3D01G495700	587745410~587748716	下调	TraesCS5A01G555300	706705261~706706358	下调
TraesCS3B01G550200	785280464~785284379	下调	TraesCS3A01G489600	717006915~717011250	下调
TraesCS3A01G489700	717296946~717300622	下调	TraesCS1B01G359000	588448000~588449096	下调
TraesCS3D01G495600	587644739~587648644	下调	TraesCS7B01G074900	84388710~84389462	下调

处理后，其中 17 个基因上调表达，27 个下调表达。

2.4 差异表达基因的 GO 富集分析

分别对盐胁迫处理后 0、1 和 6 h 的差异表达基因进行 GO 富集分析。根据 GO 功能分类，这些差异表达基因可分为分子功能、生物过程和细胞组成 3 个方面的亚类。结果显示，与处理后 0 h 对照相比，处理 1 h 的 DEGs 主要富集在 DNA 结合转录

因子活性、抗氧化反应、转录调控及 DNA 模块化、调控光周期和昼夜节律等分子功能方面；另外在胁迫应答、水盐响应、生长素响应、蛋白质泛素化、磷酸离子运输及金属离子运输和脂质代谢等生物过程中也有部分 DEGs 富集；细胞组成类主要分布在植物细胞壁组织、膜整体组分和胞外区等分支（图 2a）。而处理 6 h 的 DEGs 主要注释在跨膜转



圆点位置代表代谢途径；圆点大小代表基因的数量；Rich factor 为该代谢途径下差异基因数目与所有注释到该途径基因数目的比值，数值越大表示富集程度越大。下同。

The dots represent metabolic pathways; The size of the dot represents the number of genes; Rich factor is the ratio of the number of differential genes in this metabolic pathway to the number of genes annotated to this pathway, and the higher values indicate a higher degree of enrichment. The same below.

图 2 差异表达基因的 GO 分析
Fig.2 GO analysis of differentially expressed genes

运、蛋白磷酸化、细胞壁生物起源、氧化还原及铁离子结合等生物过程中（图 2b）。

2.5 差异表达基因的 KEGG 通路分析

KEGG 分析结果表明, 1 h 盐处理后小麦 bHLH

的差异表达基因涉及 17 条通路, 主要有淀粉和蔗糖代谢途径、苯丙烷代谢、甘油磷脂代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢以及 α -亚麻酸代谢途径等（图 3a）。而 6 h 盐处理后只涉及到碳代谢以及氨基糖和核苷

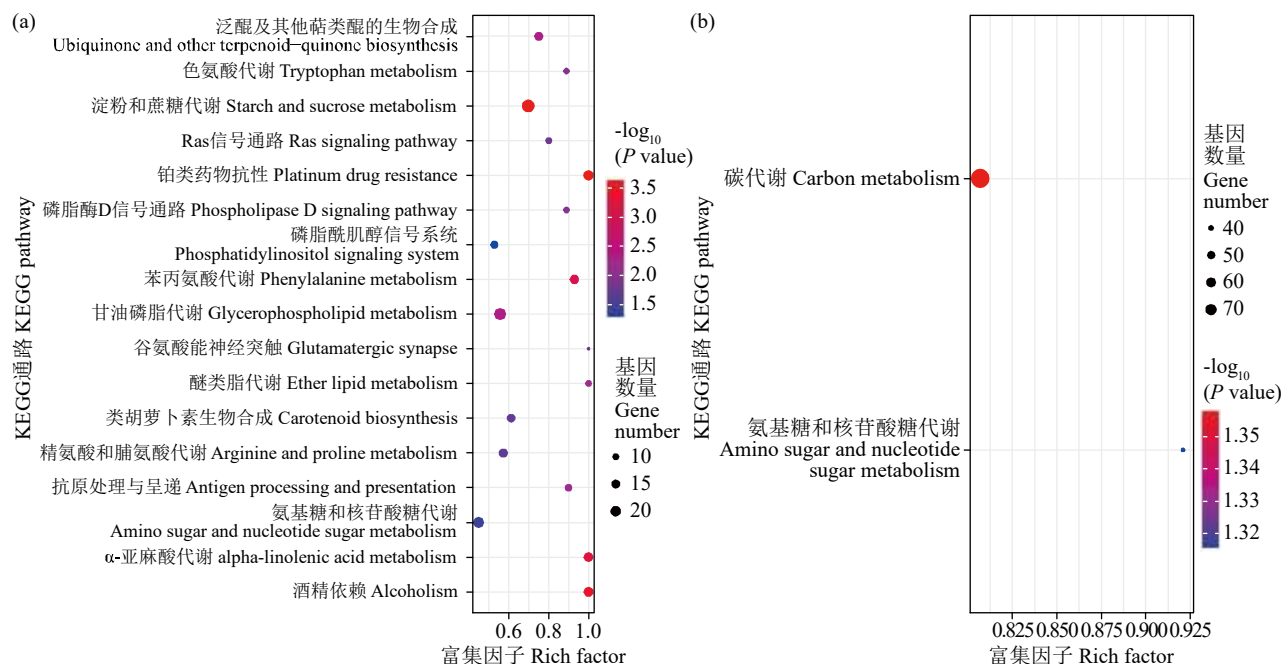


图 3 差异表达基因的 KEGG 分析
Fig.3 KEGG analysis of differential expressed genes

酸糖代谢 2 条通路（图 3b）。

2.6 bHLH 转录因子家族差异表达基因的表达聚类分析

为了进一步明确 bHLH 转录因子家族差异表达基因的表达变化, 从 2 组差异表达基因中（盐处理 1 h 和 6 h 后）挑选公共的差异表达基因进行表达聚类分析。结果（图 4）表明, 小麦 bHLH 转录因子中有 44 个基因在盐胁迫下表达量发生变化, 相比盐处理 0 h 来说, 对盐处理 1 和 6 h 后其表达量有明显上升或下降的趋势, 其中上调表达的基因有 17 个; 而下调表达的基因有 27 个。

2.7 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

为了验证转录组数据结果的可靠性, 随机选取 8 个差异表达基因进行 qRT-PCR 分析。由图 5 可看出, 8 个基因在胁迫处理后表达发生明显改变, 上调表达的 4 个基因中, *TraesCS1A01G110400* 和 *TraesCS4A01G408800* 在盐处理 1 h 时极显著上调, 处理 6 h 后表达上调趋势较处理 1 h 来说相对低; 而 *TraesCS5B01G518800* 和 *TraesCS5D01G244000* 的表达量则是随着盐胁迫处理时间延长逐渐上升,

这与转录组测序数据中差异基因的表达量趋势一致。另外 4 个下调表达的基因, 其表达变化趋势也与转录组数据结果一致, *TraesCS2B01G543800*、*TraesCS7B01G074900*、*TraesCS1B01G359000* 的表达量都随盐胁迫处理时间逐渐下降, *TraesCS1A01G345200* 的表达量在盐胁迫处理 1 h 时显著下降, 当盐处理 6 h 时其表达量变化趋势反而没有 1 h 盐处理的表达量下降趋势明显。虽然 qRT-PCR 分析得到的表达差异与转录组测序分析的表达差异倍数不一致, 但胁迫诱导表达的变化趋势相同, 在一定程度上说明了转录组测序结果的可靠性。

3 讨论

小麦是我国重要的粮食作物, 在生长发育过程中会遭受各种非生物胁迫, 严重影响其产量与品质。土壤盐碱化严重制约植物的生长进程, 盐碱地是我国主要的后备土壤资源, 约 80% 的盐渍土地有待开发利用。因此, 研究植物响应盐胁迫过程, 培育具有一定耐盐性的作物品种, 结合盐碱地的开发利

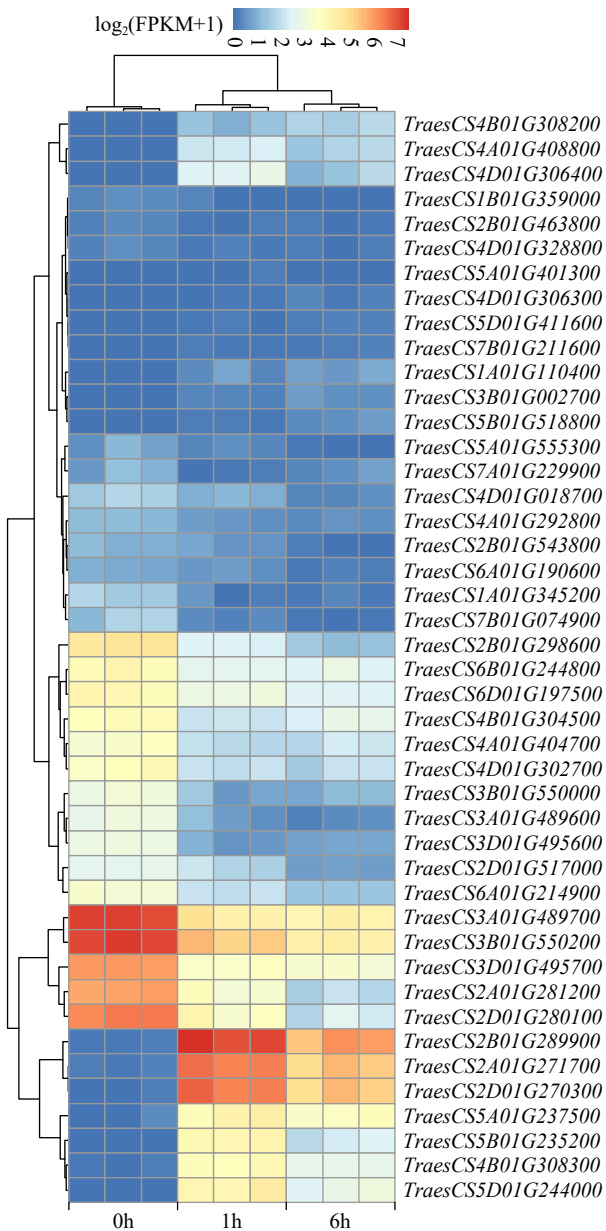


图 4 小麦响应盐胁迫 bHLH 转录因子聚类分析
Fig.4 Cluster analysis of wheat bHLH transcription factor genes in response to salt stress

用,可在一定程度上增加耕地面积,保障粮食安全。

研究^[16]表明,bHLH 转录因子通过影响植物的离子平衡、膜透性来调节植物对盐胁迫的耐受性。对 *AhbHLH18* 进行盐胁迫处理后,其表达发生明显变化,在 12 h 内, *AhbHLH18* 的相对表达量处于上升阶段,12 h 后逐渐趋于稳定,并且相比于 0 h,6 h 的相对表达量表现为显著差异,12~48 h 的表达量为极显著差异。对盐胁迫条件下的粗山羊草进行转录组测序,得到 546 个和 876 个上调和下调表达的 DEG,通过 GO 和 KEGG 富集分析和注释,明确了响应盐胁迫 DEG 的生物功能和所富集的信号

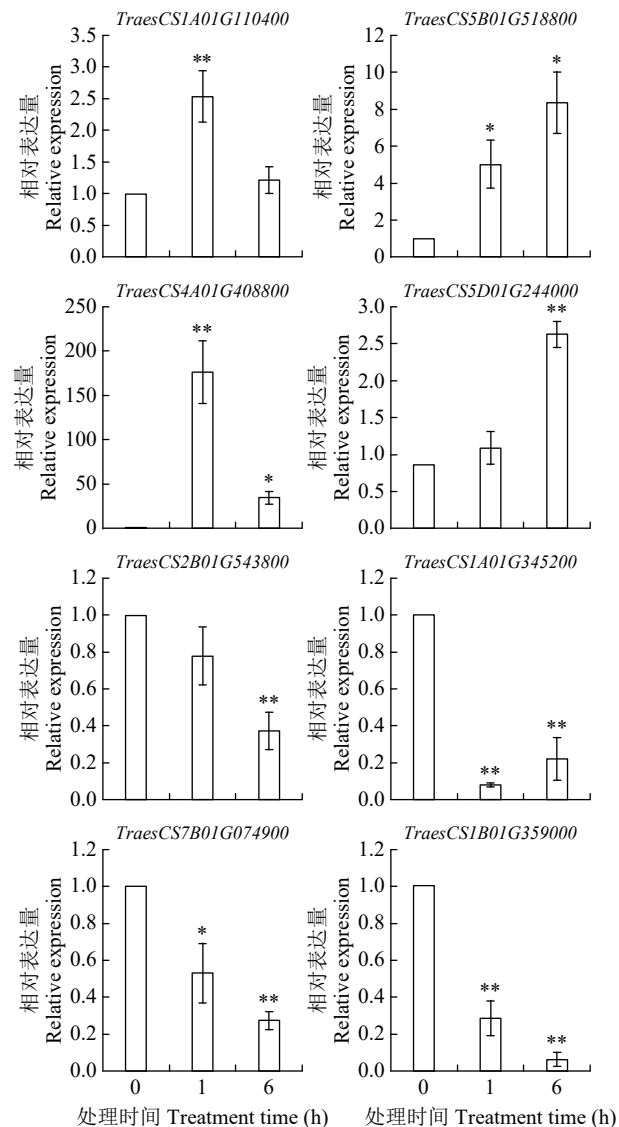


图 5 部分 DEGs 的实时荧光定量 PCR 验证
Fig.5 Real-time PCR validation of part of DEG

通路^[17]。以甜菜耐盐品系 T710MU 为研究对象,通过对转录组测序数据进行分析获得 10 个响应盐胁迫的 bHLH 基因家族的差异表达基因,荧光定量 PCR 结果显示,在盐处理 12 h 后,叶片中表达量上调,推测这些基因为盐应答转录因子^[18]。对毛竹 bHLH 转录因子进行转录组表达谱分析,结果表明有 151 个 *PebHLHs* 在不同组织和生长发育时期有不同程度表达,表明其在毛竹中功能的多样性,盐胁迫处理后,毛竹叶片中同一基因表达的差异以及不同 *PebHLHs* 基因间表达量的差异进一步说明 *PebHLHs* 功能的多样性和复杂性^[19]。以上结论在一定程度上表明,不同物种在响应盐胁迫时,基因在

表达量上表现为多样性和复杂性,进一步发挥不同功能。

bHLH 家族作为植物体内第二大转录因子,普遍存在于大多数真核生物中,不仅在植物生长发育各个阶段、下胚轴伸长、种子萌发、气孔开闭及开花等方面发挥重要功能,还在昼夜节律、生物合成、信号传导及非生物胁迫中发挥功能。目前,已经在白菜^[20]、甘薯^[21]、谷子^[22]、西瓜^[23]及拟南芥等植物中鉴定了 bHLH 转录因子家族,通过生物信息学方法分析 bHLH 基因的结构和蛋白性质,并对其功能进行预测。但在小麦中,还没有对 bHLH 转录因子家族进行鉴定,本研究利用生物信息学分析的方法,鉴定出 489 个 *TabHLH* 基因,染色体定位发现其分布在 21 条染色体上,对盐胁迫下 *TabHLH* 基因的转录组分析发现,在盐处理 1 和 6 h 后分别有 100 个和 148 个 DEGs 参与盐胁迫应答反应。差异表达基因的 GO 富集分析结果显示,富集程度最高的 GO 功能分类项为 DNA 结合转录因子活性以及转录调控等分子功能,这从一定程度上证明了植物分子功能是造成植物响应盐胁迫差异性的主要原因之一。KEGG 注释分析将差异表达基因富集在淀粉和蔗糖代谢途径以及氨基糖和核苷酸糖代谢途径上,这些途径可在植物生长发育过程中提供能量。表达聚类分析表明,盐胁迫下小麦 bHLH 家族转录因子具有特异性表达,可为挖掘耐盐基因提供依据。

4 结论

通过转录组测序手段和生物信息学分析的方法对小麦 bHLH 转录因子在盐胁迫下的表达特性进行了系统分析。共鉴定出 489 个 bHLH 转录因子,分布在 21 条染色体上;盐胁迫下小麦根部组织转录组测序结果表明,在盐胁迫处理后 1 和 6 h 差异表达基因 (DEG) 共有 44 个,其中上调表达基因 17 个,下调表达有 27 个;GO 分析表明,DEG 富集在水盐胁迫及生长素调节等方面;KEGG 注释分析表明,DEG 主要富集在淀粉和蔗糖代谢途径、氨基糖和核苷酸糖代谢等信号通路。

参考文献

- [1] Zhang H M, Zhu J H, Gong Z Z, et al. Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(2): 104-119.
- [2] Bhanbhro N, Xiao B B, Han L, et al. Adaptive strategy of allohexaploid wheat to long-term salinity stress. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 210.
- [3] 马彦军, 段慧荣, 魏佳, 等. NaCl 胁迫下黑果枸杞转录组测序分析. *生物技术通报*, 2020, 36(2): 100-109.
- [4] 朱涛, 李芳菲, 杨海涵, 等. 山药 bHLH 基因家族鉴定及表达分析. *信阳师范学院学报 (自然科学版)*, 2022, 35(3): 393-399.
- [5] 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*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 7152.
- [6] Wang Y G, Li H Y, University H, et al. Sugar beet BvBHLH92 tissue expression and subcellular localization. *Journal of Engineering of Heilongjiang University*, 2017, 8(3): 45-49, 2.
- [7] Lee H Y, Seo J S, Um T Y. *OsBHLH148* confers drought tolerance in *Arabidopsis*. *International Plant and Animal Genome Conference*, January 14-18, 2012. California: San Diego, 2012.
- [8] 孙玉合, 孙晋浩, 牛文利, 等. 烟草 *NiBHLH112* 基因的克隆、鉴定及表达模式分析. *中国烟草科学*, 2020, 41(5): 8-14.
- [9] 悦曼芳, 张春, 郑登俞, 等. 玉米转录因子 *ZmBHLH91* 对非生物逆境胁迫的应答. *作物学报*, 2022, 48(12): 3004-3017.
- [10] Zhai Y Q, Zhang L C, Xia C, et al. The wheat transcription factor, *TabHLH39*, improves tolerance to multiple abiotic stressors in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 473(4): 1321-1327.
- [11] Wang F B, Zhu H, Kong W L, et al. The Antirrhinum *AmDEL* gene enhances flavonoids accumulation and salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 2016, 244(1): 59-73.
- [12] Sun X, Wang Y, Sui N. Transcriptional regulation of bHLH during plant response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(2): 397-401.
- [13] 毕晨曦, 杨宇昕, 于月华, 等. 小麦 bZIP 家族转录因子的鉴定及其在盐胁迫条件下的表达分析. *分子植物育种*, 2021, 19(15): 4887-4895.
- [14] Gabriela T, Enamul H, Peter H Q. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*, 2003, 15: 1749-1770.
- [15] Lorenzo C P, Anahit G, Irma R V, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1398-1412.
- [16] 赵小波, 闫彩霞, 李春娟, 等. 花生转录因子 *AhbHLH18* 克隆与功能分析. *花生学报*, 2022, 51(2): 1-8.
- [17] 施田野, 顾宇蓝, 张磊, 等. 粗山羊草响应盐胁迫转录组分析. *分子植物育种*, 2020, 18(21): 7015-7022.
- [18] 田烨, 王爽, 路正禹, 等. 甜菜应答盐胁迫诱导表达 bHLH 基因的鉴定与分析. *黑龙江大学自然科学学报*, 2020, 37(6): 712-717.
- [19] 徐秀荣, 杨克彬, 王思宁, 等. 毛竹 bHLH 转录因子的鉴定及其在干旱和盐胁迫条件下的表达分析. *植物科学学报*, 2019, 37(5): 610-620.
- [20] 唐文武, 吴秀兰, 钟佩桥, 等. 白菜 bHLH 转录因子家族的全基因鉴定及表达特征分析. *江西农业学报*, 2020, 32(6): 1-5.
- [21] 黄小芳, 毕楚韵, 王和寿, 等. 甘薯基因组 bHLH 转录因子鉴定与逆境胁迫表达分析. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2021, 50(4): 440-450.
- [22] 孙颖琦, 孟亚轩, 赵心月, 等. 谷子 bHLH 转录因子家族基因鉴定及生物信息学分析. *种子*, 2021, 40(12): 45-55.
- [23] 何洁, 顾秀容, 魏春华, 等. 西瓜 bHLH 转录因子家族基因的鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析. *园艺学报*, 2016, 43(2): 281-294.

Identification of bHLH Family Transcription Factors of Wheat and Expression Analysis under Salt Stress

Lü Baolian^{1,2}, Yang Yuxin², Cui Licao², Shi Feng³, Ma Liang³,
Kong Xiuying², Zhang Lichao², Ni Zhiyong¹

(¹College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China;

²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

³Shijiazhuang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050041, Hebei, China)

Abstract Basic helix-loop-helix, or bHLH, is a major family of plant transcription factors that is involved in signal transduction, biosynthesis, abiotic stress response, and plant growth and development. Using the winter wheat cultivar ‘Kenong 199’ as the experimental material, we systematically analyzed the expression characteristics of wheat bHLH transcription factor under salt stress using transcriptional sequencing and bioinformatics analysis to investigate the functions of common wheat bHLH transcription factors in response to salt stress. According to the findings, wheat contains 489 bHLH transcription factors spreading across 21 chromosomes. Following the construction of the phylogenetic tree, the bHLH family was further subdivided into nine subfamilies, with the VI subfamily having the greatest number of members and the IV subfamily having the least. Wheat roots’ transcriptome sequencing revealed 44 differentially expressed genes (DEGs), of which 17 were up-regulated and 27 were down-regulated at one and six hours after salt stress. According to GO analysis, DEGs were more abundant in the regulation of auxin, water and salt stress. According to KEGG annotation analysis, DEGs were primarily enriched in metabolic pathways related to starch and sucrose, amino sugars, nucleotide sugars, and other signaling pathways. The accuracy of the RNA-Seq results was confirmed through qRT-PCR verification of a few DEGs, which revealed that their expression pattern matched the transcriptome sequencing results.

Key words Wheat; bHLH transcription factor; Salt stress; Bioinformatics analysis