

巴西橡胶树 *HbbHLH48* 基因克隆与亚细胞定位分析

范晓康^{1,2,3}, 樊松乐¹, 刘明洋¹, 郭冰冰¹, 杨 洪¹, 代龙军¹, 张 宇^{2,3*},
王立丰^{1*}

1. 农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理学重点实验室/中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南海口 571101; 2. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572024; 3. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737

摘 要: 植物 bHLH 转录因子是乙烯和茉莉酸激素信号转导的关键环节之一, 在橡胶树胶乳产量形成和排胶过程中起到重要调控作用。本研究从橡胶树热研 73397 叶片中克隆了 1 个 bHLH 转录因子基因, 命名为 *HbbHLH48* (GenBank 号: PQ303617), 编码区全长 1128 bp, 编码 375 个氨基酸。其编码蛋白与拟南芥 *AtbHLH48* 相似度最高属于 XVII 亚组。生物信息学分析表明, *HbbHLH48* 含有 bHLH_SF superfamily 结构域, 不含跨膜结构域和信号肽。表达分析发现 *HbbHLH48* 在花、叶片和胶乳中的表达量高于根和茎中的表达量。在割胶树中, 机械伤害处理使其表达下调。茉莉酸甲酯、水杨酸和乙烯利处理后, *HbbHLH48* 先显著上调表达而后下调表达, 赤霉素处理的表达模式与其相反。亚细胞定位分析显示 *HbbHLH48* 定位在细胞核中。综上, *HbbHLH48* 是植物 bHLH 转录因子家族的一员, 其在橡胶树中可能参与赤霉素过程中进而调控开花过程和胶乳合成过程, 为进一步深入研究其功能奠定基础。

关键词: 巴西橡胶树; *HbbHLH48*; 克隆; 表达分析; 亚细胞定位

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

Cloning and Subcellular Localization Analysis of *HbbHLH48* Gene from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

FAN Xiaokang^{1,2,3}, FAN Songle¹, LIU Mingyang¹, GUO Bingbing¹, YANG Hong¹, DAI Longjun¹,
ZHANG Yu^{2,3*}, WANG Lifeng^{1*}

1. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops / Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572024; 3. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Plant bHLH transcription factor is one of the key factor of ethylene and jasmonic acid hormone signal transduction pathway, and plays an important role in the yield formation and latex flow in rubber trees. A bHLH transcription factor was cloned from the leaves of Reyan73397 designed as *HbbHLH48* (GenBank: PQ303617), with a total length of 1128 bp encoding 375 amino acids. Its encoded protein has the highest similarity to *Arabidopsis* *AtbHLH48*, and belongs to the XVII subgroup. Bioinformatics analysis showed that it contained the bHLH_SF superfamily domain, but did not contain the transmembrane domain and signal peptide. The expression levels in flowers, leaves and latex were higher than those in roots and stems. Mechanical injury treatment down-regulated its expression in tapping trees. Methyl jasmonate, salicylic acid, and ethephon treatments initially significantly upregulate their expression and then downregulate it, while the expression pattern with gibberellin treatment is opposite to them. Subcellular localization

收稿日期 2024-11-08; 接受日期 2024-11-14

基金项目 海南省自然科学基金创新研究团队项目(No. 322CXTD506); 海南省自然科学基金高层次人才项目(No. 323RC526); 热带作物病虫害疫情监测与防控项目(No. 21240116)。

作者简介 范晓康(2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 资源利用与植物保护。*通信作者(Corresponding author), 张 宇(ZHANG Yu), E-mail: yuzhang_rain@163.com; 王立丰(WANG Lifeng), E-mail: lfwang@catas.cn。

analysis revealed it to be in the nucleus. It can be seen that *HbbHLH48* is a member of the plant bHLH transcription factor family, and its function in *Hevea brasiliensis* may be involved in the gibberellin process, thereby regulating the flowering process and latex biosynthesis process, laying the foundation for further in-depth research.

Keywords: *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.; *HbbHLH48*; clone; expression analysis; subcellular localization

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.003

天然橡胶 (natural rubber) 生物合成是在橡胶树等产胶植物经类异戊二烯合成路径进行^[1-2], 其前体是由光合作用产物蔗糖转化而成的异戊烯基二磷酸 (IPP), 经甲羟戊酸 (MVA) 路径或甲基赤藓醇 4-磷酸 (MEP) 路径合成。在转录水平研究发现, 天然橡胶生物合成关键酶基因启动子区多含有 GCC-box、MYB 结合元件、伤信号 WUN 等多信号结合位点, 其基因表达受到乙烯、茉莉酸等激素、干旱、病虫害^[3]和光照等多种信号交互调控。在橡胶树中, 已经证明转录因子 HbWRKY1 和 HbMADS4 负调控 HbSRPP^[4]。茉莉酸信号关键 bHLH 转录因子 MYC2 与 *SRPP1*、*REF3* 启动子区域结合^[5]。乙烯等产量促进剂上调 *HbSRPP* 基因表达但不能提高其蛋白水平^[6]。HbMYC2 通过与 *HbFPS1* 和 *HbSRPP1* 启动子结合调控天然橡胶生物合成^[7]。在新型产胶植物橡胶草中也发现了多个 SRPP 家族成员, 但过表达 *TkSRPP3* 不能显著提高橡胶草根系天然橡胶产量, 反之, 敲除该基因则显著降低橡胶分子量^[8]。综上, 植物转录因子在天然橡胶生物合成中具有重要作用。

植物 bHLH 转录因子家族是重要的转录因子家族之一, 调控植物生长发育、次生代谢和逆境响应过程^[9-10]。bHLH 转录因子因含有 bHLH 结构域而得名。bHLH 结构域由 50~60 个氨基酸组成, 可分为长度为 10~15 个氨基酸的碱性氨基酸区和 40 个氨基酸左右的 α -螺旋-环- α -螺旋区 (HLH 区)。bHLH 转录因子参与染色体的分离、新陈代谢调节等过程, 通过二聚化与靶基因启动子区域中顺式作用元件 E-box (5'-CANNTG-3') 或 CACGCG 和 CATGCG 特异性结合调控下游靶基因表达^[11]。在拟南芥中发现的 133 个 *bHLH* 基因划分为 12 个家族; 随后又有 14 个新的 bHLH 转录因子被发现, 并进一步被分为 21 个家族, 但是这种分类方法仅局限于高等陆生植物。随着该家族成员在苔藓、海藻等物种中被更多地发现与鉴定, bHLH 转录因子被细分为 32 个家族, 每个家族具有特异性的功能。如油菜素内酯通过调控 bHLH 转录因子 CESTA 调控赤霉素氧化酶基因 *GA2ox7*。腊梅

CpbHLH1 通过阻遏 LBGs 表达抑制花青素积累^[12]。bHLH 转录因子除了单独调控下游基因表达外, 还通过分子模块和聚合体形式调控植物的次生代谢和生长发育。如 bHLH-MYB 复合体在茉莉酸调控的拟南芥育性^[13]和雄蕊发育^[14]中发挥重要作用。3 种转录因子复合体 MYB-bHLH-WDR (MNW) 调控花青素合成^[15], 其分为促进^[16]和抑制^[17]2 种类型。这种精细调控是由于上游的信号途径阻遏蛋白控制实现的^[18]。如茉莉酸信号途径的 JAZ 蛋白通过阻遏 MYB-bHLH 复合体抑制雄蕊发育^[14]。众多研究表明, 植物中 bHLH 转录因子参与调控植物次生代谢, 除花青素外^[19], *LibHLH7* 转录因子调控百脉根中生氰糖苷的合成^[20]。bHLH 转录因子 *SIJIG* 参与萜烯合成并提高昆虫和真菌抗性^[21]。*BHLH IRIDOID SYNTHESIS 3* 基因调控长春花中的类萜吲哚碱的合成^[22]。橡胶树胶乳合成这一典型的次生代谢过程中亦有可能存在 bHLH 转录因子在橡胶生物合成和排胶过程中起作用。

本研究在橡胶树热研 73397 品种叶片中克隆了 1 个 bHLH 转录因子 *HbbHLH48* 基因, 发现其在橡胶树花和胶乳中高表达。分析 bHLH 转录因子结构与功能将有助于研究其在天然橡胶生物合成这一典型次生代谢过程的转录调控机制, 也将为研究林木次生代谢机制创新提供新思路 and 关键基因。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以位于中国热带农业科学院儋州天然橡胶新种质材料创新基地的热研 73379 开割树作为材料, 选取健康割胶树的花、胶乳、叶片、茎和根组织进行基因克隆与表达分析。机械伤害采用图钉对割线上 1 cm 处进行伤害处理。对叶片喷施 10 mmol/L 水杨酸 (SA)、20 μ mol/L 茉莉酸甲酯 (MeJA)、0.3 μ mol/L 乙烯利 (ETH)、300 mg/L 赤霉素 3 (GA_3) 进行激素处理。对照组采用 0.05% (V/V) 乙醇进行处理^[23]。所有处理过的叶片、胶乳等材料按照不同时间点依次采样, 液氮冷冻

后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 *HbbHLH48* 基因克隆 根据橡胶树热研 73397 基因组^[24]中的 *HbbHLH48* 序列, 利用 Snapgene 软件设计引物(表 1)。以橡胶树胶乳组织 cDNA 为模板, 使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)高保真酶进行基因克隆, 将克隆得到的目的片段与 pEASY-Blunt Zero(北京全式金生物技术有限公司)载体进行连接并转入大肠杆菌感受态 DH5 α 细胞中, 使用 Taq Master Mix 酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行菌落 PCR 鉴定, 将阳性克隆送至擎科生物有限公司进行测序, 采用冻存甘油菌的方式将测序正确的阳性克隆于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将测序正确的序列提交至 NCBI Bankit (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>) 数据库获得 GenBank 编号。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Primer sequence in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	作用 Function
HbbHLH48-F	ATGGAGTCACCCGCTGGAC	基因克隆
HbbHLH48-R	TCATAGCTCCATTTTCAAGTA-TTCG	
HbbHLH48-GFP-F	gtcgacgggtatcgataagcttATGGAGTC-ACCCGCTGGAC	表达载体构建
HbbHLH48-GFP-R	tttactcactagtggatccTAGCTCCAT-TTCAAGTGATTCGA	
HbbHLH48-qF	GGTGAAGAGGAAGGAGCGA-GAG	实时荧光定量
HbbHLH48-qR	GCTATGGCTGTCTGTGGCTTGA	
Hb18SrRNA-qF	GCTCGAAGACGATCAGATAACC	实时荧光定量内参基因
Hb18SrRNA-qR	TTCAGCCTTGCGACCATAC	

1.2.2 *HbbHLH48* 生物信息学分析 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>) 数据库中分析 *HbbHLH48* 蛋白序列的保守结构域; 使用 ExPASy (<http://web.expasy.org>) 在线软件分析其理化特性和蛋白的三级结构; 使用 Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 与 MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) 在线软件进行序列比对分析; 利用 MEGA XI 软件进行多物种系统进化树的构建; 使用 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 在线软件

预测蛋白跨膜结构和信号肽。

1.2.3 *HbbHLH48* 基因表达分析 所有样品材料使用天根植物多糖多分提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]进行总 RNA 的提取, 取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 使用 RevertAid RT Kit(Thermo Scientific, USA) 根据试剂说明书进行反转录。采用 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)荧光定量试剂在 CFX96 Touch System(Bio-Rad, USA) 仪器上进行组织特异性表达及激素处理后的表达模式分析, 以 *Hb18S* 基因为内参基因, 引物见表 1。反应体系为: $10\text{ }\mu\text{L}$ ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix, $0.4\text{ }\mu\text{L}$ 的正向引物, $0.4\text{ }\mu\text{L}$ 的反向引物, $1\text{ }\mu\text{L}$ cDNA 模板, $8.2\text{ }\mu\text{L}$ ddH $_2\text{O}$, 共 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , 共 40 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s 。通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。

1.2.4 *HbbHLH48* 载体构建 根据 GFP 载体设计其与 *HbbHLH48* 的同源重组引物(表 1), 以本实验室保存的 pEASY-HbbHLH48 为模板, 使用重组引物进行扩增纯化回收, 同时对表达载体进行双酶切并纯化回收, 将纯化产物按照重组试剂盒进行连接并转化大肠杆菌感受态 DH5 α 细胞, 在抗性平板中培养 12 h , 菌落 PCR 鉴定, 将测序正确的菌液进行质粒提取并转化农杆菌感受态 GV3101 细胞, 构建重组 *HbbHLH48*-GFP 过表达载体。将得到的过表达 *HbbHLH48* 农杆菌菌株注射烟草表皮细胞, 利用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 进行核染色^[25], 在激光共聚焦显微镜 (Zeiss, 德国) 下观察 *HbbHLH48* 的亚细胞定位。

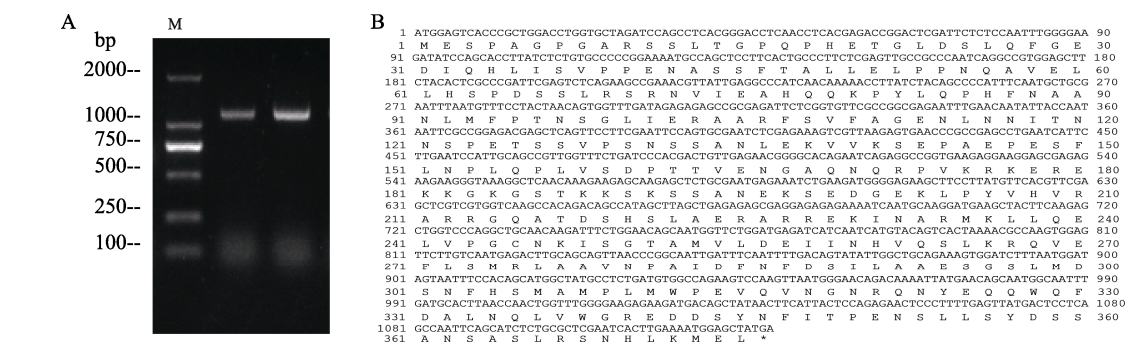
1.3 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行差异显著性分析, 显著性差异分析选择 0.05 水平。采用 Origin 2019 软件制图。

2 结果与分析

2.1 *HbbHLH48* 基因克隆

以橡胶树热研 73379 叶片的 cDNA 为模板, 基因组文件中的 CDS 序列设计引物, PCR 克隆得到 *HbbHLH48* 基因(图 1A)并上传至 NCBI 数据库, 其 GenBank 登录号为 PQ303617。*HbbHLH48* 的 CDS 长度为 1128 bp , 编码 375 个氨基酸, 与基因组中的蛋白文件相比, 氨基酸序列的相似度为 99.47% (图 1B)。



A: *HbbHLH48* 基因克隆, M: DL2000 DNA marker; B: *HbbHLH48* 编码区序列。
A: Cloning of the *HbbHLH48* gene, M: DL2000 DNA marker; B: Sequence of the coding region of *HbbHLH48*.
图 1 *HbbHLH48* 基因克隆和编码区序列

Fig. 1 Cloning and coding region sequence of *HbbHLH48*

2.2 *HbbHLH48* 生物信息学分析

保守结构域分析结果表明, *HbbHLH48* 氨基酸序列的第 205~290 位氨基酸序列构成 bHLH 结构域 (图 2A)。橡胶树 bHLH 序列与其他植物的同源序列的多序列比对结果表明, bHLH 结构域在不同植物间高度保守, 仅水稻和麻风树的 bHLH 结构域序列发生了 1 个氨基酸的变异 (图 2B)。*HbbHLH48* 理化性质分析显示, 蛋白质分子式为 $C_{1802}H_{2859}N_{527}O_{579}S_{11}$, 相对分子质量为 41.52 kDa, 等电点为 5.86, 不稳定系数为 53.36, 总平均亲水性为 -0.639。跨膜结构预测和信号肽预测表明, *HbbHLH48* 不存在信号肽 (图 3A) 和无跨膜蛋白结构 (图 3B)。亚细胞定位预测表明, *HbbHLH48*

位于细胞核中。*HbbHLH48* 三级结构见图 3C。

不同植物中 bHLH48 的同源序列系统进化关系结果表明, 橡胶树 bHLH48 与木薯的 bHLH48 的序列亲缘关系最近。为了进一步解析 *HbbHLH48* 的功能, 构建了橡胶树和拟南芥 bHLH 家族的系系统进化树, 结果表明, *HbbHLH* 可分为 17 个亚家族, 其中, *HbbHLH48* 与 *AtbHLH48*、*AtbHLH60* 聚为一支, 属于 XVIII 亚家族 (图 4)。

2.3 *HbbHLH48* 基因表达分析

HbbHLH48 基因的表达分析结果表明: *HbbHLH48* 在花中表达量最高, 在叶片中的表达量次之, 在茎中的表达量最低; 机械伤害处理后, *HbbHLH48* 的表达量在 0 h 时最高, 机械伤害后

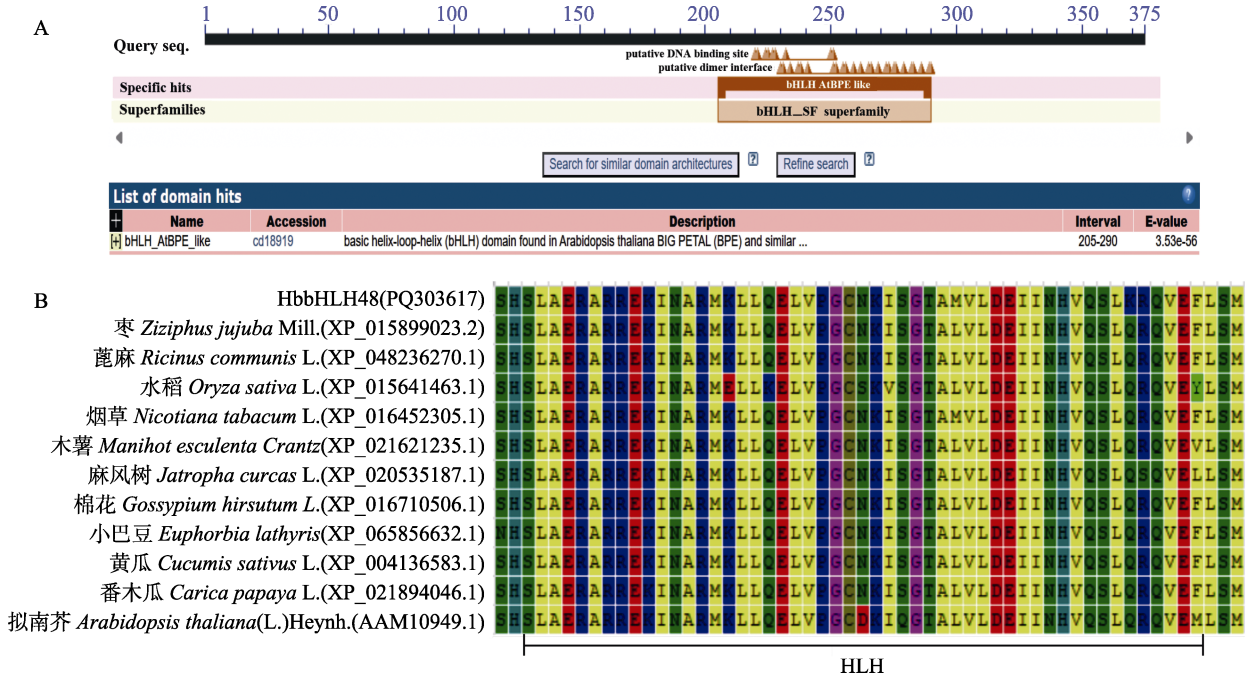


图 2 *HbbHLH48* 保守结构域分析 (A) 和多物种 bHLH 保守结构域多序列比对 (B)
Fig. 2 Analysis of the conserved domain of *HbbHLH48* (A) and multiple species bHLH conserved domain multiple sequence alignment (B)

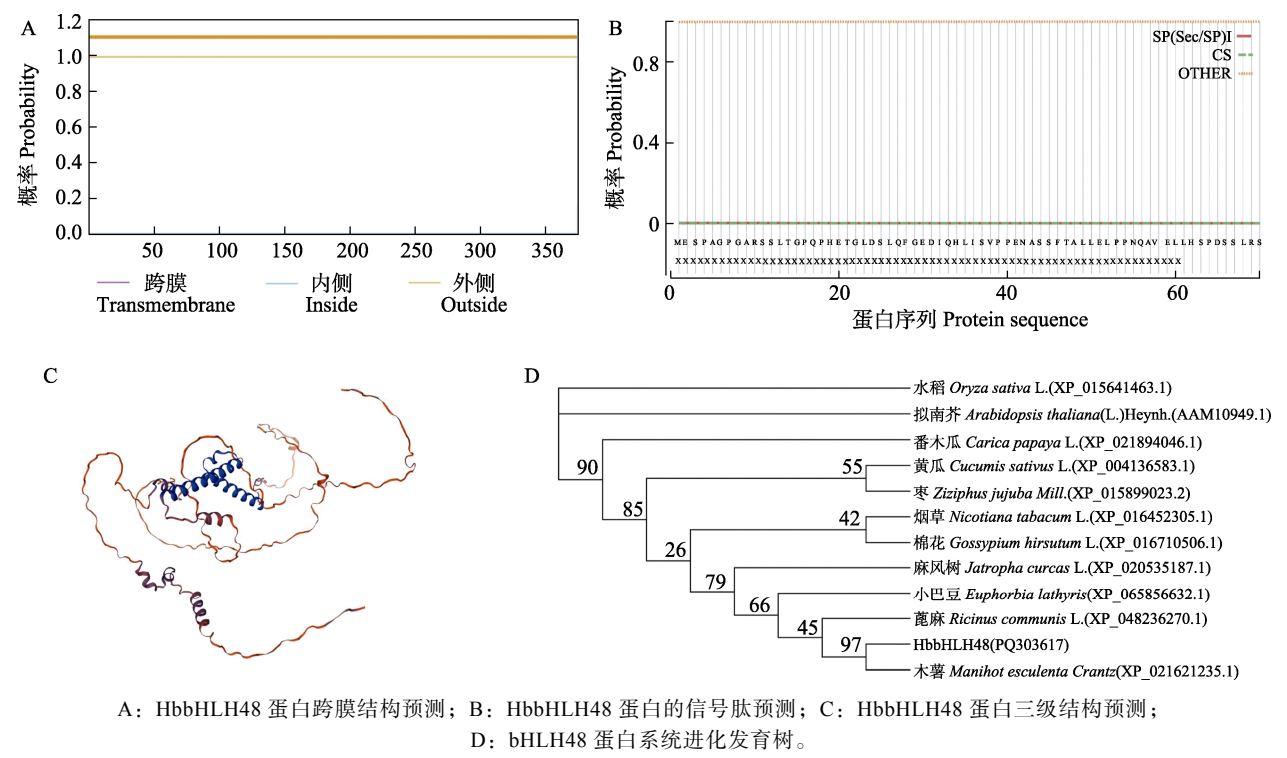


图 3 HbbHLH48 生物信息学分析
Fig. 3 Bioinformatics analysis of HbbHLH48

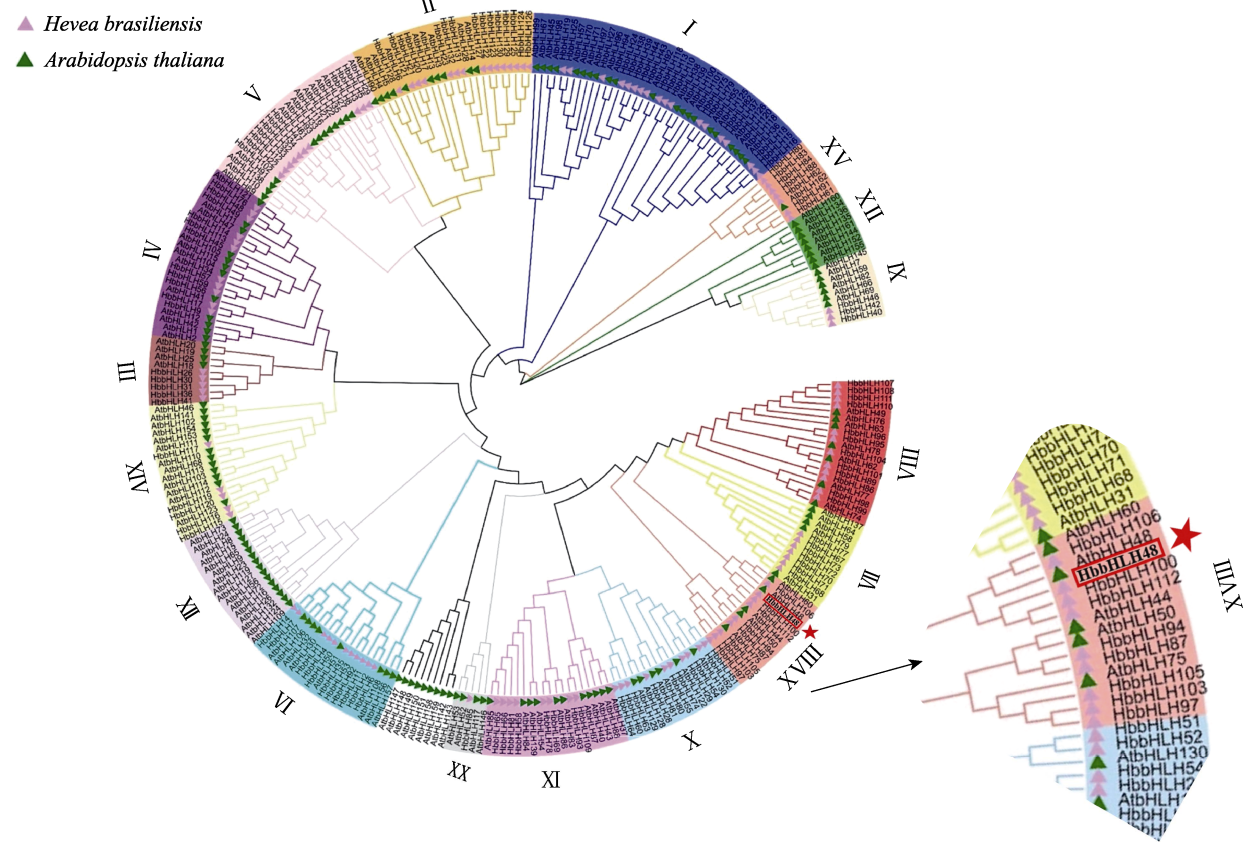
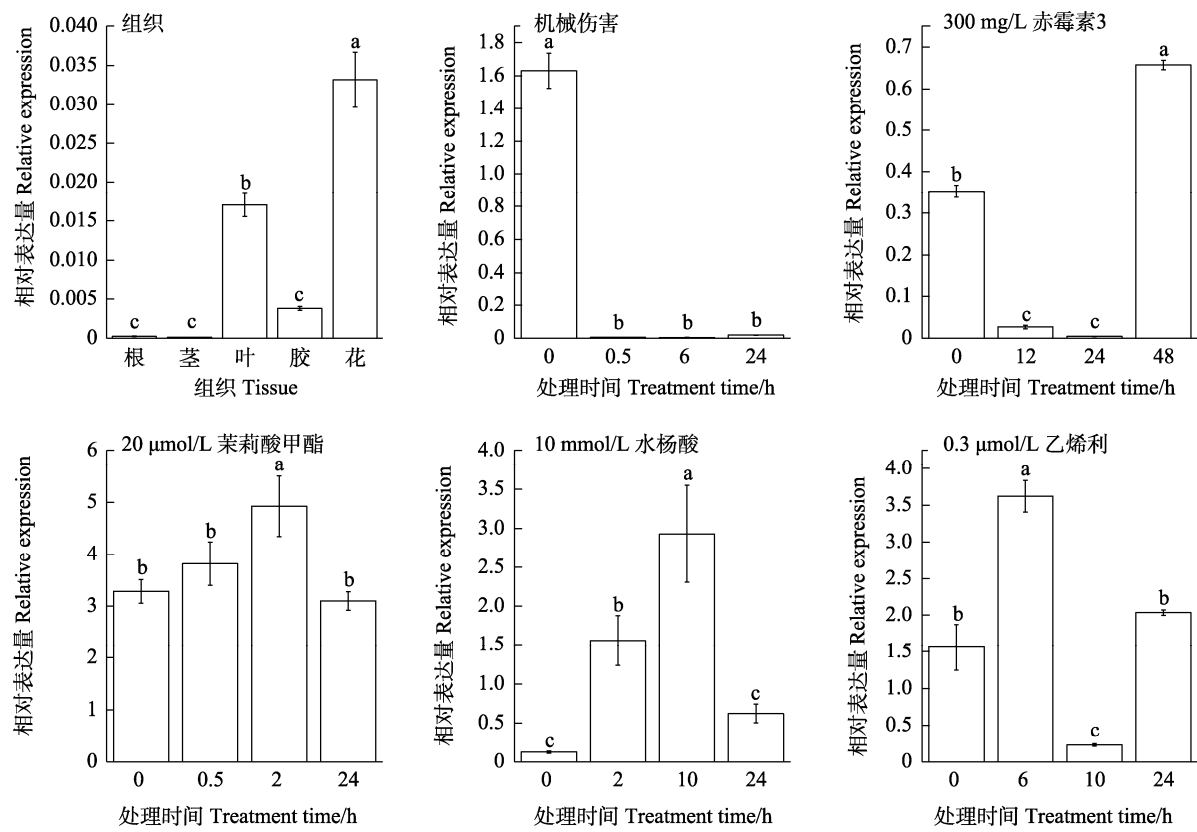


图 4 橡胶树与拟南芥 bHLH 蛋白的系统进化分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of bHLH proteins in rubber tree and *Arabidopsis thaliana*

显著下调表达；赤霉素处理后，*HbbHLH48* 的表达先显著下调后显著上调；茉莉酸甲酯、水杨酸、乙烯利处理后，*HbbHLH48* 基因的表达趋势相似，均是先显著上调表达后下调表达，其表达模式与赤霉素处理后的表达模式相反（图 5）。

2.4 *HbbHLH48* 植物表达载体构建和亚细胞定位

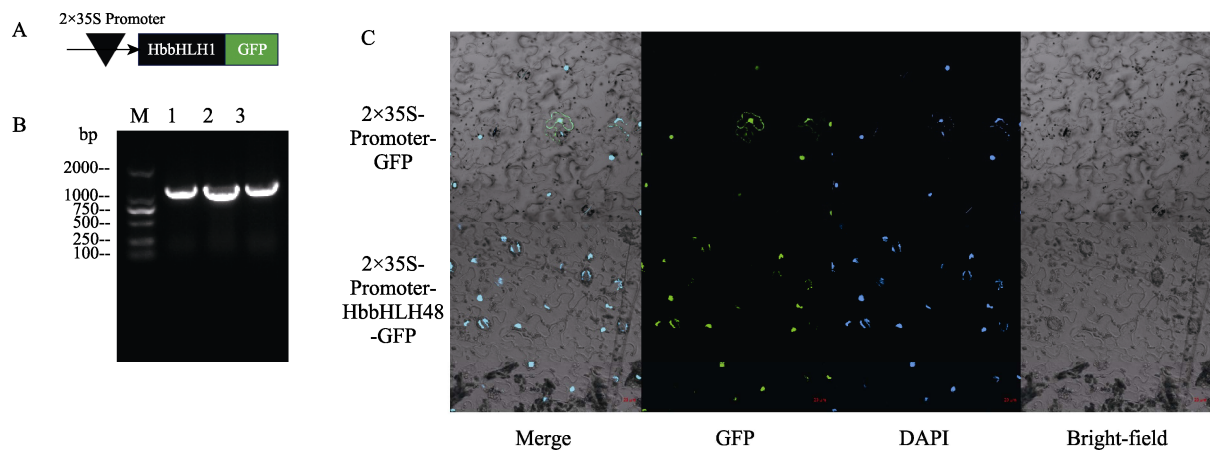
利用同源重组的方法，构建 *HbbHLH48*-GFP 植物过表达重组载体，*HbbHLH48* 在 GFP 标签的 N 端（图 6A）。菌落 PCR 表明 *HbbHLH48*-GFP 植



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 5 *HbbHLH48* 基因的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *HbbHLH48* gene



A: 表达载体构建图谱; B: *HbbHLH48* 重组载体单克隆菌落 PCR; C: *HbbHLH48* 亚细胞定位; M: DL2000 DNA marker。
A: Expression vector construction map; B: *HbbHLH48* recombinant vector monoclonal colony PCR;
C: Subcellular localization of *HbbHLH48*; M: DL2000 DNA marker.

图 6 *HbbHLH48* 亚细胞定位分析

Fig. 6 Subcellular localization analysis of *HbbHLH48*

物过表达重组载体构建成功(图 6B)。共聚焦显微镜下观察可知, HbbHLH48 定位在细胞核中(图 6C), 与预测的结果一致, 符合转录因子在细胞核中发挥功能的要求。

3 讨论

HbbHLH48 的保守结构域和三级结构具有 bHLH 家族成员的典型特性。基本螺旋-环-螺旋(bHLH)转录因子家族是一类在植物中广泛分布且成员众多的重要转录因子。这些转录因子以其碱性/螺旋-环-螺旋(basic/helix-loop-helix)结构域为特征, 这一结构域在植物的信号转导、生长发育以及抗逆性等生物学过程中扮演着关键角色^[26]。bHLH 转录因子家族成员的基因编码产物通常包含一个高度保守的 bHLH 结构域, 该结构域由 2 个紧密相连的亚区组成: 碱性区(b)和螺旋环螺旋区(HLH)。碱性区是 DNA 结合的关键区域, 而 HLH 区则由大约 40~50 个氨基酸残基构成, 负责介导同源或异源二聚化过程^[11]。随着基因测序技术和实验技术的发展, 越来越多植物中的 bHLH 家族成员被鉴定发现。

HbbHLH48 蛋白无跨膜结构和信号肽, 定位于细胞核, 符合转录因子定位于细胞核中发挥功能的特性。如 bHLH 转录因子 BEAR1 在水稻原生质体中与细胞核标记蛋白共定位在细胞核中发挥作用调控盐胁迫^[27]。本研究为了研究 HbbHLH48 的系统进化关系及功能, 以拟南芥 bHLH 为参考, 将橡胶树 bHLH 分为 17 个类群。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、白杨(*Populus trichocarpa*)、水稻(*Oryza sativa*)、小立碗藻(*Physcomitrella patens*)和 5 种藻类共 638 个 bHLH, 系统发育分析将其基因划分为 32 个亚家族^[28]。目前在拟南芥中鉴定出 171 个 bHLHs, 根据提出的命名模型, 将其分为 17 个主要类群(I~XVII)和 31 个亚家族^[29]。番茄基因组中共鉴定到 159 个 bHLH, 被划分为 21 个亚家族^[30]。番茄 bHLH 进化分析表明, 92%的 *SibHLH* 基因可能来自早期陆生植物祖先, 8%的 *SibHLH* 基因可能来自藻类祖先^[30]。玉米基因组中共鉴定出 208 个 bHLH 家族成员, 以拟南芥为参考通过系统进化关系将其划分为 18 个亚家族^[31]。在杨树(*Populus canescens*)基因组中共鉴定出 170 个 bHLH, 被划分为 22 个亚家族^[32]。WANG 等^[33]在橡胶树基因组中共鉴定出 180 个 bHLH 基因, 不均匀分布在 18 条染色体上,

分为 23 个不同的亚家族。其中 HbbHLH48 与拟南芥 AtbHLH48、AtbHLH60 聚为一支, 属于 XVII 类群。此外, XVII 类群还有拟南芥 AtbHLH44、AtbHLH50、AtbHLH75 成员, 其功能尚不清楚, 而 AtbHLH48 和 AtbHLH60 的研究相对比较深入。研究表明, 在长日照条件下, 35S:HA-bHLH48 和 35S:HA-bHLH60 过表达的转基因拟南芥植株开花时间明显提前, 上调了开花基因(*FT*)的表达^[34]。此外, bHLH48 和 bHLH60 均与赤霉素受体 DELLA 蛋白 RGL1 互作。DNA 拉下实验、凝胶迁移实验(EMSA)和染色质免疫沉淀法(ChIP)等实验证明了 bHLH48 和 bHLH60 均能和 *PIF7* 的启动子结合并促进其表达, 调控下胚轴伸长, 二者功能存在冗余^[35]。AabHLH48 是侧金盏花(*Adonis amurensis*)中的一个新型 bHLH 转录因子, 定位于细胞核中, 通过结合 *FRUITFULL* 基因的启动子激活其表达, 促进拟南芥早开花^[36]。综上, 推测 HbbHLH48 与橡胶树的 RGL1 蛋白互作, 参与赤霉素途径进而调控开花过程以及胶乳合成途径。

HbbHLH48 基因在花中表达量最高, 经赤霉素处理后的表达水平先显著下调后显著上调。经茉莉酸甲酯、水杨酸、乙烯利处理后, HbbHLH48 的表达模式与经赤霉素处理后的表达模式相反, 先上升后下降。HbbHLH 基因的表达谱显示出对乙烯、茉莉酸处理的不同反应。如 HbbHLH015、HbbHLH074 和 HbbHLH164 在乙烯和茉莉酸处理下显著上调^[33]。茉莉酸处理下, HbbHLH163、HbbHLH094、HbbHLH059、HbbHLH074、HbbHLH15 表达模式相似, 表明这些基因可能参与了茉莉酸介导调控橡胶生物合成^[33]。在橡胶树中, 茉莉酸和乙烯对促进乳汁管分化和乳胶生产至关重要^[37]。YAMAGUCHI 等^[5]研究表明, Hb_MYC2-1 和 Hb_MYC2-2 可能调节细胞分化, Hb_bHLH1 和 Hb_bHLH2 可能促进橡胶的生物合成。ZHANG 等^[38]根据经冠状碱(COR)和割胶处理后, 在形成层区和乳汁管中的表达模式, 结合与其他植物中已功能鉴定的 MYCs(bHLH)的系统发育关系, 得出 HbIMYC24 和 HbIMYC30 可能与乳管分化有关, 而 HbIMYC6、HbIMYC11、HbIMYC15 以及 HbIMYC16、HbIMYC21 可能正调控橡胶的生物合成。研究表明赤霉素可促进 bHLH48 结合开花基因(*FT*)启动子区的转录活性进而调控拟南芥开花过程^[34]。HbbHLH48 响应赤霉素的表达模式与

茉莉酸甲酯、水杨酸、乙烯利的表达模式相反,推测其可能是通过调控赤霉素途径影响开花进而导致橡胶树能量分配,最终影响天然橡胶生物合成。

本研究利用生物信息学和荧光定量 PCR 技术解析了 *HbbHLH48* 的基因结构和在不同组织及激素处理下的表达模式。橡胶树 *HbbHLH48* 响应多种激素处理,响应赤霉素的作用机制和其他激素的响应机制不同。此外,本研究还构建了 *HbbHLH48*-GFP 植物融合表达载体,利用遗传转化的方法证明 *HbbHLH48* 定位在细胞核。本研究为进一步解析 *HbbHLH48* 参与赤霉素途径的作用机制进而调控开花过程以及胶乳合成途径奠定重要基础。

参考文献

- [1] LIU J, SHI C, SHI C C, LI W, ZHANG Q J, ZHANG Y, LI K, LU H F, SHI C, ZHU S T, XIAO Z Y, NAN H, YUE Y, ZHU X G, WU Y, HONG X N, FAN G Y, TONG Y, ZHANG D, MAO C L, LIU Y L, HAO S J, LIU W Q, LV M Q, ZHANG H B, LIU Y, HU-TANG G R, WANG J P, WANG J H, SUN Y H, NI S B, CHEN W B, ZHANG X C, JIAO Y N, EICHLER E E, LI G H, LIU X, GAO L Z. The chromosome-based rubber tree genome provides new insights into spurge genome evolution and rubber biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(2): 336-350.
- [2] NIEPHAUS E, MULLER B, VAN DEENEN N, LASSOWSKAT I, BONIN M, FINKEMEIER I, PRUFER D, SCHULZE GRONOVER C. Uncovering mechanisms of rubber biosynthesis in *Taraxacum koksaghyz*-role of *cis*-renyltransferase-like 1 protein[J]. *Plant Journal*, 2019, 100(3): 591-609.
- [3] QIN B, WANG M, HE H X, XIAO H X, ZHANG Y, WANG L F. Identification and characterization of a potential candidate *Mlo* gene conferring susceptibility to powdery mildew in rubber tree[J]. *Phytopathology*, 2019, 109(7): 1236-1245.
- [4] LI H L, WEI L R, GUO D, WANG Y, ZHU J H, CHEN X T, PENG S Q. HbMADS4, a MADS-box transcription factor from *Hevea brasiliensis*, negatively regulates *HbSRPP*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1709.
- [5] YAMAGUCHI T, KURIHARA Y, MAKITA Y, OKUBO-KURIHARA E, KAGEYAMA A, OSADA E, SHIMADA S, TSUCHIDA H, SHIMADA H, MATSUI M. Regulatory potential of bHLH-Type transcription factors on the road to rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plants*, 2020, 9(6): 674.
- [6] TONG Z, WANG D, SUN Y, YANG Q, MENG X, WANG L, FENG W, LI L, WURTELE E S, WANG X. Comparative proteomics of rubber latex revealed multiple protein species of REF/SRPP family respond diversely to ethylene stimulation among different rubber tree clones[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 958.
- [7] DENG X, GUO D, YANG S, SHI M, CHAO J, LI H, PENG S, TIAN W. Jasmonate signalling in the regulation of rubber biosynthesis in laticifer cells of rubber tree, *Hevea brasiliensis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(15): 3559-3571.
- [8] COLLINS-SILVA J, NURAL A T, SKAGGS A, SCOTT D, HATHWAIK U, WOOLSEY R, SCHEGG K, MCMAHAN C, WHALEN M, CORNISH K, SHINTANI D. Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TkSRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism[J]. *Phytochemistry*, 2012, 79: 46-56.
- [9] ZHENG X, HE L, LIU Y, MAO Y, WANG C, ZHAO B, LI Y, HE H, GUO S, ZHANG L, SCHNEIDER H, TADEGE M, CHANG F, CHEN J. A study of male fertility control in *Medicago truncatula* uncovers an evolutionarily conserved recruitment of two tapetal bHLH subfamilies in plant sexual reproduction[J]. *New Phytol*, 2020, 228(3): 1115-1133.
- [10] OSNATO M. Fantastic four: bHLH factors and the making of the pollen[J]. *Plant Cell*, 2022, 34(4): 1151-1152.
- [11] BUTI S, HAYES S, PIERIK R. The bHLH network underlying plant shade-avoidance[J]. *Physiologia Plantarum*, 2020, 169(3): 312-324.
- [12] ZHANG X, CHEN L, SHI Q, REN Z. *SIMYB102*, an R2R3-type MYB gene, confers salt tolerance in transgenic tomato[J]. *Plant Science*, 2020, 291: 110356.
- [13] CHEN X, HUANG H, QI T, LIU B, SONG S. New perspective of the bHLH-MYB complex in jasmonate-regulated plant fertility in *Arabidopsis*[J]. *Plant Signal Signaling & Behavior*, 2016, 11(2): e1135280.
- [14] QI T, HUANG H, SONG S, XIE D. Regulation of jasmonate-mediated stamen development and seed production by a bHLH-MYB complex in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2015, 27(6): 1620-1633.
- [15] MOGLIA A, FLORIO F E, IACOPINO S, GUERRIERI A, MILANI A M, COMINO C, BARCHI L, MARENGO A, CAGLIERO C, RUBIOLO P, TOPPINO L, ROTINO G L, LANTERI S, BASSOLINO L. Identification of a new R3 MYB type repressor and functional characterization of the members of the MBW transcriptional complex involved in anthocyanin biosynthesis in eggplant (*S. melongena* L.)[J]. *PLoS International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 15(5): e0232986.

- [16] LI Y, SHAN X, GAO R, HAN T, ZHANG J, WANG Y, KIMANI S, WANG L, GAO X. MYB repressors and MBW activation complex collaborate to fine-tune flower coloration in *Freesia hybrida*[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 396.
- [17] NGUYEN C T, TRAN G B, NGUYEN N H. The MYB-bHLH-WDR interferers (MBWi) epigenetically suppress the MBW's targets[J]. Biology of the Cell, 2019, 111(11): 284-291.
- [18] LI S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex[J]. Plant Signal Behav, 2014, 9(1): e27522.
- [19] KIM J, KIM D H, LEE J Y, LIM S H. The R3-Type MYB transcription factor BrMYBL2.1 negatively regulates anthocyanin biosynthesis in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) by repressing MYB-bHLH-WD40 complex activity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(6): 3382.
- [20] CHEN C, LIU F, ZHANG K, NIU X, ZHAO H, LIU Q, GEORGIEV M I, XU X, ZHANG X, ZHOU M. MeJA-responsive bHLH transcription factor LjbHLH7 regulates cyanogenic glucoside biosynthesis in *Lotus japonicus*[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(8): 2650-2665.
- [21] CAO Y, LIU L, MA K, WANG W, LV H, GAO M, WANG X, ZHANG X, REN S, ZHANG N, GUO Y D. The Jasmonate-induced bHLH gene *sljig* functions in terpene biosynthesis and resistance to insects and fungus[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(5): 1102-1115.
- [22] SINGH S K, PATRA B, PAUL P, LIU Y, PATTANAIK S, YUAN L. *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.
- [23] 刘明洋, 杨洪, 代龙军, 王立丰, 郭冰冰. 橡胶树胶乳 *HbHSP90.6* 基因克隆、表达与亚细胞定位分析[J]. 热带作物学报, 2023, 44(10): 1935-1943.
- LIU M Y, YANG Y, DAI L J, WANG L F, GUO B B. Analysis of *HbHSP90.6* gene cloning, expression and sub-cellular localization in rubber tree latex[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(10): 1935-1943. (in Chinese)
- [24] FANG Y, XIAO X, LIN J, LIN Q, WANG J, LIU K, LI Z, XING J, LIU Z, WANG B, QI Y, LONG X, ZENG X, HU Y, QI J, QIN Y, YANG J, ZHANG Y, ZHANG S, YE D, ZHANG J, LIU J, TANG C. Pan-genome and phylogenomic analyses highlight *Hevea* species delineation and rubber trait evolution[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 7232.
- [25] QIN B, FAN S L, YU H Y, LU Y X, WANG L F. HbMYB44, a rubber tree MYB transcription factor with versatile functions in modulating multiple phytohormone signaling and abiotic stress responses[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 893896.
- [26] ABBAS M, ZANG Y Y, LU C, KHAN M A, RAHMAN M A U, UMER M J, LIANG C Z, MENG Z G, WANG P L, ASKARI M, WEI Y X, ZHANG R. Insights into genetic diversity and functional significance of the *bHLH* genes in cotton fiber development[J]. Industrial Crops and Products, 2024, 216(15): 118763.
- [27] TENG Y, LV M, ZHANG X, CAI M, CHEN T. BEAR1, a bHLH transcription factor, controls salt response genes to regulate rice salt response[J]. Journal of Plant Biology, 2022, 65(3): 217-230.
- [28] CARRETERO-PAULET L, GALSTYAN A, ROIG-VILLANOVA I, MARTINEZ-GARCIA J F, BILBAO-CASTRO J R, ROBERTSON D L. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae[J]. Plant Physiol, 2010, 153(3): 1398-1412.
- [29] GAO F, DUBOS C. The arabidopsis bHLH transcription factor family[J]. Trends in Plant Science, 2024, 29(6): 668-680.
- [30] SUN H, FAN H J, LING H Q. Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 9.
- [31] ZHANG T, LV W, ZHANG H, MA L, LI P, GE L, LI G. Genome-wide analysis of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in maize[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 235.
- [32] WANG X J, PENG X Q, SHU X C, LI Y H, WANG Z, ZHUANG W B. Genome-wide identification and characterization of PdbHLH transcription factors related to anthocyanin biosynthesis in colored-leaf poplar (*Populus deltoids*)[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 244.
- [33] WANG Z, YUAN Y, REHMAN F, WANG X, WU T, DENG Z, CHENG H. Genome-wide identification and characterization of bHLH gene family in *Hevea brasiliensis*[J]. Genomics, 2024, 104(1): 14-23.
- [34] LI Y, WANG H, LI X, LIANG G, YU D. Two DELLA-interacting proteins bHLH48 and bHLH60 regulate flowering under long-day conditions in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(11): 2757-2767.
- [35] YANG C, HUANG S, ZENG Y, LIU C, MA Q, PRUNEDAPAZ J, KAY S A, LI L. Two bHLH transcription factors, bHLH48 and bHLH60, associate with phytochrome interacting factor 7 to regulate hypocotyl elongation in *Arabidopsis*[J]. Cell Reports, 2021, 35(5): 109054.
- [36] FENG S, REN L, DAI S, WANG H, ZHANG F, ZHOU A, ZHOU B, WANG J. AabHLH48, a novel basic helix-loop-

- helix transcription factor from *Adonis amurensis*, promotes early flowering in *Arabidopsis* by activating FRUITFULL expression[J]. Journal of Plant Physiology, 2024, 297: 154256.
- [37] HAO B Z, WU J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid[J]. Annals of Botany, 2000, 85(1): 37-43.
- [38] ZHANG S X, WU S H, CHAO J Q, YANG S G, BAO J, TIAN W M. Genome-wide identification and expression analysis of MYC transcription factor family genes in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. Forests, 2022, 13(4): 531.