

DOI: 10.13376/j.cbls/2015030

文章编号: 1004-0374(2015)02-0208-09

# 植物bHLH转录因子参与非生物胁迫信号通路研究进展

王昕嘉, 李昆志\*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

**摘要:** 干旱、高盐以及低温作为主要的非生物胁迫在全球范围内影响了许多粮食作物的生长和产量。植物对非生物胁迫的适应性应答主要是通过复杂的信号通路改变大量下游基因表达来实现。bHLH作为植物体内第二大类转录因子, 能与E-box顺式作用元件特异性结合, 调控胁迫-应答相关基因的表达。侧重对植物中bHLH转录因子参与非生物胁迫信号通路的最新研究进展进行综述, 以期进一步了解植物bHLH转录因子在逆境胁迫方面发挥作用的分子机理, 为基因工程调控植物应答胁迫的能力提出理论依据。

**关键词:** 非生物胁迫; 植物bHLH转录因子; 胁迫信号通路; 胁迫耐受性

**中图分类号:** Q948.112 **文献标志码:** A

## Progress of plant bHLH transcription factors involved in abiotic stress signaling pathways

WANG Xin-Jia, LI Kun-Zhi\*

(School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** The growth and yield of many grain crops are influenced by drought, high salt concentration, and low temperature, which are main abiotic stress factors throughout the world. The adaptive response of plants to abiotic stress is realized mainly through complex signaling pathways changing the expressions of many downstream genes. As the second largest category of transcription factors, the bHLH transcription factors in plants could regulate the expression of the stress-responsive genes with the specific binding to the E-box cis-acting element in their promoters. In this paper, the new progress of plant bHLH transcription factors involved in abiotic stress signaling pathways is reviewed. We hope to further understand the molecular mechanisms of the plants bHLH transcription factors functioning under environmental stress, so as to provide theoretical basis for regulating the stress-responsive capability of plant through the genetic engineering.

**Key words:** abiotic stress; plant bHLH transcription factors; stress signaling pathways; stress tolerance

非生物胁迫是植物生长以及粮食产出的主要制约因素之一。植物经过长期的进化演化出一系列对非生物胁迫的适应性应答。简单来说, 植物的这种适应性应答主要是通过复杂的信号通路改变大量下游基因表达来实现。信号通路的第一步是信号的感受, 紧接着产生二级信号物质, 这些物质通常是非蛋白分子, 如Ca<sup>2+</sup>、磷酸肌醇(inositol trisphosphate, IPs)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等, 通过这些信号物质水平的变化将信号进一步向下传递。二级信号物质有能力起始蛋白的磷酸化以调控某些特定转录因子的活性, 从而最终调控目的基因

的表达<sup>[1]</sup>。

越来越多的证据表明植物胁迫信号传递是由大量的胁迫相关基因组成。当植物处于胁迫环境下, 不同的基因会受到抑制或诱导。这些基因基于它们

收稿日期: 2014-05-28; 修回日期: 2014-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31060258, 31260297); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养基金资助项目(2006PY01-10)

\*通信作者: E-mail: likunzhi63@126.com; Tel: 153-98533250

所编码蛋白的功能被分为两大类<sup>[2-4]</sup>: 第一类由直接作用于保护植物细胞不受胁迫伤害的功能性蛋白 (functional proteins) 组成, 包括渗透保护剂所需的酶 (enzymes required for osmoprotectants)、胚胎发育晚期丰富 (late embryogenesis abundant, LEA) 蛋白、水孔蛋白 (aquaporins)、分子伴侣 (molecular chaperones) 以及解毒酶 (detoxification enzymes) 等; 第二类由负责信号转导以及调控基因表达的调节蛋白 (regulatory proteins) 组成, 以转录因子 (transcription factors, TF) 和蛋白激酶 (protein kinases) 为代表。植物对非生物胁迫的适应性应答最终是通过编码多样的功能性蛋白来发挥作用, 如植物应对干旱胁迫的主要机制是: 植物感知胁迫, 通过信号物质转导信号, 最终作用于激活大量与胁迫相关的基因, 合成多种功能性蛋白, 从而产生不同的生理和代谢应答<sup>[5]</sup>, 而在整个过程中调节蛋白所起的作用不可或缺。其中, 转录因子能与各类胁迫相关基因启动子区域内的顺式作用元件相结合, 从而激活下游或整个系统的基因, 使它们协同作用于提高植物对胁迫的耐受性。与其他功能蛋白相比, 转录因子能潜在地产生更多的响应。这些特性决定了转录因子适合作为调控胁迫耐性的候选因子<sup>[6]</sup>。同时, Chen 等<sup>[7]</sup>研究表明, 植物体内的转录因子也的确参与了抗逆境胁迫应答, 通过利用基因芯片技术对胁迫条件下拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 402 个转录因子的表达水平进行分析, 发现有 28 个编码转录因子基因的表达都受到胁迫诱导。

## 1 植物bHLH转录因子

bHLH (basic helix loop helix) 转录因子是植物体内第二大类转录因子, 因含有 bHLH 结构域而得名。bHLH 结构域高度保守, 大约包含 60 个氨基酸, 一般由两个在功能上完全不同的区域组成: 碱性区域和螺旋-环-螺旋结构域。N-端的碱性区域作为 DNA 结合域发挥作用, 大约由 15 个氨基酸残基组成, 其中包括约 6 个碱性氨基酸残基。它能与靶基因启动子区域中顺式作用元件 E-box (5'-CANNTG-3') 特异性结合, 以 G-box (5'-CACGTG-3') 形式最为常见。C-端的螺旋-环-螺旋结构域由两个双亲的  $\alpha$ -螺旋通过一个不定长度的环结构连接起来, 组成环结构的氨基酸大多为疏水氨基酸。两个 bHLH 蛋白的双亲  $\alpha$ -螺旋能够发生互作, 形成同源或者异源二聚体。与植物其他转录因子一样, bHLH 转录因子也参与了非生物胁迫应答。在最近的报道中, 植物 bHLH 蛋白可能从气孔的发育、叶毛与根毛的发

育和对脱落酸 (abscisic acid, ABA) 的敏感性几方面参与植物耐旱应答<sup>[8]</sup>。本文通过对 bHLH 转录因子参与胁迫信号通路的研究进行综述, 以期进一步了解 bHLH 转录因子在逆境胁迫中所起的作用, 人为调控植物应答非生物胁迫提供更多的理论依据。

## 2 依赖于ABA的信号途径(The ABA-dependent signaling pathways)和独立于ABA信号途径(The ABA-independent signaling pathways)

ABA 是一种重要的植物激素, 在植物应答胁迫过程中起着重要的作用, 它能诱发一系列的存活机制: 对光合作用的抑制、对呼吸作用的激活以及控制气孔的闭合<sup>[9]</sup>。简言之, ABA 能抑制  $Ca^{2+}$  的内流, 降低膜上的质子泵活性, 使质膜去极化, 最终导致气孔的关闭<sup>[10]</sup>。根据 ABA 的参与情况将植物中胁迫应答信号通路分为两类: 依赖于 ABA 的信号途径和独立于 ABA 的信号途径。相应地, 在应激诱导基因启动子区域内的顺式作用元件也分为两大类: 依赖于 ABA 的信号途径对应 ABRE (ABA-responsive elements) 元件; 独立于 ABA 的信号途径对应 DRE (dehydration responsive elements) [CRT (C-repeat)] 元件<sup>[11]</sup>。根据这个分类, bHLH 转录因子参与胁迫信号传递的分子机制也可分为这两部分。

### 2.1 独立于ABA信号途径

#### 2.1.1 ICE1-CBF冷响应通路

据推测, 正常生长温度下的拟南芥细胞中存在一个组成型表达的转录因子, 它能识别 CBF (CRT binding factors) 基因的启动子, 且能在冷胁迫条件下诱导 CBF 基因的表达, 故将其命名为 ICE (inducer of CBF expression)<sup>[12]</sup>。之后研究发现的 ICE1 基因编码了一个 bHLH 转录因子, 它能与 CBF3 基因的启动子结合, 验证了之前的假说<sup>[13]</sup>。在野生型拟南芥中, 室温下过量表达 ICE1 并不能激活下游 CBF3 基因的表达, 而在冷胁迫下过量表达却能提高 CBF3 基因的表达量。CBFs/DREBs (DRE-bindings) 蛋白也是一类与胁迫相关的转录因子, 它们能激活或抑制启动子区域内具有 DRE/CRT 元件的下游基因, 如 COR15 和 COR47 基因。过表达 CBF1<sup>[14]</sup> 与 DREB1a/CBF3<sup>[15]</sup> 均能在正常温度下诱导 COR (cold-regulated genes) 家族基因的表达。ice1 突变体抑制了 CBF3 基因以及其下游基因的表达, 最终导致植物的抗冻性显著下降。与野生型相比, 在纯合子 ice1 突变体中约有 40% 的冷响应基因表达受到抑制, 这些基因中有 46% 编码了冷调控相关的转录

因子<sup>[16]</sup>。这些结果说明, ICE1 参与了植物感受冷胁迫信号以及传递信号的过程: 外界温度降低的信号通过某种途径传递至 ICE1, ICE1 在冷胁迫下能激活下游 *CBF3* 基因, 胁迫信号传递至下游 CBF 转录因子, 进一步激活 CBF 下游基因的表达, 使植物表现出耐冷性和抗冻性。这一研究首次发现了 bHLH 转录因子在胁迫信号传递过程中起着不可替代的作用, ICE1 作为上游调控因子, 调控了包括 CBF 在内的许多冷响应元。之后在拟南芥中发现的 ICE2 与 ICE1 在编码 bHLH 结构域序列上完全相同, 过量表达 *ICE2* 能显著提高转基因拟南芥的耐冷性。推测 ICE2 与 ICE1 相似, 能够通过直接激活 *CBF1* 的表达来调控更多冷响应基因的表达<sup>[17]</sup>。

ICE1 转录因子仅当植物暴露于低温环境才诱导 *CBF* 和其他冷胁迫响应基因, 因此转录后修饰对 ICE1 的活性起着重要作用<sup>[18]</sup>。低温胁迫诱导了 ICE1 的 SUMO (small ubiquitin related modifier) 化<sup>[19]</sup>, 保护了 ICE1 蛋白的活性与稳定性。同时, 泛素 E3 连接酶 HOS1<sup>[20]</sup> 通过泛素化介导了 ICE1 蛋白表达水平的降低。SUMO 化与泛素化可能互为拮抗关系, 它们共同作用调控了 ICE1 的活性。在过量表达 *MdCibHLH1* (cold-induced bHLH1) 基因的苹果 (*Malus × domestica*) 组织中, *MdCibHLH1* 蛋白同样发生了泛素化及 SUMO 化修饰, *MdCibHLH1* 的基因结构和氨基酸序列都与 *ICE1* 具有较高的相似性<sup>[21]</sup>。低温下, 胁迫信号可能通过 ICE1 蛋白的转录后修饰引起 ICE1 蛋白表达水平的变化, 从而将胁迫信号继续向下传递。

ICE1-CBF 冷响应通路在多种植物种类中是保守存在的, 包括茶树 (*Camellia sinensis*)<sup>[22]</sup>、小麦 (*Triticum aestivum*)<sup>[23]</sup>、苹果<sup>[21]</sup>、番茄 (*Solanum lycopersicum*)<sup>[24-25]</sup>、赤桉 (*Eucalyptus camaldulensis*)<sup>[26]</sup>、板蓝根 (*Isatis tinctoria* L.)<sup>[27]</sup> 以及荠菜 (*Capsella bursa-pastoris*)<sup>[28]</sup> 等。其中, 单子叶植物中一般具有两种 ICE 同源性较高的蛋白, 它们的相对分子质量分别为  $40 \times 10^3$  和  $55 \times 10^3$ , 而双子叶植物中大多仅有一个 *ICE* 基因<sup>[29]</sup>。在白菜 (*Non-heading Chinese cabbage*) 中, 同源性分析、蛋白质二级结构分析和冷胁迫下表达谱分析均表明 *BrICE1*、*BrCBF* 以及 *BrCOR14* 在冷响应通路中所起的关键性作用与拟南芥中 *ICE1*、*CBF3* 以及 *COR15b* 基因的模式相类似<sup>[30]</sup>。同时, *BrCBF* 以及 *BrCOR14* 通过独立于 ABA 的途径参与了胁迫下的诱导应答。水稻 (*Oryza sativa* L.) 中 ICE1 的同源性蛋白 *OsICE1* 和 *OsICE2* 作为上游

转录调控因子, 参与了上调冷胁迫诱导表达转录因子 *OsDREB1B* 和 *OsHSFA3* (rice heat shock factor A3) 的表达水平。冷胁迫仅提高了 *OsICE1* 和 *OsICE2* 的蛋白表达水平, 而编码它们基因的表达量并未提高<sup>[29]</sup>, 相似于拟南芥中 *ICE1* 的转录后调控机制。中国野生山葡萄 (*Vitis amurensis*) 中的 *VabHLH1* 以及赤霞珠品种葡萄 (*Vitis vinifera* cv. *Cabernet Sauvignon*) 中的 *VvbHLH1* 在氨基酸序列方面具有较高的相似性 (99.1%)。冷胁迫 24 h 后, 过表达 *VabHLH1* 时, 拟南芥中 *AtCBF3* 基因的表达量高出对照组拟南芥 6.5 倍; 而过表达 *VvbHLH1* 时, *AtCBF3* 基因的表达量高出对照组拟南芥 4.5 倍。与 ICE1 转录因子类似, *VabHLH1* 蛋白和 *VvbHLH1* 蛋白在冷胁迫下可能通过一个依赖 CBF 的冷信号途径起着关键性的调控作用<sup>[31]</sup>。

### 2.1.2 独立于 ABA 信号途径

参与独立于 ABA 信号途径胁迫应答基因的表达, 一直被认为是通过 DRE 元件进行调控的。以 *OrbHLH2* 为例, 与野生型种子相比, *OrbHLH2* 过表达植株种子的萌发表现出对外源 ABA 相似的敏感性。过表达植株中 *DREB1A/CBF3*、*COR15A*、*RD29A* 以及 *KINI* 基因的表达量显著高于野生型<sup>[32]</sup>。*OrbHLH2* 可能作为 *DREB1/CBF* 的上游调控因子起作用, *OrbHLH2* 接受到胁迫信号后, 诱导 *DREB1/CBF* 基因的表达并将信号向下转导, *DREB1/CBF* 特异性地与 *COR15A*、*RD29A* 以及 *KINI* 等下游作用基因启动子区域内的 DRE/CRT 元件相结合, 诱导下游基因表达, 最终表现出胁迫应答。ICE1-CBF 冷响应通路也可以归为独立于 ABA 信号途径, 以上几个 bHLH 蛋白都作为 CBFs/DREBs 类转录因子的上游激活因子, 将胁迫信号向下传递。

外源 ABA 处理对拟南芥 *bHLH122* 的表达并未产生显著性变化。与野生型相比, 干旱胁迫诱导 *bHLH122* 基因表达量升高的现象在 ABA- 缺陷性突变体 (*aba2-1*) 和 ABA- 不敏感突变体 (*abi4-1*) 中也无明显差异。同时, 芯片结果显示: 部分可能的 bHLH122 作用靶基因, 如 *CCA1* (circadian clock-associated 1)、*SZF1* (salt-inducible zinc finger) 以及 *ZAT10* (salt-tolerance zinc finger) 等对外源 ABA 并不敏感<sup>[4]</sup>。*bHLH122* 可能通过独立于 ABA 信号途径直接调控胁迫应答基因的表达。而在非胁迫条件下, 过量表达 *bHLH122* 会使植物体内的 ABA 含量升高, 这可能是由于过量表达 *bHLH122* 抑制了 *CYP707A3* 基因的转录。*CYP707A3* 基因编码一个



ABA 8'-羟化酶, 在脱水和复水后的拟南芥中决定了体内 ABA 的阈值水平<sup>[33]</sup>。CYP707A3 基因的 mRNA 水平在过量表达 *bHLH122* 植株中显著下调, 而在 *bhlh122* 突变体植株中明显上调。这些结果又表明, bHLH122 通过抑制 CYP707A3 的转录水平来提高植物体内 ABA 的含量, 最终通过改变气孔开度等途径来应答干旱、盐和渗透胁迫。总之, 在过量表达 *bHLH122* 植株中, 存在着依赖于 ABA 的信号通路和独立于 ABA 信号途径相交叠的现象。

### 2.1.3 JA信号通路

水稻中茉莉酸 (jasmonates, JA) 响应基因 *RERJ1*<sup>[34]</sup> 编码了一个 bHLH 蛋白, *RERJ1* 基因能被外源 JA 诱导, 同时机械损伤和干旱胁迫也能上调其在水稻叶中的表达, 而外源 ABA 并不能诱导它的表达。推测 *RERJ1* 可能是通过 JA 信号通路获得胁迫信号参与了胁迫应答。2011 年, Seo 等<sup>[35]</sup> 的研究进一步补充了这一信号通路: 水稻中 *OsbHLH148* 基因编码了一个 bHLH 转录因子, 在没有茉莉酸的情况下, *OsbHLH148* 与 OsJAZ 发生相互作用, 从而抑制了 *OsbHLH148* 的活性。植株处于胁迫环境下, 具有生物活性形式的茉莉酸 JA-Ile (jasmonoyl isoleucine) 的水平上升, 促进了 26S 蛋白酶体介导的 OsJAZ 降解。在接受到茉莉酸信号后, OsJAZ 的降解释放了转录因子 *OsbHLH148*。这说明, *OsbHLH148* 参与了茉莉酸信号通路中发生在上游的应答起始阶段。*AtDREB1A* 编码的蛋白在拟南芥中作为非生物胁迫应答 (脱水、高盐和低温胁迫) 的一个关键性转录因子, 以独立于 ABA 的方式起作用, 而作为同源基因的 *OsDREB1A* 通过茉莉酸信号途径获得干旱信号, 最终表现出干旱耐性。*OsDREB1A* 基因在茉莉酸甲酯 (metjasmo, MeJA) 处理 15 min 后受到诱导表达, 在干旱条件下也能逐渐被诱导表达, 但 ABA 并不能诱导其表达。在干旱胁迫条件下, *OsbHLH148* 的诱导表达时间点要早于 *OsDREB1A* 的诱导表达时间点。过表达 *OsbHLH148* 植株与野生型植株相比, *OsDREB1* 表达水平明显上调。这些结果说明, *OsDREB1* 可能作为 *OsbHLH148* 转录因子的下游靶基因。同时, 过表达 *OsbHLH148* 植株与野生型植株相比, 表达量上调的基因中有 29 个基因的启动子区域内含有一个以上的 DRE 核心序列 (A/GCCGAC) 拷贝, *OsDREB1* 蛋白能特异性识别该核心序列。*OsDREB1* 受到诱导激活后, 也会激活其下游的目标作用基因, 最终使过表达 *OsbHLH148* 植株表现出干旱耐性。

值得注意的是: 分别用 MeJA、ABA 以及 MeJA + ABA 处理后, 水稻中 *OsbHLH148* 的表达均受到诱导。MeJA+ABA 的诱导表达水平高于 MeJA, ABA 最低。非生物胁迫促进了水稻中 MeJA 和 ABA 的生物合成; *OsbHLH148* 通过 MeJA 与 ABA 协同介导参与了水稻对非生物胁迫的适应性。拟南芥中的 *AtJMT* 基因编码的蛋白参与了 MeJA 的生物合成, 过量表达 *AtJMT* 使转基因水稻中的 *OsSDR* 基因获得上调表达, *OsSDR* 基因编码的蛋白参与 ABA 的生物合成, 从而使非干旱条件下转基因水稻幼穗组织中的 ABA 水平上升<sup>[36]</sup>。同样, 在干旱条件下, 茉莉酸水平可能先升高, 之后 ABA 的水平也出现相应升高。

## 2.2 依赖于ABA的信号途径

ABRE 元件能与 bZIP 家族的转录因子发生特异性结合, 而几乎所有 ABA 胁迫应答相关基因的启动子都包含 ABRE 元件。一些 bHLH 家族的基因参与了非生物胁迫的耐受性, 但在对盐胁迫应答过程中并不依赖 ABA, 这表明在胁迫条件下, bHLH 家族中的部分基因成员<sup>[30, 32]</sup> 可能不涉及依赖于 ABA 的信号通路。但部分 bHLH 基因也会受到外源 ABA 处理的诱导, 如 *AtMYC2* 和 *AtAIB*<sup>[37-38]</sup>, 说明也有 bHLH 蛋白参与了依赖于 ABA 的信号途径调控机制。

### 2.2.1 间接参与依赖于ABA的信号途径

间接参与依赖于 ABA 的信号途径可能是通过 ABA 处理, 诱导 bZIP 蛋白的表达, 结合启动子区域内含有 ABRE 元件的下游靶基因 (bHLH 包括在这些基因中), bHLH 受到诱导表达后, 再调控其自身下游靶基因的表达, 最终表现出对非生物胁迫的抗逆性。香杨 (*Populus koreana* Rehd) *PkbHLH2* 基因<sup>[39]</sup> 的启动子区域内具有 ABRE 核心元件, *PkbZIP2* 能与该核心元件发生特异性结合, 调控 *PkbHLH2* 基因的表达。同时, ABA 和氧化胁迫都能上调 *PkbHLH2* 基因与 *PkbZIP2* 基因的表达, 且表达模式类似。*PkbHLH2* 基因作为 *PkbZIP2* 转录因子的下游靶基因, 通过获得 *PkbZIP2* 所传递的胁迫信号, 最终进一步传递信号, 诱导 *PkbHLH2* 自身的下游靶基因表达。

### 2.2.2 直接参与依赖于ABA的信号途径

在拟南芥中, *RD22* (responsive to desiccation 22) 基因是个脱水应答基因, 其编码了一个 bHLH 转录因子, 能被外源 ABA 诱导表达。而这种诱导需要在干旱胁迫下合成一种新蛋白。但 *RD22* 基因的启动

子内并未发现传统的 ABRE 元件<sup>[40]</sup>。之后研究证实：干旱胁迫下，体内合成了 bHLH 相关蛋白 AtMYC2 和 MYB 相关蛋白 AtMYB2<sup>[37, 41]</sup>。在 ABA 诱导下，过量表达 *AtMYC2* 增加了 *RD22* 和 *AtADH1* 基因的表达水平，而在这两个基因的启动子内均含有 MYC 和 MYB 特异性结合的位点。这些结果说明，在干旱胁迫和盐胁迫下，bHLH (AtMYC2) 蛋白与 MYB (AtMYB2) 蛋白协作调控基因的表达可能是 ABA 信号通路中的另一种调控系统。

在转基因植物中过量表达 *AtMYC2* 和 (或) *AtMYB2* 都使植物组织和种子表现出对 ABA 更敏锐的感受能力，而 Ds transposon 插入纯合子突变体则表现出较低的敏感性。之后发现：*AtAIB* 基因编码一个 bHLH 转录因子，*AtAIB* 基因过量表达能提高子叶和幼苗根系对 ABA 的敏感性；T-DNA 插入 *AtAIB* 的表达导致植物对 ABA 敏感性降低。土培 *AtAIB* 过表达植株增强了植株的干旱耐受性。AtMYC2 及 *AtAIB* 这类 bHLH 转录因子可能直接通过 ABA 获得胁迫信号，并作为信号传递中间体，最终将胁迫信号进一步向下传递。

### 2.3 $\text{Ca}^{2+}$ 结合型bHLH转录因子参与胁迫信号通路

AtNIG1 是首个证实参与植物盐胁迫信号通路的  $\text{Ca}^{2+}$  结合型 bHLH 转录因子<sup>[42]</sup>，AtNIG1 定位在核仁并能在体外与  $\text{Ca}^{2+}$  发生结合作用。与野生型相比，*atnig1-1* 敲除突变体对盐胁迫的敏感性显著提高，同时，盐胁迫下突变体的成活率、干重等生理指标均显著下降，这些都说明了 AtNIG1 在盐胁迫信号通路中起着至关重要的作用。与以上信号通路不同的是，AtNIG1 通过  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路直接结合二级信号物质 ( $\text{Ca}^{2+}$ )，而 bHLH 转录因子在这条通路中同时作为  $\text{Ca}^{2+}$  受体和转录因子发挥作用。

## 3 植物bHLH转录因子在参与非生物胁迫应答中的下游靶基因

对 bHLH 转录因子参与非生物胁迫应答中下游靶基因的研究仍处于基础阶段，许多研究仅间接推测出一些可能的下游靶基因。对于下游靶基因的研究还需要科研工作者不懈的努力，争取为植物 bHLH 转录因子参与非生物胁迫信号通路提供更多的理论支持。

### 3.1 编码CBF/DREB转录因子基因

作为 bHLH 的靶基因，bHLH 转录因子能在胁迫条件下激活编码 CBF/DREB 转录因子基因的转录，从而进一步激活 CBF/DREB 转录因子的靶基因，调控下游更多的胁迫响应相关基因。在拟南芥中，

电泳迁移率分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 表明 ICE1 能特异地与 *CBF3* 启动子区域内的 MYC 识别位点发生结合<sup>[13]</sup>。苹果 MdCibHLH1 蛋白能与 *AtCBF3* 和 *MdCBF2* 启动子区域的 MYC 识别位点发生特异性结合并激活它们的表达<sup>[21]</sup>。番茄中 SIICE1a 能与 *SICBF1* 和 *SICBF3* 启动子区域内的 MYC 元件直接作用来调控下游 *CBF* 基因的转录水平<sup>[24]</sup>。编码 CBF/DREB 转录因子的基因可能是植物 bHLH 转录因子在参与非生物胁迫应答中起关键作用的一类下游靶基因。

### 3.2 编码参与ABA信号通路基因

EMSA 和染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 分析同时证明拟南芥 bHLH122 能直接与 *CYP707A3* 基因启动子结合，抑制了 *CYP707A3* 基因的转录，从而提高了体内 ABA 含量。过量表达 *bHLH122* 基因能在非胁迫条件下提高植物体内 ABA 含量，而 ABA 的产生会诱发一系列保护机制。胡杨 (*Populus euphratica*) 中的 *PebHLH35* 可能在干旱胁迫下诱导 *FAMA* 基因的表达上调<sup>[43]</sup>，该基因在拟南芥中编码一个转录因子，负责保卫细胞的分化，缺失该转录因子会导致气孔不能正常发育<sup>[44]</sup>。*PebHLH35* 的过量表达显著降低了气孔的密度和开度，从而降低了蒸腾速率。这些结果验证了通过转录因子调控气孔的发育是一个响应干旱胁迫的重要途径<sup>[8]</sup>，显然植物 bHLH 转录因子也参与了这一应答。拟南芥中，*RD22* 转录因子以转录激活因子在逆境胁迫下参与 ABA 信号转导过程。*RD22* 基因的启动子区域内具有 MYC (CANNTG) bHLH 以及 MYB (C/TAACNA/G) 识别位点，该基因的表达受到 AtMYC2 转录因子的调控，AtMYC2 的单独过表达能诱导下游 *RD22* 基因的表达<sup>[41]</sup>。

### 3.3 编码过氧化物酶(POD)基因

在枳 (*Poncirus trifoliata*)<sup>[3]</sup> 中，通过酵母单杂交 (yeast one-hybrid assay) 与瞬时表达 (transient expression analysis) 分析，表明 PtrbHLH 转录因子能与一个编码 *POD* 基因的启动子区域内 E-box 元件相结合。无论在冷胁迫还是正常生长条件下，与野生型烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 和野生型柠檬 (*Citrus limon*) 相比，过表达 *PtrbHLH* 烟草和柠檬中，*POD* 活性都显著升高，体内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累量则显著降低；同时，通过 RNA 干扰 (RNAi) 下调 *PtrbHLH* 表达的植物中 *POD* 的活性较低，体内  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量更高。这些结果共同表明，PtrbHLH 转录因子通过调控 *POD* 介导的  $\text{H}_2\text{O}_2$  清除参与了植物对冷胁迫的应答。

### 4 植物bHLH与其他转录因子所形成的调控网络

根据之前的论述, 植物 bHLH 能直接与 *CYP707A3* 基因和 *POD* 基因等编码功能性蛋白的基因启动子结合, 但大部分研究结果仍集中于对下游编码 CBFs/DREBs 和 RD22 等转录因子基因的激活诱导作用。在香杨中, PkbHLH2 作为 PkbZIP2 转录因子的下游转录因子, 通过 PkbZIP2 转录因子的诱导激活作用, 编码 PkbHLH2 转录因子蛋白再诱导其自身作用靶基因的表达, 编码功能性蛋白, 使植物表现出干旱耐性<sup>[39]</sup>。上游转录因子特异地与编码下游转录因子基因启动子区域内的对应顺式作用元件相结合, 分布传递胁迫信号。

通过 STIFDB 数据库分析了拟南芥中逆境胁迫相关基因的启动子区域内转录因子的结合位点<sup>[45-46]</sup>。在分析的 2 629 个基因中, 根据结合位点的数量可知: 2 628 个基因具有 MYB 转录因子结合位点、2 097 个基因具有 HSEs 结合位点、

1 734 个具有 WRKY 结合位点、N-box bHLH 579 个、G-box-bHLH 781 个。这些结果表明, 每个逆境胁迫相关基因的启动子区域内至少具有两个或两个以上的顺式作用元件结合位点。共表达 *AtbHLH17* 和 *AtWRKY28* 转基因拟南芥植株<sup>[47]</sup> 在甲基紫精 (methyl viologen, MV) 模拟的胁迫条件下,

*CZSOD2* 基因的表达量增加, 对其启动子区域分析并未发现 WRKY 和 bHLH 结合元件, 而具有 HSE1、MYBRS 以及 GCC-box 元件。这可能是由于其他转录因子诸如 DREB、MYB 和 HSF 等的启动子区域内具有 bHLH 或者 WRKY 结合元件, 间接地调控了 *CZSOD2* 基因的转录表达。共表达植株在 NaCl、PEG 和 MV 模拟胁迫下表现出较高的逆境耐受性, 两种转录因子的过表达直接或间接上调其他转录因子的表达水平, 最终调控了更多数量的下游靶基因。所以, 过量表达某种转录因子, 可能会间接地通过它上调其他的转录因子, 最终上调功能基因。*ice1* 突变体与野生型植株冷处理 6 h 后基因芯片的结果显示, 有 306 个基因在野生型中具有 3 倍或者 3 倍以上更高的诱导表达, 这其中的 2/3 编码了转录因子<sup>[13]</sup>。这些结果都证明了, 在传递胁迫信号过程中, 包括 bHLH 在内的不同转录因子之间的相互作用是普遍现象, 它们可能形成一个复杂的传递中间网络, 对下游逆境诱导的基因进行调控。

### 5 小结

bHLH 转录因子参与的胁迫信号通路可根据是否依赖 ABA 被分为两类 (图 1)。在独立于 ABA 途径中, 植物可能通过 JA 信号途径获得胁迫信号。Dombrecht 等<sup>[48]</sup> 研究报道, AtMYC2 通过 JA 信号途径调控一系列 JA 响应基因参与氧化胁迫自我保

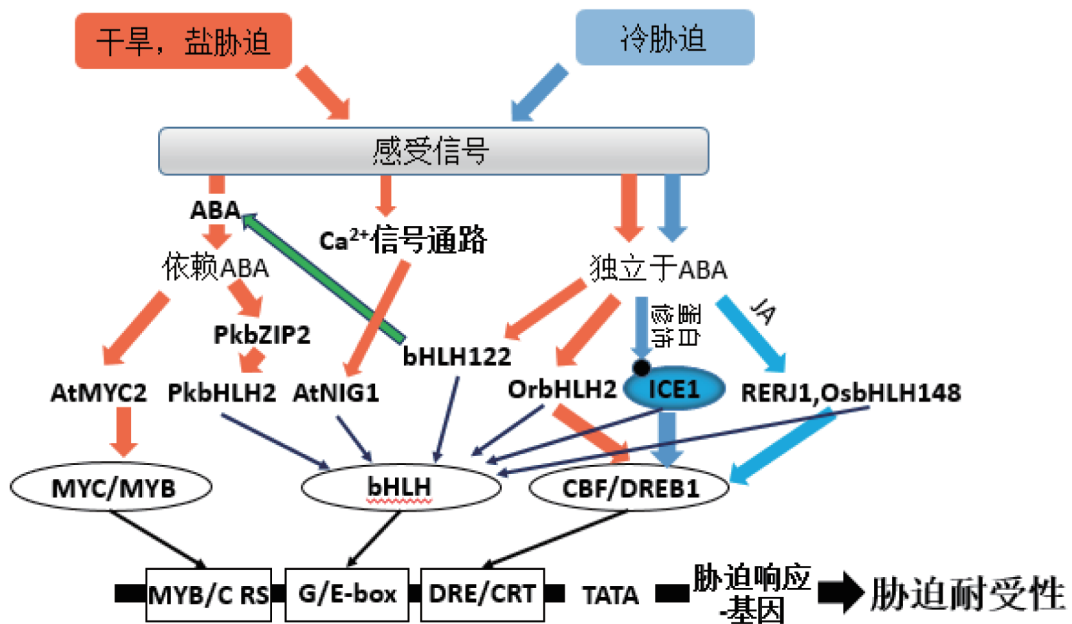


图1 bHLH转录因子参与的胁迫信号的传递以及非生物胁迫应答基因的表达



护的过程。但 MYC2 参与 ABA 信号途径与参与 JA 信号通路之间的联系，独立于 ABA 的信号途径与 JA 信号通路的重叠效应还需更充分的研究来验证。水稻中，非生物胁迫促进了 MeJA 和 ABA 的生物合成；Os**bHLH148** 通过 MeJA 和 ABA 协同介导参与了水稻对非生物胁迫的适应性。在干旱条件下，水稻体内茉莉酸水平可能先升高，之后，ABA 的水平也出现升高。胁迫条件下，ABA 信号途径与 JA 信号通路之间的关系还需进一步研究。ICE1-CBF 冷响应通路也可以归为独立于 ABA 信号途径，该通路作为研究最清楚的冷胁迫响应通路，在越来越多种类的植物中被证明是保守存在的。在最近发表的许多研究成果中，过量表达或异位表达 ICE 基因都能显著提高植物的抗冻性。拟南芥中 **bHLH122** 可能通过独立于 ABA 的信号途径直接调控胁迫应答基因的表达。但在非胁迫条件下，过量表达 **bHLH122** 会使植物体内的 ABA 含量升高，在过量表达 **bHLH122** 植株中明显存在着依赖于 ABA 的信号通路以及独立于 ABA 信号途径相交叠的现象。在依赖于 ABA 信号通路中，**bHLH** 启动子区域内含有 **bZIP** 特异性识别的 ABRE 元件间接参与 ABA 信号通路。**bHLH** (**AtMYC2**) 蛋白与 **MYB** (**AtMYB2**)

蛋白协作调控基因的表达可能是 ABA 信号通路中的另一种调控系统。**AtNIG1** 通过  $Ca^{2+}$  信号通路直接结合二级信号物质 ( $Ca^{2+}$ )，从而参与了盐胁迫信号通路。所有 **bHLH** 蛋白作为转录因子，都能与下游靶基因启动子区域内的 G/E-box 顺式作用元件结合，进而激活下游非生物胁迫应答基因的转录。

在提高作物对环境胁迫抗性的分子育种中，与导入个别功能基因来提高某种抗性的方法相比，导入一个编码转录因子的基因可能是更有效的方法。**bHLH** 转录因子作为植物体内第二大转录因子，在拟南芥和水稻等植物中的过量表达改变了下游基因的表达模式，从而增强了植物对非生物胁迫的耐受性。最近报道的部分基于 **bHLH**- 基因的转基因植株所表现出的逆境耐受性的相关内容总结在表 1 中。然而，为了更好地理解胁迫耐受性的分子机制，仍需对 **bHLH** 转录因子参与非生物胁迫信号通路中所起作用及 **bHLH** 转录因子自身下游靶基因进行更深入的研究。至今，对 **bHLH** 转录因子参与非生物胁迫信号通路仍停留在理论框架。人为地根据是否依赖 ABA 将胁迫信号通路分为两类，并不能将问题完全解释清楚。植物激素 (ABA 或 JA)、各类转录因子及蛋白激酶等调控蛋白共同参与的胁迫信号转

表1 过量表达**bHLH**家族转录因子提高植物非生物胁迫耐性的实例

基因	基因来源	转基因植物	胁迫应答	文献
<i>ICE1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	抗冻性	[13]
<i>AtMYC2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	渗透胁迫耐性	[41]
<i>AtAIB</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	干旱耐性	[38]
<i>OrbHLH2</i>	Rice	<i>Arabidopsis</i>	耐盐性、氧化抗性	[32]
<i>TaICE41</i>				
<i>TaICE87</i>	Wheat	<i>Arabidopsis</i>	抗冻性	[23]
<i>bHLH92</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	耐盐性、渗透胁迫	[49]
<i>ICE2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	抗冻性	[17]
<i>Os<b>bHLH001</b></i>	Rice	<i>Arabidopsis</i>	抗冻性、耐盐性	[50]
<i>Os<b>bHLH148</b></i>	Rice	Rice	干旱耐性	[35]
<i>MdC1<b>bHLH1</b></i>	Apple	Apple	抗冻性	[21]
<i>Or<b>bHLH001</b></i>	Rice	Rice	耐盐性	[51]
<i>ItICE1</i>	<i>Isatis tinctoria</i> L.	Rice	抗冻性	[27]
<i>EcaICE1</i>	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Tobacco	抗冻性	[26]
<i>SlICE1a</i>	Tomato	Tobacco	抗冻性、耐盐性、渗透胁迫	[24]
<i>bHLH122</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	干旱耐性、耐盐、渗透胁迫耐性	[4]
<i>Ptr<b>bHLH</b></i>	<i>Poncirus trifoliata</i>	Tobacco	抗冻性、氧化抗性	[3]
		<i>Citrus limon</i>	抗冻性	
<i>VabHLH1</i>	<i>Vitis amurensis</i>	<i>Arabidopsis</i>	抗冻性	[31]
<i>VvbHLH1</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Arabidopsis</i>		
<i>PebHLH35</i>	<i>Populus euphratica</i> .	<i>Arabidopsis</i>	干旱耐性	[43]

导机制是复杂多样的, 这就需要将复杂调控网络中那些具体的路径不断地补充和完善, 为提高植物非生物胁迫耐受性提供更多理论依据。对 bHLH 转录因子与其他基因相互作用机制的进一步研究, 可能是未来植物胁迫基因工程的重要发展方向。

### [参 考 文 献]

- [1] Jenks MA, Hasegawa PM. Plant abiotic stress[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008
- [2] Wei W, Huang J, Hao YJ, et al. Soybean GmPHD-type transcription regulators improve stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. PLoS One, 2009, 4(9): e7209
- [3] Huang XS, Wang W, Zhang Q, et al. A basic helix-loop-helix transcription factor, PtrbHLH, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide. Plant Physiol, 2013, 162(2): 1178-94
- [4] Liu W, Tai H, Li S, et al. bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism. New Phytol, 2014: 201(4): 1192-204
- [5] Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53(1): 247-73
- [6] Akhtar M, Jaiswal A, Taj G, et al. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. J Genet, 2012, 91(3): 385-95
- [7] Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, et al. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell, 2002, 14(3): 559-74
- [8] Castilhos G, Lazzarotto F, Spagnolo-Fonini L, et al. Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. Plant Sci, 2014, 223: 1-7
- [9] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. J Exp Bot, 2007, 58(2): 221-7
- [10] Books A. Abiotic stress in plants-mechanisms and adaptations [M]. Croatia: InTech, 2011
- [11] Liao Y, Zou HF, Wei W, et al. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Planta, 2008, 228(2): 225-40
- [12] Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. Plant J, 1998, 16(4): 433-42
- [13] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. Gene Dev, 2003, 17(8): 1043-54
- [14] Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, et al. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. Science, 1998, 280(5360): 104-6
- [15] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat Biotechnol, 1999, 17(3): 287-91
- [16] Lee BH, Henderson DA, Zhu JK. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. Plant Cell, 2005, 17(11): 3155-75
- [17] Fursova OV, Pogorelko GV, Tarasov VA. Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Gene, 2009, 429(1): 98-103
- [18] Chinnusamy V, Zhu JK, Sunkar R. Gene regulation during cold stress acclimation in plants[M]// Ramanjulus S(eds.). Plant stress tolerance: Methods and protocols. New York: Humana Press, 2010: 39-55
- [19] Miura K, Jin JB, Lee J, et al. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2007, 19(4): 1403-14
- [20] Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, et al. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(21): 8281-6
- [21] Feng XM, Zhao Q, Zhao LL, et al. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdCIBHLH1 encodes an ICE-like protein in apple. BMC Plant Biol, 2012, 12(1): 22
- [22] Wang Y, Jiang CJ, Li YY, et al. CsICE1 and CsCBF1: two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis*. Plant Cell Rep, 2012, 31(1): 27-34
- [23] Badawi M, Reddy YV, Agharbaoui Z, et al. Structure and functional analysis of wheat *ICE* (inducer of CBF expression) genes. Plant Cell Physiol, 2008, 49(8): 1237-49
- [24] Feng HL, Ma NN, Meng X, et al. A novel tomato MYC-type ICE1-like transcription factor, *SlICE1a*, confers cold, osmotic and salt tolerance in transgenic tobacco. Plant Physiol Biochem, 2013, 73: 309-20
- [25] Miura K, Shiba H, Ohta M, et al. SlICE1 encoding a MYC-type transcription factor controls cold tolerance in tomato, *Solanum lycopersicum*. Plant Biotechnol J, 2012, 29(3): 253-60
- [26] Lin Y, Zheng H, Zhang Q, et al. Functional profiling of *EcaICE1* transcription factor gene from *Eucalyptus camaldulensis* involved in cold response in tobacco plants. J Plant Biochem Biotechnol, 2014, 23(2): 141-50
- [27] Xiang D, Man L, Yin K, et al. Overexpression of a *ItICE1* gene from *Isatis tinctoria* enhances cold tolerance in rice. Mol Breeding, 2013, 32(3): 617-28
- [28] Wang X, Sun X, Liu S, et al. Molecular cloning and characterization of a novel ice gene from *Capsella bursa-pastoris*. Mol Biol: Mosk, 2005, 39(1): 18-25
- [29] Nakamura J, Yuasa T, Huang TT, et al. Rice homologs of inducer of CBF expression (*OsICE*) are involved in cold acclimation. Plant Biotechnol J, 2011, 28(3): 303-9
- [30] Jiang F, Wang F, Wu Z, et al. Components of the



- Arabidopsis* CBF cold-response pathway are conserved in non-heading Chinese cabbage. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(3): 525-32
- Xu W, Zhang N, Jiao Y, et al. The grapevine basic helix-loop-helix (*bHLH*) transcription factor positively modulates CBF-pathway and confers tolerance to cold-stress in *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 5329-42
- [31] Zhou J, Li F, Wang JI, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor from wild rice (*OrbHLH2*) improves tolerance to salt-and osmotic stress in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 2009, 166(12): 1296-306
- [32] Umezawa T, Okamoto M, Kushiuro T, et al. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2006, 46(2): 171-82
- [33] Kiribuchi K, Jikumaru Y, Kaku H, et al. Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants. *Biosci Biotech Bioch*, 2005, 69(5): 1042-4
- [34] Seo JS, Joo J, Kim MJ, et al. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *Plant J*, 2011, 65(6): 907-21
- [35] Kim EH, Kim YS, Park SH, et al. Methyl jasmonate reduces grain yield by mediating stress signals to alter spikelet development in rice. *Plant Physiol*, 2009, 149(4): 1751-60
- [36] Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, et al. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1997, 9(10): 1859-68
- [37] Li H, Sun J, Xu Y, et al. The bHLH-type transcription factor *AtAIB* positively regulates ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(5): 655-65
- [38] He L, Gao C, Wang Y, et al. A basic helix-loop-helix gene from opplar is regulated by a basic leucine-zipper protein and is involved in the ABA-dependent signaling pathway. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31(2): 344-51
- [39] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet*, 1993, 238(1-2): 17-25
- [40] Abe H, Urao T, Ito T, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 63-78
- [41] Kim J, Kim HY. Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling. *FEBS Lett*, 2006, 580(22): 5251-6
- [42] Dong Y, Wang C, Han X, et al. A novel bHLH transcription factor PebHLH35 from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 453-8
- [43] Ohashi-Ito K, Bergmann DC. *Arabidopsis* FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell*, 2006, 18(10): 2493-505
- [44] Sundar AS, Varghese SM, Shameer K, et al. STIF: identification of stress-upregulated transcription factor binding sites in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 2008, 2(10): 431
- [45] Shameer K, Ambika S, Varghese SM, et al. STIFDB-*Arabidopsis* stress responsive transcription factor DataBase. *Int J Plant Genomics*, 2009, 2009: 583429
- [46] Babitha K, Ramu S, Pruthvi V, et al. Co-expression of *AtbHLH17* and *AtWRKY28* confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis*. *Transgenic Res*, 2013, 22(2): 327-41
- [47] Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, et al. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(7): 2225-45
- [48] Jiang Y, Yang B, Deyholos MK. Functional characterization of the *Arabidopsis bHLH92* transcription factor in abiotic stress. *Mol Genet Genomics*, 2009, 282(5): 503-16
- [49] Li F, Guo S, Zhao Y, et al. Overexpression of a homopeptide repeat-containing bHLH protein gene (*OrbHLH001*) from Dongxiang Wild Rice confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(9): 977-86
- [50] Chen Y, Li F, Ma Y, et al. Overexpression of *OrbHLH001*, a putative helix-loop-helix transcription factor, causes increased expression of AKT1 and maintains ionic balance under salt stress in rice. *J Plant Physiol*, 2013, 170(1): 93-100