

文章编号:1674-2974(2016)06-0109-08

## 水稻 bHLH 转录因子 Os11g39000 的功能研究\*

刘选明<sup>1†</sup>, 彭玉冲<sup>1</sup>, 杨远柱<sup>2</sup>, 李懿星<sup>1</sup>, 夏妙林<sup>1</sup>, 王文文<sup>1</sup>, 林建中<sup>1</sup>

(1. 湖南大学 生物学院 植物基因组学与发育调控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410082;

2. 湖南亚华种业科学研究院, 湖南 长沙 410001)

**摘要:**水稻 Os11g39000 为非典型的 bHLH 家族成员, 其功能尚不清楚. 酵母双杂交实验表明, 转录因子 Os11g39000 可以形成同源蛋白聚合体. 随机结合位点筛选实验表明, 转录因子 Os11g39000 可以与 DNA 结合, 并且其结合位点初步确定为 TT/CG/CACC/GT/C. Os11g39000 基因的组织表达模式分析发现, Os11g39000 基因主要在叶片和根中表达, 推测该基因可能在叶和根的发育调控中发挥作用. 水培实验发现, 该基因功能缺陷型转基因株系的根长显著短于野生型, 表现出明显的根部发育缺陷, 表明 Os11g39000 在水稻根的发育中起调控作用. Q-PCR 分析进一步证明, 功能缺陷型转基因植株体内生长素合成和信号转导相关基因表达量显著上升, 表明转录因子 Os11g39000 参与了水稻生长素的合成和信号转导的调控.

**关键词:**水稻; bHLH 转录因子; Os11g39000; 生长素

**中图分类号:** S601

**文献标识码:** A

## Functional Analysis of a bHLH Transcription Factor Os11g39000 in Rice

LIU Xuan-ming<sup>1†</sup>, PENG Yu-chong<sup>1</sup>, YANG Yuan-zhu<sup>2</sup>, LI Yi-xing<sup>1</sup>,  
XIA Miao-lin<sup>1</sup>, WANG Wen-wen<sup>1</sup>, LIN Jian-zhong<sup>1</sup>

(1. Hunan Province Key Laboratory of Plant Function Genomics and Developmental Regulation,  
College of Biology, Hunan Univ, Changsha, Hunan 410082, China;

2. Academy of Seed Industry of Hunan Yahua, Changsha, Hunan 410001, China)

**Abstract:** Os11g39000 is a member of atypical bHLH transcription factor family in rice, and its function remains unclear. Yeast two-hybrid experiments revealed that the transcription factor Os11g39000 could form a homologous protein polymer. Random binding site selection demonstrated that Os11g39000 could bind to DNA, and its binding site was preliminarily identified as TT/CG/CACC/GT/C. Expression pattern analysis discovered that the Os11g39000 gene was mainly expressed in leaves and roots, which was a speculation that Os11g39000 may play a role in the developmental regulation of leaves and roots. The hydroponic experiments showed that, compared with wild-type plants, the loss-of-function transgenic plants

\* 收稿日期: 2015-12-12

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(31170172; 31571635), National Natural Science Foundation of China(31170172; 31571635); 湖南省自然科学基金资助项目(12JJ3024); 湖南省生物发育工程与新产品研发协同创新中心资助项目(20134486); 湖南省科技计划资助项目(2012FJ4262)

**作者简介:** 刘选明(1963-), 男, 湖南邵阳人, 湖南大学教授, 博士生导师

† 通讯联系人, E-mail: xml05@hnu.edu.cn

exhibited much shorter roots and obvious defect in root development, indicating that *Os11g39000* was involved in the developmental regulation of roots. Q-PCR analysis further revealed that the transcriptional levels of auxin biosynthesis and signal transduction related genes increased significantly in loss-of-function transgenic plants. These results together demonstrated that the transcription factor *Os11g39000* was involved in the regulation of auxin biosynthesis and signal transduction.

**Key words:** rice; bHLH transcription factor; *Os11g39000*; auxin

转录因子(transcription factor, TF)是能够与目的基因上游特定 DNA 序列结合的蛋白质,又被称为反式作用因子,通过与顺式作用元件相互作用,从而保证目的基因以特定强度在特定时间与空间表达的蛋白质分子<sup>[1]</sup>. bHLH(basic Helix-Loop-Helix, 碱性螺旋-环-螺旋)转录因子是真核生物蛋白质中的一个大家族,其成员在动植物界行使着多种重要的功能.例如,一个 bHLH 蛋白 BPE<sub>p</sub> 可以通过与生长素应答因子 ARF8 相互作用调控拟南芥花蕊的早期发育<sup>[2]</sup>. 研究发现 bHLH 在光敏色素的信号转导,细胞分化,应答油菜素内酯的基因表达等过程中都起着重要作用<sup>[3-5]</sup>.

典型的 bHLH 结构域包含大约 60 个氨基酸,由位于 bHLH 结构域 N 端能够结合 DNA 的 basic 区域和 HLH 区域组成<sup>[6]</sup>. HLH 区域包含两个  $\alpha$  螺旋,通过它们 bHLH 蛋白可以相互作用,形成同源或者异源蛋白聚集体<sup>[1, 7-8]</sup>. 一类以人类 Id 蛋白为代表缺少 basic 区域的 HLH 蛋白虽然不能够与 DNA 直接相互作用,但是可以通过与其它 bHLH 蛋白的 HLH 区域形成特异的异源蛋白聚集体来抑制相应 bHLH 转录因子的活性<sup>[9-10]</sup>. 通过抑制像 E 这样的 bHLH 蛋白,从而在细胞分化和发育过程中起到关键作用<sup>[11]</sup>. 在拟南芥中,发现一个 HLH 蛋白 KIDARI,通过与一个在光调控过程中起作用的 bHLH 转录因子相互作用来抑制该转录因子活性,从而调控植物生长发育<sup>[12]</sup>.

随着水稻全基因组测序的完成,利用生物信息学分析发现,水稻中包含有 167 个 bHLH 转录因子,绝大多数成员功能未知.有研究表明,bHLH 家族在水稻生长发育过程中起着关键作用,如 Zhang<sup>[13]</sup>等发现一对参与 BR 下游的 bHLH 基因 ILI1 和 PRE1 可以通过形成异源二聚体的形式参与调控与 BR 相关的基因的表达. *ili1* 的水稻突变体表现出与使用 BR 处理时相同的叶片倾角的表型,

过表达和 RNA 干扰的 ILI1 转基因水稻株系都分别表现出了叶片倾角增加和减小的相反表型. ILI1 和 PRE1 的相互作用导致了水稻叶片的直立. 因此该家族蛋白功能的揭示将有助于丰富和完善水稻基因功能调控网络.

本研究选取了一个水稻非典型的 bHLH 基因家族成员 *Os11g39000* 基因进行了初步的功能研究,发现转录因子 *Os11g39000* 可以以同源蛋白聚合体的形式结合 DNA,从而实现生长素(IAA)信号转导,调节下游基因的表达,最终实现对水稻根部生长发育的调控.

## 1 材料与方法

### 1.1 生物信息学分析

利用 TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi>, Rice Genome Annotation Project)和 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, National Center for Biotechnology information)数据库获得 *Os11g39000* 全长 CDS 序列、氨基酸序列及启动子序列. 通过基于隐马尔科夫模型的蛋白质结构域分析数据库 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>, Simple Modular Architecture Research Tool)对 *Os11g39000* 氨基酸序列比对分析,获得 *Os11g39000* 蛋白的结构域类型. 同时,利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)数据库对 *Os11g39000* 起始密码子 ATG 上游 1 500 bp 的启动子序列进行分析,预测该基因启动子区域所存在的调控元件,根据调控元件推测其可能的调控途径.

### 1.2 载体构建与功能缺陷型转基因株系的获得

以粳稻品种日本晴的 cDNA 为模板,利用 Gateway 方法,设计含有 attB 接头的引物(F: 5' CAAAAAAGCAGGCTTCATGTCGTCGAGCCG-GCG3'; R: 5' CAAGAAAGCTGGGTCTTACAT-

GAGTAGGCTACGGATGAGG3'), PCR 克隆目的片段. PCR 反应程序为: 98 °C, 5 min; 98 °C, 10 s; 58 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 共 35 个循环. 利用 BP ClonaseII (Invitrogen) 经 BP 重组反应将 PCR 产物克隆到入门载体 pDONR/Zeo, 测序正确后, 利用 LR ClonaseII (Invitrogen) 将 Os11g39000 克隆到玉米 Ubiquitin 启动子驱动表达的 pCAMBIA1301GW-EAR 表达载体中, 得到 N 端添加转录抑制基序 EAR 的合成型转录因子<sup>[14]</sup>, 并抑制目标转录因子的转录活性. 根据林建中等的水稻转化方法<sup>[15]</sup>, 将重组的 pCAMBIA1301GW-EAR-Os11g39000 质粒经过电击法转入农杆菌, 通过农杆菌侵染水稻粳稻品种 *Kitaake* 的愈伤组织, 获得功能缺陷型转基因株系 *Ubi::EAR-Os11g39000*.

### 1.3 酵母双杂交

pGADT7-Os11g39000 重组质粒能够编码融合 Os11g39000 和 GAL4 激活域的蛋白, pGBKT7-Os11g39000 重组质粒能够编码融合 Os11g39000 和 GAL4 结合域的蛋白, 将两个重组质粒按照酵母手册进行酵母转化, 涂布于 SD/-Leu/-Try 平板上培养. 28 °C 培养 2~3 d, 挑选 4~5 个单克隆用无菌水混匀后涂布于 SD/-Leu/-Try/-His 平板上, 分析结

果. 为了进一步检测相互作用的真实性, 同时参照 COLONTECH 说明书进行滤纸显色实验.

### 1.4 蛋白表达和随机结合位点筛选

根据 Liu 等<sup>[14]</sup>的蛋白诱导纯化方法, 分别将 pGEX-4T-1-Os11g39000 和 pGEX-4T-1 质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3), 诱导表达. 离心收集菌体, 超声破碎, 离心, 谷胱甘肽琼脂糖珠 (Ferments) 亲和纯化蛋白, SDS-PAGE 检测. 将已纯化的重组蛋白保存, 用于后续随机结合片段筛选实验.

根据 Blackwell 的方法<sup>[16]</sup>, 使用引物 RBSS4 和 CPDF4 进行 PCR 扩增, 得到双链随机 DNA 片段并与结合目的蛋白的谷胱甘肽琼脂糖珠室温孵育 10 min. 使用 DNA 结合缓冲液洗涤离心, 重复 5 次, 最后加入 30  $\mu$ L 蛋白洗脱缓冲液, 洗脱后离心取上清为模板, PCR 扩增目的片段, 正向引物为 RBSS3, 反向引物为 CPDF4, 琼脂糖凝胶电泳观察结果. 重复 6~8 次, 直到扩增出目的条带, 然后将扩增片段克隆至 pMD18-T 载体 (TaKaRa), 测序. 测序结果使用在线分析工具分析 (<http://weblogo.berkeley.edu/>). 引物见表 1.

表 1 随机结合位点筛选实验引物

Tab. 1 Primer sequences used for random binding site selection assay

引物名称	序列(从 5'-3')
CPDF4	CCCGAATTGGAAGAAGAATGCAAAAAGAG
RBSS3	TGGAGAAGAGGAGAGTGGGC
RBSS4	GGAGAGTGGGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTCTTTTGCATTCTTC

### 1.5 植物材料种植、激素处理及取材设置

参照 Lin 等<sup>[17]</sup>水稻种子催芽及种植方法, 用 3% 次氯酸钠溶液对水稻种子表面消毒, 37 °C 下种子吸胀处理 48 h, 28 °C 恒温培养箱催芽 48 h. 待种子露白后, 用 1:1 000 浓度的潮霉素 (Hyg) 溶液对种子进行初筛, 然后将阳性植株转入 1/2 MS 培养液置于恒温培养箱中 (28 °C, 光照 16 h/黑暗 8 h).

参照 Song 等<sup>[18]</sup>检测基因时空表达的取材方法, 分别对营养生长期和生殖生长期的水稻材料进行取材. 营养生长期的水稻材料取自温室生长 20 d 的野生型水稻日本晴, 分别取根、茎和叶 3 部分; 生殖生长期的水稻材料取自大田内灌浆时期的野生型水稻日本晴, 分别取根、茎、叶、节间、叶鞘和幼穗等组织材料. 液氮速冻, -80 °C 低温保存.

参照 Li 等<sup>[19]</sup>植物生长素诱导基因表达检测的方法, 将正常条件生长 10 d 的日本晴幼苗, 转入含有 10  $\mu$ mol/L 生长素的水培溶液中, 分别处理 0, 1, 3, 6 和 12 h 并取材, -80 °C 保存. 设置生长素浓度梯度为 0, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> 和 10<sup>-5</sup> mol/L 分别处理野生型材料 *Kitaake* 和功能缺陷型转基因材料, 处理 7 d 后观察表型并统计分析.

### 1.6 实时荧光定量 PCR 分析

按照 RNAeasy Mini Kit (TaKaRa) 试剂盒说明提取总 RNA, 然后利用 Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 合成 cDNA, 用于实时定量 PCR 分析. 利用 Ferments 定量试剂盒 (Ferments), Mx3000P 仪器 (Stratagene) 进行 PCR 分析. 实时荧光定量 PCR 反应程序为: 95 °C, 2 min;

95 °C, 10 min; 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; 45 个循环. 实验重复 3 次, 以持家基因 *OsACTIN1* 为内参, Mx3000P 软件分析检测基因的相对表达水平. 定量 PCR 引物见表 2.

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列  
Tab. 2 Primer sequences used for real time fluorescence quantitative PCR

引物名称	序列 (5'-3')
<i>Os11g39000</i> QF	CGGAGCCGTACATCGTCGA
<i>Os11g39000</i> QR	CGTTGATGGCGAGATCGGA
<i>OsARF23</i> QF	CACCAGGTGCTACTGAATGG
<i>OsARF23</i> QR	CATCCACTCCTTCTTAGGACC
<i>OsARF24</i> QF	TGAATTCTGCAACATGGTTCA
<i>OsARF24</i> QR	TAGACCACCTTGGAGCCCTT
<i>OsYUCCA1</i> QF	TCATCGGACGCCCTCAACGTCGC
<i>OsYUCCA1</i> QR	GGCAGAGCAAGATTATCAGTC
<i>OsYUCCA4</i> QF	GCAGAATGGCCTGTACGCTGTTGG
<i>OsYUCCA4</i> QR	CAGACCAGCACATGACGTGTCTAC
<i>OsPIN1b</i> QF	CTGTTTCATGGCGCTGCAGCC
<i>OsPIN1b</i> QR	CGCGGTACTCGAAGAGGAACA
<i>OsPIN2</i> QF	CAGGGCTAGGAATGGCTATGT
<i>OsPIN2</i> QR	CCTATTCTTCAGCTCTGGTAG
<i>OsACTIN1</i> QF	TGCTATGTACGTCGCCATCCAG
<i>OsACTIN1</i> QR	AATGAGTAACCACGCTCCGTCA

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析与基因克隆

根据 TIGR 和 NCBI 数据库的序列信息, 设计引物, 以水稻 cDNA 为模板克隆出和预测分子量大小相似的 DNA 片段(图 1(a)). 测序发现该片段的序列和数据库中预测相同, 命名为 *Os11g39000*. 该

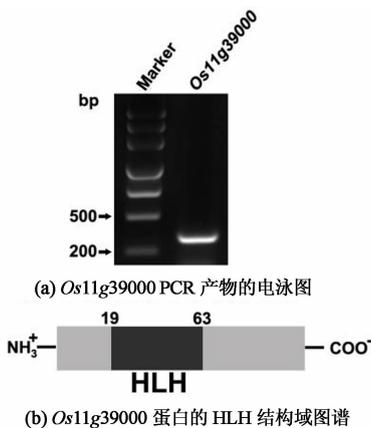


图 1 *Os11g39000* 基因的克隆  
和其编码蛋白结构域位点图谱

基因的编码序列含有 306 个核苷酸, 编码含 102 个氨基酸序列的蛋白质. 利用蛋白质结构域分析数据库 SMART 对 *Os11g39000* 蛋白结构进行分析, 发现 *Os11g39000* 蛋白在第 19~63 个氨基酸区域包含一个 HLH 保守结构域(图 1(b)), 但是并没有结合 DNA 的 basic 区域, 因此 *Os11g39000* 是一个非典型的 bHLH 蛋白, 单个的 *Os11g39000* 蛋白不能够直接结合 DNA 片段. 有研究表明 bHLH 蛋白可以通过 HLH 结构域形成同源或异源聚合体行使功能<sup>[7-8]</sup>. 因此推测该蛋白可能是以蛋白聚合体的形式行使功能.

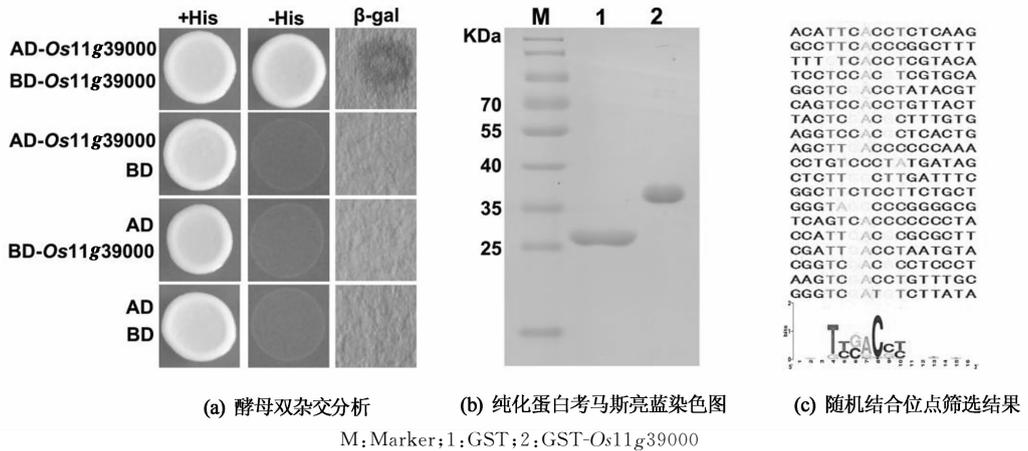
### 2.2 *Os11g39000* 蛋白与自身的相互作用

为了探究该编码蛋白能够形成同源蛋白聚合体, 进行了酵母双杂交实验. 首先构建了 pGADT7-*Os11g39000* 重组质粒和 pGBKT7-*Os11g39000* 重组质粒, 然后将重组质粒共转入 AH109 酵母中, 同时用共转 pGADT7-*Os11g39000*/pGBKT7, pGADT7/pGBKT7-*Os11g39000* 和 pGADT7/pGBKT7 载体的酵母作为阴性对照, 涂布于含有 10 mmol/L 3-AT 的 SD/-Leu/-Try 固体平板, 以及于含有 10 mM 3-AT 的 SD/-Leu/-Try/-His 固体平板. 结果显示只有共转入 pGADT7-*Os11g39000*/pGBKT7-*Os11g39000* 的酵母在含有 10 mmol/L 3-AT 的 SD/-Leu/-Try/-His 固体平板上继续生长. 滤纸显色实验也发现只有共转入 pGADT7-*Os11g39000* 和 pGBKT7-*Os11g39000* 重组质粒的酵母可以显色(图 2(a)), 说明 *Os11g39000* 蛋白可以形成同源蛋白聚合体.

### 2.3 *Os11g39000* 蛋白的 DNA 随机结合位点筛选

酵母双杂交实验证明 *Os11g39000* 蛋白可以形成同源蛋白聚合体, 为了进一步验证 *Os11g39000* 蛋白形成的同源蛋白聚合体是否可以与 DNA 直接相互作用, 构建了 pGEX-4T-1-*Os11g39000* 重组质粒. 将重组质粒通过热激法转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 并成功诱导纯化了 GST-*Os11g39000* 重组蛋白(图 2(b)). DNA 随机结合位点筛选实验. 结果显示, 该蛋白可以通过形成同源蛋白聚合体与 DNA 片段直接相互作用, 且直接结合的 DNA 片段为 TT/CG/CACC/GT/C(图 2(c)). 表明该蛋白可以通过 HLH 区域相互作用形成同源蛋白聚合体结合特定 DNA 片段, 从而行使调控下游基因表达的功能.

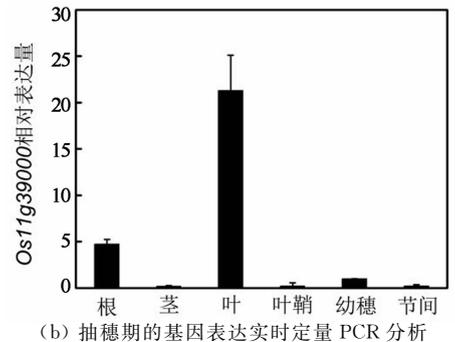
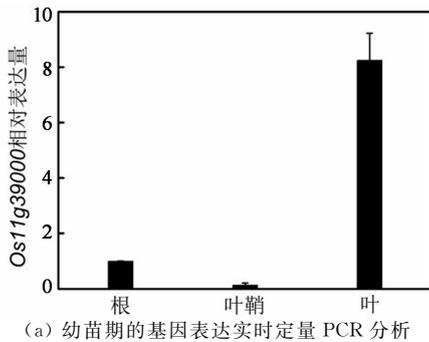
Fig. 1 Cloning of the *Os11g39000* gene and schematic diagram of conserved domains in its encoded protein

图 2 *Os11g39000* 蛋白的酵母双杂交分析及与 DNA 结合位点的筛选Fig. 2 Yeast two hybrid analysis and random binding site selection assay of *Os11g39000* protein

## 2.4 *Os11g39000* 在水稻不同组织器官中的表达

基因的时空表达模式可以为预测和研究其生物学功能提供参考依据. 实时定量 PCR 分析 *Os11g39000* 基因在水稻不同组织器官中的相对表

达量, 表明该基因在苗期和抽穗期都主要在叶和根表达, 其它的组织器官表达量极少(图 3(a), (b)), 推测该基因可能参与植物根和叶的生长发育调控.

图 3 不同水稻组织器官中 *Os11g39000* 基因转录水平的实时定量 PCR 分析Fig. 3 Real time PCR analysis of transcriptional levels of *Os11g39000* gene in various rice organs

## 2.5 转基因植物鉴定与表型分析

利用嵌合抑制因子基因沉默技术<sup>[14, 20]</sup> (chimeric repressor gene-silencing technology CRES-T) 及 Gateway 技术获得了 pCAMBIA1301GW-EAR-*Os11g39000* 重组质粒(图 4(a)). 通过农杆菌侵染水稻 *Kitaake* 愈伤组织的方法, 得到 *Os11g39000* 转录抑制型的转基因株系, 即该转录因子的功能缺陷型转基因株系. 通过 DNA 和 RNA 水平上的分子鉴定(图 4(b), (c)), 筛选出 2 个阳性功能缺陷型转基因株系 *Ubi::EAR-Os11g39000-10* 和 *Ubi::EAR-Os11g39000-11*. 水培实验表明, 转基因株系 *Ubi::EAR-Os11g39000-10* 和 *Ubi::EAR-Os11g39000-11* 的根长比野生型的短, 表现为明显的根部发育缺陷(图 4(c), (d)). 该结果表明, 当抑制 *Os11g39000* 的转录活性时严重干扰了水稻根部的正常生长发

育, 说明 *Os11g39000* 基因参与了水稻根部发育的调控.

## 2.6 生长素对 *Os11g39000* 的表达调控

研究表明, 生长素对植物根部发育具有显著影响<sup>[21]</sup>. 利用 Plant CARE 数据库对 *Os11g39000* 基因起始密码子 ATG 上游 1 500 bp 的启动子序列进行分析, 发现该基因启动子 -792 bp 处含有一个生长素应答元件(图 5(a)), 推测该基因功能可能与生长素有关. 实时荧光定量 PCR 分析表明, 随着生长素处理时间的延长, 该基因表达量持续升高(图 5(b)), 表明该基因表达受到生长素诱导. 同时, 不同浓度生长素对野生型 *Kitaake* 和转基因株系 *Ubi::EAR-Os11g39000-10* 和 *Ubi::EAR-Os11g39000-11* 处理 7 d 发现, 随着生长素浓度的升高, 野生型根长受到明显抑制, 而转基因株系根长没有明显变化

(图 5(c),(d)), 表现为对生长素不敏感, 即抑制转录因子 *Os11g39000* 的转录活性干扰了植物对生长

素的响应, 暗示该基因参与了生长素的相关途径.

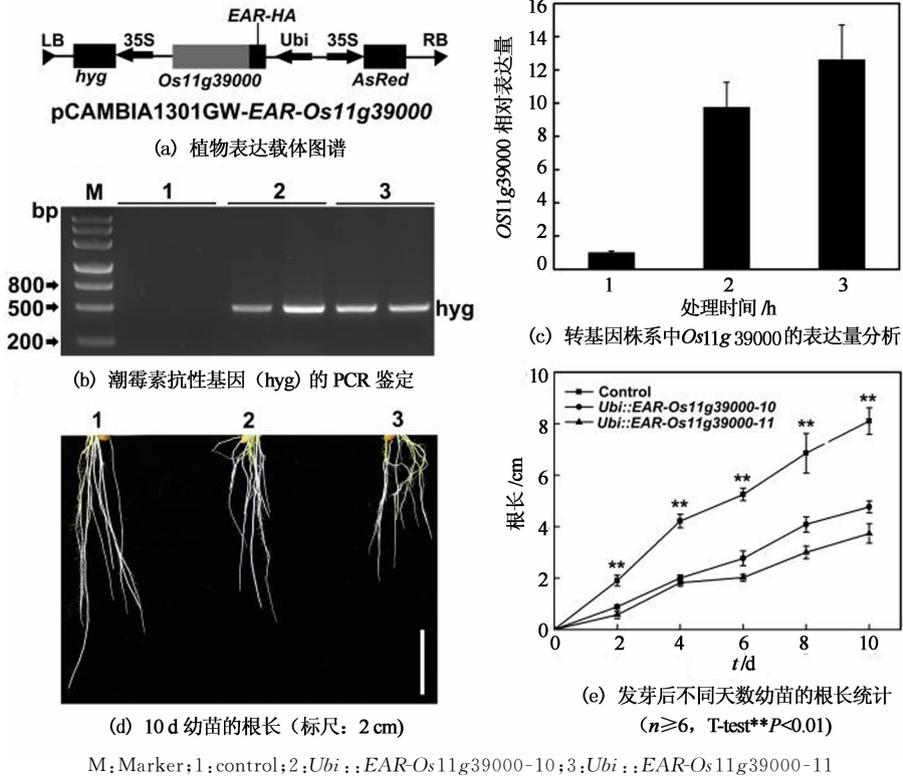


图 4 功能缺陷型转基因株系的鉴定与表现分析

Fig. 4 Identification and phenotypic analysis of loss-of-function transgenic lines

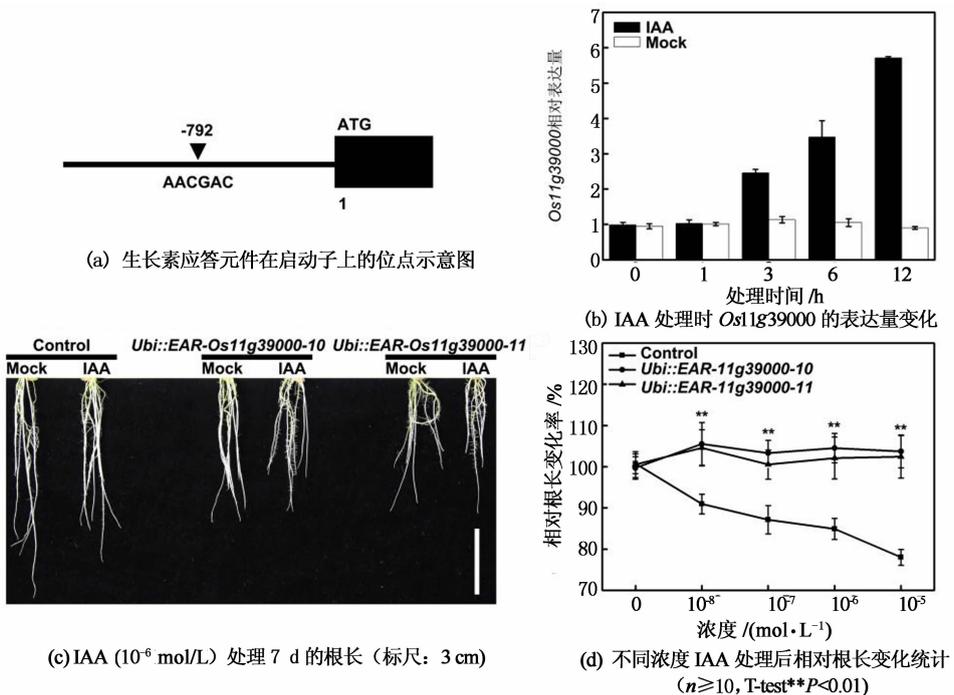


图 5 *Os11g39000* 基因启动子分析和生长素处理对植株的影响

Fig. 5 The promoter analysis of *Os11g39000* gene and the effect of rices treated with auxin

为了进一步探究该基因对生长素生物合成、信号转导和极性运输途径的影响,选取这些途径中的相关基因,检测其表达量.结果表明,在功能缺陷型转基因株系中,生长素信号转导相关基因 *OsARF23*, *OsARF24* 和生长素合成相关基因 *OsYUCCA1*, *OsYUCCA4* 的表达量显著提高(图 6(a),

(b));生长素极性运输相关基因 *OsPIN1b* 和 *OsPIN2* 表达量没有明显变化(图 6(c)).该结果说明, *Os11g39000* 基因的功能缺陷主要影响了生长素的信号转导和生物合成途径,而对于生长素的极性运输并没有显著影响,推测 *Os11g39000* 参与了生长素合成与显著信号转导的调控.

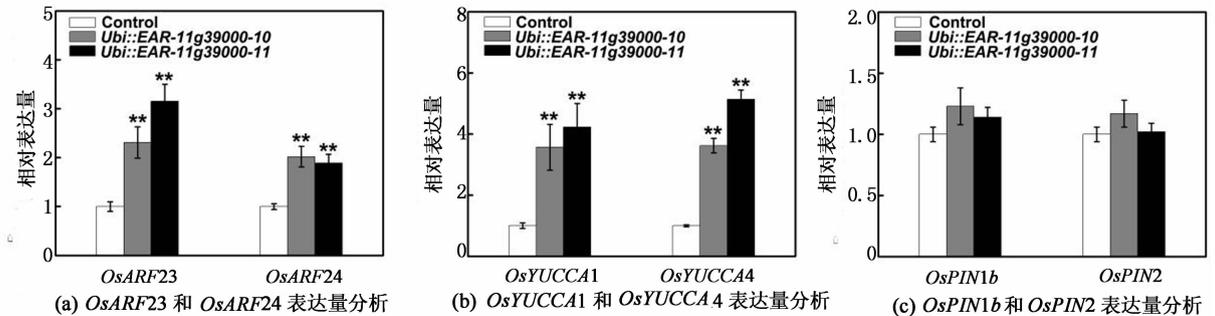


图 6 功能缺陷型转基因株系中生长素相关基因的转录水平分析

Fig. 6 Analysis of transcriptional levels of IAA related genes in loss-of-function transgenic lines

### 3 讨论

bHLH 蛋白通常通过 HLH 区域相互作用形成同源或异源蛋白聚合体行使对下游基因的调控<sup>[8]</sup>. 本研究发现, *Os11g39000* 蛋白不能直接结合 DNA 的 basic 区域(图 1(b)),但 *Os11g39000* 蛋白可以通过形成同源蛋白聚合体来直接结合 DNA 片段,从而调控下游基因表达(图 2(a)~(c)). 同时通过 DNA 随机结合位点筛选实验分析了该基因的直接 DNA 结合位点 TT/CG/CACC/GT/C(图 2(c)),为深入研究 *Os11g39000* 蛋白的生理功能提供了重要线索.

分析基因在植物不同组织器官中的表达可以对该基因行使的功能进行预测<sup>[22]</sup>. 通过 Q-PCR 分析发现 *Os11g39000* 基因主要在水稻叶和根中表达(图 3(a),(b)),暗示该基因可能参与植物叶和根的生长发育. 水培实验发现,功能缺陷型转基因株系的根相对于野生型明显变短(图 4(d),(e)),证实了该基因在根发育过程中起作用. 但叶片中我们没有发现明显差异,对于该结果还有待进一步研究. bHLH 基因家族在动植物界广泛存在且行使多种多样的功能,已知 *PIF3*, *PIF4*, *HFR1* 在光敏色素信号传导中起作用, *SPT* 和 *ALC* 与雌蕊发育有关, *AMS* 在花粉粒发育中起作用, *AtMYC2* 与脱落酸诱导的基因表达有关<sup>[23]</sup>. 植物激素是调控植物生长发育的重要因子. 生长素影响植物生长发育的各个方面,包括细胞分裂与生长,细胞分化,顶端优势,根的向地性

等<sup>[24]</sup>. 本研究通过 Plant CARE 对 *Os11g39000* 基因的启动子顺式元件进行分析,结果显示该基因启动子区域存在生长素响应元件(图 5(a)). *Os11g39000* 基因的表达受到生长素诱导并且随着生长素处理时间的延长,该基因的表达量显著提高(图 5(b)). 不同浓度的生长素对转基因株系处理发现其根对生长素不敏感(图 5(c),(d)),说明该基因的表达受到生长素的调控. 为了进一步研究该基因对生长素途径的影响,对功能缺陷型转基因株系中生长素的相关基因进行定量分析,发现与生长素信号转导和合成相关的基因表达量显著提高(图 6(a),(b)),表明抑制转录因子 *Os11g39000* 的转录活性主要影响了生长素的信号转导和合成途径. 这些结果表明, *Os11g39000* 是生长素对植物调节途径中的相关基因,为进一步阐明 *Os11g39000* 的作用机理奠定了良好的基础.

### 参考文献

- [1] MURRE C, MCCA W P S, BALTIMORE D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins[J]. Cell, 1989, 56(5): 777-783.
- [2] VARAUD E, BRIOUDES F, SZECSI J, et al. AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates *Arabidopsis* petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp [J]. Plant Cell, 2011, 23(3): 973-983.
- [3] BERNHARDT C, ZHAO M, GONZALEZ A, et al. The bHLH genes GL3 and EGL3 participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the *Arabi-*

- dopsis root epidermis[J]. *Development*, 2005, 132(2): 291—298.
- [4] DUEK P D, FANKHAUSER C. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signaling[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 51—54.
- [5] SERNA L. bHLH proteins know when to make a stoma[J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(11): 483—485.
- [6] ATCHLEY W R, TERHALLE W, DRESS A. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain[J]. *J Mol Evol*, 1999, 48(5): 501—516.
- [7] ELLENBERGER T, FASS D, ARNAUD M, *et al.* Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer[J]. *Genes Dev*, 1994, 8(8): 970—980.
- [8] NESI N, DEBEAUJON I, JOND C, *et al.* 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.
- [9] SUN X H, COPELAND N G, JENKINS N A, *et al.* Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(11): 5603—5611.
- [10] RUZINOVA M B, BENEZRA R. Id proteins in development, cell cycle and cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(8): 410—418.
- [11] KEE B L. E and ID proteins branch out[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(3): 175—184.
- [12] HYUN Y, LEE I, KIDARI, encoding a non-DNA binding bHLH protein, represses light signal transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 61(1/2): 283—296.
- [13] ZHANG L Y, BAI M Y, WU J, *et al.* Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(12): 3767—3780.
- [14] LIU H, YU X, LI K, *et al.* Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2008, 322(5907): 1535—1539.
- [15] 林建中, 杨远柱, 周波, 等. 一种简单高效的水稻体细胞诱变育种新方法[J]. *湖南大学学报: 自然科学版*, 2013, 40(9): 79—85.
- LIN Jian-zhong, YANG Yuan-zhu, ZHOU Bo, *et al.* A new and effective somatic mutagenesis rice breeding method[J]. *Journal of Hunan University: Natural Sciences*, 2013, 40(9): 79—85. (In Chinese)
- [16] BLACKWELL T K, WEINTRAUB H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection [J]. *Science*, 1990, 250(4984): 1104—1110.
- [17] LIN J, ZHOU B, YANG Y, *et al.* Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of Indica rice [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(7): 1065—1074.
- [18] SONG X Q, LIU L F, JIANG Y J, *et al.* Disruption of secondary wall cellulose biosynthesis alters cadmium translocation and tolerance in rice plants[J]. *Mol Plant*, 2013, 6(3): 768—780.
- [19] LI Gang, LIANG Wan-qi, ZHANG Xiao-qing, *et al.* Rice actin-binding protein RMD is a key link in the auxin-actin regulatory loop that controls cell growth[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(28): 10377—10382.
- [20] HIRATSU K, MATSUI K, KOYAMA T, *et al.* Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2003, 34(5): 733—739.
- [21] TANAKA H, DHONUKSHE P, BREWER P B, *et al.* Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(23): 2738—2754.
- [22] QIN Y, LI X, GUO M, *et al.* Regulation of salt and ABA responses by CIPK14, a calcium sensor interacting protein kinase in *Arabidopsis* [J]. *Sci China C Life Sci*, 2008, 51(5): 391—401.
- [23] 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.
- [24] VANNESTE S, FRIML J. Auxin: a trigger for change in plant development[J]. *Cell*, 2009, 136(6): 1005—1016.