

‘凤丹白’牡丹中参与受精过程的***PobHLH***基因的克隆与表达

李真[#], 郝青[#], 李伟, 刘庆超, 刘庆华, 王奎玲^{*}

青岛农业大学园林与林学院, 山东青岛266109

摘要: 以油用牡丹‘凤丹白’为试材, 基于已构建的雌蕊转录组数据库, 筛选出与双受精相关的***bHLH***基因同源性高的Unigene序列, 命名为***PobHLH***。其开放阅读框(ORF) 1 338 bp, 推测编码一个含有445个氨基酸的蛋白。序列分析表明, ***PobHLH***编码的氨基酸序列中包含已确定的保守基序, 包括HLH结构域、APB基序和核定位信号NLS。氨基酸序列比对发现***PobHLH***与拟南芥***bHLH***家族VII(a+b)亚组的AtUNE10相似度最高, 其次是同亚组的AtSPT和AtALC, 可能参与双受精中雌配子体的发育。荧光定量PCR分析表明***PobHLH***在授粉后24 h表达增量最高, 在授粉后48 h表达丰度最大, 与‘凤丹白’双受精时间进程相吻合, 暗示***PobHLH***可能在双受精过程中起关键作用。

关键词: 油用牡丹‘凤丹白’; ***bHLH***; 双受精; 基因克隆; 表达分析

牡丹是集观赏、药用和油用为一身的重要经济植物。牡丹籽油含有非常丰富的不饱和脂肪酸, 作为一种具有中国特色的潜在油料作物, 提高种子产量成为研究的重点。远缘杂交过程中的生殖障碍严重阻碍了牡丹资源的有效利用和优质新品种的培育。受精成败是种子产量和杂交育种的前提, 花粉粒在柱头上萌发, 通过花粉管的引导, 被运输到封闭的胚珠中, 并释放雄配子, 这一雌雄配子体的识别过程是多蛋白互作的结果(Higashiyama 2010)。目前雌雄配子体识别的研究主要集中在拟南芥和水稻等模式植物和农作物中(Wang等2016; Li等2006a), 而牡丹中未见报道。探讨牡丹雌雄配子体识别的分子机制将有助于增加结实率, 推进油用牡丹产业发展; 并在一定程度上解决远缘杂交过程中的受精障碍问题, 推进我国杂交育种工作进程, 创造具有我国自主知识产权的新种质。

bHLH蛋白家族是一类具有***bHLH***结构域的转录因子, 是已知在植物中存在最为广泛的一类转录因子, 迄今鉴定得到600余个, 其中仅在拟南芥中就有162个成员(Bailey等2003), 水稻中167个成员(Li等2006b)。已报道***bHLH***转录因子在植物生长发育(Zhao等2016)、形态建成(Penfield等2005)、逆境响应(Abe等1997; Chinnusamy等2003; Jiang和Deyholos 2006)、生物合成与信号转导(Nakata等2013)等方面均有重要作用。***bHLH***蛋白影响受精的途径多种多样, 拟南芥SPATULA (SPT)和ALCATRAZ (ALC)作为一对部分功能冗余的***bHLH***蛋白,

分别调控早期雌蕊发育和后期果实开裂(Groszmann等2011); 由***DYTI***和***AMS***编码的***bHLH***蛋白调控拟南芥花药绒毡层发育并涉及胼胝质的降解(Zhu等2015)。大白菜中BcbHLHpol和BcSKP1蛋白在减数分裂中起到关键作用, 可以正向调控花粉发育(Liu等2014)。水稻***bHLH142***蛋白缺失会导致其雄性不育, 而过表达***bHLH142***则会导致其他几种转录因子的提前表达, 从而引起花药细胞过早的程序性死亡, 也会导致雄性不育(Ko等2017)。

上述研究为其它植物尤其是非模式植物的相关研究提供了思路。然而, 牡丹中调控其受精结实相关的***bHLH***基因尚未被克隆和研究。本研究从‘凤丹白’雌蕊中克隆得到了同源基因, 命名为***PobHLH***, 对其序列进行生物信息学分析, 并利用荧光定量PCR技术对其在授粉前后4个不同时期的雌蕊中的表达量进行了分析, 为进一步研究***PobHLH***基因的功能奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择结实性强的油用牡丹‘凤丹白’ (*Paeonia ostii* T. Hong & J. X. Zhang ‘Fengdanbai’)作为试材,

收稿 2018-10-08 修定 2019-01-30

资助 国家自然科学基金(31601789)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2015SW017)。

并列第一作者。

* 通讯作者(wkl6310@163.com)。

种植于中国科学院植物研究所北京植物园牡丹芍药资源圃。于2017年4月采用‘凤丹白’异株异花的花粉对其进行授粉,采集圆桃期(S1期)、柱头黏液分泌第1天(S2期)、授粉后24 h (S3期)和授粉后48 h (S4期)的雌蕊进行取样,分别用锡箔纸包裹,立即用液氮速冻后于-80°C冰箱中保存备用。

1.2 基因编码区序列的克隆

采用TianGen多糖多酚植物总RNA试剂盒提取牡丹雌蕊群总RNA。检测质量合格后,以1 μg总RNA为模板,利用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(Takara)合成cDNA第一链。根据已测得的‘凤丹白’转录组数据库中的bHLH转录因子Unigene信息设计特异引物(表1)。1.2%琼脂糖凝胶检测PCR扩增产物,凝胶回收与预期片段大小一致的条带,连接到pEASY-T1载体(TransGen)上,再转化到大肠杆菌DH5α,通过蓝白筛选及菌落PCR检测后,由北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。其中引物设计采用PrimerPremier 5.0软件。基因扩增引物委托北京擎科新业生物技术有限公司合成,序列如表1所示。

1.3 生物信息学分析

利用DNAMAN 6.0软件进行序列翻译和氨基酸相似性比对,并通过ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)运用Compute pI/Mw软件对目的基因编码蛋白等电点和分子量进行预测,并运用ProtScale、TMHMM Server、npsa-prabi、SWISS-MODEL软件分别对其亲疏水性、跨膜区域、二级结构、三级结构预测分析。在<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>预测蛋白质保守结构域。利用MEGA 7.0软件中的Neighbor-Joining (邻位相连法, NJ)法进行系统进化分析。

1.4 qRT-PCR表达分析

以*PoTubulin* (EF608942)为内参基因,应用qRT-PCR法分析*PobHLH*在授粉前后不同时期的表达量,引物序列见表1。取1 μg总RNA,按照Prime Script RT reagent Kit (With gDNA Erase)试剂盒(Takara)的方法合成cDNA。参照Takara公司的SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)荧光定量说明书,利用StepOne Plus实时荧光定量PCR仪(Light-Cycler480, 美国ABI公司)运行反应程序: 95°C预变性60 s; 40个循环: 95°C, 10 s; 58°C, 20 s; 72°C, 15 s; 通过加热扩增产物72°C至99°C, 第一步72°C, 45 s, 之后每升高1°C维持5 s, 获得溶解曲线。每个试验设3次重复,利用StepOne Software v2.3软件进行数据分析。采用软件SPSS 19.0进行显著性差异分析, Excel 2003软件绘制图表。

2 实验结果

2.1 *PobHLH*编码区的克隆与分析

从‘凤丹白’雌蕊转录组数据中筛选出与双受精相关的*bHLH*同源性高的Unigene序列,利用NCBI提供的ORF Finder分析,发现其cDNA全长为1 653 bp, 包含一个长度为1 338 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF), 5’非翻译区长160 bp, 3’非翻译区长155 bp。经BlastN分析,发现该序列编码的氨基酸与多种植物的bHLH蛋白相似性都较高,将其命名为*PobHLH*。以该序列作为已知序列设计特异引物,从授粉后48 h的‘凤丹白’雌蕊cDNA中扩增获得约1 500 bp大小的目的条带(图1),测序结果表明所获得条带与该序列的编码区一致。推测编码一个含445个氨基酸的蛋白质, ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白相对分

表1 ‘凤丹白’*bHLH*基因克隆及表达分析所用引物

Table 1 Primers for *PobHLH* cloning and expression analysis

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>PobHLH-F</i>	ATGAGCCAGTGTGTTCCGAGC	基因克隆
<i>PobHLH-R</i>	TTAACTCTTAGAACTTGAGGCTGGGTGT	
<i>PoTubulin-F</i>	GCACCAAAGAAGTGGACGAACAAAT	qRT-PCR
<i>PoTubulin-R</i>	AGTAAACTGTCTCACTCACACGCCTG	
<i>PobHLH-qF</i>	ACCAAGGACGACGAACC	
<i>PobHLH-qR</i>	CAAGGGAAGTAGAAGTAAACC	

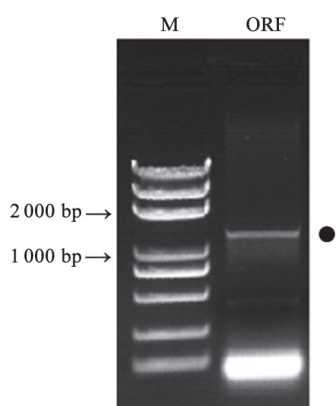


图1 *PobHLH*开放阅读框的PCR扩增产物
Fig.1 PCR amplification product of *PobHLH* ORF
M: DNA Marker DL5000; ●处为ORF目的条带。

子量(Mw)为48.52 kDa, 理论等电点(pI)为6.42。*PobHLH*蛋白为亲水蛋白(图2-A), 未发现跨膜区域, 无信号肽结构, 不属于分泌蛋白。对*PobHLH*蛋白进行二级和三级结构预测显示, 其氨基酸组成中 α -螺旋(Hh)占32.58%, 延伸链(Ee)占13.48%,

无规卷曲(Cc)占53.93%, 属于不规则结构(图2-B), 其模型相似度与4atk.1模型达到43.75% (图2-C)。利用NCBI保守结构域分析显示, *PobHLH*编码的蛋白保守结构域为HLH结构域(图2-D)。HLH结构域的特异位点包括8个残基组成的DNA结合位点(275...276、282...284、286、306、309)、1个E-box特异位点(283)和14个残基构成的二聚接口(289...290、293...294、296...297、310、313、317、319...320、324、326...327) (图3)。

2.2 *PobHLH*与来自其他物种的同源蛋白多重比较

利用DNAMAN软件进行同源氨基酸序列比对, 发现*PobHLH*与其他植物UNE10和AtPIF1氨基酸都具有HLH结构域、APB基序(active phytochrome-binding motif)和核定位信号NLS (nuclear localization signal) (Leivar等2008) (图4)且非常保守。

2.3 *PobHLH*与来自拟南芥同源氨基酸系统进化分析

系统进化分析表明, *PobHLH*蛋白与拟南芥AtUNE10蛋白同源性最高聚为一支, 并与AtSPT和

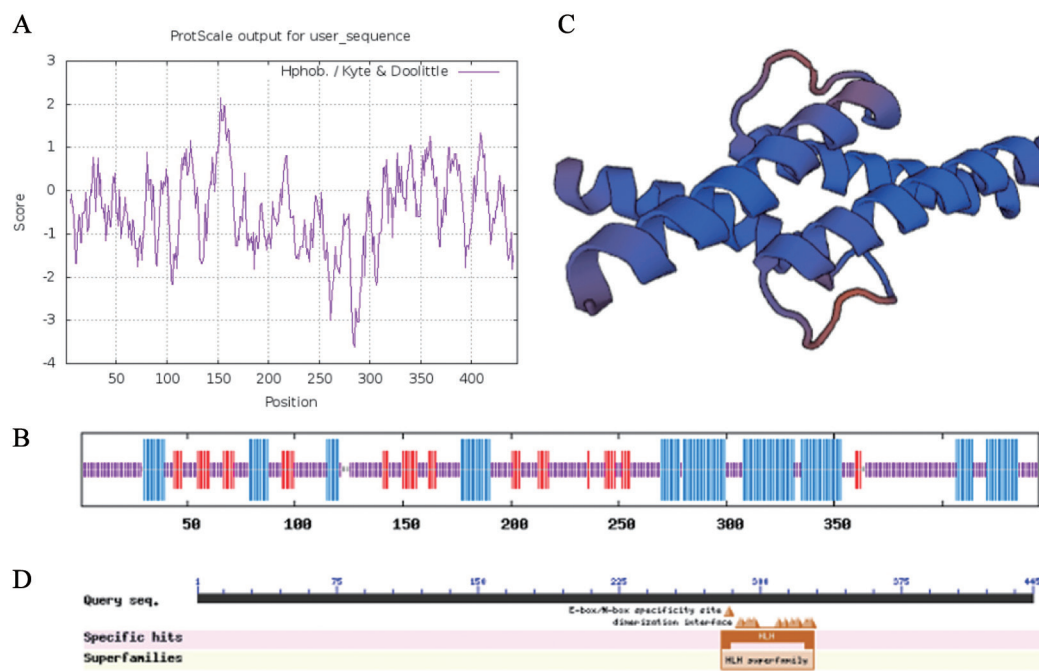


图2 *PobHLH*的生物信息学分析
Fig.2 Bioinformatics analysis of *PobHLH*

A: 疏水性预测分析; B: 二级结构预测分析; C: 三级结构预测分析; D: 保守结构域分析。

```

AAAGAATTGGTCTCTCTCAGTCCCTTGGTTATCGCTAAAATAAAATGCTGCCATG
CTTTTCTTCGTATGCCCTTCCATAAAGGATGACTCTATTGAGGCCCTTGTAATC
TCTATCACTCGCGAAAACAACAAATCGGTTTGGAGCTAAATCGCTGGTTCGAAA
1  ATGAGCCAGTGTGTCCGAGCTGGGATCTGGATGACGATCCCCCATCTACGTTCCAACGCAAT
1  M S Q C V P S W D L D D D P P I L R S N C N
67  TCCATGGCACCTGATGTCTCCATGTTGGACTACGAAGTGGCAGAGCTGACATGGGAGAATGGGCAA
23  S M A P D V S M L D Y E V A E L T W E N G Q
133  CTAGCCATGCATAGCTTAGGACCTCCTCGTGAACGGTAAAACACTTCACTTCTTCTTCCCACC
45  L A M H S L G P P R A T V K H F T S S S P T
199  ACTAAATACATTTGGGAGAAGCCGCGTGTAGCGGTACCCTGGAATCCATAGTTAACCAAGCCACT
67  T K Y I W E K P R A S G T L E S I V N Q A T
265  CGGTTGCCGAGAACAAGGCCGCACTTCTTTGACAGCAGGGGATGGTTTGACCGTCACCGTAGT
89  R L P E N K A A I F F D S R G W F D R H R S
331  GCCCCTGCCCCTGCCGCCCTCAGCCACCATGAGTATGGACGCTTTGGTCCCCAGCTCCCACAAC
111  A P A P A A A S A T M S M D A L V P S S H N
397  CCAGTGGAGGATCCGCCTTCCCCTTGATGGAGTCCGTTATCAGGACCTGTAACCTACCGGAGTGGTT
133  P V E D P P S P L M E S V S G P V T T G R V
463  GCGTGTGTGGTTCTGTACCGGAGCCGTCGCCACTACCAAGGACGACGAACCAGTGTCTCCGGTG
155  A C V G S C T G A V A T T K D D E P V L P V
529  AAACCGCTAGGGTGGATCGTGTGCACACGAGTGGAGCCAGTGGCAAAGTGCTACGTTTGAAGA
177  K R A R V D R A A H E W S Q C E S A T F G R
595  GAGAGTCAGCAGGTGACACTGGACACGTGCGAGAGAGATTTTGGTATAGGGTTTACTTCTACTTCC
199  E S Q Q V T L D T C E R D F G I G F T S T S
661  CTTGGTCCGCCGACACCAAGTTCGGAAAACCAAGCACCAGGGCGACCACTACTGCGGACGATCAT
221  L G S P D T S S G K P S T R A T T T A D D H
727  GACTCAGTTTGTACAGCATATCACAGAGGAGATAGGCGTGGACGAAAAAGAAAAAGAAATGGG
243  D S V C H S I S Q R E I G V D E K K K G N G
793  AAATCCTCAGGTTCAACAAAAAGAGTAGGGCTGTGCTGTTTCATAACCAGTCTGAACGGAAAAGA
265  K S S G S T K R S R A A A V H N Q S E R K R
859  AGAGATAAGATTAACGAAAAGGATGAAGACCCTGCAGAACTGGTCCCAAATTCACAAAGACTGAC
287  R D K I N E R M K T L Q K L V P N S N K T D
925  AAAGCTTCATGCTTGATGAAGTCATTGAATATTGAAACAACACTACAAGCCCAGATCAGTATGATT
309  K A S M L D E V I E Y L K Q L Q A Q I S M I
991  AGTAGAATGAATATGCCATACATGCTGTCAATGGCCATGCAACAACAACCTCCAAATGCTCTATG
331  S R M N M P Y M M L S M A M Q Q Q L Q M S M
1057  ATGGCACCAATGGGCATGGGCATGGGTGTTGTGGATCATATGAACACATGGGAAGACCCAACATC
353  M A P M G M G M G V V D H M N T L G R P N I
1123  CCTGGGATTTCTCCCCTTCACTCTTCTGCTTTTCATGCCTTTATCTTCTTGGGATGGTCCAGC
375  P G I S P L L H S S A F M P L S S W D G S S
1189  GACCGGTTATCACCTCCTGCAACTCTCATGGATCCCTTGGCCACATTTCTGGCTACCAATCACAA
397  D R L S P P A T L M D P L A T F L A Y Q S Q
1255  CCAATGACAATGGATGCTTACAGCAGGATGGCTGCCTTGATCAACAATTACAGCAACACCCAGCC
419  P M T M D A Y S R M A A L Y Q Q L Q Q H P A
1321  TCAAGTCTAAGAGTTAATTAAGCATTGAAAACCTCCATTTAAATTTTATGAAATATATTTTCAT
441  S S S K S *
TTTAATTAACATGATGAGCCAAAATTTGGTTTCATTTATTTGGTAACTAAAGAT
GTATAAAATGTAATTTATTTCTTCTGGGACCAGGTTTATATCTACTTTTCCG

```

图3 *PobHLH*基因cDNA及推测编码的氨基酸序列Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PobHLH*

黄色阴影为DNA结合位点, 绿色阴影处为二聚体接口, *处为E-box特异结合位点; ATG是起始密码子, TAA是终止密码子, 3' UTR和5' UTR区域用虚线表示。

AtALC聚成一个分支, 三者同属于bHLH家族的VII(a+b)亚组(Pires和Dolan 2010) (图5)。该亚组的功能包括参与光敏色素、细胞色素和赤霉素信号调节(PIF1/PIL5、PIF3、PIF4、PIF5/PIL6和HFR1) (Castillon等2007; de Lucas等2008; Duek和Fankhauser 2003; Leivar等2008)、对高温的响应(PIF5/PIL6) (Koini等2009)、调控心皮发育、果实开裂和受精过程(SPT、ALC和UNE10) (Heisler等2001; Pen-

field等2005; Rajani和Sundaresan 2001; Pagnussat等2005)等。

2.4 授粉前后*PobHLH*的表达量分析

对授粉前后不同时期的雌蕊提取总RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测均显示具有28S和18S两条带, 且28S条带亮度明显高于18S条带, 分光光度计检测OD_{260/280}均在1.8~2.0之间, 表明RNA质量较高, 可用于后续分析。以‘凤丹白’ *PoTublin*为内参基

图4 *PobHLLH*与其他植物同源氨基酸序列比对Fig. 4 Multi-alignment of the predicted amino acid sequences of *PobHLLH* and its homologs from other plants

APB基序和NLS/bHLH结构域用实线标明。所用氨基酸序列: 二倍体棉花(XP_012489734.1)、三叶橡胶树(XP_021677931.1)、麻疯树(XP_012083633.1)、蓖麻(XP_015582839.1)、可可(EXO96336.1)、葡萄(XP_002275629.2)和拟南芥PIF1 (AT2G20180)。

因, 对授粉前后不同时期的雌蕊中*PobHLLH*的相对表达量进行检测分析, 结果表明*PobHLLH*在授粉前后不同时期的表达丰度差异很大(图6)。 *PobHLLH*在授粉后48 h (S4期)的雌蕊中表达量最高, 相对表达量为 15.55 ± 0.30 , 在柱头黏液分泌第1天(S2期)的雌蕊中表达量最低, 相对表达量为 0.17 ± 0.04 , 前者为后者的91倍。表达量从大到小排序为授粉后48 h (S4期)>授粉后24 h (S3期)>圆桃期(S1期)>柱头黏液分泌第1天(S2期)。从授粉后开始, *PobHLLH*表达量表现为明显的上升趋势, 且授粉后24 h表达量增加了50倍, 授粉后48 h后表达量仍然处于增长状

态, 是授粉后24 h的1.82倍(图6)。 *PobHLLH*表达量的急剧上升说明了其在授粉后雌雄配子体识别和双受精过程中可能起到了较为关键的作用。

3 讨论

本研究通过筛选‘凤丹白’雌蕊转录组数据库获得了*bHLH*同源基因序列, 并通过PCR扩增测序进行了验证, 序列分析表明其与拟南芥*bHLH*家族的VII (a+b)亚组调控受精过程UNE10同源性最高, 推测其可能参与牡丹受精过程。荧光定量分析显示其在授精后不同时期表达量逐渐升高, 进一步

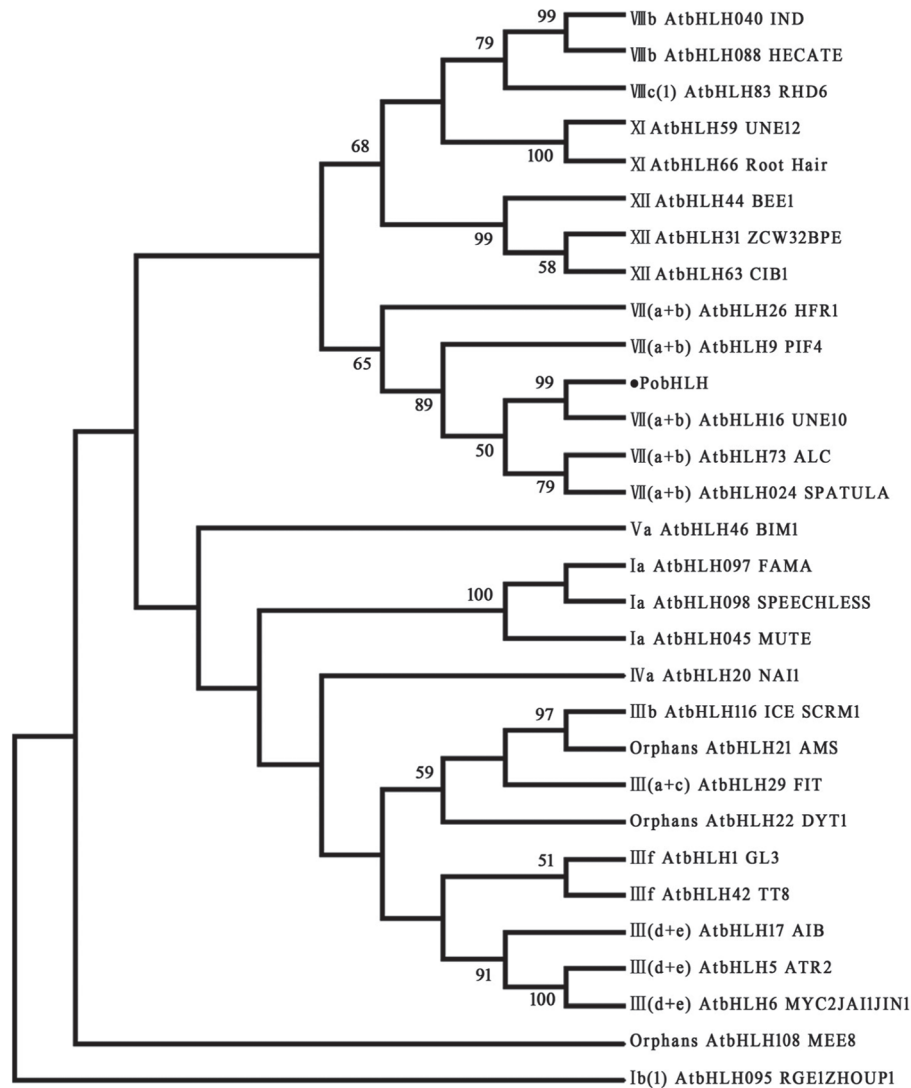


图5 PoblHLH和拟南芥bHLH家族蛋白系统进化树

Fig.5 A phylogenetic tree of the PoblHLH and it's homology from *Arabidopsis thaliana*

●表示本研究中获得PoblHLH。其他所用蛋白序列: VIIIb AtbHLH040 IND (At4g00120); VIIIb AtbHLH088 HEC1 (At5g67060); VIIIc(1) AtbHLH83 RHD6 (At1g66470); XI AtbHLH59 UNE12 (At4g02590); XI AtbHLH66 LRL1 (At2g24260); XII AtbHLH44 BEE1 (At1g18400); XII AtbHLH31 BPE (At1g59640); XII AtbHLH63 CIB1 (At4g34530); VII(a + b) AtbHLH26 HFR1 (At1g02340); VII(a + b) AtbHLH9 PIF4 (At2g43010); VII(a + b) AtbHLH16 UNE10 (At4g00050); VII(a + b) AtbHLH73 ALC (At5g67110); VII(a + b) AtbHLH24 SPT (At4g36930); Va AtbHLH46 BIM1 (At5g08130); Ia AtbHLH97 FAMA (At3g24140); Ia AtbHLH98 SPCH (At5g53210); Ia AtbHLH45 MUTE (At3g06120); IVa AtbHLH20 NAI1 (At2g22770); IIIb AtbHLH116 ICE SCRM1 (At3g26744); Orphans AtbHLH21 AMS (At2g16910); III(a + c) AtbHLH29 FIT (At2g28160); Orphans AtbHLH22 DYT1 (At4g21330); IIIf AtbHLH1 GL3 (At5g41315); IIIf AtbHLH42 TT8 (At4g09820); III(d + e) AtbHLH17 AIB (At2g46510); III(d + e) AtbHLH5 ATR2 (At5g46760); III(d + e) AtbHLH6 MYC2 (At1g32640); Orphans AtbHLH108 MEE8 (At1g25310); Ib(1) AtbHLH95 RGE1 (At1g49770)。

推测其在牡丹授粉、雌雄配子体识别、受精过程中可能发挥重要作用。

通过NCBI数据库比对显示, PoblHLH与UNE10

编码的bHLH蛋白相似性最高, 在多个物种中相似性都在60%左右; 另一方面, 在PoblHLH与其他bHLH氨基酸序列的系统进化分析结果中也显示

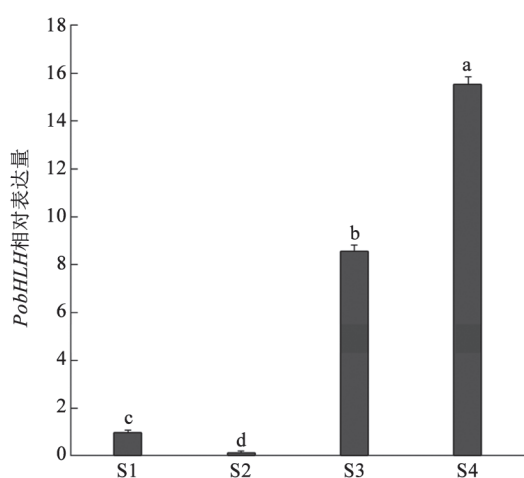


图6 *PobHLH*在‘凤丹白’不同授粉时期的相对表达量

Fig.6 Relative expression levels of *PobHLH* at different stages of pollination

S1~S4: 圆桃期、柱头黏液分泌第1天、授粉后24 h、授粉后48 h; 不同小写字母表示不同时期之间显著性差异水平($P \leq 0.05$)。

*PobHLH*与*AtUNE10*单独聚在一支, 且支持度高达99%, 亲缘关系最近, 这与NCBI数据库比对结果相吻合。与*PobHLH*同源性较高的*UNE10*、*SPT*和*ALC*组成一个分支, 三者分别涉及双受精、早期雌蕊发育和后期果实开裂的调控, 这预示着*PobHLH*可能具有相似的功能。

*bHLH*转录因子家族在许多方面影响着植物雌雄配子体发育以及双受精过程。已有研究发现‘凤丹白’的双受精过程发生在授粉后4~48 h之间, 花粉管穿过花柱的时间集中在10~36 h, 花粉管进入胚珠, 到达胚囊的时间集中在12~48 h (董兆磊 2010)。本研究中*PobHLH*在授粉后0~24 h之间的表达量上调50倍, 变化幅度最大, 24~48 h之间表达量上升幅度依然显著, 与‘凤丹白’受精规律相吻合, 表明*PobHLH*很可能在牡丹受精过程中起到了正向调节的作用。

*UNE*蛋白通过影响花粉管生长情况、花粉管导向和助细胞活性等影响植物的双受精过程。Pagnussat等(2005)对拟南芥雌配子体发育相关基因突变体进行研究发现, 拟南芥*une10*突变体自花授粉以及野生型花粉授粉后都表现为不育, 但是花粉管可以到达胚珠并进入珠孔, 推测可能是助细胞死亡导致不育, 说明*UNE10*蛋白影响的是双

受精后期胚囊的功能, 与本研究授粉后0~24 h *PobHLH*表达量显著上调表现一致, 推测*PobHLH*在牡丹中也对助细胞活性有影响, 有待后期验证。本研究明确了牡丹*PobHLH*转录因子在受精前后的表达规律, 为进一步研究其功能以及牡丹双受精分子机制的研究提供了理论基础。

参考文献(References)

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, et al (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 9: 1859–1868
- Bailey PC, Martin C, Toledo-Ortiz G, et al (2003). Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 15: 2497–2502
- Castillon A, Shen H, Huq E (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci*, 12: 514–521
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 17: 1043–1054
- de Lucas M, Daviere J-M, Rodriguez-Falcon M, et al (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451: 480–484
- Dong ZL (2010). Studies on the reproductive biology of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’ (dissertation). Beijing: Beijing Forest University (in Chinese with English abstract) [董兆磊 (2010). ‘凤丹’ (*Paeonia ostii* ‘Feng Dan’) 生殖生物学的初步研究(学位论文). 北京: 北京林业大学]
- Duek PD, Fankhauser C (2003). HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signaling. *Plant J*, 34: 827–836
- Groszmann M, Paicu T, Alvarez JP, et al (2011). *SPATULA* and *ALCATRAZ*, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for *Arabidopsis* gynoecium and fruit development. *Plant J*, 68: 816–829
- Heisler MG, Atkinson A, Bylstra YH, et al (2001). *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development*, 128: 1089–1098
- Higashiyama T (2010). Peptide signaling in pollen-pistil interactions. *Plant Cell Physiol*, 51: 177–189
- Jiang Y, Deyholos MK (2006). Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biol*, 6: 25–44
- Ko SS, Li MJ, Lin YJ, et al (2017). Tightly controlled expression of *bHLH142* is essential for timely tapetal programmed cell death and pollen development in rice. *Front*

- Plant Sci, 8: 1258–1273
- Koini MA, Alvey L, Allen T, et al (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr Biol*, 19: 408–413
- Leivar P, Monte E, Al-Sady B, et al (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell*, 20: 337–352
- Li N, Zhang DS, Liu HS, et al (2006a). The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell*, 18: 2999–3014
- Li X, Duan X, Jiang H, et al (2006b). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 141: 1167–1184
- Liu T, Li Y, Zhang C, et al (2014). Basic helix-loop-helix transcription factor *BcbHLLHpol* functions as a positive regulator of pollen development in non-heading Chinese cabbage. *Funct Integr Genomics*, 14: 731–739
- Nakata M, Mitsuda N, Herde M, et al (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 1641–1656
- Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, et al (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development*, 132: 603–614
- Penfield S, Josse EM, Kannangara R, et al (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol*, 15: 1998–2006
- Pires N, Dolan L (2010). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Mol Biol Evol*, 27: 862–874
- Rajani S, Sundaresan V (2001). The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr Biol*, 11: 1914–1922
- Wang T, Liang L, Xue Y, et al (2016). A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature*, 531: 241–244
- Zhao Q, Ren YR, Wang QJ, et al (2016). Ubiquitination-related MdbT scaffold proteins target a bHLH transcription factor for iron homeostasis. *Plant Physiol*, 172: 1973–1988
- Zhu E, You C, Wang S, et al (2015). The DYT1-interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome. *Plant J*, 83: 976–990

Cloning and expression of *PobHLH* involved in fertilization in *Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’

LI Zhen[#], HAO Qing[#], LI Wei, LIU Qing-Chao, LIU Qing-Hua, WANG Kui-Ling^{*}

College of Landscape Architecture and Forestry, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract: An unigene sequence shared high homology with bHLH putatively involved in plant double fertilization were obtained from previous-constructed oil tree peony (*Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’) gynoeceium transcriptome database and named as *PobHLH*. *PobHLH* contains a 1 338 bp-long ORF, putatively encoding 445 amino acid residues with typical bHLH domains. The putative amino acid sequence encoded by *PobHLH* contained conserved motifs, including HLH domain, APB motifs and NLS. By amino acid sequence comparison, it showed that *PobHLH* shared the highest similarity with that of AtUNE10 belonging to bHLH subgroup of VII(a+b) in *Arabidopsis thaliana*, followed by AtSPT and AtALC, which were confirmed to regulate the development of female gametophyte during double fertilization. qRT-PCR analysis indicated that *PobHLH* showed the highest increment appeared after fertilization for 24 hours, while, the highest abundance was detected after fertilization for 48 hours, which was consistent with process of the double fertilization, which implied its putative function in double fertilization.

Key words: oil peony *Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’; bHLH; double fertilization; gene cloning; expression analysis

Received 2018-10-08 Accepted 2019-01-30

This work was supported by the National Science Foundation of China (31601789) and the Promotive Research Fund for Excellent Young and Middle-aged Scientists of Shandong Province (BS2015SW017).

[#]Co-first authors.

^{*}Corresponding author (wkl6310@163.com).