

综 述 Reviews

bHLH转录因子在茉莉酸信号诱导植物次生产物合成中的作用及分子机制

李欣¹, 李影¹, 曲子越¹, 孙璐¹, 王思瑶¹, 詹亚光^{1,2}, 尹静^{1,2,*}东北林业大学¹生命科学学院, ²林学院林木遗传育种与生物技术国家重点实验室, 哈尔滨150040

摘要: 在茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号途径中, 植物通过转录激活子和转录抑制子之间的合理协调来调控适当的防御反应及生长发育过程, 从而适应多变的环境, 以刺激次生产物有效合成, 其中bHLH (basic helix-loop-helix)转录因子在响应JA信号诱导植物次生产物萜类合成中起重要调控作用。本文结合植物中bHLH转录因子的结构特点和JA信号在萜类物质合成中的作用, 系统地阐述了bHLH转录因子在响应JA信号诱导萜类合成中的调控作用及分子机制, 并探讨了bHLH类转录因子与MYB类转录因子互作参与次生代谢调控的过程。本综述为进一步深入揭示bHLH在植物萜类合成代谢调控网络中的分子功能和药用植物活性成分代谢途径的遗传改良提供理论参考。

关键词: bHLH; 茉莉酸; 萜类; 调控机制

近年来, 随着人口扩增和对天然药物需求的不断增大, 天然药物生产和自然资源可持续发展之间的矛盾加剧。细胞工程及代谢基因工程的发展使得人们能够通过对植物细胞代谢进行关键步骤改造和靶分子遗传修饰而使目标产物积累提高, 相关研究已取得显著进展(Du等2010; Lee等2010), 拓展了有关植物代谢途径及其调控机制的认识。然而, 次生代谢途径复杂, 且不同途径之间有着繁复的交互作用, 目前, 除了黄酮途径外, 对多数次生代谢途径的合成代谢机制及调控网络的认识仍有限, 通过代谢基因工程提高植物天然产物含量的潜力尚未被充分认识和挖掘。

随着后基因组工作的深入, 转录因子(transcription factor, TF)作为改造植物代谢途径的工具, 以其独有的“多点调控”优势, 弥补了代谢工程操作中单个关键酶基因作用不足和多个关键酶基因可能产生组成型致死表达的缺点(赵恒伟等2012)。此外, 由于代谢途径通常有多个限速酶, 而且限速步骤很难确定, 通过转录因子基因的表达调控可以激活特定代谢支路中多个基因的协同表达, 因此可通过调节转录因子的表达量从整体角度调控代谢途径进而提高目的代谢物的产量。bHLH (basic helix-loop-helix)是植物中广泛存在的一类重要转录因子, 在植物生长发育、胁迫应答、信号传导和次生代谢调控中起重要作用(徐茂军等2006; Anjum等2011)。

对植物防御反应和生长发育具有重要的调节和控制作用的植物激素茉莉酸(jasmonic acid, JA)也是次生代谢产物合成中最有效的诱导子之一,

可显著刺激抗逆酶活性提高, 促进萜类、黄酮、生物碱的合成及相关途径基因表达(徐茂军等2006; Anjum等2011)。本文系统地介绍了bHLH转录因子在响应JA信号调控植物次生产物合成中的作用及其分子机制, 以期为更好地推进bHLH类转录因子在药用活性成分合成中高效地发挥作用提供理论依据。

1 bHLH转录因子的结构

bHLH是植物中广泛存在的一类重要转录因子, 其结构域约有60个氨基酸, 包含碱性区域和螺旋-环-螺旋(HLH)区域(图1)。碱性区域由大约15

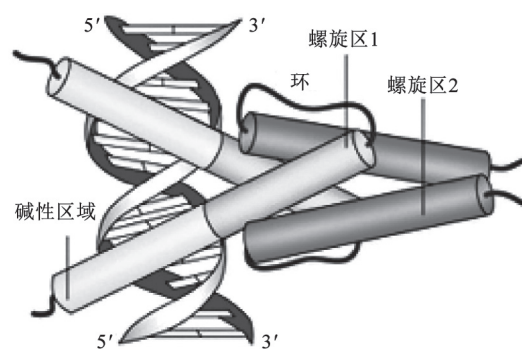


图1 bHLH基序及其目标DNA复合体

Fig.1 A complex formed between bHLH motif and its target DNA

参考张全琪等(2011)并略有修改。

收稿 2016-09-22 修定 2016-12-02
资助 国家自然科学基金(31570589)、中央高校基本科研业务费(257-2015DY01)和国家基础科学人才培养基金(J1210053)。

* 通讯作者(E-mail: yinjing20135@163.com)。

个氨基酸组成,包括6个共有氨基酸残基,位于bHLH结构域的N端,该区域主要与DNA结合有关;HLH区域位于bHLH结构域的C端,包含亲水又亲脂的 α -螺旋,两个 α -螺旋之间被不同长度的连接区(环)分开,形成HLH结构。bHLH转录因子通过两个 α -螺旋之间的相互作用,形成同源或异源二聚体,从而与靶基因启动子的不同部位相结合(Kovalenko等2007)。bHLH转录因子碱性区域中的某些氨基酸能特异性识别靶基因启动子区域中的G-box并与之结合,从而调控靶基因的表达。Carretero-Paulet等(2010)认为植物中bHLH蛋白也是多基因家族,并对植物中分离得到的638个bHLH转录因子进行了分类,共32个亚家族,这些bHLH蛋白在植物生长发育、信号转导和次生代谢调控中起重要作用。

2 关于甲羟戊酸合成途径

三萜类物质是植物界一大类次生代谢产物,广泛分布于各种植物中,人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、三七(*Panax notoginseng* F. H. Chen)、红豆杉(*Taxus* Linn.)、白桦(*Betula platyphylla* Suk.)中三萜种类、含量十分丰富。植物三萜类物质均是以乙酰辅酶A为原料经甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径在细胞质中合成的,途经关键酶基因3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, *HMGR*)、法呢基焦磷酸合成酶(farnesyl pyrophosphonate synthase, *FPS*)、角鲨烯合成酶(squalene synthase, *SS*),此后,在角鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase, *SE*)作用下合成三萜类和固醇物质的共同前体2,3-氧鲨烯(2,3-oxidosqualene) (Haralampidis等2002),最终在不同氧鲨烯环化酶作用下,产生五环或四环三萜的骨架,形成不同种类的萜类物质。如白桦中的2,3-氧鲨烯在羽扇醇合酶(lupeol synthases, *LUS*)作用下合成白桦酯醇、白桦酯酸(白桦酯醇衍生物),在环阿乔醇合酶(cycloartenol synthase, *CAS*)作用下合成固醇,在达玛烷烯二醇合酶(dammarenediol synthases, *DS*)作用下合成达玛烯二醇,在 β -香树酯醇合酶(β -amyrin synthase, β -AS)作用下合成齐墩果酸三萜。如人参中的2,3-氧鲨烯在*DS*作用下合成达玛烷型皂苷,在*CAS*作用下合成环阿乔醇,在羊毛甾醇合成酶(lanosterol synthase, *LAS*)作用下合

成羊毛甾醇。关于三萜基因的克隆也陆续见到报道,包括十种植物的50多个三萜合成基因(Zhang等2003b; Hayashi等2004; Basyuni等2007; Niu等2014),分别来自人参、豌豆(*Pisum sativum* L.)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.)等, Zhang等(2015)也已从日本白桦(*B. platyphylla* var. *japonica*)中成功克隆*CAS* (*BPX*)、 β -AS (*BPY*)、*LUS* (*BPW*)基因。由于目前对植物三萜生物合成酶及其生化途径的认知有限,所以只有详尽阐明其生物合成途径的分子基础,才有可能通过改良单个或多个酶促步骤,实现人工调控植物三萜物质在植物细胞中的产量。本实验室前期,在中国东北白桦中首次克隆了白桦*HMGR*、*FPS*、*SS*、*SE*、*DS*、*CAS*基因全长序列,并明确了其表达特性(Yin等2012, 2015, 2016),同时获得了白桦*HMGR*、*SS*、*SE*、*FPS*启动子序列,明确其具有JA响应元件CGTCA-motif及转录因子bHLH结合位点G-box调控元件(Zhang等2016),这为在转录水平深入研究及揭示白桦三萜代谢调控网络及代谢途径的遗传修饰奠定了基础。

3 MeJA和SA对萜类合成的调控研究

来源于植物内部的内源性诱导信号茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和水杨酸(salicylic acid, SA)不仅诱导植物防御系统产生植保素,对植物抗逆、抗病虫和微生物侵染起作用,而且也是介导外源诱导物促进植物细胞次生代谢产物合成的重要信号分子,对细胞培养中多种次生代谢产物如紫杉醇、喜树碱、异黄酮、甘草皂苷、葛根素、白桦三萜等的合成及其相应产物关键酶基因具有积极的诱导和促进作用。最近研究证实, SA、MeJA或真菌等处理植物细胞后的早期应答是氧的迸发,并伴随着活性氧数量的增加, NO或H₂O₂是介导MeJA和SA等诱导子促进次生产物合成的主要信号分子(Fernández-Calvo等2011; 李春晓等2012; Yin等2015),因此,植物的氧自由基清除系统中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等酶活与多种次生代谢产物合成与积累有密切关系。在紫杉醇细胞培养中用外源100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA处理,诱导了H₂O₂的产生,同时诱导了脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)和L-苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanin

ammonia-lyase, PAL)活性的增加。在人参根培养物中加入MeJA和SA可以增强羰基化合物和H₂O₂含量,促进总酚、黄酮类、抗氧化剂含量提高,这种提高主要是因为使用诱导子后提高了植物体内抗氧化防御蛋白活性和自由基的清除能力(李春晓等2012; Yin等2015, 2016)。除此之外, MeJA和SA还调控植物的生长发育、萜类合成途径中关键酶基因和转录因子的表达。清华大学谢道昕团队研究表明,在JA和赤霉素(gibberellin, GA)途径中,WD/bHLH/MYB转录因子是JAZ、DELLA蛋白直接靶位点,二者通过相互结合去调节腺毛的发育,GA和JA可以通过泛素化降解JAZ与DELLA蛋白来激活WD/bHLH/MYB转录因子,从而诱导腺毛的产生,分泌出萜类物质(Yan等2009, 2013; Wasternack 2014a)。本实验室前期也已经证明, MeJA和SA可以诱导HMGR、FPS、SS、SE、DS、CAS基因的表达(Yin等2012, 2015, 2016)。

4 bHLH类转录因子在植物萜类次生代谢合成中的调控机制

4.1 bHLH转录因子参与JA诱导防御信号调控

MYC2是bHLH转录因子家族之一,JA信号途径中MYC2被认为是主要的调控因子(Zhang等2003a; 王勇等2008; Koini等2009)。清华大学谢道昕研究组发现,在植物体内JA信号的核心组件是一个复合体COI1-JAZ-MYC2,在没有外界刺激时处于静止的关闭状态(Yan等2009, 2013; Wasternack 2014b; Hu等2013)。当植物体受到害虫、外界攻击及出现机械伤害时,JA就会迅速在植物体内合成。植物通过感知JA信号启动JAZ-COI1受体复合物结合,降解JAZ蛋白(作为阻遏蛋白参与JA信号途径的调控),释放MYC2调节各种JA信号及特殊的JAZ信号蛋白通路,从而使植物产生各种防御反应或者激活相应的发育过程(Ohno等2011; Carretero-Paulet等2010; Feller等2011)。同时有研究显示, bHLH家族成员在形成生物学功能时不是简单的单个成员执行作用,MYC2、MYC3和MYC4都参与了JA信号启动和相关基因表达(Carretero-Paulet等2010; Chico等2014)。中国科学院李传友研究组发现,作为主效的JA信号调节子,MYC2通过不同的分子机制调节不同通路的JA响应基因(Zhai等2013),MYC2磷酸化依赖的开关作用与其功能密

切相关。研究表明在JA信号途径中,植物通过转录激活子和转录抑制子之间的合理协调来调控适当的防御反应及生长发育过程,从而适应多变的环境(Zhai等2013)。目前发现的萜类转录因子主要集中在长春花(*Catharanthus roseus* G. Don)、拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]、葡萄(*Vitis vinifera* L.)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)等植物中,包括AP2类、WRKY类、锌指类、bZIP、bHLH类等,但其中多数与黄酮类花青素代谢途径相关(Chatel等2003; Fernández-Calvo等2011; Yin等2015)。玉米(*Zea mays* L.)中许多部位(如花药、种子、叶片、幼苗等)花青素的合成都需要*r*和*c1*两大基因家族的作用,*r*基因家族成员(*r*、*lc*、*sn*、*b*等)所编码的蛋白质属于bHLH转录因子,对花青素合成的时间、分布和数量具有决定性作用(Ohno等2011)。在长春花中,ORCA3(转录因子AP2/ERF)应答于MeJA的诱导,可以增强长春花碱生物合成代谢途径上多个基因(*DXS*、*AS*、*TDC*、*STR*、*D4H*)的过量表达,进而增加长春花碱的产量(Chatel等2003)。

对植物的防御反应和生长发育具有重要的调节和控制作用的植物激素JA也是次生代谢产物合成中最有效的诱导子,可显著刺激抗逆酶活性的提高及促进萜类、黄酮、生物碱的合成以及相关途径基因表达(Zhang等2003b; Hayashi等2004; 徐茂军等2006; Anjum等2011; Lu等2010),在本实验室前期关于白桦细胞三萜合成中也有类似结果,但关于JA在次生产物合成中的转录调控三萜合成的机制认识尚不清楚。随着清华大学谢道昕等研究组鉴定了JA的受体COI1,提出了COI1与JA的互作模型(图2)。中科院陈晓亚等团队通过多种实验技术明确了拟南芥bHLH类转录因子参与激活JA信号途径调节植物的防御反应和生长发育,证实bHLH参与了多种信号途径之间的互作,提出MYC2(bHLH转录因子家族之一)是JA信号途径中主要的调控因子(Hong等2012)。另有研究发现SA与乙烯结合可抑制长春花JA应答基因的表达,乙烯对SA与JA之间的互作对长春花碱合成起正负两种调控效应。本实验室前期对SA与JA诱导的白桦转录组数据分析发现,尽管SA与JA均可显著促进三萜合成及相关途径基因表达,但不同bHLH(MYC)转录因子对两种信号诱导后的响应模式存

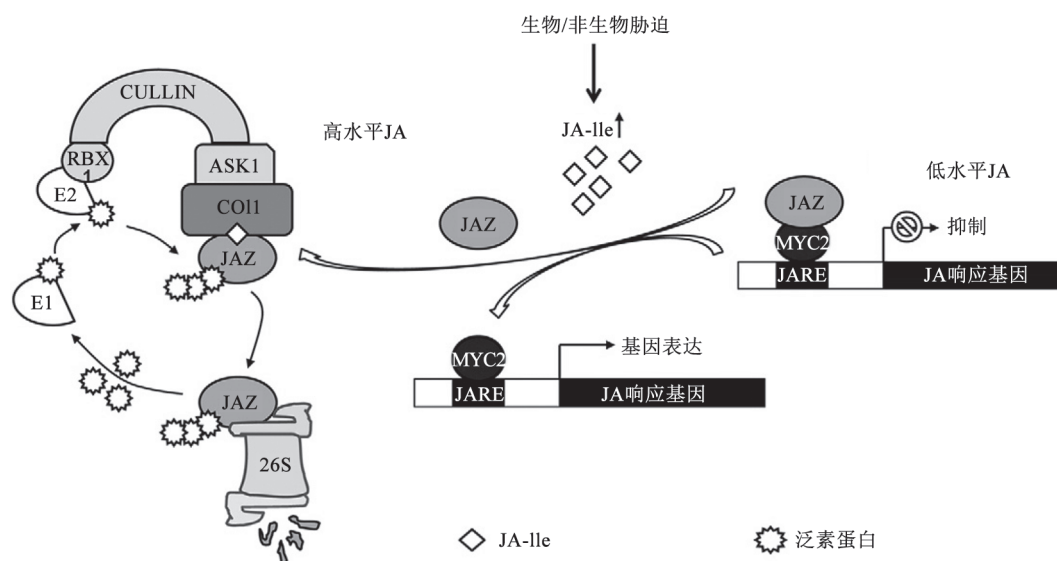


图2 JA通过SCF^{COI1}-JAZ复合体调节基因表达机制模式图

Fig.2 Mechanism of JA-induced gene expression following JA perception via the SCF^{COI1}-JAZ co-receptor complex

26S为蛋白酶体, ASK1为凋亡信号调节激酶, COI1为茉莉素信号转导途径中的关键调控因子, CULLIN为E3类泛素连接酶, E1和E2为泛素连接酶, JA-Ile为JA异亮氨酸配合物, JARE为JA响应元件, JAZ为JA ZIM结构域蛋白, MYC2为bHLH家族中的转录因子, RBX为进化保守的泛素连接酶; 参考Wasternack (2014b)并略有修改。

在显著差异(Yin等2012, 2015, 2016), 暗示bHLH可能以不同的转录调控机制参与SA与JA信号诱导及调控萜类合成。上述研究为深入揭示bHLH类转录因子在MeJA或SA诱导萜类次生产物合成及转录调控机制研究提供了线索。

4.2 bHLH转录因子响应JA信号在萜类合成中的调控作用

多数植物bHLH可与G-box结合, 如Srebp、Tfe、Myc、Mad、Mxil、Cbf1、ESC和R等; 拟南芥的147种bHLH转录因子中, 有104种bHLH属于这一类。以STR启动子上的G-box作为诱导, 从长春花cDNA文库中分离出bHLH类转录因子CrMYC1、CrMYC2, 在酵母细胞中发现该基因相应的蛋白能特异性地与G-box结合(Zhang等2011)。在长春花悬浮培养细胞中, 真菌诱导剂和JA可以诱导CrMYC1、CrMYC2 mRNA的表达, 但CrMYC2与其他的CrMYCs之间无协同作用(Chatel等2003)。JA应答中, CrMYC2的下调对生物碱合成相关基因TDC和STR的表达没有影响, 但对生物碱的积累有强烈的作用, 这表明一个或多个下游合成基因或者是别的未知的直接或间接的转录因子被CrMYC2控制(Chatel等2003)。GL3是bHLH家族的转录因子, 对

其进行过量表达可使拟南芥腺毛数目增加, 进而可增加薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)中的精油、青蒿(*Artemisia carvifolia* Buch.)中的青蒿素等均储存腺毛中的萜类物质的产量, 从而大幅度提高中药中有效成分含量(Zhai等2013)。橡胶(*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)是一种典型的类异戊二烯途径合成的多萜产物, 在橡胶树乳管细胞中, JA分子也可能通过对bHLH等转录因子基因表达的激活作用, 启动一系列与橡胶树乳管分化和橡胶生物合成相关的功能基因, 从而提高乳管细胞的代谢活性和胶乳产量(Zhao等2011; Song等2011)。图3是bHLH调控JA介导萜类合成分子机制模型。可见, 在植物JA信号转导途径中, bHLH转录因子起着“主开关调节子”作用, 通过启动一系列相关基因的表达从而产生JA诱导的生理效应。

4.3 bHLH类转录因子与MYB转录因子互作参与次生代谢调控

近年来, MYB和bHLH两种转录因子的相互作用成为类黄酮合成途径调控的最新研究热点(Chatel等2003; Huang等2013; Xu等2015; Luo等2015; Bulgakov等2016; Wang等2016)。在拟南芥花青素生物合成途径中, TT2-TT8-TTG1作为复合体调控

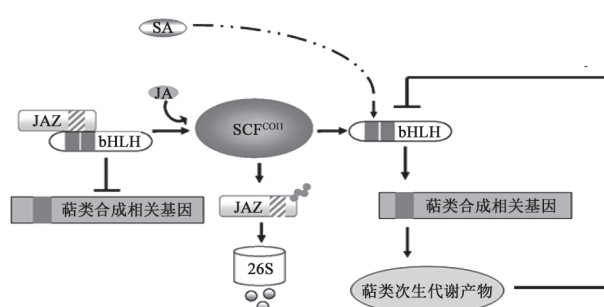


图3 bHLH调控JA介导萜类合成分子机制模型

Fig.3 A model for the molecular mechanism of bHLH regulating JA-mediated terpenoids synthesis

26S: 26S蛋白酶体; JAZ: JA ZIM结构域蛋白; SCF^{COI1}: 泛素连接酶复合物。参考Song等(2011)并略有修改。

*ban*基因表达, 其中TTG1通常作为bHLH的协同转录因子发挥作用。在bHLH转录因子的N端有与MYB蛋白互作的MIR区, C端有ACT类似结构域, 在玉米中这一结构在bHLH蛋白与R2R3-MYB蛋白互作激活颜色生成中起重要作用。两个保守的氨基酸(K157和A159)是bHLH蛋白发挥转录激活活性所必须的。bHLH转录因子常常与MYB转录因子协同作用从而调控类黄酮代谢途径(Song等2011; Wang等2013)。拟南芥的113个bHLH转录因子中, 参与类黄酮代谢的有4个。基序分析还发现, *CsMYB4-1*、*CsMYB4-2*、*CsMYB4-3*、*CsMYB4-4*、*CsMYB5-1*和*CsMYB5-2*的序列中包含[DE]Lx2[RK]x3Lx-6Lx3R基序, 该基序特定结合bHLH, 有助于形成稳定的MYB-bHLH复合物, 提示这些MYB蛋白可能与bHLH一起发挥作用。葡萄中VvMYC1调控果皮和种子中单宁和花青素的累积, 并在根、茎、叶等器官均有表达。VvMYC1自身不能激活类黄酮代谢途径的*CHI*、*UFGT*和*ANR*基因的启动子, 但与MYB转录因子共同转染时可极显著激活三个结构基因的启动子(Licausi等2010)。AtTT8是拟南芥角果中DFR和BAN两个类黄酮代谢结构基因的表达所必须的, AtTT8控制自身表达的同时反馈调节WD40转录因子TTG1和不同的MYB和bHLH组合, 进而调控拟南芥中种皮上单宁的累积(Baudry等2004)。苹果(*Malus pumila* Mill.)中, MYB、bHLH和WD40蛋白质形成复合体, 激活花青素生物合成相关基因的表达, 参与花青素合成的调控(Li等2007)。在拟南芥中, JA通过SCF^{COI1}复合体降解

JAZ蛋白, 与之结合的MYC2/3/4和FIL/YAB3等转录因子得以释放, 从而激活下游WD-repeat/bHLH转录因子, 使其与MYB75形成复合体, 促进花青素的合成(Fernández-Calvo等2011; Boter等2015)。

5 展望

JA通过bHLH转录因子来诱导萜类合成途径的研究愈来愈广泛及深入, bHLH调控JA介导萜类合成的分子传递模式已经初步建立(图2), JA促进JAZ与SCF^{COI1}结合, 从而释放与JAZ蛋白结合的bHLH转录因子, bHLH转录因子再与下游萜类合成基因的启动子结合, 促进萜类合成相关基因的表达, 但过多的萜类物质又会反馈调节来抑制bHLH转录因子活性, 使bHLH转录因子维持在动态平衡中。SA和MeJA对萜类物质合成的影响是能快速、高度专一性地诱导合成途径特定基因的表达。本实验室前期研究显示, 50 mg·L⁻¹ SA和100 μmol·L⁻¹ MeJA诱导24~48 h后, 白桦悬浮细胞中抗逆酶SOD、CAT、PAL活性均被提高, 且三萜合成途径关键基因*FPS*、*SS*、*SE*、*BPY*等有不同程度上调表达, 并证实H₂O₂、Ca²⁺参与介导了SA和MeJA诱导白桦细胞的防御系统启动和萜类代谢产物合成(王艳等2014; 马泓思等2015); 同时在转录组数据中已确定9个bHLH参与MeJA诱导响应, 10个bHLH参与SA诱导, 且表达模式显著不同; 但关于木本植物白桦bHLH转录因子对MeJA信号分子响应与三萜合成的关系及在介导信号分子调控三萜合成中的作用机制尚不清楚。进一步的深入研究不仅将有助于在转录水平上深入揭示MeJA诱导白桦三萜生物合成的调控机制, 也将进一步阐明bHLH在白桦三萜代谢调控网络中的分子功能及为白桦三萜代谢途径的遗传改良奠定基础。

参考文献

- Afrin S, Nuruzzaman M, Zhu J, Luo ZY (2015). Combinatorial interactions of MYB and bHLH in flavonoid biosynthesis and their function in plants. *J Plant Res*, 3 (2): 1123–1129
- Anjum SA, Wang L, Farooq M, Khan I, Xue L (2011). Methyl jasmonate-induced alteration in lipid peroxidation, antioxidative defence system and yield in soybean under drought. *J Agron Crop Sci*, 197 (4): 296–301
- Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, Kinjo K, Baba S, Takara K (2007). Triterpene synthases from the Okinawan mangrove tribe, Rhizophoraceae. *FEBS J*, 274 (19): 5028–5042
- Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weissshaar B, Lep-

- iniec L (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 39 (3): 366–380
- Boter M, Golz JF, Giménez-Ibañez S, Fernandez-Barbero G, Franco-Zorrilla JM, Solano R (2015). FILAMENTOUS FLOWER is a direct target of JAZ3 and modulates responses to jasmonate. *Plant Cell*, 27 (11): 3160–3174
- Bulgakov VP, Veremeichik GN, Grigorchuk VP, Rybin VG, Shkryl VN (2016). The *rolB* gene activates secondary metabolism in *Arabidopsis* calli via selective activation of genes encoding MYB and bHLH transcription factors. *Plant Physiol Bioch*, 102: 70–79
- Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martínez-García JF, Bilbao-Castro JR, Robertson DL (2010). Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *J Plant Physiol*, 153 (3): 1398–1412
- Chatel G, Montiel G, Pré M, Memelink J, Thiersault M, Saint-Pierre B, Doireau P, Gantet P (2003). *CrMYC1*, a *Catharanthus roseus* elicitor- and jasmonate-responsive bHLH transcription factor that binds the G-box element of the strictosidine synthase gene promoter. *J Exp Bot*, 54 (392): 2587–2588
- Chico JM, Fernández-Barbero G, Chini A, Fernández-Calvo P, Díez-Díaz M, Solano R (2014). Repression of jasmonate-dependent defenses by shade involves differential regulation of protein stability of MYC transcription factors and their JAZ repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26 (5): 1967–1980
- Du Y, Chu H, Chu IK, Lo C (2010). CYP93G2 is a flavanone 2-hydroxylase required for C-glycosyl-flavone biosynthesis in rice. *Plant Physiol*, 154 (1): 324–333
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J*, 66 (1): 94–116
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, et al (2011). The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell*, 23 (2): 701–715
- Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biot*, 75: 31–49
- Hayashi H, Huang PY, Takada S, Obinata M, Inoue K, Shibuya M, Ebizuka Y (2004). Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biol Pharm Bull*, 27 (7): 1086–1092
- Hong GJ, Xue XY, Mao YB, Wang LJ, Chen XY (2012). *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell*, 24 (6): 2635–2648
- Hu P, Zhou W, Cheng Z, Fan M, Wang L, Xie D (2013). *JAV1* controls jasmonate-regulated plant defense. *Mol Cell*, 50 (4): 504–515
- Huang XS, Wang W, Zhang Q, Liu JH (2013). A basic helix-loop-helix transcription factor, *PtrbHLH*, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide. *Plant Physiol*, 162 (2): 1178–1194
- Koini MA, Alvey L, Allen T, Tilley CA, Harberd NP, Whitelam GC, Franklin KA (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr Biol*, 19 (5): 408–413
- Kovalenko LP, Balakshin VV, Presnova GA, Chistyakov AN, Shipaeva EV, Alekseeva SV, Durnev AD (2007). Immunotoxicity and allergenic properties of betulin-containing birch bark dry extract. *Pharm Chem J*, 41 (1): 17–19
- Lee EK, Jin YW, Park JH, Yoo YM, Hong SM, Amir R, Yan Z, Kwon E, Elfick A, Tomlinson S, et al (2010). Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nat Biotechnol*, 28 (11): 1213–1217
- Li CX, Yin J, Zhan YG, Ren CL, Wang ZH (2012). Effects of water, nitrogen and methyl jasmonate treatment on triterpenes accumulation in birch (*Betula platyphylla* Suk.). *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 32 (1): 155–161 (in Chinese with English abstract) [李春晓, 尹静, 詹亚光, 任春林, 王智慧(2012). 水分、氮肥及MeJA处理对白桦三萜积累特性的影响. 西北植物学报, 32 (1): 155–161]
- Li H, Flachowsky H, Fischer TC, Hanke MV, Forkmann G, Treutter D, Schwab W, Hoffmann T, Szankowski I (2007). Maize *Lc* transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta*, 226 (5): 1243–1254
- Licausi F, Giorgi FM, Zenoni S, Osti F, Pezzotti M, Perata P (2010). Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genom*, 11: 719
- Ma HS, Pan YJ, Wang Y, Yin J, Zhan YG, Zhao W, Zhang MY, Liang T (2015). Effect of Ca²⁺ on mediating the MeJA-induced synthesis of triterpenoid in suspension cells of *Betula platyphylla* Suk. *Bull Bot Res*, 35 (1): 117–126 (in Chinese with English abstract) [马泓思, 潘亚婕, 王艳, 尹静, 詹亚光, 赵薇, 张梦岩, 梁甜(2015). Ca²⁺在介导MeJA诱导白桦悬浮培养三萜合成中的作用. 植物研究, 35 (1): 117–126]
- Niu Y, Luo H, Sun C, Yang TJ, Dong L, Huang L, Chen S (2014). Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes *FPS*, *SS*, *SE*, and *DS* in the medicinal plant *Panax notoginseng*. *Gene*, 533 (1): 295–303
- Ohno S, Hosokawa M, Hoshino A, Kitamura Y, Morita Y, Park KI, Nakashima A, Deguchi A, Tatsuzawa F, Doi M, et al (2011). A bHLH transcription factor, *DvIVS*, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in dahlia (*Dahlia variabilis*). *J Exp Bot*, 62 (14): 5105–5116
- Song S, Qi T, Huang H, Ren Q, Wua D, Chang C, Peng W, Liu Y, Peng J, Xie D (2011). The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23 (3): 1000–1013
- Wang F, Zhu H, Chen D, Li Z, Peng R, Yao Q (2016). A grape bHLH transcription factor gene, *VvbHLH1*, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 125 (2): 387–398

- Wang Y, Cheng KP, Yao Q (2008). Progress of studies on bHLH transcription factor families, *Hereditas*, 30 (7): 821–830 (in Chinese with English abstract) [王勇, 陈克平, 姚勤(2008). bHLH转录因子家族研究进展. *遗传*, 30 (7): 821–830]
- Wang Y, Yin J, Ma HS, Zhan YG, Su X, Liang T, Zhang MY (2014). Role of calcium ion in mediating the triterpenoid synthesis induced by SA in suspension cells of *Betula platyphylla*. *J Beijing For Univ*, 36 (2): 51–58 (in Chinese with English abstract) [王艳, 尹静, 马泓思, 詹亚光, 苏欣, 梁甜, 张梦岩(2014). 钙离子在介导SA诱导白桦悬浮细胞三萜合成途径中的作用. *北京林业大学学报*, 36 (2): 51–58]
- Wang Z, Meng D, Wang A, Li T, Jiang S, Cong P, Li T (2013). The methylation of the *PcMYB10* promoter is associated with green-skinned sport in Max Red Bartlett pear. *Plant Physiol*, 162 (2): 885–896
- Wasternack C (2014a). Perception, signaling and cross-talk of jasmonates and the seminal contributions of the Daoxin Xie's lab and the Chuanyou Li's lab. *Plant Cell Rep*, 33 (5): 707–718
- Wasternack C (2014b). Action of jasmonates in plant stress responses and development – applied aspects. *Biotechnol Adv*, 32 (1): 31–39
- Xu M, Dong J, Zhu M (2006). NO mediates fungal elicitor puerarin in kudzu suspension cell biosynthesis by salicylic acid (SA) or jasmonic acid (JA) signaling pathways. *Sci Sin Vitae*, 36 (1): 66–75 (in Chinese) [徐茂军, 董菊芳, 朱睦元 (2006). NO通过水杨酸(SA)或者茉莉酸(JA)信号途径介导真菌诱导子对粉葛悬浮细胞中葛根素生物合成的促进作用. *中国科学: 生命科学*, 36 (1): 66–75]
- Xu W, Dubos C, Lepiniec L (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes. *Trends Plant Sci*, 20 (3): 176–185
- Yan J, Li H, Li S, Yao R, Deng H, Xie Q, Xie D (2013). The *Arabidopsis* F-box protein CORONATINE INSENSITIVE1 is stabilized by SCF^{COI1} and degraded via the 26S proteasome pathway. *Plant Cell*, 25 (2): 486–498
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F (2009). The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell*, 21 (8): 2220–2236
- Yin J, Li C, Zhan Y, Sun H, Gong Y, Zhang M, Xiao J (2016). The response of physiological characteristics, expression of OSC genes, and accumulation of triterpenoids in *Betula platyphylla* Suk to MeJA and SA treatment. *Plant Mol Biol Rep*, 34 (2): 427–439
- Yin J, Liang T, Wang S, Zhang M, Xiao J, Zhan Y, Li C (2015). Effect of drought and nitrogen on betulin and oleanolic acid accumulation and OSC gene expression in white birch saplings. *Plant Mol Biol Rep*, 33 (3): 705–715
- Yin J, Ren CL, Zhan YG, Li CX, Xiao JL, Qiu W, Lin XY, Peng HM (2012). Distribution and expression characteristics of triterpenoids and OSC genes in white birch (*Betula platyphylla* Suk.). *Mol Biol Rep*, 39 (3): 2321–2328
- Zhai Q, Yan L, Tan D, Chen R, Sun J, Gao L, Dong M, Wang Y, Li C (2013). Phosphorylation-coupled proteolysis of the transcription factor MYC2 is important for jasmonate-signaled plant immunity. *PLoS Genet*, 9 (4): e1003422
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne C, Lloyd A (2003a). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*, 130 (20): 4859–4869
- Zhang H, Hedhili S, Montiel G, Zhang Y, Chatel G, Pré M, Gantet P, Memelink J (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the *ORCA* genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J*, 67 (1): 61–71
- Zhang H, Shibuya M, Yokota S, Ebizuka Y (2003b). Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants. *Biol Pharm Bull*, 26 (5): 642–650
- Zhang M, Wang S, Yin J, Li C, Zhan Y, Xiao J, Liang T, Li X (2016). Molecular cloning and promoter analysis of squalene synthase and squalene epoxidase genes from *Betula platyphylla*. *Protoplasma*, 253 (5): 1347–1363
- Zhang QQ, Zhu JH, Ni YM, Zhang ZL (2011). The structure and function of plant bHLH transcription factors. *J Trop Subtrop Bot*, 19 (1): 84–90 (in Chinese with English abstract) [张全琪, 朱家红, 倪燕妹, 张治礼(2011). 植物bHLH转录因子的结构特点及其生物学功能. *热带亚热带植物学报*, 19 (1): 84–90]
- Zhao HW, Ge F, Sun Y, Liu Q, Chen ZY (2012). Transcription factors involved in plant terpenoid biosynthesis and their application prospect. *Chin Tradit Herb Drugs*, 43 (12): 2512–2519 (in Chinese with English abstract) [赵恒伟, 葛锋, 孙颖, 刘迪秋, 陈朝银(2012). 植物萜类物质生物合成的相关转录因子及其应用前景. *中草药*, 43 (12): 2512–2519]
- Zhao Y, Zhou LM, Chena YY, Yang SG, Tian WM (2011). MYC genes with differential responses to tapping, mechanical wounding, ethrel and methyl jasmonate in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *J Plant Physiol*, 168 (14): 1649–1658

The molecular mechanism and the function of bHLH regulating jasmonic acid-mediated secondary metabolites synthesis

LI Xin¹, LI Ying¹, QU Zi-Yue¹, SUN Lu¹, WANG Si-Yao¹, ZHAN Ya-Guang^{1,2}, YIN Jing^{1,2,*}

¹College of Life Sciences; ²State Key Laboratory of Tree Genetics Breeding, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In jasmonic acid (JA) signaling pathways, the proper defense reaction and the development process of the plant were regulated through transcription activation factor and transcription inhibition factor, in order to adapt to the changing environment and to stimulate synthesis of secondary products. The bHLH transcription factor plays an important role in JA inducing synthesis of terpenoids. Combining with structure characteristics of the bHLH transcription factors and the role of jasmonate-mediated in terpenoids synthesis, the molecular mechanism of bHLH regulated JA-mediated terpenoids synthesis were expound systematically, and interaction of the bHLH transcription factor with MYB transcription factors regulation participated in the process of secondary metabolism were discussed in this paper. This review deeply reveals the molecular function of bHLH in plant terpenes synthesis, and provides theoretical basis of genetic improvement in metabolic pathways of active components from medicine plant.

Key words: bHLH; jasmonic acid; terpenoids; regulatory mechanism

Received 2016-09-22 Accepted 2016-12-02

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31570589), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No. 257-2015DY01), and National Talent Cultivation Fund for Fundamental Science (Grant No. J1210053).

*Corresponding author (E-mail: yinjing20135@163.com).