

NaCl 胁迫下黑果枸杞 bHLH 转录因子家族鉴定与生物信息学分析

马彦军¹, 谢军², 马瑞^{1*}, 周晓雷¹, 魏佳¹, Richard John Tiika¹

1. 甘肃农业大学林学院, 甘肃 兰州 730070

2. 宁夏林业研究院股份有限公司, 宁夏 银川 730050

摘要: 目的 基于不同浓度 NaCl 胁迫下黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* 杞转录组测序结果, 利用生物信息学方法对黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员进行鉴定。方法 通过对 NaCl 胁迫下黑果枸杞根和叶的样品进行转录组测序, 筛选出 bHLH 家族基因, 利用生物信息学方法对筛选到的基因进行理化性质、保守结构域、基因结构、细胞定位及系统进化分析。结果 黑果枸杞在 NaCl 胁迫下的转录组数据库中共筛选出 89 个 bHLH 转录因子家族基因; bHLH 家族蛋白理化性质差异较大, 71.90% 的蛋白质呈弱酸性, 蛋白属于亲水蛋白。黑果枸杞 bHLH 家族蛋白含有 2 个保守结构域, 分别位于 N 端的碱性氨基酸区和 C 端的螺旋-环-螺旋区。亚细胞定位预测 bHLH 家族蛋白主要分布在细胞核内和细胞质中。进化分析显示, 黑果枸杞中 89 个 bHLH 转录因子家族蛋白可分为 20 个亚族, 其中第 3 亚族中包含的 bHLH 成员最多, 为 11 个; 第 7、11、13、22 亚族中的成员数量均为 1 个, 其他亚族为 2~9 个。结论 NaCl 胁迫下黑果枸杞 bHLH 转录因子家族有 89 个成员, bHLH 家族蛋白大多数呈弱酸性, 属亲水蛋白, 可分为 20 个亚族。

关键词: 黑果枸杞; NaCl 胁迫; bHLH 基因家族; 生物信息学分析; 转录组测序

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)20-5311-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.025

Identification and bioinformatics analysis of bHLH transcription factor gene family in *Lycium ruthenicum* Murr under NaCl stress

MA Yan-jun¹, XIE Jun², MA Rui¹, ZHOU Xiao-lei¹, WEI Jia¹, Richard John Tiika¹

1. Forestry College, Gansu Agriculture University, Lanzhou, 730070, China

2. Ningxia Forestry Institute, Yin chuan, 730050, China

Abstract: Objective Based on the transcriptome sequencing results of *Lycium barbarum* under different concentrations of NaCl stress, the bHLH transcription factor family members of *Lycium barbarum* were identified by bioinformatics method. **Methods** The bHLH family genes were screened by transcriptome sequencing of leaf and root samples of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress. **Results** The physicochemical properties, conserved domain, gene structure, cell location and phylogenetic development of these genes were analyzed by bioinformatics method. The results showed there were 89 bHLH family of *Lycium ruthenicum*. under NaCl stress. Their physicochemical properties were different, of which 71.90% proteins were weakly acidic and they were hydrophilic protein. The bHLH family of *Lycium ruthenicum* contained two conserved domains, which were located in the alkaline amino acid region of N and the helical ring and spiral region of C, respectively. The subcellular localization prediction of these bHLHs were mainly in the nucleus and extracellular. Phylogenetic analysis showed that 89 bHLH genes were divided into 20 subgroups, among which the 3 subgroup contained the most abundant bHLH members, including 11 bHLH proteins; the 7, 11, 13, 22 subgroups had only 1 member, respectively. In the other subgroups, the range was between 2 and 8. **Conclusion** There are 89 members of bHLH transcription factor family in *Lycium barbarum* under NaCl stress, and most of the bHLH family proteins are weakly acidic, belonging to hydrophilic proteins, which can be divided into 20 subgroups.

Key words: *Lycium ruthenicum* Murr.; NaCl stress; bHLH transcription factor family; bioinformatics analysis; transcriptome sequencing

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31760244); 国家自然科学基金资助项目 (31560215); 甘肃农业大学科技创新项目 (林学一级学科建设开放基金: GAU-XKJS-2018-112); 中国博士后科学基金资助项目 (2017M613295XB); 甘肃农业大学青年研究生指导教师扶持基金项目 (GAU-QNDS-201712); 甘肃省 GEF/OP12 三期项目专题研究项目 (GS-GEF/OP12-02)

作者简介: 马彦军 (1975—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物种质资源调查收集、保存与研究。E-mail: 756847715@qq.com

***通讯作者** 马瑞 (1977—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为荒漠植物生理生态。E-mail: mr031103@126.com

bHLH (basic/helix-loop-helix) 是含碱性-螺旋-环-螺旋结构并广泛存在于真核生物中的一类含有众多成员的重要转录因子^[1]。bHLH 结构域高度保守, 大约包含 60 个氨基酸, 一般由 2 个在功能上完全不同的区域, 即碱性区域和螺旋-环-螺旋结构域^[2] 组成。N-端为富含碱性氨基酸的碱性区域, 作为 DNA 结合域发挥作用, 碳端为螺旋-环-螺旋^[3]。bHLH 转录因子在高等植物组织中普遍存在, 参与调控植物体生长发育^[4]、信号传导^[5]、次生代谢^[6]及抗逆反应^[7]等诸多生理生化进程。目前在植物 bHLH 转录因子家族成员数量、基因序列及结构、蛋白质结构、功能验证等方面已有大量研究, 但不同物种 bHLH 转录因子家族成员数量不一、基因结构及调控功能也有所不同^[8], 因此有必要对特定植物的 bHLH 转录因子家族进行研究, 以丰富 bHLH 研究资料。

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 为茄科 (Solanaceae) 枸杞属 *Lycium* L. 多年生灌木, 主要分布于中国西北地区及内蒙古等地^[9]。黑果枸杞大多生长在盐碱地、盐化沙地等各种盐渍化土壤或荒漠环境, 是盐碱荒漠区具有的耐盐、抗旱, 同时有较高经济价值及营养价值的盐生植物^[10]。黑果枸杞具有很强的抗逆性, 且根蘖性强, 是盐碱地治理的先锋树种, 具有广泛的经济前景和开发潜力^[11-12]。目前有关黑果枸杞抗盐性研究主要集中在生理和生化方面^[13-14], 在分子生物学方面研究的比较少。王翠平等^[15]对可能参与花青素代谢调控的黑果枸杞 R1-MYB 转录因子基因进行了克隆、生物信息学分析和不同品种、同一品种不同器官在盐胁迫条件下的差异表达进行了分析, 结果表明 LrMYB1R1 的表达受盐胁迫抑制。严莉等^[16]对可能参与黑果枸杞花青素生物合成的调控研究中发现, 随着 NaCl (250 mmol/L) 胁迫时间的延长, LrAN11 的表达量呈先降低后升高的趋势, 推测该基因可能为盐胁迫响应基因。本研究基于不同浓度 NaCl 胁迫下黑果枸杞转录组测序结果, 利用生物信息学方法对黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员进行鉴定, 对其理化性质、蛋白结构、基因差异表达、蛋白进化等进行分析, 旨在为揭示其在黑果枸杞抗盐性方面所发挥的作用提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

以本实验室保存的黑果枸杞组培苗为材料。实验材料于 2013 年采自甘肃省永靖县, 将所采集的黑果枸杞果实带回实验室, 建立黑果枸杞组织培养快

繁技术体系。黑果枸杞由甘肃农业大学林学院孙学刚教授鉴定, 确定本次所采集的材料为枸杞属的黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr.。

1.2 试剂及仪器

RNA 提取试剂盒: mirVana™ miRNA ISolation Kit (Ambion-1561); 氯仿、无水乙醇、DEPC、乙腈、甲酸等其他试剂购自上海瑞德公司。ST168 型冷冻离心机 (Thermo 公司); 凝胶成像系统: Tanon 2500; 紫外分光光度计: NanoDrop 2000 (Thermo 公司); PCR 仪: Bio-rad (MyCycler 公司); 多种枪头、离心管 (Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 NaCl 处理

2018 年 10 月, 选取生长健壮、长势一致黑果枸杞组培苗, 开盖炼苗 5 d 后, 移植到盛有等量含不同浓度 NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液塑料盒 (口径 10 cm、高 10 cm, 带有通气装置) 进行组培苗盐胁迫处理, 每个处理 1 株, 3 次重复。1/2 Hoagland 营养液中添加的 NaCl 浓度为 0 (CK)、50、250 mmol/L。上述处理分别在胁迫 0、1、12 h 时取根和叶 (含嫩茎) 各 0.1 g 用于转录组和基因表达谱的分析。

2.2 总 RNA 的提取、文库构建和转录组测序

用 mirVana™ miRNA ISolation Kit (Ambion-1561) 试剂盒提取和纯化黑果枸杞叶片和根的总 RNA。用 Nanodrop 2000 检测 RNA 质量, Agilent 2100 Bioanalyzer 检测 RNA 纯度。将纯度和浓度符合要求的 RNA 样品送上海欧易生物医学科技有限公司进行转录组测序。

2.3 盐胁迫下黑果枸杞 bHLH 家族基因的筛选及理化性质分析

基于转录组测序数据, 在 NR、KOG 和 Swiss-Prot3 个数据库进行注释, 初步注释到 252 个 bHLH 转录因子相关基因, 将这些基因编码蛋白逐个进行 NCBI Blast 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测, 去除重复序列及冗余转录本后, 最终得到 89 个具有 bHLH 转录因子保守结构域的蛋白序列。用在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 bHLH 编码蛋白氨基酸大小、相对分子质量和等电点等进行预测, 利用在线软件 ProtComp9.0 (<http://linux1.softberry.com>) 对 bHLH 转录因子家族基因进行亚细胞定位预测。通过 ORF Finder 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih>

gov/projects/gorf/) 预测 bHLH 片段的开放阅读框 (ORF) 序列。

2.4 盐胁迫下黑果枸杞 bHLH 家族基因差异表达分析

转录组中 bHLH 转录因子家族基因表达水平评估采用 FPKM 方法^[17]。本研究将 (处理组 FPKM - 对照组 FPKM) / 对照组 FPKM ≥ 0.5 的 Ungene 定义为上调基因, 处理组 FPKM / 对照组 FPKM ≤ 0.5 的 Ungene 定义为下调基因, 将 (处理组 FPKM - 对照组 FPKM) / 对照组 FPKM < 0.5, 且处理组 FPKM / 对照组 FPKM > 0.5 的 Ungene 定义为表达差异不显著基因^[18]。

2.5 盐胁迫下黑果枸杞 bHLH 家族基因的保守域结构元件分析

通过在线软件 WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/>) 进行 bHLH 保守结构域各位点氨基酸保守性分析, 并绘制保守结构域 Logo; 利用在线软件 MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme-intro.html>) 对黑果枸杞 bHLH 蛋白保守域结构元件 (motif) 进行分析。

2.6 盐胁迫下黑果枸杞 bHLH 家族基因序列对比与系统进化分析

先使用 Clustal X 程序对所有黑果枸杞蛋白序

列进行对比, 再利用 Mega7 (<http://www.megasoftware.net/history.php>), 蛋白序列导入用 mega7 软件, 选用最大似然算法 ML, Piosson model, bootstrap 1000, 进行进化分析。导出 NWK 进化树结果, 利用在线软件 (<https://itol.embl.de/>) 做进化树结构图, 根据进化树结构, 划分 Subfamily。

3 结果与分析

3.1 NaCl 胁迫下黑果枸杞 bHLH 转录因子基因筛选

根据盐胁迫下黑果枸杞转录组测序数据, 在 NR、KOG 和 Swiss-Prot 3 个数据库进行注释, 初步注释到 252 个 bHLH 转录因子相关基因。利用 NCBI Blast 和 SMART 进一步对这 252 个基因对应蛋白质进行分析, 除去冗余和重复基因, 最终确定黑果枸杞在盐胁迫下, bHLH 转录因子家族相关基因共有 89 个, 命名为 LrbHLH01 ~ LrbHLH89 (表 1)。从 RNA 序列中提取对应蛋白序列起始密码序列和终止密码序列, 根据起始密码子和终止密码子特性, 判断出 29 条蛋白序列是全长序列, 即 29 个基因具有完整的 ORF。

由表 1 可看出, 黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员蛋白序列含有氨基酸数目在 59 (LrbHLH83) ~ 624 (LrbHLH35), 通过 Exspasy 预测其相对分子质量大小介于 6 592.58 (LrbHLH83) ~ 69 470.17 (LrbHLH35),

表 1 黑果枸杞 bHLH 转录因子的理化性质

Table 1 The physicochemical properties of bHLH transcription factors in *L. ruthenicum*

基因编号	氨基酸	相对分子质量	理论等电点	亚细胞定位	分子式	蛋白质疏水性平均值
LrbHLH1	424	46 782.27	6.20	extracellular	C ₂₀₂₆ H ₃₁₈₆ N ₅₇₂ O ₆₆₂ S ₂₂	-0.571
LrbHLH2	607	67 275.90	6.89	nuclear	C ₂₉₃₂ H ₄₆₆₀ N ₈₅₈ O ₉₁₁ S ₂₄	-0.538
LrbHLH3	233	25 953.26	6.09	nuclear	C ₁₁₂₆ H ₁₇₉₆ N ₃₂₄ O ₃₅₈ S ₁₁	-0.609
LrbHLH4	464	51 583.36	6.36	nuclear	C ₂₂₈₂ H ₃₆₁₁ N ₆₃₁ O ₇₀₅ S ₁₃	-0.473
LrbHLH5	521	58 427.08	6.13	nuclear	C ₂₅₅₉ H ₄₀₅₅ N ₇₂₁ O ₇₉₈ S ₂₃	-0.350
LrbHLH6	200	22 612.81	6.79	extracellular	C ₉₈₆ H ₁₆₀₉ N ₂₈₃ O ₃₀₈ S ₈	-0.460
LrbHLH7	248	28 395.56	8.92	nuclear	C ₁₂₆₂ H ₂₀₃₇ N ₃₄₅ O ₃₈₃ S ₇	-0.471
LrbHLH8	246	28 144.82	8.61	nuclear	C ₁₂₀₆ H ₁₉₇₉ N ₃₆₉ O ₃₈₆ S ₁₀	-0.608
LrbHLH9	279	29 941.18	5.54	nuclear	C ₁₂₈₁ H ₂₀₄₈ N ₃₈₀ O ₄₃₀ S ₉	-0.600
LrbHLH10	240	27 287.07	5.55	extracellular	C ₁₁₅₉ H ₁₈₃₅ N ₃₃₉ O ₃₉₉ S ₁₂	-0.923
LrbHLH11	227	26 301.78	5.34	nuclear	C ₁₁₄₈ H ₁₈₁₆ N ₃₂₄ O ₃₅₈ S ₁₃	-0.854
LrbHLH12	252	28 498.58	7.02	nuclear	C ₁₂₈₄ H ₂₀₈₃ N ₃₇₃ O ₄₀₀ S ₁₁	-0.788
LrbHLH13	171	19 620.30	5.95	nuclear	C ₁₂₈₄ H ₂₀₈₃ N ₃₇₃ O ₄₀₀ S ₁₁	-0.788
LrbHLH14	353	39 747.77	5.09	extracellular	C ₁₇₀₇ H ₂₆₆₄ N ₄₉₀ O ₅₇₆ S ₁₅	-0.873
LrbHLH15	309	34 925.35	4.72	nuclear	C ₁₅₃₁ H ₂₄₂₆ N ₄₁₂ O ₄₉₄ S ₁₃	-0.487
LrbHLH16	335	37 432.72	6.20	nuclear	C ₁₅₉₁ H ₂₅₆₁ N ₄₆₇ O ₅₃₉ S ₁₈	-0.962
LrbHLH17	314	35 891.68	7.61	nuclear	C ₁₅₆₃ H ₂₄₉₃ N ₄₅₁ O ₄₈₆ S ₁₆	-0.564
LrbHLH18	206	22 887.04	8.36	nuclear	C ₁₀₀₉ H ₁₆₁₁ N ₂₈₅ O ₃₀₈ S ₇	-0.270
LrbHLH19	294	33 280.86	6.39	nuclear	C ₁₄₈₂ H ₂₃₀₁ N ₄₀₅ O ₄₄₀ S ₁₄	-0.348
LrbHLH20	510	56 349.63	6.49	nuclear	C ₂₄₁₃ H ₃₈₂₅ N ₇₁₉ O ₇₉₄ S ₂₃	-0.832
LrbHLH21	342	37 752.03	6.10	extracellular	C ₁₆₃₄ H ₂₅₈₆ N ₄₅₈ O ₅₄₃ S ₁₃	-0.671
LrbHLH22	281	31 936.57	5.41	nuclear	C ₁₃₇₄ H ₂₁₇₁ N ₃₈₇ O ₄₅₉ S ₁₅	-0.733
LrbHLH23	450	50 349.60	5.74	nuclear	C ₂₁₆₅ H ₃₃₈₂ N ₆₃₀ O ₇₁₉ S ₁₉	-0.806
LrbHLH24	261	28 915.08	8.12	nuclear	C ₁₂₃₃ H ₂₀₃₀ N ₃₆₄ O ₃₉₅ S ₂₀	-0.411
LrbHLH25	328	37 014.47	4.52	nuclear	C ₁₆₁₁ H ₂₅₂₇ N ₄₂₇ O ₅₃₃ S ₁₉	-0.504
LrbHLH26	286	32 308.27	8.69	nuclear	C ₁₃₉₄ H ₂₂₂₄ N ₄₀₄ O ₄₅₁ S ₁₄	-0.785
LrbHLH27	255	28 150.92	6.46	nuclear	C ₁₂₂₃ H ₁₉₈₉ N ₃₅₅ O ₃₈₉ S ₉	-0.336

续表 1

基因编号	氨基酸	相对分子质量	理论等电点	亚细胞定位	分子式	蛋白质疏水性平均值
LrbHLH28	512	58 321.30	8.35	extracellular	C ₂₅₂₂ H ₃₉₆₄ N ₇₃₈ O ₈₀₂ S ₂₇	-0.762
LrbHLH29	248	27 679.93	5.77	nuclear	C ₁₂₀₈ H ₁₈₉₁ N ₃₂₉ O ₃₉₄ S ₁₁	-0.624
LrbHLH30	299	33 038.70	6.55	extracellular	C ₁₄₁₂ H ₂₂₆₂ N ₄₂₂ O ₄₇₁ S ₁₁	-0.774
LrbHLH31	326	35 854.00	7.16	extracellular	C ₁₅₅₁ H ₂₄₆₆ N ₄₅₆ O ₅₀₂ S ₁₀	-0.623
LrbHLH32	272	30 037.54	7.78	nuclear with	C ₁₂₈₄ H ₂₀₈₀ N ₃₈₂ O ₄₂₈ S ₁₀	-0.804
LrbHLH33	624	69 470.17	5.24	nuclear	C ₃₀₁₅ H ₄₈₄₀ N ₈₅₄ O ₉₇₈ S ₂₄	-0.503
LrbHLH34	366	40 570.14	6.09	nuclear	C ₁₇₅₂ H ₂₇₇₉ N ₅₁₁ O ₅₇₄ S ₁₂	-0.718
LrbHLH35	237	26 868.19	8.62	nuclear	C ₁₁₆₃ H ₁₈₇₀ N ₃₅₀ O ₃₆₈ S ₇	-0.808
LrbHLH36	293	30 159.40	6.66	nuclear	C ₁₂₅₉ H ₂₀₅₄ N ₃₉₈ O ₄₃₄ S ₁₄	-0.459
LrbHLH37	316	33 674.49	5.89	nuclear	C ₁₄₂₁ H ₂₂₉₁ N ₄₂₉ O ₄₈₂ S ₁₈	-0.503
LrbHLH38	609	69 041.87	8.69	extracellular	C ₃₀₇₀ H ₄₈₁₃ N ₈₄₉ O ₉₀₆ S ₂₉	-0.365
LrbHLH39	233	27 169.82	7.74	nuclear	C ₁₁₉₃ H ₁₈₈₁ N ₃₃₇ O ₃₆₅ S ₁₂	-0.770
LrbHLH40	330	38 210.67	7.20	extracellular	C ₁₆₅₂ H ₂₆₁₆ N ₄₈₈ O ₅₃₀ S ₁₃	-0.767
LrbHLH41	234	26 764.34	6.31	extracellular	C ₁₁₇₀ H ₁₈₅₀ N ₃₂₂ O ₃₆₈ S ₁₄	-0.615
LrbHLH42	459	51 122.83	6.87	nuclear	C ₂₁₉₂ H ₃₄₇₄ N ₆₅₂ O ₇₂₀ S ₂₀	-0.806
LrbHLH43	102	11 747.62	10.74	nuclear	C ₅₂₀ H ₈₅₀ N ₁₅₈ O ₁₄₆ S ₃	-0.752
LrbHLH44	584	64 879.28	8.23	extracellular	C ₂₈₂₆ H ₄₄₉₀ N ₈₁₄ O ₈₈₄ S ₂₇	-0.475
LrbHLH45	141	15 949.22	9.69	nuclear	C ₇₀₂ H ₁₁₂₉ N ₂₀₃ O ₂₁₁ S ₅	-0.585
LrbHLH46	213	23 810.65	6.23	nuclear	C ₁₀₄₀ H ₁₆₆₄ N ₂₈₄ O ₃₄₄ S ₅	-0.572
LrbHLH47	274	31 254.47	6.76	nuclear	C ₁₃₈₁ H ₂₁₈₅ N ₃₆₉ O ₄₃₂ S ₁₂	-0.521
LrbHLH48	263	29 317.83	5.48	extracellular	C ₂₈₂₆ H ₄₄₉₀ N ₈₁₄ O ₈₈₄ S ₂₇	-0.475
LrbHLH49	443	48 968.50	6.23	extracellular	C ₂₁₄₁ H ₃₄₃₁ N ₆₀₁ O ₆₇₅ S ₁₈	-0.379
LrbHLH50	233	26 157.71	8.93	nuclear	C ₁₁₃₅ H ₁₈₅₂ N ₃₂₈ O ₃₆₁ S ₉	-0.539
LrbHLH51	346	38 983.88	5.16	nuclear	C ₁₇₀₉ H ₂₆₈₈ N ₄₆₄ O ₅₄₆ S ₁₆	-0.488
LrbHLH52	487	54 219.44	5.85	nuclear	C ₂₃₉₃ H ₃₇₇₀ N ₆₅₂ O ₇₄₂ S ₂₁	-0.398
LrbHLH53	325	35 862.51	5.51	extracellular	C ₁₅₄₀ H ₂₄₁₃ N ₄₃₉ O ₅₂₃ S ₁₃	-0.814
LrbHLH54	230	26 023.26	9.26	nuclear	C ₁₁₃₆ H ₁₈₄₆ N ₃₂₆ O ₃₅₆ S ₈	-0.481
LrbHLH55	429	48 388.26	5.98	nuclear	C ₂₁₁₈ H ₃₃₂₆ N ₅₉₆ O ₆₇₁ S ₁₆	-0.479
LrbHLH56	429	48 388.26	5.98	nuclear	C ₂₁₁₈ H ₃₃₂₆ N ₅₉₆ O ₆₇₁ S ₁₆	-0.479
LrbHLH57	238	26 222.67	6.54	nuclear	C ₁₁₃₄ H ₁₈₄₃ N ₃₂₅ O ₃₆₇ S ₁₀	-0.326
LrbHLH58	301	34 179.28	6.03	nuclear	C ₁₄₇₅ H ₂₃₃₉ N ₄₃₇ O ₄₇₁ S ₁₄	-0.823
LrbHLH59	391	44 051.07	6.77	nuclear	C ₁₉₃₁ H ₃₀₈₇ N ₅₂₉ O ₆₀₈ S ₁₉	-0.430
LrbHLH60	231	25 485.69	7.24	nuclear	C ₁₁₀₂ H ₁₇₇₉ N ₃₂₅ O ₃₅₃ S ₈	-0.756
LrbHLH61	252	28 537.81	5.02	nuclear	C ₁₂₂₆ H ₁₉₇₈ N ₃₄₈ O ₄₁₆ S ₉	-0.694
LrbHLH62	187	21 114.90	6.55	extracellular	C ₉₁₆ H ₁₄₇₃ N ₂₆₃ O ₂₉₁ S ₉	-0.509
LrbHLH63	312	25 621.62	6.07	nuclear	C ₁₅₅₁ H ₂₄₂₆ N ₄₅₆ O ₄₉₂ S ₉	-0.700
LrbHLH64	251	28 768.93	8.91	extracellular	C ₁₂₃₇ H ₂₀₆₈ N ₃₆₈ O ₃₉₅ S ₁₁	-0.758
LrbHLH65	246	27 016.77	6.02	nuclear	C ₁₁₅₅ H ₁₈₂₉ N ₃₅₁ O ₃₈₅ S ₇	-0.871
LrbHLH66	365	40 010.90	8.88	nuclear	C ₁₇₁₇ H ₂₇₄₆ N ₅₁₆ O ₅₅₁ S ₁₈	-0.623
LrbHLH67	348	39 269.85	5.59	nuclear	C ₁₆₉₃ H ₂₇₀₂ N ₄₉₆ O ₅₅₃ S ₁₃	-0.711
LrbHLH68	86	9 742.00	7.94	nuclear	C ₄₀₈ H ₆₉₇ N ₁₃₁ O ₁₃₈ S ₃	-0.556
LrbHLH69	487	52 977.03	5.57	nuclear	C ₂₂₇₆ H ₃₃₉₄ N ₆₅₈ O ₇₅₀ S ₂₅	-0.734
LrbHLH70	293	33 663.54	8.89	nuclear	C ₁₄₈₁ H ₂₃₅₉ N ₄₂₁ O ₄₄₃ S ₁₆	-0.454
LrbHLH71	322	36 703.12	5.73	nuclear	C ₁₆₀₀ H ₂₅₀₂ N ₄₄₈ O ₅₁₁ S ₁₆	-0.645
LrbHLH72	309	35 127.38	6.09	nuclear	C ₁₅₂₇ H ₂₃₈₀ N ₄₃₂ O ₄₈₅ S ₁₈	-0.535
LrbHLH73	323	36 867.02	9.11	nuclear	C ₁₆₀₂ H ₂₆₀₇ N ₄₆₃ O ₅₀₂ S ₁₅	-0.440
LrbHLH74	268	30 180.01	4.95	extracellular	C ₁₃₀₀ H ₂₀₉₈ N ₃₆₀ O ₄₃₃ S ₁₅	-0.500
LrbHLH75	297	33 175.21	5.38	nuclear	C ₁₄₃₃ H ₂₃₁₀ N ₄₀₈ O ₄₇₃ S ₁₁	-0.605
LrbHLH76	174	18 256.67	5.38	nuclear	C ₇₆₅ H ₁₂₇₂ N ₂₂₈ O ₂₆₁ S ₁₃	-0.252
LrbHLH77	437	48 763.76	5.54	extracellular	C ₂₀₈₇ H ₃₃₉₉ N ₆₁₁ O ₆₉₄ S ₁₉	-0.625
LrbHLH78	271	30 809.50	8.52	extracellular	C ₁₃₂₃ H ₂₁₃₇ N ₄₀₃ O ₄₂₇ S ₉	-0.846
LrbHLH79	258	28 269.47	6.67	nuclear	C ₁₂₁₅ H ₁₉₂₆ N ₃₆₆ O ₃₉₃ S ₁₀	-0.736
LrbHLH80	59	6 592.58	10.58	nuclear	C ₂₈₃ H ₄₈₇ N ₉₇ O ₈₄	-0.942
LrbHLH81	255	28 968.17	8.67	nuclear	C ₁₂₄₈ H ₂₀₆₅ N ₃₇₃ O ₃₉₁ S ₁₃	-0.587
LrbHLH82	587	67 104.18	7.23	extracellular	C ₂₉₁₈ H ₄₅₅₉ N ₈₄₁ O ₉₂₀ S ₃₀	-0.672
LrbHLH83	240	27 196.76	9.63	nuclear	C ₁₁₇₀ H ₁₈₆₂ N ₃₄₄ O ₃₆₉ S ₁₇	-0.681
LrbHLH84	257	28 479.73	6.97	nuclear	C ₁₂₁₉ H ₁₉₆₀ N ₃₅₀ O ₄₁₃ S ₁₁	-0.780
LrbHLH85	417	47 619.70	4.98	extracellular	C ₂₁₂₄ H ₃₃₁₉ N ₅₄₁ O ₆₄₁ S ₂₉	-0.138
LrbHLH86	272	31 072.64	4.57	extracellular	C ₁₃₅₀ H ₂₁₀₂ N ₃₆₀ O ₄₄₉ S ₁₆	-0.700
LrbHLH87	390	43 335.11	8.64	nuclear	C ₁₈₄₈ H ₂₉₅₇ N ₅₅₅ O ₆₁₇ S ₁₆	-0.882
LrbHLH88	411	45 079.31	7.64	nuclear	C ₁₉₄₁ H ₃₀₉₁ N ₅₇₃ O ₆₃₂ S ₁₆	-0.777
LrbHLH89	317	35 770.65	6.72	nuclear	C ₁₅₅₉ H ₂₄₉₀ N ₄₃₀ O ₄₉₄ S ₁₉	-0.420

理论等电点介于 4.52 (LrbHLH26) ~ 10.74 (LrbHLH46)。以上理化性质分析表明黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员之间特性差异较大, 71.90% 的蛋白等电点小于 7, 呈弱酸性。蛋白质疏水性分析表明, 89 条蛋白质疏水性平均值均为负值, 表明黑果枸杞 bHLH 家族蛋白属于亲水蛋白。利用在线软件 ProtComp9.0 对黑果枸杞 bHLH 转录因子家族基因进行亚细胞定位预测, 预测结果表明黑果枸杞 bHLH 家族基因位于细胞核 (nuclear) 和细胞外 (extracellular)。

由 Unigene 同源序列注释图 (图 1) 可知, 盐胁迫下黑果枸杞转录组中 89 个 bHLH 家族基因 Unigene 在 Nr 中被注释到了 10 个物种中, 其中与马铃薯 *Solanum tuberosum* 序列中注释最多, 为 27%, 注释最少的是野生烟草 *Nicotiana attenuata*, 为 4%。

3.2 NaCl 胁迫下黑果枸杞 bHLH 转录因子差异表达基因数分析

由图 2 可知, 黑果枸杞叶 LrbHLH 转录因子基

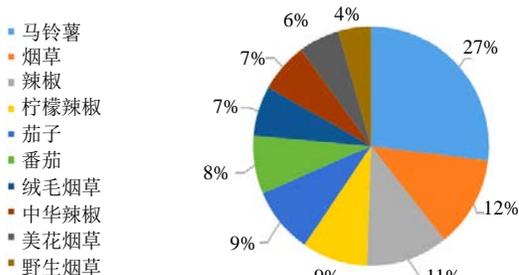
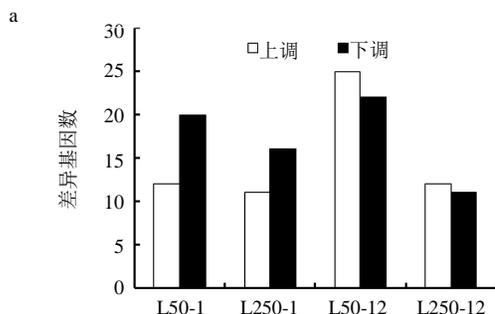


图 1 bHLH 家族基因 Unigenes 在 NR 库中的注释

Fig. 1 bHLH family Unigenes distribution in NR



因在不同浓度 NaCl 胁迫 1 h 后, 下调基因数大于上调基因数, 胁迫 12 h 后, 上调基因数大于下调基因数。黑果枸杞根 LrbHLH 转录因子基因在不同浓度 NaCl 和不同时间处理下, 下调基因数大于上调基因数。表 2 可看出不同浓度 NaCl 和不同时间处理下, 叶片共差异表达基因 6 个, 其中共上调基因 4 个, 共下调基因 2 个。黑果枸杞根 LrbHLH 转录因子基因在不同浓度 NaCl 和不同时间处理下, 上调基因数均大于下调基因数, 根共差异表达基因 5 个, 其中共上调基因 3 个, 共下调基因 2 个。

对保守的氨基酸位点外, 其他区域都有不同数量的保守位点 (图 3)。bHLH 结构域共包含了 65 个左右的氨基酸, 包含 N 端碱性区域和 C 端 2 个不同 HLH 功能区。N 端碱性氨基酸区由 10 个左右氨基酸组成, 与 DNA 结合有关。bHLH 保守域氨基酸大部分成员在碱性氨基酸区含有高度保守的 H4-E8-R9 序列 (His4-Glu8-Arg9), 此区域与 DNA 结合有关。在第 11 位和第 12 位上精氨酸 (Arg) 保守性为 100%。黑果枸杞 HLH 区位于 C 端, 大多数为疏水性氨基酸, 构成了螺旋-环-螺旋结构。HLH 第 22、50 和 60 位的亮氨酸 (Leu) 以及 26 位上缬氨酸 (Val) 均非常保守, 这些保守的位点对形成二聚体及 bHLH 发挥其他功能十分重要。此外, 27 位的脯氨酸 (Pro)、31 位的赖氨酸 (Lys) 具有高度的保守性。结果分析表明在靶 DNA 结合区域和形成同源或异源二聚体相关位点上的氨基酸残基保守性都比较高。

bHLH 转录因子家族除了具有 bHLH 保守结构

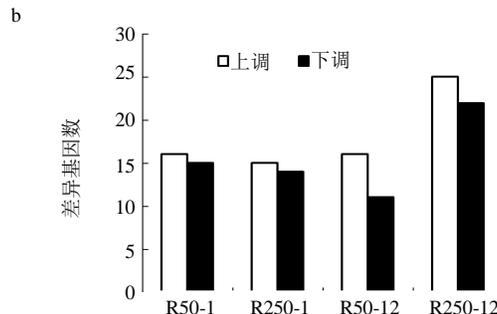


图 2 NaCl 胁迫下黑果枸杞叶 (a) 和根 (b) LrbHLH 转录因子差异表达基因数

Fig. 2 Different expressions gene number of *L. ruthenicum* leaf (a) and root (b) under NaCl stress

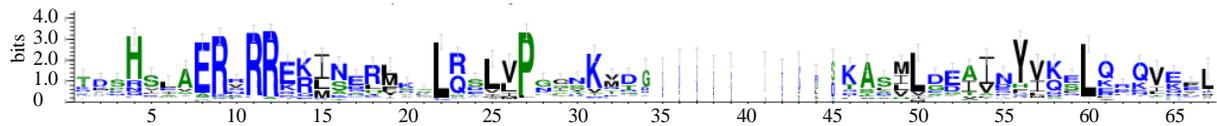
表 2 NaCl 胁迫下黑果枸杞叶和根 LrbHLH 转录因子共有差异表达基因

Table 2 Co-expression different gene of leaf and root of LrbHLH under NaCl stress

叶共表达差异基因	调节方向	根共表达差异基因	调节方向
LrbHLH78	上调	LrbHLH79	上调
LrbHLH71	上调	LrbHLH34	上调
LrbHLH26	上调	LrbHLH27	上调
LrbHLH69	上调	LrbHLH14	下调
LrbHLH39	下调	LrbHLH46	下调
LrbHLH55	下调		

3.3 NaCl 胁迫下黑果枸杞 bHLH 基因保守域鉴定与分析

在结构域序列保守性方面，除 LOOP 区没有域外，还含有其他类型的保守结构域，由 MEME SUITE 在线工具分析得到黑果枸杞 bHLH 转录因子家族含有的 3 种保守元件（图 4）。Motif 1 和 Motif 2 是黑果枸杞 bHLH 蛋白质保守结构域的特征保守基序，有 82 个 bHLH 转录因子同时含有 Motif 1 和 Motif 2，出现频率最高。序列 LrbHLH16、68、76，只有 Motif 2；LrbHLH47、80，只有 Motif 1。根



不同位点上氨基酸字母的高度代表保守性的高低；保守性高于 50% 的氨基酸用大写字母代表
The overall height of the stack indicates the sequence conservation of the corresponding amino acid; The capital letters below the logo indicate >50% consensus amino acids among all HLH domains

图 3 黑果枸杞 bHLH 家族蛋白保守结构域分析

Fig. 3 Conservation domain structures analysis in *L. ruthenicum* bHLH proteins

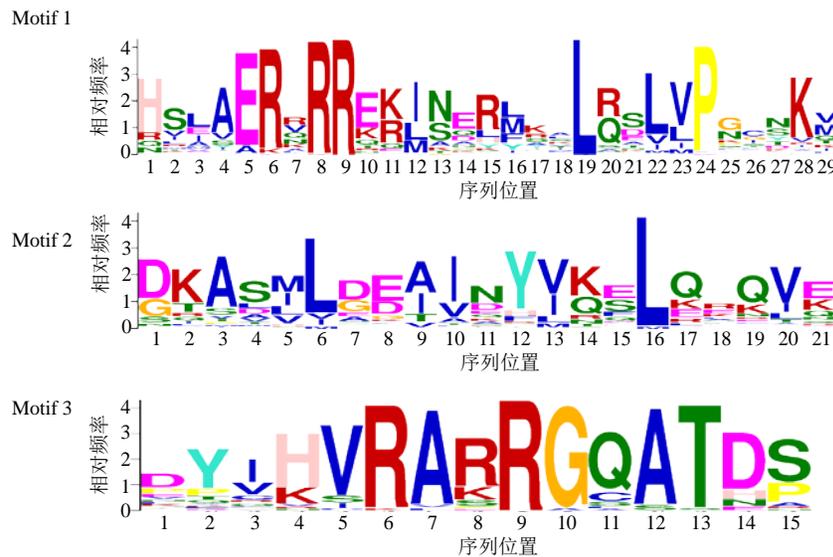


图 4 黑果枸杞 bHLH 转录因子的蛋白保守基序

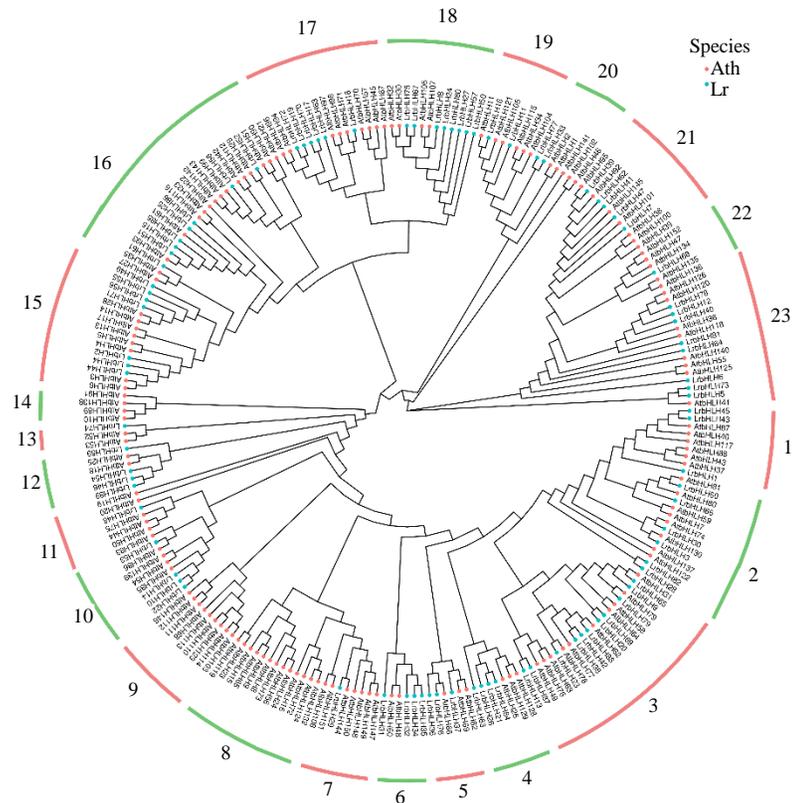
Fig. 4 The protein conserved motif of bHLH transcription factor in *L. ruthenicum*

据黑果枸杞 bHLH 蛋白家族具有不同 Motif 组合，将黑果枸杞 bHLH 蛋白家族分为 5 组，第 I 组有 Motif 1、2、3；第 II 组有 Motif 1、2；第 III 组有 Motif 1、3；第 IV 组有 Motif 1；第 V 组有 Motif 2。

3.4 NaCl 胁迫下黑果枸杞 bHLH 基因进化树分析和分组鉴定

为确定本研究所获得 89 个黑果枸杞在盐胁迫下 bHLH 转录因子与已知的 147 个拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. bHLH 转录因子^[1]进化关

系，根据预测到黑果枸杞 bHLH 蛋白序列保守结构域氨基酸序列相似性，利用 MEGA7 软件的 ML 法进行进化分析，在线软件 (<https://itol.embl.de/>) 构建包含黑果枸杞和拟南芥 bHLH 蛋白序列系统进化发育树（图 5）。根据进化树分类情况和拟南芥中 bHLH 转录因子的分类系统，全部成员分为 23 个亚族，其中第 8、9、14 亚族只含拟南芥 bHLH 家族成员，黑果枸杞 89 个 bHLH 蛋白可分成 20 个亚族。第 3 亚家族中的 bHLH 成员数量最多，



图中红色圆点代表拟南芥 bLHL 序列，蓝色圆点代表黑果枸杞 bLHL 序列
The small red circles represent the *Arabidopsis* bHLH proteins; the small blue circles represent the *L. ruthenicum* bHLH proteins

图 5 黑果枸杞 bHLH 转录因子家族系统发育进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of bHLH transcription factor family in *L. ruthenicum*

共 11 个；第 7、11、13、22 亚族中的成员数量最少，仅为 1 个。

4 讨论

近年来，植物 bHLH 家族蛋白质的功能研究已经成为热点并且得到了快速发展。何洁等^[21]利用生物信息学方法，在西瓜测序基因组 97103 中共鉴定出 96 个 bHLH 家族成员，并预测其中多个 bHLH 转录因子在西瓜受到低温、ABA 和盐胁迫时发挥重要作用。应炎标等^[22]在“短柄樱桃”*Prunus pseudocerasus* Lindl. ‘Duanbing’ 花芽转录组文库中发现了 30 个具有完整开放阅读框 bHLH 类转录因子，采用生物信息学方法对 30 个 bHLH 转录因子的基因结构和氨基酸序列进行分析，结果表明 30 个 bHLH 转录因子均受低温诱导表达，可能参与低温诱导花芽休眠解除分子调控。冯磊等^[23]从银杏 *Ginkgo biloba* L. 基因组中鉴定出 72 条 bHLH 转录因子，预测这些转录因子在银杏发育过程中起主要作用。陈红霖等^[24]利用生物信息学的方法鉴定出 122 个绿豆 *Vigna radiata* (L.) Wilczek bHLH 转录

因子，多数 bHLH 基因在绿豆根、茎、叶、花和种子等组织中均有表达，但具有组织表达特异性，且不同基因表达量差异较大。本研究从黑果枸杞在盐胁迫下转录组测序结果中共鉴定出 89 个 bHLH 类转录因子家族成员，其中 29 个基因具有完整的 ORF (Open read frame)。这些转录因子可能在黑果枸杞耐盐性过程发挥主要作用。获得 89 个黑果枸杞 bHLH 转录因子家族基因，在 Nr 中被注释到了 10 个物种中，这 10 个物种都是茄科植物，这说明了植物 bHLH 转录因子在进化中种属间保守性较高。黑果枸杞 bHLH 家族蛋白 71.90% 蛋白呈弱酸性，蛋白均属于亲水蛋白，这一结果与其他物种 bHLH 家族蛋白理化性质一致^[25]，表明 bHLH 家族蛋白具保守性。黑果枸杞 bHLH 转录因子中 89 个基因差异表达分析结果表明在不同浓度和不同时间盐胁迫下黑果枸杞叶和根中上调基因数和下调基因数不一，说明黑果枸杞在受到盐胁迫时叶和根有不同基因表达，来参与叶和根对盐胁迫的适应性。

由于 bHLH 转录因子家族成员数量在不同物

种中变化较大,即使同一物种在研究时由于所选取材料不同、处理方法不同,所得到 bHLH 数量也不同,如 Heim 等^[26]研究结果表明拟南芥中 bHLH 转录因子家族有 133 个成员, Toledo 等^[1]研究结果表明拟南芥中 bHLH 转录因子家族有 147 个成员。刘静等^[27]在黑果枸杞果实发育过程中鉴定出有关 bHLH 家族成员 132 个 Unigene,而本研究中鉴定出盐胁迫下黑果枸杞根和叶中 bHLH 家族成员数 89 个。这是由于本实验选取材料是在盐胁迫下黑果枸杞根和叶,可能有部分基因由于盐胁迫原因而没有表达。目前,有关动物 bHLH 转录因子家族成员分类比较清楚,一般分为 A-F6 个亚家族^[28],但植物 bHLH 转录因子家族成员没有统一分类系统。Shen 等^[29]将甘蓝型油菜 *Brassica napus* 中 460bHLH 转录因子分为 25 个亚家族;Kavas 等^[30]将菜豆 155 个 bHLH 转录因子家族分为 8 组 21 个亚家族; Toledo-Ortiz 等^[1]将拟南芥中 147 个 bHLH 转录因子划分为 21 个亚家族。本研究在参考 Toledo-Ortiz 等^[1]、Zhang 等^[19]、Li 等^[20]分类系统的同时,结合 bHLH 转录因子家族蛋白保守结构域氨基酸,将黑果枸杞盐胁迫下所得到的 89 个 bHLH 转录因子家族成员划分为 20 个亚家族,同一亚家族内的成员大都具有相同保守基序。黑果枸杞在盐胁迫下 bHLH 第 3 亚族成员数量最多,这与对拟南芥 bHLH 转录因子中第 3 亚族成员数量最多分析结果一致^[21],第 3 亚族的主要功能是对非生物胁迫的响应及参与依赖脱落酸 (ABA) 信号传导途径^[21]。由于目前对黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员蛋白结构和功能研究资料较少,还不能根据其结构和功能对黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员进行更精确分类,这就需要研究者在今后做更多研究工作,从而更科学合理地对黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员进行精准的分类,来解释 bHLH 转录因子家族在黑果枸杞抗盐中所发挥作用。

5 小结

本研究基于黑果枸杞在不同浓度 NaCl 胁迫下转录组测序数据,筛选注释出 89 个黑果枸杞 bHLH 转录因子,黑果枸杞 bHLH 转录因子家族成员蛋白序列含有氨基酸数目在 59 (LrbHLH83)~624 (LrbHLH35),相对分子质量大小在 6 592.58 (LrbHLH83)~69 470.17 (LrbHLH35),理论等电点在 4.52 (LrbHLH26)~10.74 (LrbHLH46)。黑果枸杞 bHLH 转录因子家族的 71.90% 的蛋白等电

点小于 7,呈弱酸性,蛋白属于亲水蛋白。黑果枸杞 bHLH 家族基因位于细胞核和细胞外。bHLH 转录因子家族除了具有 bHLH 保守结构域外,还含有其他 3 种保守元件。黑果枸杞中 89 个 bHLH 转录因子家族蛋白可分为 20 个亚族,其中第 3 亚族中包含最多的 bHLH 成员,共包含 11 个 bHLH 蛋白。对黑果枸杞在盐胁迫下 bHLH 基因家族进行的生物信息学分析,为进一步研究 bHLH 转录因子在植物生长发育、抗逆性功能,以及深入研究该基因家族在黑果枸杞抗盐中所发挥作用提供了基础资料。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Bailey P C, Martin C, Toledo-Ortiz G, et al. Update on the basic *Helix-loop-Helix* transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2497-2502.
- [3] Li X X, Duan X P, Jiang H X, et al. Genome-wide analysis of basic/*Helix-loop-Helix* transcription factor family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [4] Ito S, Song Y H, Josephson-Day A R, et al. FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(9): 3582-3587.
- [5] Gao M, Zhu Y X, Yang J H, et al. Identification of the grape basic *Helix-loop-Helix* transcription factor family and characterization of expression patterns in response to different stresses [J]. *Plant Growth Regul*, 2019, 88(1): 19-39.
- [6] Ludwig S R, Habera L F, Dellaporta S L, et al. Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(18): 7092-7096.
- [7] Jiang Y Q, Yang B, Deyholos M K. Functional characterization of the *Arabidopsis* bHLH92 transcription factor in abiotic stress [J]. *Mol Genet Genomics*, 2009, 282(5): 503-516.
- [8] Zhou J, Li F, Wang J L, et al. Basic *Helix-loop-Helix* transcription factor from wild rice (OrbHLH2) improves tolerance to salt- and osmotic stress in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Physiol*, 2009, 166(12): 1296-1306.

- [9] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 67 卷第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 马彦军, 张荣梅, 苏永德. 黑果枸杞基础理论研究进展 [J]. 中国水土保持, 2017(2): 46-50.
- [11] 王 静, 马腾斋, 邱佳俊, 等. NaCl 胁迫对黑果枸杞幼苗生理及生化指标的影响 [J]. 北方园艺, 2019(6): 59-64.
- [12] 武 燕, 尹建军, 李善家. 黑河下游荒漠植物黑果枸杞叶片性状特征及其盐分响应 [J]. 生态学杂志, 2017, 36(5): 1277-1284.
- [13] 马彦军, 许晶晶, 韩谨如, 等. 3 个种群黑果枸杞叶片解剖结构的耐盐性分析 [J]. 干旱区资源与环境, 2018, 32(4): 100-105.
- [14] 张荣梅, 马彦军. NaCl 胁迫对黑果枸杞叶片生理指标的影响 [J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(4): 110-117.
- [15] 王翠平, 陈建伟, 严 莉, 等. 黑果枸杞 R1-MYB 转录因子基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 203-210.
- [16] 严 莉, 陈建伟, 王翠平, 等. 黑果枸杞 WD40 编码基因 LrAN11 的克隆及表达分析 [J]. 核农学报, 2017, 31(11): 2103-2112.
- [17] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [18] 袁琳琳, 王亚茹, 曾卫军, 等. 独行菜种子 bHLH 类转录因子基因家族及幼苗 *laICE1* 表达对冷胁迫的响应 [J]. 西北植物学报, 2018, 38(1): 26-34.
- [19] Zhang C H, Feng R C, Ma R J, *et al.* Genome-wide analysis of basic *Helix-loop-Helix* superfamily members in peach [J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195974.
- [20] Li X X, Duan X P, Jiang H X, *et al.* Genome-wide analysis of basic/*Helix-loop-Helix* transcription factor family in rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [21] 何 洁, 顾秀容, 魏春华, 等. 西瓜 bHLH 转录因子家族基因的鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 281-294.
- [22] 应炎标, 朱友银, 郭卫东, 等. 樱桃 bHLH 转录因子家族基因鉴定及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(14): 4559-4568.
- [23] 冯 磊, 石元豹, 汪贵斌, 等. 银杏 bHLH 家族转录因子生物信息学及表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 400-411.
- [24] 陈红霖, 胡亮亮, 王丽侠, 等. 绿豆 bHLH 转录因子家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(6): 1159-1167.
- [25] Shi Q Q, Li X, Du J T, *et al.* Anthocyanin synthesis and the expression patterns of bHLH transcription factor family during development of the Chinese jujube fruit (*Ziziphus jujuba* mill.) [J]. *Forests*, 2019, 10(4): 346.
- [26] Heim M A, Jakoby M, Werber M, *et al.* The basic *Helix-loop-Helix* transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(5): 735-747.
- [27] 刘 静, 王翠平, 朱 强, 等. 黑果枸杞 bHLH 转录因子家族的生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(14): 4612-4623.
- [28] Atchley W R, Fitch W M. A natural classification of the basic *Helix-loop-Helix* class of transcription factors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(10): 5172-5176.
- [29] Shen W, Cui X, Li H, *et al.* Genome-wide identification and analyses of bHLH family genes in *Brassica napus* [J]. *Canad J Plant Sci*, 2019, 99: 589-598.
- [30] Kavas M, Baloglu M C, Atabay E S, *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of common bean bHLH transcription factors in response to excess salt concentration [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(1): 129-143.