

陈 微,潘 美,惠林冲,等. 基于转录组的洋葱 bHLH 转录因子家族鉴定与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(5):11-18.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.05.002

基于转录组的洋葱 bHLH 转录因子家族鉴定 与生物信息学分析

陈 微¹,潘美红¹,惠林冲¹,李威亚¹,邰国磊²,何林玉¹,缪美华¹,陈振泰¹,杨海峰¹

(1. 江苏省连云港市农业科学院,江苏连云港 222000; 2. 江苏省灌南县农业农村局,江苏灌南 222000)

摘要:bHLH 转录因子家族是真核生物中重要的转录因子家族,在植物生长发育、次生代谢和逆境应答中发挥重要作用。本研究利用转录组数据对洋葱基因家族成员进行筛选和鉴定,并对家族成员进行理化性质、保守基序、亚细胞定位、系统发育和蛋白互作生物信息学分析,同时对 bHLH 基因家族在洋葱幼苗中的表达情况进行分析。结果表明,从洋葱转录组共鉴定到 36 个 bHLH 基因,预测编码蛋白质含有的氨基酸数量为 127~610 个,且均为亲水性蛋白,系统发育分析表明,洋葱 bHLH 基因家族分为 12 个亚族,同一亚族的大多数基因具有相似的保守基序,大多数 bHLH 基因在洋葱幼苗中表达,不同基因的表达量水平差异较大。本研究结果为进一步研究洋葱 bHLH 转录因子家族的生物学功能奠定了基础。

关键词:洋葱;bHLH;转录因子;生物信息学分析

中图分类号:S633.201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)05-0011-08

转录因子是真核生物中重要的调节因子,可以与顺式元件相互作用,调节特定基因的表达,来响应环境胁迫。bHLH(basic helix-loop-helix)转录因子家族是植物中最大的转录因子家族之一^[1],具有高度保守的 bHLH 结构域,由大约 50~60 个保守氨基酸组成,包含 2 个功能区:一个是 N 端的碱性氨基酸区,长度约为 15 个氨基酸,另一个是 HLH 区^[2]。bHLH 蛋白调节许多生理过程,在黄酮类生

物合成^[3-4]、信号转导^[5]和植物生长发育^[6-8]等方面发挥着重要作用。

随着不同物种全基因组和转录组测序的完成,多个物种中鉴定到 bHLH 基因家族。目前,已从拟南芥^[9]、毛竹^[10]、胡萝卜^[11]、人参^[12]、梨^[13]、苹果^[14]、葡萄^[15]等植物物种鉴定和分析了大量 bHLH 基因家族。随着 bHLH 蛋白功能的确定,bHLH 的分类不断得到改进。根据序列相似性和进化关系以及结合 DNA 的能力,bHLH 通常分为从 A 到 F 的 6 个主要组^[16-17]。

洋葱是全球范围内种植的蔬菜之一,具有丰富的营养成分,很多国家视其为一种非常重要的蔬菜。迄今为止,bHLH 转录因子的研究主要在拟南芥、葡萄、水稻等植物中,在洋葱中未见 bHLH 转录因子功能及理化性质的报道。本研究利用洋葱转

收稿日期:2022-04-21

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(20)3164];连云港市财政专项(编号:QNJJ2005)。

作者简介:陈 微(1990—),女,山东菏泽人,硕士,助理研究员,主要从事蔬菜育种和栽培研究。E-mail:1135050599@qq.com。

通信作者:杨海峰,副研究员,主要从事蔬菜育种和栽培研究。E-mail:13775492959@163.com。

[33] Cui J W, Shen N, Lu Z G, et al. Analysis and comprehensive comparison of PacBio and nanopore-based RNA sequencing of the *Arabidopsis* transcriptome [J]. *Plant Methods*, 2020, 16(1):85.

[34] Ivanov A G, Velitchkova M Y, Allakhverdiev S I, et al. Heat stress-induced effects of photosystem I: an overview of structural and functional responses [J]. *Photosynthesis Research*, 2017, 133(1/2/3):17-30.

[35] Allakhverdiev S I, Kreslavski V D, Klimov V V, et al. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis [J]. *Photosynthesis Research*, 2008, 98(1/2/3):541-550.

[36] Shakeel S N, Aman S, Haq N U, et al. Proteomic and transcriptomic analyses of *Agave americana* in response to heat stress [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(4):840-851.

[37] Li W M, Wei Z W, Qiao Z H, et al. Proteomics analysis of alfalfa response to heat stress [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e82725.

[38] Spence A K, Boddu J, Wang D F, et al. Transcriptional responses indicate maintenance of photosynthetic proteins as key to the exceptional chilling tolerance of *C₄* photosynthesis in *Miscanthus × giganteus* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(13):3737-3747.

录组测序的数据库,在转录水平上对 *bHLH* 基因家族进行鉴定,并对其基本理化性质、保守基序、蛋白互作、系统进化以及基因表达情况进行生物信息学分析,此外,还筛选到一些可能参与洋葱黄酮生物合成途径的 *bHLH* 基因,结果可为洋葱 *AcbHLH* 基因功能的研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验所用的材料来自江苏省连云港市农业科学院东辛基地,在苗期,选取长势相近的 3 株紫皮洋葱和 3 株黄皮洋葱,选取幼嫩鳞茎的表皮,液氮速冻后, -80°C 冰箱保存备用,用于转录组测序(转录组数据已发表)。

1.2 数据来源及 *bHLH* 基因的鉴定

将测序得到的原始序列进行过滤,去除接头污染、低质量、N 比例大于 5% 的 Reads,得到质量较高的 Clean Reads,利用 Trinity 软件对高质量序列进行混合组装,共获到 77 474 条 Unigene^[18]。分别从拟南芥数据库 (<https://www.arabidopsis.org>) 和水稻数据库 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html>) 下载拟南芥 *bHLH* 家族蛋白序列和水稻 *bHLH* 家族蛋白序列。然后使用 HMMER 3.0 软件对获取的已知 *bHLH* 蛋白家族序列构建隐马尔可夫模型,以此模型搜寻洋葱转录组所有编码蛋白序列,找出洋葱转录组蛋白序列中潜在的 *bHLH* 家族序列。使用 BLASTP 把洋葱转录组所有蛋白的序列比对获取的 *bHLH* 家族参考序列, e -value 设为 $1e-10$,比对上的序列用作候选的 *bHLH* 家族序列。

1.3 *bHLH* 生物信息学分析

利用在线软件 ExPASy - ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对洋葱 *bHLH* 蛋白序列的氨基酸数目、分子量、等电点、不稳定系数等理化性质进行预测。利用 MEME 软件 (<http://meme.nbcr.net/meme>) 分析洋葱 *bHLH* 家族的保守基序,保守基序的数目选择 15,其他参数均采用默认值。利用 ProtComp (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>) 网站对洋葱 *bHLH* 家族成员的亚细胞定位进行预测。

1.4 洋葱 *bHLH* 基因的系统发育

构建方法:用 MAFFT 进行多序列比对,然后用 MEGA6.0 软件对鉴定得到的洋葱、拟南芥的 *bHLH*

蛋白家族序列构建系统进化树。使用邻接法 (neighbor-joining) 和 P-distance 模型构建进化树,校验参数 Bootstrap 设置为重复 1 000 次。

1.5 洋葱 *bHLH* 蛋白功能联系网络

利用 String 蛋白相互作用的数据库 (<http://string-db.org/>) 分析洋葱 *bHLH* 蛋白的互作网络,以模式植物拟南芥作为参考物种。

1.6 洋葱 *bHLH* 基因的表达分析

利用洋葱转录组测序数据分析 *bHLH* 基因的表达特征。以 FPKM 值表示转录本丰度,通过对数据均一化处理,利用 Heml 工具做热图。

2 结果与分析

2.1 洋葱 *bHLH* 基因家族的鉴定及理化性质分析

为了从洋葱转录组中获得 *bHLH* 家族基因,使用拟南芥和水稻的 *bHLH* 蛋白序列进行隐马尔可夫模型和 BLASTP 搜索,对获得的候选序列利用软件 pfamscan 和 Pfam A 数据库对目标序列进行结构域注释,确定将只含有保守结构域 *bHLH* 基序 (PF00010) 的序列作为最终的 *bHLH* 序列,最终获得 36 个 *bHLH* 基因,根据转录组编号顺序将其命名为 *AcbHLH1* ~ *AcbHLH36* (表 1)。

对洋葱 36 个 *bHLH* 基因编码蛋白质的基本理化性质进行分析 (表 1),结果显示,*bHLH* 基因编码的氨基酸数目为 127 ~ 610 个,平均长度为 297 个氨基酸,预测其相对分子量大小为 $14\ 718.73 \sim 66\ 957.14$ u;等电点在 $4.84 \sim 9.44$ 范围内。从整体看,有 67% 的洋葱 *bHLH* 家族蛋白质等电点小于 7,等电点处于酸性范围内,蛋白质分子含有丰富的酸性氨基酸。蛋白质疏水性分析结果表明,洋葱中 36 个 *bHLH* 家族蛋白总平均亲水性均小于 0,说明该家族蛋白质均属于亲水性蛋白质,但是不同蛋白质之间亲水性存在差异。不稳定指数在 $38.84 \sim 80.53$ 之间,其中 94.44% 是不稳定蛋白 ($\Pi > 40$),只有 2 个属于稳定蛋白 ($\Pi < 40$),脂肪系数介于 $55.70 \sim 94.32$ 之间。亚细胞定位预测结果显示,*AcbHLH1* 等 27 个蛋白定位于细胞核,其余的 9 个定位于细胞外。

2.2 洋葱 *bHLH* 蛋白保守基序分析

洋葱 *bHLH* 蛋白中的保守基序用在线软件 MEME 分析 (图 1),结果表明,36 个 *bHLH* 基因家族成员中保守基序的数目及种类有差异,除 *AcbHLH5* 外,所有的 *bHLH* 都含有基序 motif 1 和 motif 2,而

表 1 洋葱中鉴定出的 *AcbHLH* 基因家族成员及其基本特性

编号	基因登录号	氨基酸数量 (个)	相对分子质量 (u)	等电点	不稳定指数	脂肪系数	总平均亲水性	亚细胞定位
<i>AcbHLH1</i>	DN18731_c1_g1	401	44 701.8	6.43	57.54	66.58	-0.771	细胞核
<i>AcbHLH2</i>	DN11750_c1_g1	182	20 948.14	9.44	60.44	70.22	-0.647	细胞核
<i>AcbHLH3</i>	DN16239_c1_g4	407	46 579.67	5.29	64.54	68.28	-0.698	细胞外
<i>AcbHLH4</i>	DN20041_c0_g1	366	39 464.18	7.74	58.95	65.60	-0.477	细胞核
<i>AcbHLH5</i>	DN10755_c0_g1	127	14 718.73	6.74	80.53	81.34	-0.546	细胞核
<i>AcbHLH6</i>	DN19187_c1_g5	254	27 942.24	6.13	64.93	71.81	-0.575	细胞核
<i>AcbHLH7</i>	DN19829_c1_g1	246	27 248.15	9.42	57.28	86.83	-0.494	细胞核
<i>AcbHLH8</i>	DN16670_c0_g2	294	32 984.53	5.44	44.20	91.84	-0.350	细胞核
<i>AcbHLH9</i>	DN19369_c3_g3	257	28 574.81	6.26	50.59	67.16	-0.742	细胞核
<i>AcbHLH10</i>	DN13227_c0_g1	329	36 913.46	5.96	47.10	78.88	-0.688	细胞核
<i>AcbHLH11</i>	DN20516_c4_g2	610	66 957.14	5.60	53.05	74.41	-0.480	细胞核
<i>AcbHLH12</i>	DN17028_c0_g3	286	32 305.80	8.17	57.74	78.32	-0.534	细胞外
<i>AcbHLH13</i>	DN16008_c0_g1	405	45 396.61	5.04	40.20	83.04	-0.356	细胞外
<i>AcbHLH14</i>	DN19522_c0_g2	297	34 004.41	6.22	46.10	70.27	-0.737	细胞核
<i>AcbHLH15</i>	DN8501_c0_g1	238	26 747.31	5.92	58.70	87.31	-0.463	细胞核
<i>AcbHLH16</i>	DN14455_c0_g2	363	39 263.87	8.89	55.58	55.70	-0.461	细胞外
<i>AcbHLH17</i>	DN13336_c0_g2	317	35 638.29	6.38	54.47	56.56	-0.998	细胞核
<i>AcbHLH18</i>	DN21146_c0_g2	293	31 834.63	5.44	57.96	66.01	-0.519	细胞核
<i>AcbHLH19</i>	DN17551_c0_g2	237	26 068.49	5.43	58.18	62.57	-0.631	细胞核
<i>AcbHLH20</i>	DN15120_c0_g1	148	17 158.31	7.80	70.85	71.76	-0.869	细胞核
<i>AcbHLH21</i>	DN19364_c1_g4	234	25 575.83	6.39	49.98	80.13	-0.459	细胞核
<i>AcbHLH22</i>	DN20738_c1_g5	273	30 829.83	4.84	70.53	76.04	-0.453	细胞核
<i>AcbHLH23</i>	DN16690_c1_g4	498	55 214.24	6.92	46.13	60.52	-0.716	细胞外
<i>AcbHLH24</i>	DN19832_c0_g4	289	31 982.92	6.34	56.32	63.84	-0.667	细胞核
<i>AcbHLH25</i>	DN21393_c0_g1	217	24 845.18	5.70	57.93	80.92	-0.603	细胞核
<i>AcbHLH26</i>	DN21342_c0_g1	289	32 483.44	8.87	38.84	93.43	-0.338	细胞核
<i>AcbHLH27</i>	DN19582_c3_g1	213	24 375.06	8.52	71.73	93.80	-0.389	细胞核
<i>AcbHLH28</i>	DN18545_c4_g2	266	29 989.00	5.03	66.13	70.45	-0.876	细胞核
<i>AcbHLH29</i>	DN13098_c0_g1	488	52 795.53	8.50	47.27	71.25	-0.402	细胞核
<i>AcbHLH30</i>	DN15678_c0_g2	280	31 343.92	8.46	45.72	60.25	-0.846	细胞核
<i>AcbHLH31</i>	DN19389_c0_g1	236	26 597.02	6.02	44.76	65.00	-0.868	细胞核
<i>AcbHLH32</i>	DN20708_c0_g1	301	34 052.75	8.21	47.45	86.78	-0.459	细胞外
<i>AcbHLH33</i>	DN17028_c0_g1	299	34 141.68	5.15	54.42	85.72	-0.564	细胞外
<i>AcbHLH34</i>	DN17028_c0_g5	278	31 226.38	5.43	46.04	94.32	-0.448	细胞外
<i>AcbHLH35</i>	DN20451_c1_g3	227	26 332.23	9.21	39.53	78.15	-0.606	细胞外
<i>AcbHLH36</i>	DN25260_c0_g1	248	27 812.65	6.98	53.26	90.81	-0.467	细胞核

且 motif1 和 motif2 总是相邻,二者共同构成了 bHLH 结构域。9 个成员含有 motif 3,6 个成员基序数目和构成一样,都是 motif 1、motif 2 和 motif 4, *AcbHLH8*、*AcbHLH12*、*AcbHLH33* 和 *AcbHLH34* 含有 7 个基序,是基序最多的 bHLH 蛋白。

2.3 洋葱 bHLH 蛋白家族进化关系分析

对拟南芥的 bHLH 蛋白序列和筛选的 36 条洋葱 bHLH 蛋白序列构建系统进化树(图 2)。根据拟

南芥中 bHLH 转录因子的分类系统和洋葱 bHLH 转录因子的进化树分类情况,36 个 bHLH 可以划分为 12 个亚族,其中数量最多的是 H 亚族,共 13 个,J 亚族含有的 bHLH 数量次之,有 9 个,A、C、E 和 G 亚族仅含有 1 个 bHLH。

2.4 洋葱 bHLH 蛋白互作关系

利用在线软件 STRING,预测洋葱 bHLH 家族成员在拟南芥中同源蛋白的互作关系(图 3、图 4)。

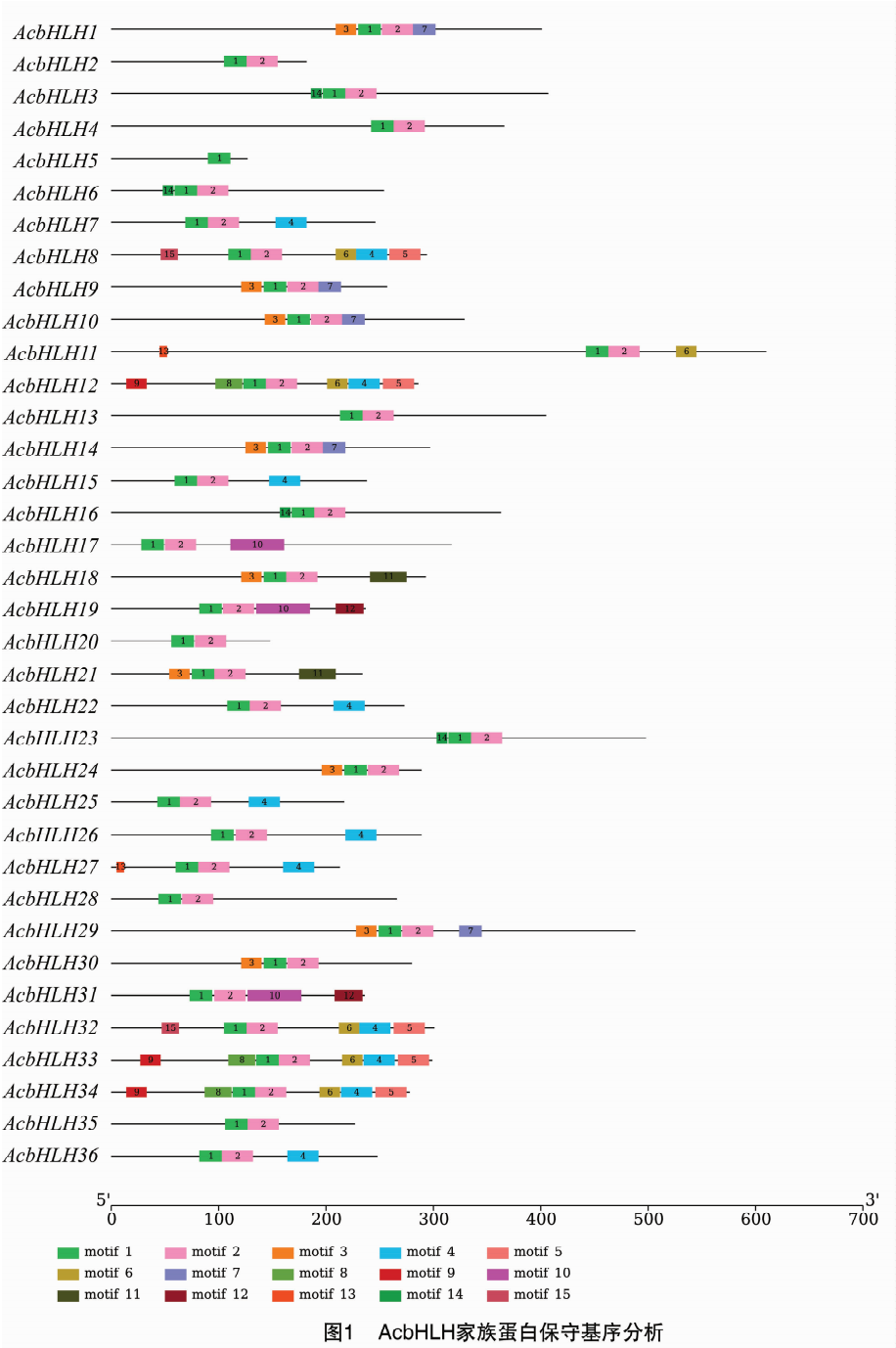


图1 AcbHLH家族蛋白保守基序分析

结果显示,洋葱 *bHLH* 家族成员和多个蛋白相互作用。其中光敏色素互作蛋白 *PIL5* 和 *PIF3* 共同作用来调节光形态发生。

2.5 洋葱 *bHLH* 基因家族表达分析

利用洋葱(紫皮和黄皮)的转录组数据库,找到候选的 36 个 *bHLH* 基因对应转录本的 RPKM 值,通过对 RPKM 值取对数值转换,利用 Heml 热图软件作热图(图 5)。结果显示,36 个 *bHLH* 基因在紫皮和黄皮洋葱中展现出不同的表达水平, *AcbHLH7*、

AcbHLH32、 *AcbHLH33*、 *AcbHLH22*、 *AcbHLH6*、 *AcbHLH35*、*AcbHLH5*、*AcbHLH19* 和 *AcbHLH26* 在紫皮洋葱中的表达量较高。

3 讨论与结论

作为植物中最大的转录因子家族之一, *bHLH* 基因家族在植物的生长发育、新陈代谢以及应对胁迫方面起着重要的作用。基于全基因组研究的深入,越来越多物种的 *bHLH* 基因家族被陆续鉴定出

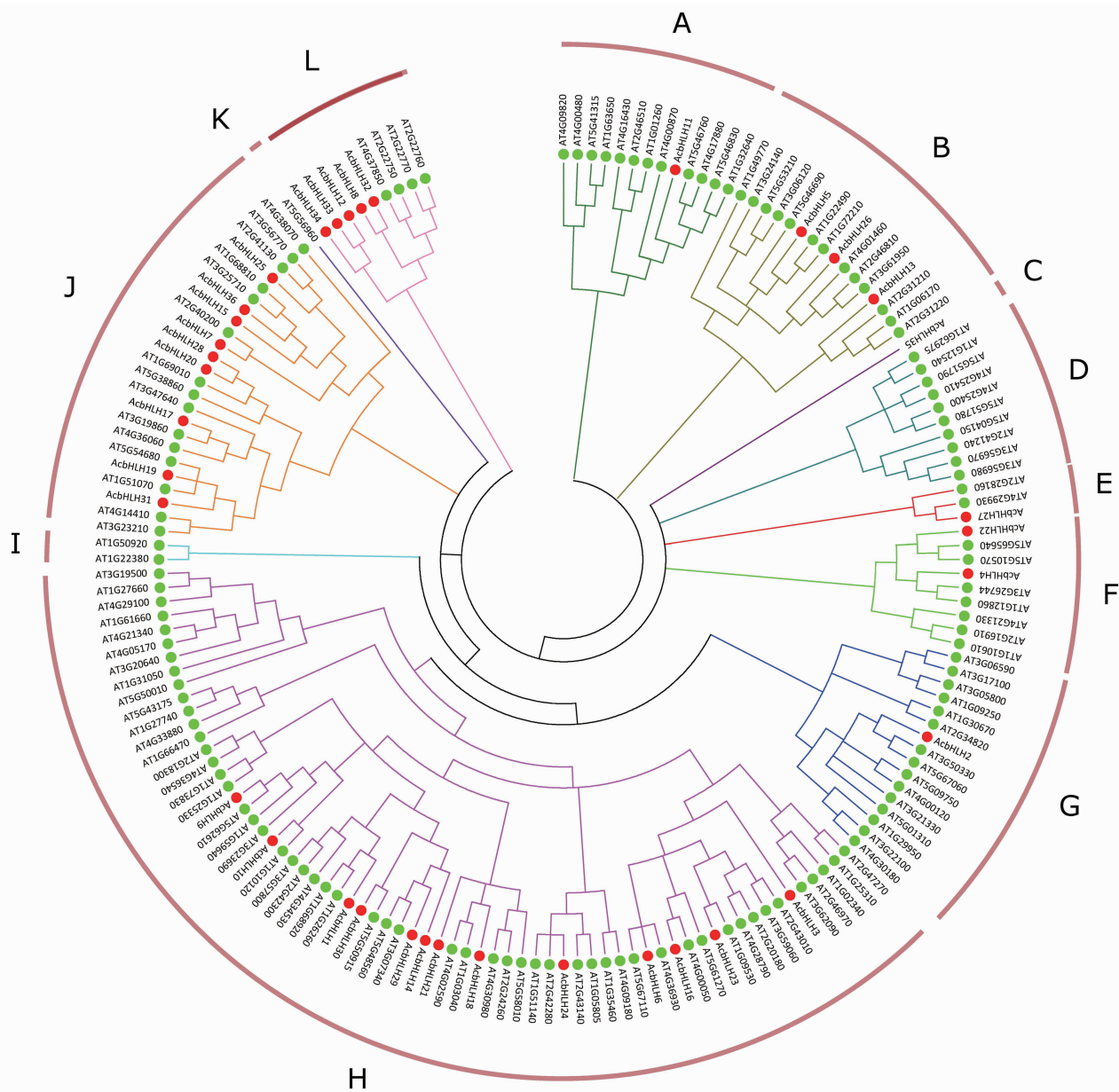


图2 洋葱和拟南芥 bHLH 蛋白质家族的进化树

来,其中拟南芥中鉴定出 162 个 *bHLH* 基因^[19],水稻中 167 个,番茄中 152 个^[20],葡萄中发现 94 个 *bHLH* 基因^[15],黄花蒿中鉴定出 99 个 *bHLH* 基因^[21],桃中有 95 个 *bHLH* 基因^[22],陈红霖等从绿豆转录组中鉴定到 122 个 *bHLH* 转录因子^[23],Zhu 等在龙血树中发现了 62 个 *bHLH* 基因^[24]。因为缺乏基因组,目前尚未见洋葱 *bHLH* 基因家族鉴定及其功能分析的报道,本研究利用洋葱幼苗转录组数据库,对洋葱中 *bHLH* 基因家族成员进行鉴定,并对 *AcbHLH* 基因家族中各蛋白的基本理化性质、保守基序、亚细胞定位、系统进化、基因表达等方面进行了分析,为 *bHLH* 基因家族成员在结构和功能以及基

因表达调控等方面的研究提供参考。

通过分析鉴定,去除冗余,在洋葱中鉴定出 36 个 *bHLH* 基因家族成员,根据转录组编号顺序,将洋葱 36 个 *bHLH* 基因分别命名为 *AcbHLH1* ~ *AcbHLH36*。通过转录组在洋葱中鉴定到的 *bHLH* 蛋白数量远远低于拟南芥、水稻和番茄中 *bHLH* 蛋白数量,这种情况可能与洋葱基因组数据未获得和转录组取样时期有关,又或者测序组装的条件限制有尚未发现的洋葱 *bHLH* 基因家族成员。

洋葱中 36 个 *bHLH* 基因的保守基序利用线软件 MEME 进行分析,共找到 15 个高度保守基序, motif 1 和 motif 2 几乎存在于所有的 *AcbHLH* 蛋白

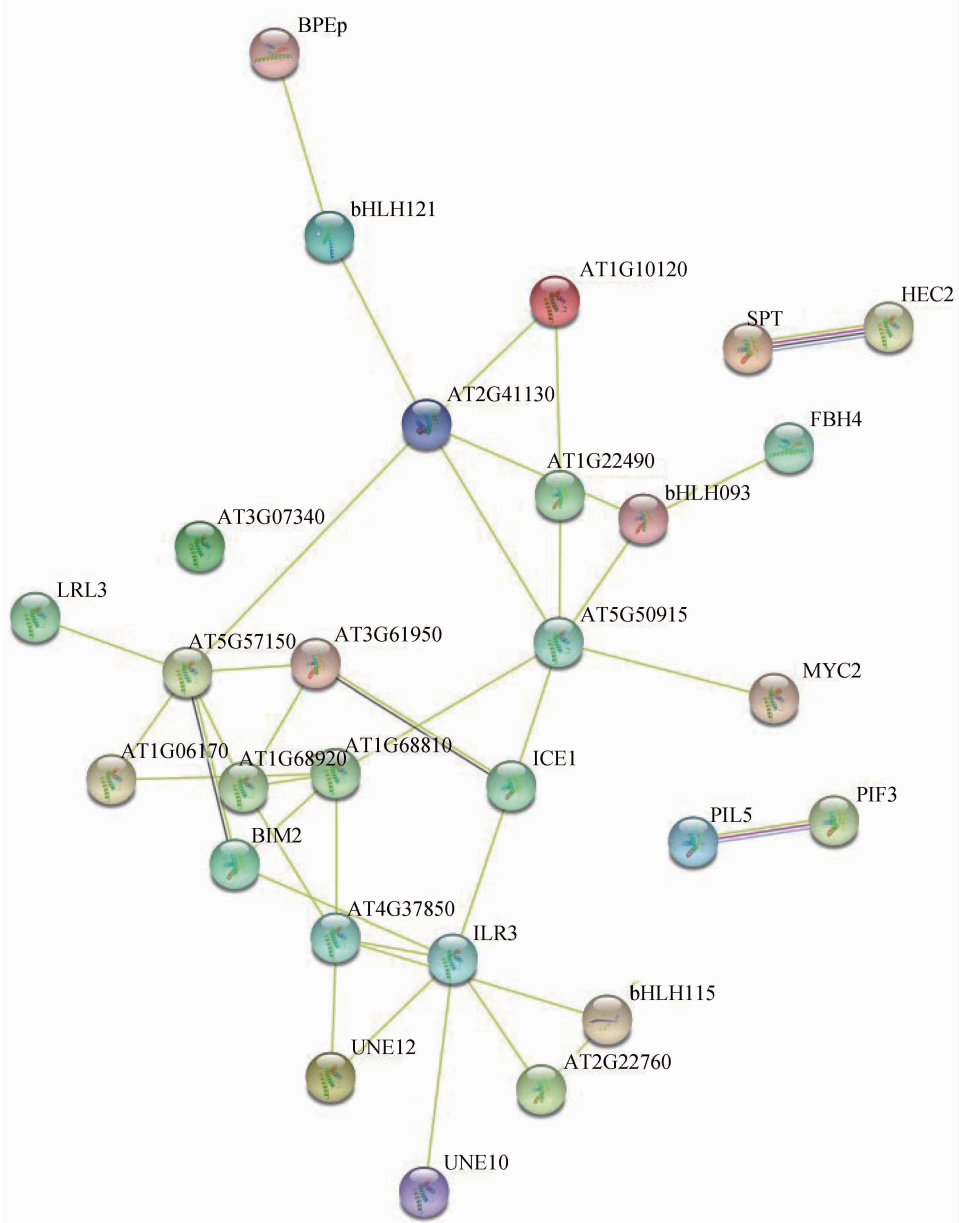


图3 洋葱AcbHLHs 蛋白功能关系网络

中,它们总是彼此相邻,共同构成 bHLH 结构域,具有相似 motif 组成的洋葱 *bHLH* 基因家族成员在聚类分析中距离较近,推测这些 bHLH 保守基序在同一亚家族具有保守性及功能独特性,而其他的保守基序也在每个亚家族发挥着不同的功能。

拟南芥和洋葱 bHLH 蛋白的系统进化结果表明,36 个 bHLH 划分为 12 个亚族,而拟南芥、水稻中的 bHLH 蛋白被划分为 21、22 个亚族^[24-25],由于目前对洋葱 bHLH 蛋白的功能了解较少,无法更深入的分析其原因。

目前,对洋葱 *bHLH* 基因家族的研究远不如拟南芥、水稻等植物深入,bHLH 转录因子可以作为转

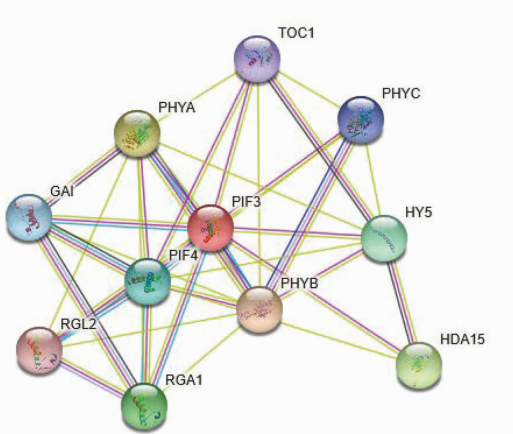


图4 洋葱 AcbHLH23(PIF3) 蛋白共表达网络

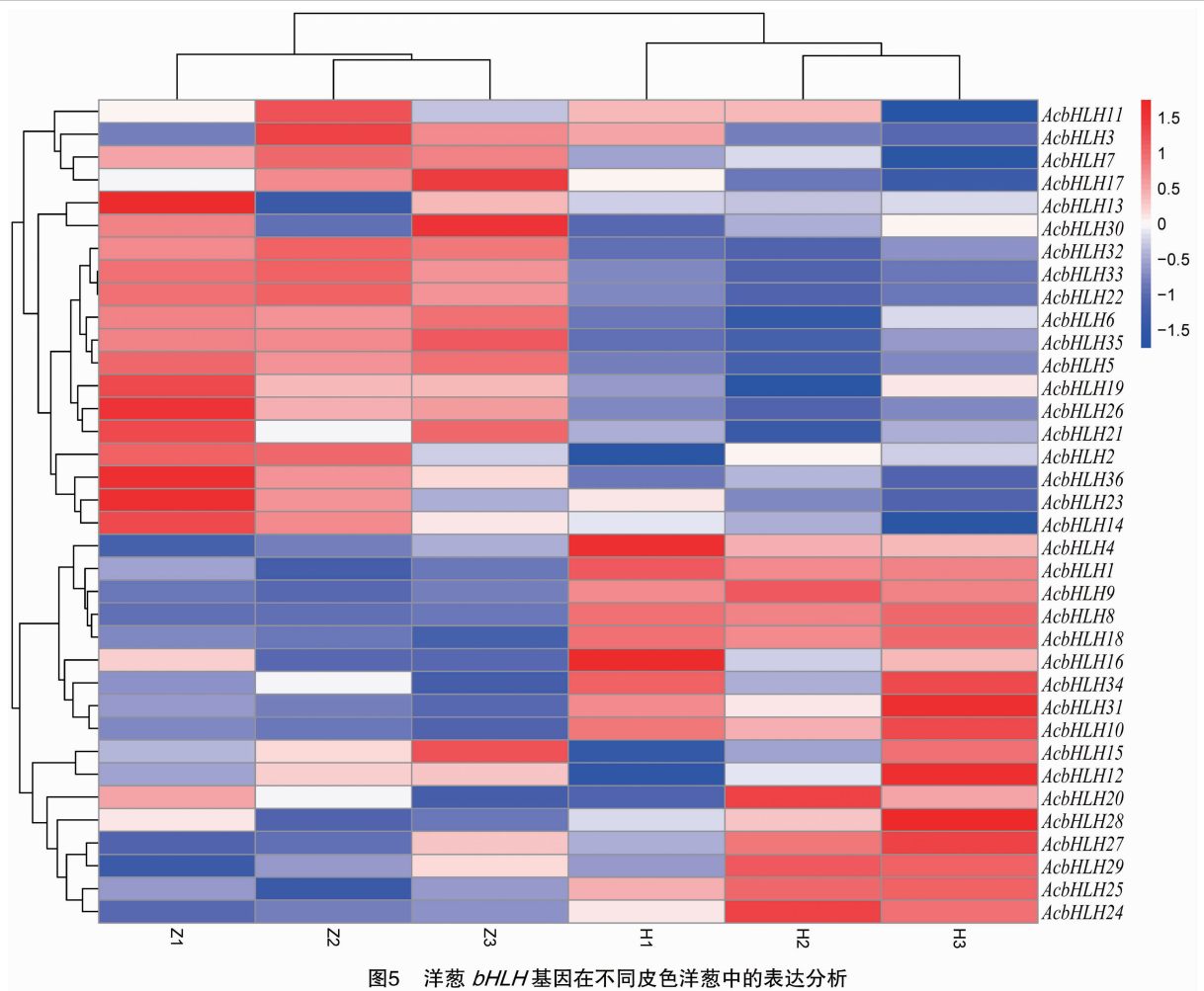


图5 洋葱 *bHLH* 基因在不同皮色洋葱中的表达分析

录激活因子或抑制因子,在代谢和发育过程中起重要作用^[26]。在拟南芥中已对大多数鉴定的 *bHLH* 蛋白进行了功能鉴定。如转录因子 *PIF3* 作为光感受器信号的直接光敏色素反应伙伴,参与控制光调节基因的表达^[9]。花青素是类黄酮中最大的一类^[27],是最重要的次级代谢产物之一。相关研究表明,*MYB* 和 *WD40* 转录因子可以与 *bHLH* 相互作用,参与花青素和黄酮醇的生物合成。*bHLH2* 和 *bHLH46* 在龙血树中可能参与茉莉酸(*JA*)调节的黄酮类生物合成^[28]。本研究中,通过网络共表达发现 *bHLH* 转录因子 *PIF3* 与 *HY5* 相互作用,*HY5* 在花青素的合成中具有一定的作用,因此,推测 *PIF3* 可能在洋葱花青素的合成中起到一定的作用,但具体的作用仍需进一步验证。

由于缺少基因组,目前在洋葱分子生物学方面的研究相对滞后,未见洋葱中 *bHLH* 家族基因的报道,对该家族基因的功能和分类还缺乏系统深入的研究。本研究通过对转录组测序得到的洋葱 *bHLH*

家族基因进行鉴定,并对其进行生物信息学、保守基序、系统进化分析以及基因表达分析,为进一步筛选洋葱 *bHLH* 家族基因,揭示该家族基因参与植物生长发育的调控机制奠定理论基础。

参考文献:

[1] Hong Y Q, Ahmad N, Tian Y Y, et al. Genome - wide identification, expression analysis, and subcellular localization of *Carthamus tinctorius* *bHLH* transcription factors [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 (12) : 3044.

[2] Wang J Y, Hu Z Z, Zhao T M, et al. Genome - wide analysis of *bHLH* transcription factor and involvement in the infection by yellow leaf curl virus in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. BMC Genomics, 2015, 16 (1) : 1 - 14.

[3] Xu W J, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by *MYB* - *bHLH* - *WDR* complexes [J]. Trends in Plant Science, 2015, 20 (3) : 176 - 185.

[4] Zhao M, Li J, Zhu L, et al. Identification and characterization of *MYB* - *bHLH* - *WD40* regulatory complex members controlling anthocyanidin biosynthesis in blueberry fruits development [J].

- Genes,2019,10(7):496.
- [5]Zhu E G,You C J,Wang S S,et al. The DYT1 – interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome [J]. The Plant Journal,2015,83(6):976 – 990.
 - [6]Lu R,Zhang J,Liu D,et al. Characterization of bHLH/HLH genes that are involved in brassinosteroid (BR) signaling in fiber development of cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. BMC Plant Biology,2018,18(1):304.
 - [7]Xing B C,Yang D F,Yu H Z,et al. Overexpression of *SmbHLH10* enhances tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Science,2018,276:229 – 238.
 - [8]Zhu Z G,Liang H L,Chen G P,et al. The bHLH transcription factor *SIPRE2* regulates tomato fruit development and modulates plant response to gibberellin [J]. Plant Cell Reports,2019,38(9):1053 – 1064.
 - [9]Toledo – Ortiz G,Huq E,Quail P H. The *Arabidopsis* basic/Helix – loop – Helix transcription factor family [J]. The Plant Cell,2003,15(8):1749 – 1770.
 - [10]Cheng X R,Xiong R,Liu H L,et al. Basic helix – loop – helix gene family: genome wide identification, phylogeny, and expression in *Moso bamboo* [J]. Plant Physiology and Biochemistry,2018,132:104 – 119.
 - [11]Chen Y Y,Li M Y,Wu X J,et al. Genome – wide analysis of basic helix – loop – helix family transcription factors and their role in responses to abiotic stress in carrot [J]. Molecular Breeding,2015,35(5):125.
 - [12]Chu Y,Xiao S M,Su H,et al. Genome – wide characterization and analysis of bHLH transcription factors in *Panax ginseng* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B,2018,8(4):666 – 677.
 - [13]Jin C,Huang X S,Li K Q,et al. Overexpression of a bHLH1 transcription factor of *Pyrus ussuriensis* confers enhanced cold tolerance and increases expression of stress – responsive genes [J]. Frontiers in Plant Science,2016,7:441.
 - [14]Mao K,Dong Q L,Li C,et al. Genome wide identification and characterization of apple bHLH transcription factors and expression analysis in response to drought and salt stress [J]. Frontiers in Plant Science,2017,8(12):480.
 - [15]Wang P F,Su L,Gao H H,et al. Genome – wide characterization of bHLH genes in grape and analysis of their potential relevance to abiotic stress tolerance and secondary metabolite biosynthesis [J]. Frontiers in Plant Science,2018,9:64.
 - [16]Atchley W R,Fitch W M. A natural classification of the basic helix – loop – helix class of transcription factors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1997,94(10):5172 – 5176.
 - [17]Simionato E,Ledent V,Richards G,et al. Origin and diversification of the basic helix – loop – helix gene family in metazoans; insights from comparative genomics [J]. BMC Evolutionary Biology,2007,7:33.
 - [18]陈 微,潘美红,惠林冲,等. 洋葱转录组测序及黄酮类化合物合成相关基因的分析 [J/OL]. 分子植物育种:1 – 6 [2022 – 10 – 17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210816.1540.010.html>.
 - [19]Carretero – Paulet L,Galstyan A,Roig – Villanova I,et al. Genome – wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae [J]. Plant Physiology,2010,153(3):1398 – 1412.
 - [20]Sun H,Fan H J,Ling H Q. Genome – wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato [J]. BMC Genomics,2015,16(1):9.
 - [21]甘 雨,吴 端,张 栋,等. 黄花蒿 bHLH 转录因子基因家族鉴定及光调控分析 [J]. 中国现代中药,2021,23(3):441 – 452.
 - [22]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.
 - [23]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.
 - [24]Zhu J H,Xia D N,Xu J,et al. Identification of the bHLH gene family in *Dracaena cambodiana* reveals candidate genes involved in flavonoid biosynthesis [J]. Industrial Crops and Products,2020,150:112407.
 - [25]Heim M A. The basic helix – loop – helix transcription factor family in plants;a genome – wide study of protein structure and functional diversity [J]. Molecular Biology and Evolution,2003,20(5):735 – 747.
 - [26]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 Physiology,2006,141(4):1167 – 1184.
 - [27]Feller A,Machemer K,Braun E L,et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. The Plant Journal,2011,66(1):94 – 116.
 - [28]Welch C R,Wu Q L,Simon J E. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization [J]. Current Analytical Chemistry,2008,4(2):75 – 101.