

3 个白桦 *BpBEE* 基因的克隆与表达分析

武丹阳, 杨 洋, 李慧玉

(东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 根据已有的白桦 *Betula platyphylla* 茎尖、叶片及木质部等 45 个转录组信息, 获得 3 条白桦 *BEE* 基因的全长 cDNA 序列, 分别命名为 *BpBEE1*, *BpBEE2* 和 *BpBEE3*。对 3 个 *BpBEE* 基因进行了生物信息学分析和实时定量聚合酶链式反应分析, 结果表明: 3 个基因具有典型的结合 DNA 及特异识别序列 E-box 和 N-box, 属于 bHLH 类转录因子。这 3 个基因与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中 *AtBEE* 基因亲缘关系较近, 属于 bHLH 超家族第 25 亚类。在白桦生长季内, *BpBEE1*, *BpBEE2* 和 *BpBEE3* 在不同组织中均有表达, 叶中 *BpBEE* 基因表达量明显高于其他部位。在生长旺盛时期, 茎、叶和顶芽中 *BpBEE* 基因均呈现上调表达, 表明 *BpBEE* 基因可能参与到白桦的生长过程。油菜素内酯(BR)激素处理之后, *BpBEE1* 在早期(2 h 和 4 h)的芽和木质部中呈显著上调(>2 倍); *BpBEE2* 在早期(2 h)的木质部和芽显著上调外, 其他处理时间也呈现不同程度的上调。表明 3 个白桦 *BpBEE* 基因参与 BR 激素应答, 且 *BpBEE1* 和 *BpBEE2* 呈现早期应答响应。图 5 表 2 参 16

关键词: 林木育种学; 白桦; bHLH 转录因子; 基因克隆; 基因表达分析

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2017)01-0137-08

Cloning and expression of three *BpBEE* genes in *Betula platyphylla*

WU Danyang, YANG Yang, LI Huiyu

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: Based on the transcriptome sequences from 45 libraries of stem tips, leaves, and xylem of *Betula platyphylla* (birch), three *BEE* genes (*BpBEE1*, *BpBEE2*, and *BpBEE3*), were obtained bioinformatics and expression patterns of three genes were analyses. Results showed that three *BpBEE* genes belonged to basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor superfamily, and contained a typical DNA binding domain and E-box/N-box specificity sites. These genes were highly homologous to *AtBEE* genes, and belonged to the 25th subclass in the bHLH superfamily. During the growing season, the RNA level of all three *BpBEE* genes were high-estin leaves than in others tissues. In the vigorous growing stage, All *BpBEE* genes were up-regulated in leaves and buds. With the brassinosteroids (BR) treatment, *BpBEE1* was up-regulated in buds and xylem (> 2 times) in the early stages (2 h and 4 h); whereas, *BpBEE2* was up-regulated in the xylem and buds in the early stage (2 h). These results suggested that the three *BpBEE* genes could be involved in the growth process of birch, and response for BR hormone, *BpBEE1* and *BpBEE2* showed early reply responses, especially. [Ch, 5 fig. 2 tab. 16 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Betula platyphylla*; bHLH transcription factors; gene cloning; gene expression analysis

Basic helix-loop-helic(bHLH)转录因子是一类在生物界广泛存在的转录因子家族, 通过特定的氨基

收稿日期: 2016-01-17; 修回日期: 2016-04-13

基金项目: “十二五” 国家科技计划农村领域项目(2013AA102704)

作者简介: 武丹阳, 从事林木遗传育种研究。E-mail: wudanyang_nm@126.com。通信作者: 李慧玉, 副教授, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: lihuiyu0519@aliyun.com

酸残基与靶基因相互作用,进而调节相关基因的表达^[1]。依据进化关系及与DNA的结合模式,将动物中bHLH转录因子分为A~F等6个家族,植物bHLH蛋白大多属于B组^[2]。拟南芥*Arabidopsis thaliana*中有147个bHLH基因,水稻*Oryza sativa*中有167个bHLH转录因子^[3]。CARRETERO-PAULE等^[3]对拟南芥、水稻、苔藓和藻类全基因组的bHLH转录因子进行了系统分析,这4类植物中所有638个bHLH基因被分为32个亚家族,主要特征是含有约60个氨基酸的bHLH结构域,可以分为长度15个氨基酸左右的碱性氨基酸区和45个氨基酸左右的 α 螺旋-环- α 螺旋区(HLH区)^[4],并且定义了植物bHLH的保守区域,即碱性氨基酸区含有高度保守的H5-E9-R13序列(His5-Glu9-Arg13),这为鉴定新的bHLH转录因子提供了依据^[3]。bHLH基因参与植物的生长发育,促进花形态的建成和抑制及种子的萌发,控制气孔细胞分化及保卫细胞形成^[5]。bHLH还参与植物适应非生物逆境反应^[6]。拟南芥中*AtbHLH92*表达受盐、干旱、渗透和寒冷等多种胁迫强烈诱导,陆地棉*Gossypium hirsutum*中分离的*GhbHLH1*被ABA、干旱和盐胁迫诱导表达^[7];过表达水稻*OsbHLH001*转录因子的拟南芥抗盐及抗冻能力均得到的提高^[1]。之外,bHLH还参与生物合成及信号转导。研究发现,bHLH类基因*OSB1*,*ATR2*和*IND*分别参与花青素、色氨酸及赤霉素的合成;*PIF3*,*PIF4*和*HFR1*在光敏色素信号传导中起调控作用;*BEE1*,*BEE2*和*BEE3*在油菜素内酯(brassinolid, BR)的信号传导中起作用^[8]。*BEE*(BR enhanced expression)所编码的蛋白质是属于bHLH超家族的一员,是调控BR信号转导的重要元件^[8]。迄今为止对*BEE*基因的研究积累较少。在拟南芥中,3个*BEE*基因在BR信号途径中是早期应答受体^[8]。拟南芥*BEE*基因突变体出现植株矮小和开花延迟的表型,且该家族成员存在功能冗余^[8]。在木本植物中*BEE*基因的功能研究未见报道。白桦*Betula platyphylla*是桦木科Betulaceae桦木属*Betula*的落叶乔木,天然次生林更新的先锋树种,也是中国重要的经济树种之一。油菜素内酯是对植物生长发育有多方面调节作用的植物激素,对植物生长发育有着多方面的重要影响。本研究以白桦为材料,克隆了3条*BpBEE*基因,通过生物信息学及实时定量聚合酶链式反应技术,对*BpBEE*在白桦不同生长阶段的表达变化及响应BR处理的情况进行了研究,旨在深入揭示*BpBEE*基因功能,探索它在木本植物BR信号途径的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

基因表达分析材料采自东北林业大学林木遗传育种试验基地10年生的白桦。雌花序出现于4月中下旬,始花5~10d后开始受粉,持续1周左右,雄花序出现于5月底,8月中旬结束。白桦的雄配子体发育很特殊,在当年不形成成熟的雄配子体,直到第2年4月中下旬才发育成熟,称为越冬宿存现象^[9]。2013年6月5日至9月20日,隔15d取材1次,每次均选取相同3株白桦中部的雄花序、叶片、嫩茎和顶芽,分别混样。越冬后第2年4月15日至4月25日,隔5d采取雄花序和雌花序。植物材料经液氮速冻后,放入-80℃超低温冰箱保存备用。

BR处理以1年生、长势一致的白桦无性系为材料。喷洒0.2 mg·L⁻¹的BR(含质量分数为0.1%的吐温80)溶液5.0 mL,同时设置对照(喷洒质量分数为0.1%吐温80溶液5.0 mL),在处理0, 2, 4, 6, 12, 24, 48和72 h后,分别采集顶芽、叶、木质部和韧皮部。液氮冷冻处理,-80℃冰箱中保存备用。

1.2 *BpBEE* 基因的生物信息学分析

根据研究团队已有的白桦不同组织转录组数据,获得3个*BEE*基因的全长cDNA序列,分别命名为*BpBEE1*,*BpBEE2*,*BpBEE3*。

利用美国生物技术信息中心(NCBI)在线开放阅读框(ORF)寻找程序确定基因的开放读码框;利用Conserved Domains工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测保守区及蛋白质的基本结构域。对蛋白质的分子量和理论等电点进行了在线计算[<http://web.expasy.org/protparam/>]。根据白桦基因组DNA序列(白桦基因组测序、拼接工作已经完成,数据尚未公布)在GSDS(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)上对其基因组序列进行外显子和内含子的预测。用BioEdit中的ClustalW进行氨基酸的多序列比对;选取白桦和拟南芥*AtBEE*基因序列,使用MEGA 5.1以默认参数构建邻接树(neighbor-joining tree, NJ-tree),其中Bootstrap分析进行1 000次重复。

1.3 总 RNA 的提取与检测

采用 RNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司, RP3302), 按说明书提取白桦不同组织部位的总 RNA。用微量紫外检测仪 NanoDrop 测定提取的 RNA 样品浓度, 用质量分数为 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

1.4 RNA 反转录

利用 PrimeScript™ RT reagentkit(TaKaRa)进行 RNA 反转录, 反应体系和条件参照试剂盒说明书操作。

1.5 实时定量分析

根据已知的 3 个 *BpBEE* 全长序列设计实时定量引物, 同时以白桦 α -*Tubulin* 为内标基因(引物序列参见表 1)。以获得的白桦不同生长阶段材料(雌花、雄花、茎、叶和顶芽)及 BR 处理后不同时间(0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 和 72 h)收集的组织(顶芽、叶、木质部和韧皮部)cDNA 稀释 10 倍作为模板。荧光定量反应体系为 SYBR Premix Ex *Taq* 10.0 μ L, 上、下游引物($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.8 μ L, Rox Dye II 0.4 μ L, cDNA 2.0 μ L, 加水至终体积 20.0 μ L。反应在 ABI PRISM 7500 实时定量聚合酶链式反应(PCR)仪上进行, 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 34 s, 循环 40 次, 绘制溶解曲线, 温度由 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 至 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 止, 重复 3 次·反应⁻¹, 采用 $-\Delta\Delta\text{Ct}$ 算法分析结果。

表 1 定量 RT-PCR 分析所用引物

Table 1 Primers used in RT-PCR analysis

基因	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
<i>BpBEE1</i>	CAGCCAAATGCAAGCATGATGG	GGAGCTGGTTGTGATAGTTCC
<i>BpBEE2</i>	GCTAGACAAGCTTCATCAACC	TTCCATCTCCTCCACCACC
<i>BpBEE3</i>	GTTCAACCAGAATGTGGTGC	CTGTGACTGTCACTAGCTTGG
α - <i>Tubulin</i>	GCACTGGCCTCCAAGGAT	TGGGTCGCTCAATGTCAAGG

2 结果与分析

2.1 3 个 *BpBEE* 基因全长的生物信息学分析

根据白桦基因组信息, 对 3 个基因的基因组序列进行分析, 结果 *BpBEE1*, *BpBEE2* 及 *BpBEE3* 基因的基因组序列长度差异较大, 其中 *BpBEE1* 基因组序列最长, 达 2 700 bp, *BpBEE2* 和 *BpBEE3* 基因分别为 1 600 bp 和 1 400 bp, 但 3 个基因的内含子和外显子数目一致, 均含有 6 个外显子 5 个内含子, 且 *BpBEE1* 的 5 个内含子长度(110, 140, 574, 106 和 982 bp)均比 *BpBEE2* 的内含子(134, 80, 72, 127 和 73 bp)长, *BpBEE3* 内含子长度依次为 82, 11, 104, 91 和 146 bp(图 1)。*BpBEE1* 和 *BpBEE3* 编码的氨基酸数目接近, 分别为 263 和 269 个氨基酸, *BpBEE2* 编码的氨基酸序列较长, 为 360 个氨基酸, 理论等电点的范围为 5.3~6.5(表 2)。

美国生物技术信息中心 BLAST 序列分析表明, *BpBEE1*, *BpBEE2* 和 *BpBEE3* 所编码的蛋白具有明显的 bHLH 蛋白质结构域, 包括 2 个螺旋和 1 个环状结构, 含有特异识别序列 E-box(CANNTG)和 N-box(CACGC/AG)。多重序列比对结果表明: 白桦 *BpBEE* 基因所编码的 bHLH 结构域与 bHLH 氨基酸序列中的严格保守的位点完全一致, 包括碱性结构域中第 9 位组氨酸, 第 13 位谷氨酸与第 16 位、第 17 位的精氨酸, 螺旋区域中第 10 位的亮氨酸(图 2)。白桦 *BpBEE2* 与拟南芥 *AtBEE2* 基因的氨基酸同源性高达

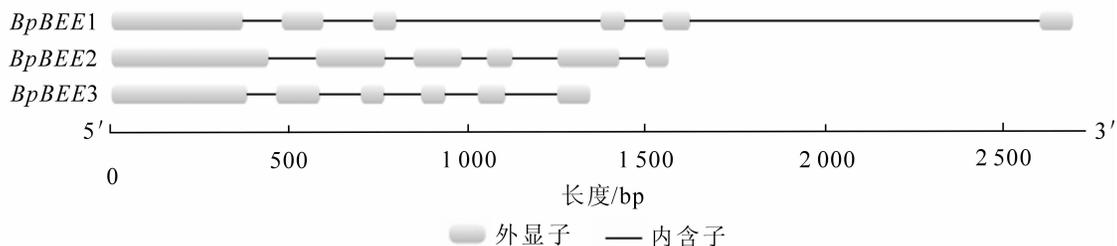


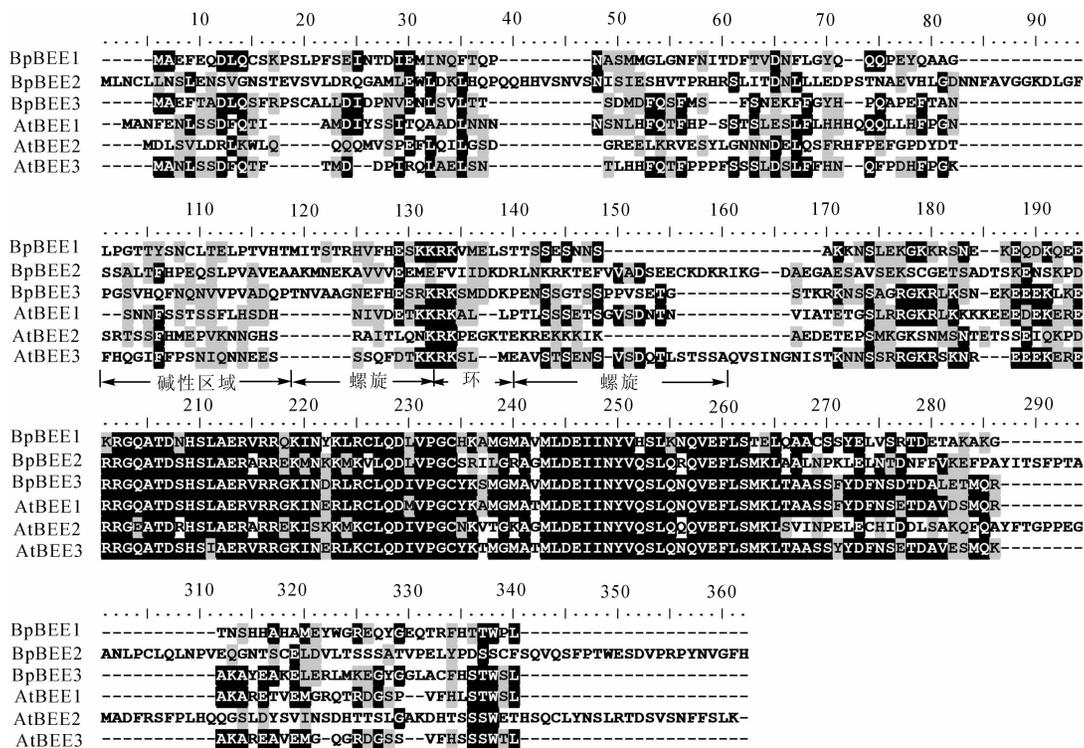
图 1 *BpBEE* 基因的结构

Figure 1 Structure of *BpBEE* genes

表2 3个 *BpBEE* 基本理化性质Table 2 Basic physico-chemical properties of *BpBEEs* genes

基因	5'UTR/bp	3'UTR/bp	ORF 长度/bp	氨基酸数目	相对分子质量/kD	理论等电点
<i>BpBEE1</i>	76	407	792	263	29.9	6.42
<i>BpBEE2</i>	73	411	1 083	360	39.9	5.31
<i>BpBEE3</i>	30	167	810	269	30.2	5.93

87%，*BpBEE3* 与拟南芥 *AtBEE1* 和 *AtBEE3* 基因的氨基酸同源性高达为 90%，*BpBEE1* 也与拟南芥中 *AtBEE1* 和 *AtBEE3* 基因的氨基酸同源性达到 55%。分子进化树表明，白桦 *BpBEE1*，*AtBEE2*，*AtBEE3* 基因聚为一类，均与拟南芥 *AtBEE* 基因同源性较高。根据已有的 bHLH 转录因子分类情况，白桦 *BpBEE* 基因在 bHLH 蛋白家族中属于第 25 亚类(图 3)。

图2 *BpBEE* 和 *AtBEE* 蛋白的多序列比对Figure 2 Multiple protein sequence alignment result between *BpBEE* and *AtBEE*

2.2 3个 *BpBEE* 基因在白桦不同组织部位的表达模式

利用实时定量 PCR 技术对 3 个 *BpBEE* 基因在不同时间和不同组织中的表达模式进行分析。结果显示：雌花中(参考组织为 2014 年 4 月 15 日 *BpBEE1* 表达量)，*BpBEE1* 基因随着雌花的发育表达量逐渐降低，在 4 月 25 日达到最低值，下调 $2^{-1.8}$ 倍。*BpBEE2* 基因呈现上调表达趋势，但是表达量逐渐减少。而 *BpBEE3* 呈现先下调后上调的趋势，下调最低峰出现在 4 月 20 日($2^{-2.0}$ 倍)，而后显著上调($2^{4.0}$ 倍)(图 4)。

在雄花发育初期，3 个 *BpBEE* 的表达丰度下调或不变(参照组织为 2014 年 4 月 15 日 *BpBEE1* 基因表达量)，在发育中期(7 月 5 日到 8 月 5 日)*BpBEE2* 和 *BpBEE3* 基因上调表达，上调倍数在 $2^{2.0}$ ~ $2^{4.0}$ ，而越冬后 3 个基因均成下调表达，尤其以 *BpBEE3* 最为明显(图 4)。

茎中 3 个基因的表达趋势不尽相同(参考组织为 2013 年 6 月 5 日 *BpBEE1* 基因表达量)。*BpBEE1* 在发育初期呈现上调趋势，到发育中期依然上调表达但表达量有所减少，到 8 月 20 日出现下调最低峰($2^{-1.0}$ 倍)，而后显著上调($2^{3.0}$ 倍)。*BpBEE2* 基因呈现持续上调趋势，在 7 月 5 日出现上调最高峰($2^{5.0}$ 倍)，随后仍呈现上调表达但是表达量逐渐减少。而 *BpBEE3* 基因在整个发育阶段大部分呈现上调趋势，但是变化量小，在 6 月 20 日达到下调最低峰($2^{-1.8}$ 倍)，在 9 月 5 日出现了明显的上调趋势($2^{3.0}$ 倍)(图 4)。

在叶中，*BpBEE1* 和 *BpBEE2* 基因表达量随着生长持续上调(参考组织为 2013 年 6 月 5 日 *BpBEE1*

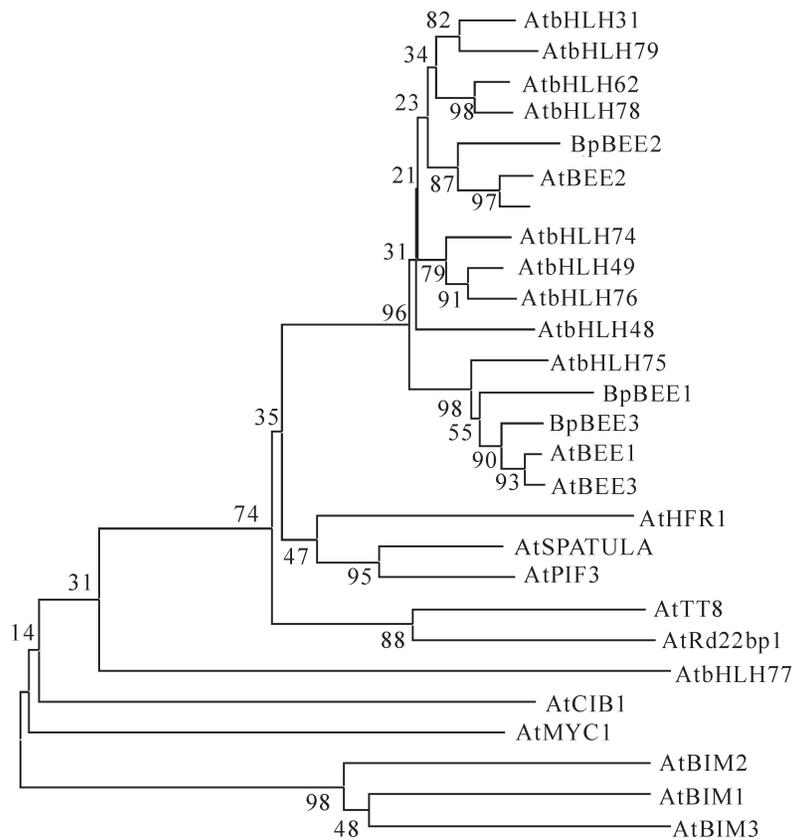


图 3 *BpBEE* 氨基酸序列与拟南芥 bHLH 氨基酸序列的系统进化树分析

Figure 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences of *BpBEE* with bHLHs from *Arabidopsis thaliana*

基因表达量), 8月20日达到最高值($2^{7.0} \sim 2^{8.0}$ 倍), 9月5日表达量显著减少。*BpBEE3*在发育初期呈现下调趋势, 随后持续上调($2^{4.5} \sim 2^{4.8}$ 倍), 在9月5日达到下调最低峰($2^{-2.5}$ 倍)(图4)。

在顶芽中, *BpBEE1*基因在发育初期表达量较低(参考组织为2013年6月5日*BpBEE1*基因表达量), 在发育的旺盛时期7月5日达到最高峰($2^{2.0}$ 倍)随后表达量逐渐降低, 在9月5日达到最低点。*BpBEE2*和*BpBEE3*的表达规律是相同的, 发育初期下调表达, 发育的旺盛时期上调表达, 发育后期表达量减少甚至下调表达。这表明基因对于顶芽的发育有影响。

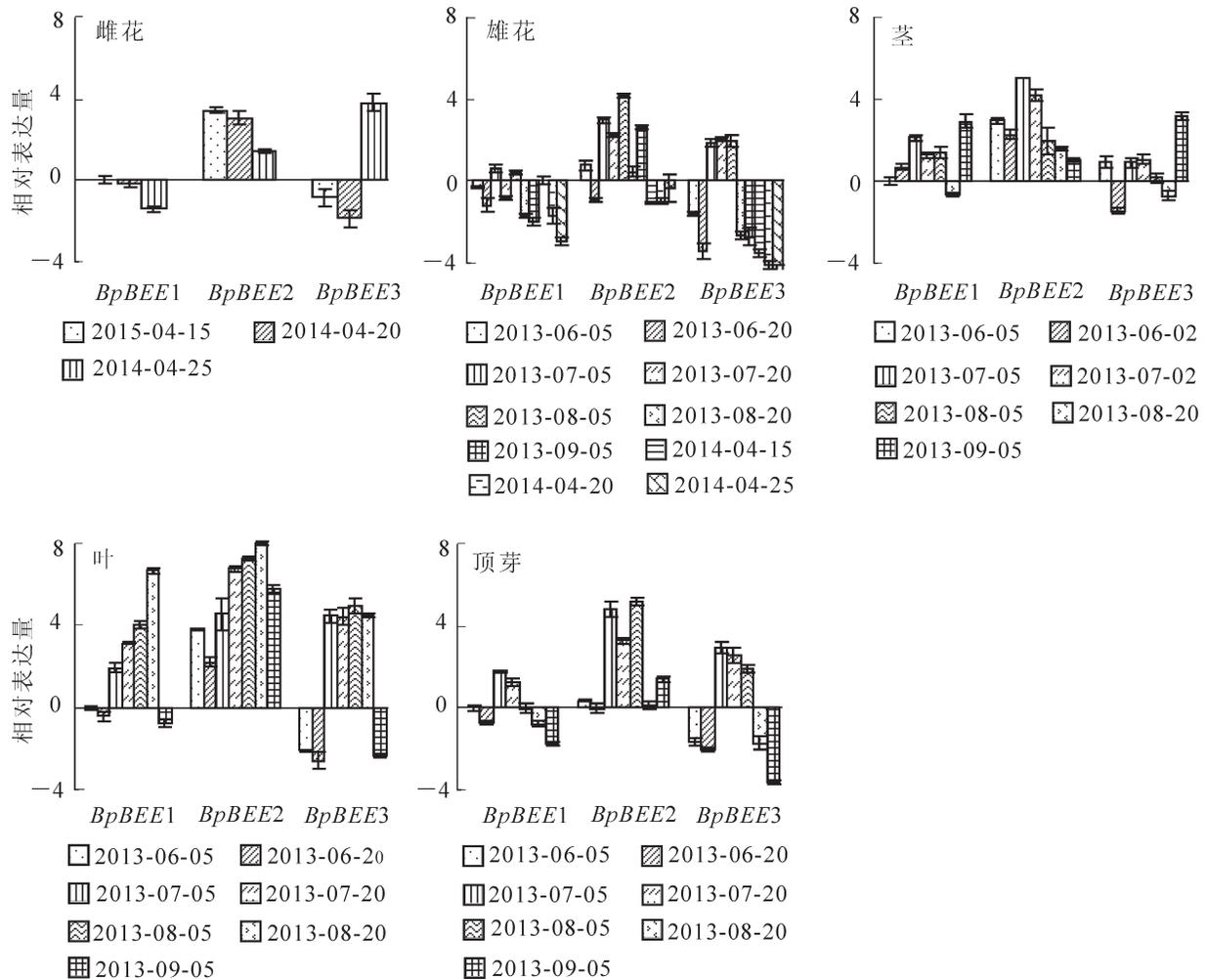
2.3 BR处理下*BpBEE*的表达模式

利用实时定量PCR技术分析了*BpBEE1*, *BpBEE2*和*BpBEE3*对BR激素的响应。结果显示: 在芽中*BpBEE2*和*BpBEE3*的表达趋势相似, 4~48h均为下调表达(不同组织以0h取材的*BpBEE1*基因的表达量为参照), 分别在6h和24h达到下调的最低值($2^{-2.0}$ 和 $2^{-4.5}$ 倍)。而*BpBEE1*与其相反, 早期(2h和4h)上调表达, 在中后期下调表达, 上调表达最高值在处理2h出现($2^{1.8}$ 倍)(图5), 这与拟南芥中*AtBEE*基因是BR信号通路中的早期应答受体的结果相符合^[8]。

在叶中, 3个*BpBEE*基因的表达趋势相同, 表达丰度均低于处理前。*BpBEE1*在早期(6h)表现为下调表达, 在中后期的表达呈现波动状, 但是在 2^0 和 $2^{-2.0}$ 倍之间波动。*BpBEE2*出现了较为明显的下调表达, 并在48h时出现了最低值($2^{-2.0}$ 倍)。*BpBEE3*的表达呈现下调, 在6h达到了最低值($2^{-6.0}$ 倍)(图5)。

在木质部中, *BpBEE1*在BR处理后表达量升高, *BpBEE1*在4h达到了最高值($2^{2.0}$ 倍)。*BpBEE2*在处理后呈现上调表达, 但是表达量均低于处理前。BR处理后*BpBEE3*下调表达, 最低值出现在6h($2^{-4.5}$ 倍)。

在韧皮部中, *BpBEE1*和*BpBEE3*基因表达趋势相似, 均为下调表达, 分别在48h和6h时达到表达最低值($2^{-3.0}$ 倍和 $2^{-5.5}$ 倍), 而*BpBEE2*在BR处理0h时为上调表达, 处理后呈现下调表达趋势, 24h达到最低值($2^{-4.0}$ 倍)(图5)。

图4 *BpBEE* 基因在不同时期不同组织部位的表达分析Figure 4 Expression patterns of *BpBEE* genes

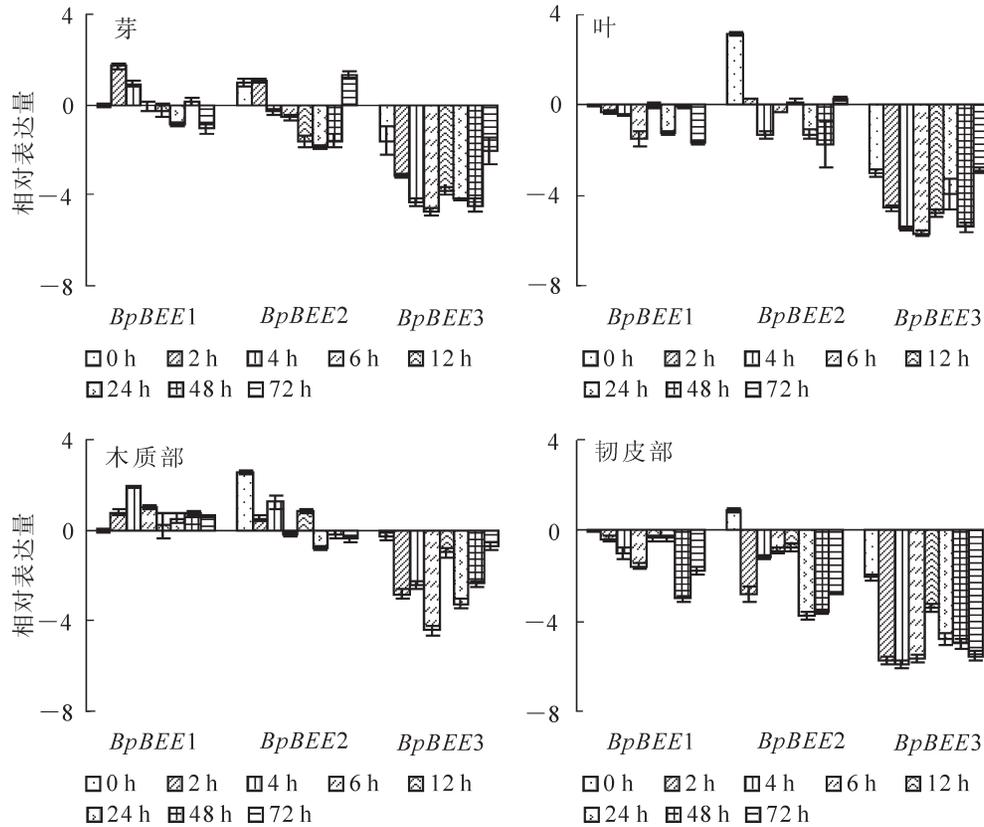
以上结果表明: BR 激素影响 *BpBEE* 基因的表达量, 在不同组织部位的影响不同。

3 讨论

真核生物中 bHLH 蛋白是一大类转录因子, 已在多种生物的基因组中得到鉴定^[10]。植物中 bHLH 家族成员数量众多, 仅次于 MYB 类转录因子家族, 在拟南芥中 bHLH 转录因子超过 140 个, 水稻中则多于 160 个^[5]。根据白桦基因组和转录组数据, 分析预测白桦中含有的 bHLH 转录因子有 157 个。bHLH 蛋白主要特征是含有 bHLH 结构域, 白桦 *BpBEE* 均含有 62 个氨基酸组成的 bHLH 结构域, 并存在高度保守的序列^[11], 对 bHLH 与靶 DNA 的结合密切相关。同时通过序列分析 *BpBEE* 能识别 E-box (CAN-NTG) 并结合, 进而激发基因进行转录^[2]。

在进化上, 一个保守结构域的内含子/外显子的剪切位点也是十分保守的, 所以它对于基因家族的进化研究也是非常重要的证据^[12]。在植物的 bHLH 蛋白超家族中, 其内含子的位置十分保守, 但数量具有多样化的特点, 最常见的是含有 2 或 3 个内含子^[12], 也有个别基因含有更多数目的内含子。例如, 拟南芥 *AtBEE* 基因含有 4~5 个内含子和 5~6 个外显子^[11]。白桦 *BpBEE* 基因含有的内含子数目一致, 均含有 5 个内含子, 故在亲缘关系上比较相近。

进化树分析发现, *BpBEE1*, *BpBEE2* 和 *BpBEE3* 属于 bHLH 转录因子的第 25 亚类, 与拟南芥中 *AtBEEs* 同源性较高^[13]。已有研究报道, 拟南芥第 25 亚类中共有 17 个成员, 其中包括 *AtBEE1*, *AtBEE2*, *AtBEE3* 和 *AtCIB1* 基因, 这些基因参与激素信号途径和器官的发育^[11]。*AtBEEs* 基因表达受 BR 和脱落酸 (ABA) 的诱导, 在喷洒植物生长调节物质 BR 后, *AtBEE* 基因的表达量明显高于未处理前, 拟南芥幼苗的胚轴也有一定程度的增长; 而 ABA 的效果与 BR 相反, 在喷洒植物生长调节物质后 *AtBEE*

图 5 BR 处理对 *BpBEE* 基因表达的影响Figure 5 Effects of BR treatment on *BpBEE* gene expression

基因的表达量降低^[8]。*AtCIB1* 基因所编码的蛋白质可以调控光诱导基因的表达，从而控制植物的成花转变^[14]。拟南芥隐花色素 CRY2 与 bHLH 转录因子 CIB1 发生互作，CIB1 能够和成花素 FT 基因启动子区的 E-box(CANNTG)结合，从而促进 FT 表达，而 FT 编码一个可移动的转录因子，从叶片转移到茎端分生组织促进开花基因的表达，最终促进光周期控制的开花^[15]。在本研究中，3 个 *BpBEE* 基因在不同组织部位的表达呈现出一定程度的相似性，预测其在功能上有一定的冗余，但也有很多不同点。在生长旺盛时期，3 个 *BpBEE* 基因在叶、顶芽和茎中均呈现上调表达；在雄花的减数分裂时期，*BpBEE2* 和 *BpBEE3* 基因呈现上调表达，故我们认为白桦 *BpBEE* 基因参与到了植物的生长发育过程中。在进行 BR 激素处理之后，3 个 *BpBEE* 基因的表达量都明显的变化，在处理早期 0~6 h 期间，*BpBEE1* 和 *BpBEE2* 基因的表达量有明显的变化，表明 *BpBEE* 基因参与对 BR 激素应答，*BpBEE1* 与 *BpBEE2* 表现为早期应答反应。在拟南芥中 *AtBEEs* 基因作为转录因子调控多个基因，例如 *BR11*，*BIMs*，*BIN2* 和 *BZR2* 基因的表达从而调节 BR 信号途径^[16]。本研究的 3 个基因与其同源性较高，*BpBEE* 基因是否具有相同的调节功能，及对下游基因及表达调控机制仍然需要进一步研究揭示。

4 参考文献

- [1] 刘晓月，王文生，傅彬英，等. 植物 bHLH 转录因子家族的功能研究进展[J]. 生物技术进展，2011，1(6): 391 - 397.
LIU Xiaoyue, WANG Wensheng, FU Binying, *et al.* Research progress of plant bHLH transcription factor family [J]. *Curr Biotechnol*, 2011, 1(6): 391 - 397.
- [2] 王勇，陈克平，姚勤. bHLH 转录因子家族研究进展[J]. 遗传，2008，30(7): 821 - 830.
WANG Yong, CHEN Keping, YAO Qin. Progress of studies on bHLH transcription factor families [J]. *Hereditas*, 2008, 30(7): 821 - 830.
- [3] 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 Physiol*, 2010, 153(3): 1398 - 1412.

- [4] 杨鹏程, 周波, 李玉花. 植物花青素合成相关的 bHLH 转录因子[J]. 植物生理学报, 2012, **48**(8): 747 – 758.
YANG Pengcheng, ZHOU Bo, LI Yuhua. The bHLH transcription factors involved in anthocyanin biosynthesis in plants [J]. *Plant Physiol J*, 2012, **48**(8): 747 – 758.
- [5] 刘文武, 李文学. 植物 bHLH 转录因子研究进展[J]. 生物技术进展, 2013, **3**(1): 7 – 11.
LIU Wenwen, LI Wenxue. Progress of plant bHLH transcription factor [J]. *Curr Biotechnol*, 2013, **3**(1): 7 – 11.
- [6] 刘文武. *bHLH122* 提高植物抗逆能力的分子机制初探[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
LIU Wenwen. *Molecular Mechanism Study of bHLH122 in Improving Plant Tolerance to Stresses* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [7] 王艳敏, 白卉, 曹焱. bHLH 转录因子研究进展及其在植物抗逆中的应用[J]. 安徽农业科学, 2015, **43**(21): 34 – 35.
WANG Yanmin, BAI Hui, CAO Yan. Research progress of bHLH transcription factor and application in plant abiotic stress tolerance [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2015, **43**(21): 34 – 35.
- [8] FRIEDRICHSEN D M, NEMHAUSER J, MURAMITSU T, *et al*. Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth [J]. *Genetics*, 2002, **162**(3): 1445 – 1456.
- [9] 刘雪梅, 杨传平. 白桦雌雄花发育周期的时序特征[J]. 林业科学, 2006, **42**(12): 28 – 32.
LIU Xuemei, YANG Chuanping. Temporal characteristics of developmental cycles of remale and male flowers in *Betula platyphylla* in northeastern China [J]. *Sci Silv Sin*, 2006, **42**(12): 28 – 32.
- [10] 张全琪, 朱家红, 倪燕妹, 等. 植物 bHLH 转录因子的结构特点及其生物学功能[J]. 热带亚热带植物学报, 2011, **19**(1): 84 – 90.
ZHANG Quanqi, ZHU Jiahong, NI Yanmei, *et al*. The structure and function of plant bHLH transcription factor [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2011, **19**(1): 84 – 90.
- [11] TOLEDOORTIZ G, HUQ E, QUAIL P H. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(8): 1749 – 1770.
- [12] 段学鹏. 水稻和拟南芥基因组 bHLH 转录因子超家族生物信息学研究[D]. 上海: 上海大学, 2006.
DUAN Xuepeng. *Genome-Wide Bioinformatics Research of bHLH Transcription Factor Superfamily in Rice and Arabidopsis thaliana* [D]. Shanghai: University of Shanghai, 2006.
- [13] LI Xiaoxing, DUAN Xuepeng, JIANG Haixiong, *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.
- [14] 杨立文, 付建新, 亓帅, 等. 高等植物开花时间的蓝光调控: 隐花色素介导的光信号传导[J]. 分子植物育种, 2015, **13**(2): 450 – 460.
YANG Liwen, FU Jianxin, QI Shuai, *et al*. Blue light regulating flowering time in higher plants: cryptochromes mediated signal transduction [J]. *Mol Plant Breed*, 2015, **13**(2): 450 – 460.
- [15] 贾贞, 赵菲佚, 吴存祥. *FT* 及其同源基因在植物发育调控中的多功能效应[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(12): 2558 – 2564.
JIA Zhen, ZHAO Feiyi, WU Cunxiang. Pleiotropic effect of *FT* and its orthologues on plant development [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2011, **31**(12): 2558 – 2564.
- [16] CIFUENTES-ESQUIVEL N, BOU-TORRENT J, GALSTYAN A, *et al*. The bHLH proteins BEE and BIM positively modulate the shade avoidance syndrome in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2013, **75**(6): 989 – 1002.