浙 江 农 林 大 学 学 报, 2023, **40**(4): 731-737 Journal of Zhejiang A&F University doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.20220553

毛竹 PhebHLH6 基因克隆及表达分析

卓 娟,侯 丹,林新春

(浙江农林大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室,浙江杭州311300)

摘要:【目的】研究 PhebHLH6 转录因子在毛竹 Phyllostachys edulis 逆境胁迫应答中的作用,为毛竹抗逆分子机制研究 奠定一定的基础。【方法】以毛竹实生苗为材料进行非生物胁迫处理[干旱胁迫、盐胁迫、水杨酸 (SA) 和脱落酸 (ABA)处理],利用转录组数据筛选出 1 条差异表达基因,命名为 PhebHLH6,并对其进行了基因克隆及生物信息学分 析;采用实时荧光定量 PCR 方法分析 PhebHLH6 在干旱、盐胁迫及 SA、ABA 处理下的表达模式。【结果】PhebHLH6 基因编码区长度为 801 bp,编码 266 个氨基酸,包含 bHLH 结构域,属于典型的 bHLH 转录因子。组织特异性表达分析 表明: PhebHLH6 在毛竹各个组织均有表达,其中在 1.5 和 3.0 m 的笋顶部表达丰度最高。在干旱和高盐胁迫处理下, PhebHLH6 的表达水平在处理 3 h 时被强烈诱导,但在处理 24 h 后显著下调。在 SA 和 ABA 处理下, PhebHLH6 的表达 水平被 SA 和 ABA 诱导也呈先上升再下降的趋势,其中受 SA 强烈诱导,受 ABA 诱导作用较弱。【结论】PhebHLH6 可能参与了毛竹干旱和盐胁迫早期响应途径,并可能在 SA 和 ABA 信号通路中起一定的调控作用。图 4 表 2 参 32 关键词:毛竹; PhebHLH6;基因克隆;表达分析

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)04-0731-07

Cloning and expression analysis of *PhebHLH*6 gene from *Phyllostachys edulis*

ZHUO Juan, HOU Dan, LIN Xinchun

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective is to study the role of *PhebHLH6* transcription factor in stress response of *Phyllostachys edulis*; so as to explore the molecular mechanism of resistance to stress in *Ph. edulis*. [Methods] Seedlings of *Ph. edulis* were treated with abiotic stress, including treatments of drought stress, salt stress, salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA). A differentially expressed gene named *PhebHLH6* was screened using transcriptome data, and its gene cloning and bioinformatic analysis were performed. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to analyze the expression patterns of *PhebHLH6* under drought, salt stress and SA and ABA treatments. [Result] The coding region of *PhebHLH6* gene had a base of 801 bp, encoding 266 amino acids, including bHLH domain, which was a typical bHLH transcription factor. Tissue-specific expression analysis showed that *PhebHLH6* was expressed in nearly all the tissues of *Ph. edulis*, with the highest abundance at the top of 1.5 m and 3.0 m shoots. Under drought and high salt stress, the expression levels of *PhebHLH6* were strongly induced after 3 h of treatment but significantly down-regulated after 24 h of treatment. Under SA and ABA hormone treatment, the expression levels of *PhebHLH6* increased first and then decreased when induced by SA and ABA, with strong SA induction and weak ABA induction. [Conclusion] *PhebHLH6* may be involved in the early response pathway to drought and salt stress of *Ph.*

收稿日期: 2022-08-30; 修回日期: 2022-12-14

基金项目:浙江省自然科学基金重点资助项目 (LZ20C160002);国家自然科学基金资助项目 (32150410354, 31971735)

作者简介: 卓娟 (ORCID: 0000-0003-4283-7848),从事植物生物技术等研究。E-mail: zj9597v@163.com。通信作者: 林新春 (ORCID: 0000-0001-9508-526X),教授,博士,从事植物生物技术等研究。E-mail: linxcx@163.com

edulis and may play a regulatory role in SA and ABA hormone signaling pathways. [Ch, 4 fig. 2 tab. 32 ref.] **Key words**: *Phyllostachys edulis*; *PhebHLH6*; gene clone; expression analysis

毛竹 Phyllostachys edulis 属于禾本科 Poaceae 竹亚科 Bambusoideae 刚竹属 Phyllostachys,在中国分布 范围广,被广泛应用于观赏、木材加工、食用等方面,具有很高的经济和生态价值^[1]。毛竹喜湿润环 境^[2],干旱、盐碱、低温等非生物胁迫将会严重限制毛竹的推广与应用^[3]。据报道,持续的高温少雨导 致了咸宁市毛竹林大批量死亡^[4],湖州市严重干旱导致大量竹笋退笋不能成竹^[5],非生物胁迫已经严重 影响产地竹产业及社会经济发展。目前已经展开了对毛竹逆境胁迫机理的系列研究,有利于实现毛竹可 持续经营,推动竹产业经济高质量可持续发展。

bHLH (basic helix-loop-helix)转录因子在真核生物中广泛存在,主要参与生物和非生物胁迫响 应^[6-7]、激素信号转导途径^[8]、植物的胚胎^[9]、雌蕊发育^[10]及开花调控^[11]。在毛竹中存在 153 个 bHLH^[3] 家族成员,在拟南芥 Arabidopsis thaliana 和水稻 Oryza sativa 中分别有 162 个^[12]和 167 个^[13],是植物中 仅次于 MYB 的第二大基因家族^[14-16]。HEIM 等^[17] 根据基因结构,又将拟南芥 bHLH 家族划分为 12 个亚 家族。大多数 bHLH 转录因子在植物非生物胁迫信号通路中起着重要的调控作用。FAN 等^[18]分析了高 粱 Sorghum bicolor 在胁迫处理下 bHLH 家族的表达模式,鉴定出 12 个可能和非生物胁迫相关的 SbbHLH 基因。本研究通过对毛竹实生苗进行非生物胁迫处理,利用转录组数据筛选出 1 条差异表达基 因,命名为 PhebHLH6,并对其进行生物信息学分析及表达模式探究,初步讨论了其潜在基因功能,以 期为毛竹抗逆基因功能研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据和材料

毛竹 26 个组织转录组数据来自美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库 (GSE169067)^[19]。毛竹种 子采自广西桂林,在浙江农林大学玻璃温室 (温度为 26 ℃;湿度为 80%) 培养 1 个月,采集幼嫩叶片置 于-80 ℃ 保存,用于后续研究。对生长至 2 月龄的毛竹实生苗进行处理,设置对照 (ck) 组观察取样,并 在处理后的 0、3、24 h 分别取样保存至-80 ℃ 液氮。

1.2 方法

1.2.1 目的基因克隆 对筛选得到的差异表达基因 *PhebHLH*6 进行克隆及表达模式分析。使用 Oligo 7 软件^[20] 设计蛋白编码区 (CDS) 全长引物,引物由杭

秋円¹² 取日编码区 (CDS) 至民引初, 引初田机 州有康生物科技有限公司合成, 引物序列参见表 1。 提取毛竹幼叶 RNA 并反转录为 cDNA 作为模板, 参考表 1 中引物进行 PCR 扩增。反应体系为 50.0 µL 体系: 2×Mix 为 25.0 µL, 10.0 µmol·L⁻¹上下游引物各 1.0 µL, cDNA 为 1.0 µL, ddH₂O 为 22.0 µL。PCR 反应 程序: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 34 个循环, 72 ℃ 延伸 5 min。将回收产物连接 pMD18-T 克隆载体并转化 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α , 菌检选取阳性克 隆送杭州有康生物技术有限公司测序。

表 1 基因克隆及表达所用引物序列

Table 1 Primers used in gene clone and quantitative real-time PCR									
用途	引物名称	引物序列(5'→3')							
	PhebHLH6-F	ATGGACGCGGACATGGGCGAC							
基因克隆	PhebHLH6-R	CTAATAGCTCATCGAGCTCGGG GGGCTTC							
实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)	Q-PhebHLH6-F	CGAGAAGCTATACGCGATCC							
	Q-PhebHLH6-F	CTGCAGCTGCTGGATGTAAT							
	Q-NTB-F	TCTTGTTTGACACCGAAGAGGA							
	Q-NTB-F	AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT							

1.2.2 生物信息学分析 将克隆获取的 PhebHLH6 蛋白序列,利用 ExPASy 的在线软件 Protparam (http://web.expasy.org/protparam/)和 ProtScale (https://web.expasy.org/protscale/)分别分析氨基酸理化性质和 蛋白的亲/疏水性。分别利用 PRABI 的 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page= npsa_sopma.Html)和 Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/interactive)进行蛋白二级、三级结构分析。蛋白保守结构域使用 NCBI Conserved Domain Database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)进行分析。根据拟南芥、水稻、玉米 Zea mays、二穗短柄草 Brachypodium distachyon、芸

香竹 Bonia amplexicaulis、瓜多竹 Guadua angustifolia、Olyra latifolia 和 Raddia guianensis^[21] 蛋白数据 库,进行 BLAST 序列比对,进一步比对得到 PhebHLH6 的同源基因氨基酸序列。利用 MEGA11.0 软件 Neighbor-Joining 算法,自检举 1 000 次,构建系统进化树。

1.2.3 启动子顺式作用元件分析 使用 TBtools^[22]软件提取基因 5'UTR 上游 2 000 bp 序列,并使用 PlantCARE 在线软件 (https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/htmL/) 对其进行分析,预测启动 子核心元件和基因结合位点。

1.2.4 组织表达特异性分析 参考毛竹 26个组织转录组数据,使用转录数据中的 FPKM 值并利用 TBtools 软件绘制热图,对 PhebHLH6 基因进行不同组织表达量分析。

1.2.5 非生物胁迫以及激素处理 毛竹种子采自广西桂林。将发芽的种子置于温度为(25±2)℃、相对湿度为(70±10)%的玻璃温室中,用1/4 霍格兰营养液水培,每周更换1次,培养至2月龄。分别设置对照、氯化钠(NaCl)、聚乙二醇(PEG)、水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)5个处理。分别使用200 mmol·L⁻¹ NaCl和质量分数为25%的PEG营养液进行盐和干旱胁迫。此外,分别采用1 mmol·L⁻¹和1 µmol·L⁻¹的SA和ABA营养液进行处理。在处理0、3、24h分别采集毛竹叶片,每个时间点采集3个生物学重复,液氮速冻,保存至-80℃冰箱以便后续分析使用。

使用 Primer 3 version 0.4.0 设计定量引物,将其在 NCBI (Primer designing tool)进行引物特异性分析。 实时荧光 PCR (RT-qPCR)反应体系如下: cDNA(已稀释)为1.0 µL,上、下游引物各 0.5 µL (10.0 µmol·L⁻¹), NovoStart®SYBR qPCR SuperMix plus (Novoprotein)为 5.0 µL, ddH₂O 为 3.0 µL。反应程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 循环; 72 °C 10 min。39 个循环,3 次重复。数据分析采用2^{- $\Delta\Delta Ct$}方 法^[23]。仪器为 CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)。内参基因为 *NTB* 基因^[24]。数据结果 采用 TBtools 软件绘制热图分析,以 10 为底取对数值。

2 结果与分析

2.1 PhebHLH6 基因克隆及序列分析

利用特异性引物进行 PCR 扩增,获得 PhebHLH6 编码氨基酸序列如图 1 所示。测序结果显示:编码 区序列长 801 bp,编码 266 个氨基酸。保守结构域分析结果表明: PhebHLH6 蛋白在 64~125 氨基酸位置 具有完整的 bHLH 保守结构域,说明该基因是典型的 bHLH 家族成员。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 PhebHLH6 蛋白特征及氨基酸序列分析 蛋白序列分析结果表明: PhebHLH6 的蛋白质分子量为 28.651 kDa,等电点为 5.04,平均疏水性为-0.102,蛋白质不稳定指数 55.58,脂肪指数为 88.83。上述结 果表明: PhebHLH6 蛋白为亲水性不稳定蛋白。二级蛋白结构预测结果显示: PhebHLH6 的蛋白二级结构占比分别为 α-螺旋 53.76%,β-转角 2.63%,延伸链 9.02%,无规则卷曲结构 34.59%。使用 SWISS-MODEL 在线比对蛋白序列,预测 PhebHLH6 蛋白的三级结构并建立空间模型,并与水稻 OsbHLH6 比较分析,发现其三级结构相似,功能可能较为保守。

2.2.2 PhebHLH6 启动子顺式作用元件分析 顺式作用元件分析结果表明 (表 2): PhebHLH6 启动子上游 2000 bp 除包含 TATA-box 和 CAAT-box 等核心启动元件外,还包含 ABRE 元件 (响应 ABA)、TGACG-motif [响应茉莉酸甲酯 (MEJA)]、CGTCA-motif (响应 MEJA)、TGA-element (响应生长素)、AAGAA-motif (响应 ABA)等一系列非生物胁迫及激素响应元件。上述结果表明: PhebHLH6 可能参与到了多种 非生物胁迫及激素响应途径中。

2.2.3 PhebHLH6多重序列比对及进化聚类分析 蛋白比对结果显示: PhebHLH6 与毛竹 PhebHLH6like 基因及水稻、拟南芥等物种同源基因的氨基酸序列相似,均具有完整的 bHLH 结构域,推测其可能 拥有相似的基因功能。为进一步探究 PhebHLH6 功能,本研究利用毛竹、水稻、拟南芥等 9 个物种的 bHLH6 同源蛋白序列构建生物进化树。如图 2 所示:毛竹 PhebHLH6 与其他 2 种木本竹同源基因的蛋白 聚在一起,2 种草本竹聚在一起,推测木本竹和草本竹在进化过程中功能出现了一定分化。此外,竹子 中的 bHLH 蛋白与水稻、玉米的蛋白以较高的置信度聚在一起,说明 bHLH 基因序列在进化方面较为保 守,其功能可能具有一定相似性。





Figure 1 Alignment of bHLH6 amino acid sequences from different species

表 2 PhebHLH6 基因启动子顺式作用元件分析

Table 2	Cis-element ar	nalvsis	of PhebHLH6	gene promoter
	cib element a		011 1000110110	gene promoter

作用元件	序列	数量	功能	作用元件	序列	数量	功能
ABRE	CACGTG	9	脱落酸响应元件	Sp1	GGGCGG	1	光响应元件
ARE	AAACCA	1	厌氧诱导顺式作用元件	chs-CMA2a	TCACTTGA	1	光响应元件
CAAT-box	CCAAT	15	启动子和增强子区域调控元件	TGA-element	AACGAC	2	生长素响应元件
CGTCA-motif	CGTCA	5	茉莉酸甲酯响应元件	O2-site	GATGATGTGG	1	玉米醇溶蛋白代谢调节元件
MRE	AACCTAA	1	光响应元件	TATA-box	TATA	35	核心启动子元件
G-Box	TACGTG	3	光响应元件	TGACG-motif	TGACG	5	茉莉酸甲酯响应元件

2.3 PhebHLH6 组织表达特异性分析

分析了 PhebHLH6 在毛竹 26 个组织中的表达水平 (图 3)。该基因在毛竹不同发育阶段的根、叶片、 芽和鞭中相对表达量都很低,在笋中相对表达量相对较高,其中 1.5 和 3.0 m 的笋顶部相对表达量最高,6.7 m 的笋各部位次之。此外,在鞭根和 3.0 m 高笋的侧芽中下部, PhebHLH6 也有一定的表达。

2.4 非生物胁迫以及激素处理下 PhebHLH6 表达模式

为探究 PhebHLH6 在非生物胁迫及激素处理下的表达模式,对2月龄毛竹实生苗进行了干旱胁迫、 盐胁迫、SA 和 ABA 处理,并通过荧光定量的方式对该基因相对表达量进行了检测(图 4)。PhebHLH6 基因对干旱和盐胁迫均具有强烈的响应,对SA 和 ABA 也有一定的应答作用。

2.4.1 PhebHLH6 应答非生物胁迫表达模式 如图 4 所示:干旱胁迫下,与 ck 相比, PhebHLH6 的相对 表达量呈先上升后下降趋势,处理 3 h 后相对表达量为未处理的 20 倍左右, 24 h 后相对表达量低于 ck,说明 PhebHLH6 在处理早期受到强烈诱导,处理后期诱导信号减弱。高盐处理下, PhebHLH6





在处理 3 h 后相对表达量明显上升,在处理 24 h 后 相对表达量有一定下降,但与 ck 相比,相对表达量 仍有极显著上调 (P<0.01),说明 PhebHLH6 持续被 高盐诱导,但在处理早期诱导程度高于后期。

2.4.2 PhebHLH6 应答激素处理表达模式 与 ck 相 比, PhebHLH6 在 SA 处理 3 h 后相对表达量升高 20 倍,呈现极显著上调趋势 (图 4, P<0.01)。在处 理 24 h 后,相对表达量呈下降趋势,说明 PhebHLH6 在处理后 24 h 期间持续被 SA 诱导,但诱导作用主 要发生于早期,在处理 24 h 后诱导作用有所下降。ABA 处理下, PhebHLH6 相对表达量前期有微弱上调, 24 h 相对表达量呈下降趋势,说明 ABA 在处理前期 对 PhebHLH6 诱导作用不强。



图4 非生物胁迫以及激素处理下 PhebHLH6 表达模式

Figure 4 Expression patterns of *PhebHLH*6 under abiotic stress and hormone treatment

3 讨论

有研究指出: bHLH 家族成员主要作用于植物的信号转导、生长发育及响应生物及非生物胁迫等重 要途径^[25]。竹子与水稻同为禾本科植物,进化关系较近,毛竹中很多基因功能研究往往参考水稻展 开^[1]。通过同源序列比对结果可知: PhebHLH6 与水稻同源基因蛋白序列相似度为 72.35%,序列相似度 很高,其功能可能具有相似性。HE 等^[26]研究发现:水稻 OsbHLH6 在嫩芽和根中特异性表达,其过表 达植株在低磷情况下比野生型拥有更长根系。PhebHLH6 在毛竹不同组织中的表达水平分析结果表明: 该基因在 1.5 和 3.0 m 的笋顶端表达量最高,推测该基因可能与毛竹笋芽顶端生长发育相关。

bHLH 家族成员在植物响应逆境胁迫中也发挥重要作用。如张子佳等^[27] 对水稻 bHLH 家族响应环境胁迫表达谱分析发现:大部分家族成员响应干旱胁迫和参与 ABA 调控途径。水稻中 OsbHLH148 可以通

过形成复合体的形式调控水稻抗干旱能力^[28]。OsbHLH6 (RERJ1) 通过在细胞核与细胞质间的移动,动态 调节水杨酸和茉莉酸 (JA) 激素信号来控制^[29]。OsJAZ9 作为 bHLH 家族的转录因子,通过与 OsNINJA 和 OsbHLH 蛋白形成转录调控复合物控制 JA 合成通路来调控植株的耐盐性^[30]。OsbHLH6 基因在 2004 年首次被鉴定为 JA 响应基因^[31],且研究发现该基因受外界伤害和干旱胁迫诱导表达上调^[32]。与之 相同的是,毛竹 PhebHLH6 也会受到干旱和盐胁迫的强烈诱导。此外,文献报道 OsbHLH6 可以通过动 态调节 SA 和 JA 信号通路来控制抗病能力^[28]。本研究表明:毛竹 PhebHLH6 受 SA 强烈诱导,在处理后 表达量极显著上升,与水稻中同源基因 OsbHLH6 表达模式一致,推测其可能具有功能相似性,但这些 推论还需进一步验证。

4 结论

本研究从毛竹中比对克隆得到1条 bHLH 同源基因,命名为 PhebHLH6。PhebHLH6 基因编码区长 度为 801 bp,编码 266 个氨基酸,序列包含完整的 bHLH 结构域,属于 bHLH 转录因子。组织特异性表 达水平表明:该基因主要在毛竹 1.5 和 3.0 m 笋顶端表达,推测其可能和毛竹生长发育相关。此外, PhebHLH6 对非生物胁迫和激素处理均有响应,其中受干旱、高盐胁迫以及 SA 激素处理强烈诱导,受 ABA 轻微诱导,表明 PhebHLH6 可能在植物逆境响应和激素初期信号转导中发挥着重要的作用。

5 参考文献

- [1] PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin, *et al.* The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nature Genetics*, 2013, **45**(4): 456 461.
- [2] 胡智勇. 毛竹的生物学特性及栽植技术[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(12): 117-118.
 HU Zhiyong. Biological characteristics and planting techniques of *Phyllostachys edulis* [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2014, 20(12): 117-118.
- [3] 徐秀荣,杨克彬,王思宁,等.毛竹bHLH转录因子的鉴定及其在干旱和盐胁迫条件下的表达分析[J]. 植物科学学报, 2019, 37(5): 610-620.

XU Xiurong, YANG Kebin, WANG Sining, *et al.* Identification of bHLH transcription factors in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and their expression analysis under drought and salt stress [J]. *Plant Science Journal*, 2019, **37**(5): 610-620.

- [4] 吕玉龙. 高温干旱对毛竹林的危害及抗旱经营措施建议[J]. 林业实用技术, 2014(8): 53-55.
 LÜ Yulong. Harm of high temperature and drought on moso bamboo forest and suggestions on drought resistance management [J]. *Practical Forestry Technology*, 2014(8): 53-55.
- [5] 毛美红, 丁笑章, 傅柳方, 等. 干旱对毛竹林新竹成竹影响的调查分析[J]. 世界竹藤通讯, 2012, 10(1): 12-15.
 MAO Meihong, DING Xiaozhang, FU Liufang, *et al.* Investigation of the effect of drought on new moso forest cultivation
 [J]. *World Bamboo and Rattan*, 2012, 10(1): 12-15.
- [6] CHEN Yiyun, LI Mengyao, WU Xuejun, *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): 1 – 12.
- [7] SONNENFELD M J, DELVECCHIO C, SUN Xuetao. Analysis of the transcriptional activation domain of the *Drosophila* tango bHLH-PAS transcription factor [J]. *Development Genes and Evolution*, 2005, 215(5): 221 – 229.
- [8] 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]. *The Plant Cell*, 2003, **15**(11): 2497 2502.
- [9] LI Xiaoqing, TANG Yuanping, YUAN Zheng, 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.
- [10] LEDENT V, VERVOORT M. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis
 [J]. Genome Research, 2001, 11(5): 754 770.
- [11] RIECHMANN J L, HEARD J E, MARTIN G, et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. Science, 2000, 290(5499): 2105 – 2110.
- [12] AN Jianping, LI Haohao, SONG Laiqing, *et al.* The molecular cloning and functional characterization of *MdMYC*2, a bHLH transcription factor in apple [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, **108**: 24 31.

- [13] KONDOU Y, NAKAZAWA M, KAWASHIMA M, et al. RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loophelix protein, expresses in endosperm to control embryo growth [J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(4): 1924 – 1935.
- [14] HEISLER M G, ATKINSON A, BYLSTRA Y H, et al. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein [J]. Development, 2001, 128(7): 1089 – 1098.
- [15] WANG Houping, LI Yang, PAN Jinjing, et al. The bHLH transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 are required for jasmonate-mediated inhibition of flowering in Arabidopsis [J]. Molecular Plant, 2017, 10(11): 1461 – 1464.
- [16] 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.
- [17] HEIM M A, JAKOBY M, WERBER M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genomewide study of protein structure and functional diversity[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5): 735 – 747.
- [18] FAN Yu, YANG Hao, LAI Dili, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the bHLH transcription factor family and its response to abiotic stress in sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench] [J/OL]. BMC Genomics, 2021, 22: 415[2022-07-30]. doi: 10.1186/s12864-021-07652-9.
- [19] ZHAO Hansheng, GAO Zhimin, WANG Le, et al. Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J/OL]. GigaScience, 2018, 7(10): giy115[2022-07-30]. doi: 10.1093/gigascience/ giy115.
- [20] RYCHLIK W. OLIGO 7 primer analysis software [J]. PCR Primer Design, 2007, 402: 35 59.
- [21] GUO Zhenhua, MA Pengfei, YANG Guoqian, *et al.* Genome sequences provide insights into the reticulate origin and unique traits of woody bamboos [J]. *Molecular Plant*, 2019, **12**(10): 1353 1365.
- [22] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194 – 1202.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2000, **25**(4): 402-408.
- [24] FAN Chunjie, MA Jinmin, GUO Qirong, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(2): e56573[2022-07-31]. doi: 10.1371/journal. pone. 0056573.
- [25] MAO Ke, DONG Qinglong, LI Chao, *et al.* Genome wide identification and characterization of apple bHLH transcription factors and expression analysis in response to drought and salt stress[J/OL]. *Front in Plant Science*, 2017, 8: 480[2022-07-30]. doi: 10.3389/fpls.2017.00480.
- [26] HE Qiuju, LU Hong, GUO Huaxing, *et al.* OsbHLH6 interacts with OsSPX4 and regulates the phosphate starvation response in rice [J]. *The Plant Journal*, 2020, **105**(3): 649 667.
- [27] 张子佳, 王迪, 傅彬英. 水稻转录因子bHLH家族基因响应环境胁迫表达谱分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 425-431.

ZHANG Zijia, WANG Di, FU Binying. Expression patterns of rice bHLH genes responsive to environmental stresses [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2008, **6**(3): 425 – 431.

[28] 李朝霞, 高强, 刘雅正, 等. 玉米 ZmPTF1 基因克隆和过表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(1): 92-96.

LI Zhaoxia, GAO Qiang, LIU Yazheng, *et al.* Cloning of *ZmPTF*1 from *Zea mays* and its over expression analysis [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2007, **33**(1): 92 – 96.

- [29] MENG Fanwei, YANG Chao, CAO Jidong, et al. A bHLH transcription activator regulates defense signaling by nucleocytosolic trafficking in rice [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62(10): 1552 – 1573.
- [30] WU Hua, YE Haiyan, YAO Ruifeng, *et al. OsJAZ9* acts as a transcriptional regulator in jasmonate signaling and modulates salt stress tolerance in rice [J]. *Plant Science*, 2015, **232**: 1 12.
- [31] KIRIBUCHI K, SUGIMORI M, TAKEDA M, *et al. RERJ*1, a jasmonic acid-responsive gene from rice, encodes a basic helix-loop-helix protein [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, **325**(3): 857 863.
- [32] KIRIBUCHI K, JIKUMARU Y, KAKU H, et al. Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(5): 1042 – 1044.