

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.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.022

## 银杏 bHLH 家族转录因子生物信息学及表达分析

冯磊<sup>1,2</sup>, 石元豹<sup>1,2</sup>, 汪贵斌<sup>1,2</sup>, 曹福亮<sup>1,2</sup>

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 以银杏基因组数据为基础, 对银杏 bHLH 转录因子进行筛选和分析, 从银杏基因组中鉴定出 72 条 bHLH 转录因子。进一步分析发现, 不同 bHLH 转录因子序列长度和分子量差异较大, 而理论等电点及亲水性等比较接近; 各家族成员均含有 N 端碱性氨基酸区和 C 端的螺旋-环-螺旋区; 该家族可分为 17 个亚家族, 相同亚家族成员保守基序的类型十分相似。通过启动子分析发现, 多数银杏 bHLH 基因启动子均含有光响应元件、激素响应元件和逆境胁迫响应元件等。表达分析结果显示, 有 7 条银杏 bHLH 基因的表达具有组织特异性, 有 6 条基因在各组织中表达水平都比较高, 预测其在银杏生物学过程中具有十分重要的作用。

**关键词:** 银杏; bHLH 转录因子; 进化分析; 表达分析

**中图分类号:** S792.95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0400-12

## Bioinformatics and expression analysis of transcription factors of ginkgo bHLH family

FENG Lei<sup>1,2</sup>, SHI Yuan-bao<sup>1,2</sup>, WANG Gui-bin<sup>1,2</sup>, CAO Fu-liang<sup>1,2</sup>

(1. Southern Modern Forestry Collaborative Innovation Center, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. School of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** Based on the genome data, the bHLH transcription factors (TFs) of ginkgo were screened and analyzed. At last, 72 bHLH TFs were identified from ginkgo genome. Further analysis revealed that the sequence length and molecular weight of different bHLH TFs were significantly different, while the theoretical isoelectric point and hydrophilic point were relatively close. Each bHLH member contained the N-terminal alkaline amino acid region and the C-terminal helix-loop-helix region. According to the evolution analysis results, all bHLH TFs could be divided into 17 subfamilies, and the same subfamily members were similar in the type of conservative motif. The promoter analysis results indicated that most ginkgo bHLH gene promoters contained light response elements, hormone response elements and stress response elements. The expression analysis results demonstrated that seven ginkgo bHLH genes were tissue-specific and six genes were highly expressed in all tissues, which predicted that they played a very important role in the biological process of ginkgo.

**Key words:** *Ginkgo biloba*; bHLH transcription factors; evolution analysis; expression analysis

bHLH (Basic helix-loop-helix) 转录因子是广泛存在于动、植物中的转录因子超家族, 因其“碱性螺旋-环-螺旋”保守结构域而命名<sup>[1]</sup>。鸟类成髓细胞癌病毒中的 *c-MYC* 原癌基因是第 1 个被发现的 bHLH 家族成员基因<sup>[2]</sup>, 之后该类型的基因又陆续在多种动、植物中被发现<sup>[3]</sup>。该家族蛋白质的 bHLH 保守结构域大约含有 60 个氨基酸, 其碱性区域分布在多肽链的 N 端, 并负责与特定 DNA 的顺时作用元件结合; HLH 区域位于 C 末端, 参与二聚

收稿日期: 2018-06-29

基金项目: 林业公益性行业科研专项重大项目 (201504105)

作者简介: 冯磊 (1993-), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 主要从事经济林栽培研究。 (E-mail) 2334734213@qq.com

通讯作者: 汪贵斌, (E-mail) gbwang@njfu.com.cn

体或者异二聚体的形成,从而行使其功能。

动物中 bHLH 家族数量较多,被分为 A~F 等 6 个组,共计 45 个家族<sup>[4]</sup>。与动物相比,植物中 bHLH 家族转录因子相对较少,而且大多数植物的 bHLH 蛋白在动物的该家族分类中属于 B 组<sup>[5]</sup>,根据植物中 bHLH 蛋白的序列同源性,又可将其分为不同的亚家族<sup>[5-6]</sup>。到目前为止,拟南芥中已鉴定的 bHLH 家族转录因子有 162 种,并且与水稻中的 bHLH 转录因子一起被分成了 25 个亚家族<sup>[7-9]</sup>。有学者对拟南芥、毛果杨、水稻、小立碗藓以及 5 种藻类的 bHLH 转录因子进行综合分析,并将其分成 32 个亚家族<sup>[10]</sup>。随着二代和三代测序技术的发展,苹果、梨、樱桃、西瓜、甘薯、大白菜等越来越多植物的 bHLH 家族转录因子被鉴定出来<sup>[11-17]</sup>。

植物中 bHLH 家族不但数量较多,还参与植物生长发育、形态建成、逆境胁迫和次生代谢调控等多种生物学过程<sup>[18-19]</sup>。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。拟南芥作为模式植物,其 bHLH 转录因子功能研究相对较多。有研究者发现 AtbHLH112 对抗盐、抗旱和抗渗透胁迫有正调控作用,但是对拟南芥根系的发育有抑制作用<sup>[20-21]</sup>。FIT 转录因子可与 AtbHLH38 和 AtbHLH39 共同调控拟南芥的铁代谢<sup>[22]</sup>。光敏色素作用因子 PIF4,也是一个 bHLH 家族成员,对光敏色素 B 的信号转导有抑制作用<sup>[23]</sup>。另外,研究者在西瓜基因组中共计鉴定出 96 个 bHLH 转录因子,并预测其中多个 bHLH 转录因子可能在低温、ABA 和盐胁迫中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。还有研究者发现水稻中 *OsBHLH1* 基因可能与其抗低温胁迫相关<sup>[24]</sup>。

银杏是原产中国的特色经济树种,栽培历史悠久,用途广泛,经济价值高,拥有中华树木“国宝”之称<sup>[25]</sup>。植物中的 bHLH 家族研究在近年来得到了快速发展,但是到目前为止,在银杏中被筛选出的 bHLH 转录因子并不多,仅有 1 条被命名为 bHLH91 的转录因子被克隆并进行了表达分析<sup>[26-27]</sup>。本研究通过生物信息学方法,在全基因组范围内对银杏 bHLH 转录因子家族成员进行分离鉴定,并对鉴定出的银杏 bHLH 转录因子进行理化性质、系统进化、启动子结构和基因表达等方面进行分析,为 bHLH 转录因子功能的解析提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 银杏 bHLH 家族的筛选

以 Pfam 数据库中 bHLH 家族的保守域 PF00010 为参考序列,用 HMMER 3.0 软件在测试银杏基因组库 (GigaDB, <http://gigadb.org/dataset/100209>) 中进行检索。检索得到的序列用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线程序进行保守域预测,去除假阳性序列<sup>[28]</sup>。将预测的具有 bHLH 保守域的序列作为银杏 bHLH 家族候选转录因子,用于后续分析。

### 1.2 银杏 bHLH 家族的理化性质及保守域和保守基序分析

bHLH 家族候选蛋白质的氨基酸数、分子量、理论等电点等理化性质用在线软件 ExPASy 中的 ProtParam 模块 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行分析。用 DNAMAN (Lynnon Corporation, USA) 对银杏 bHLH 家族候选基因编码的保守氨基酸序列进行多序列比对,并用 MEME 在线程序 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 进行氨基酸的保守基序分析<sup>[29]</sup>。

### 1.3 银杏 bHLH 转录因子家族的进化分析

从 PlantTFDB 数据库 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 中下载拟南芥 bHLH 转录因子序列作为参考,每个亚家族分别下载 1~4 条,共下载了 49 条 AtbHLH 家族转录因子<sup>[30]</sup>。将银杏候选 bHLH 蛋白序列与 24 个 AtbHLH 参考序列用 MUSCLE 法进行多序列比对,截取 bHLH 保守域序列并用软件 MEGA5.0 的 Neighbor-Joining 邻接法构建进化树,校验参数 Bootstrap 重复 1 000 次<sup>[31]</sup>。

### 1.4 银杏 bHLH 转录因子家族基因结构分析

从银杏基因组数据库中提取筛选出 bHLH 基因 CDS 序列对应的基因组序列,用 GSDS 2.0 在线程序绘制基因外显子-内含子模式图。

### 1.5 银杏 bHLH 家族基因的启动子分析

从银杏基因组数据库中截取银杏 bHLH 家族基因成员起始密码子上游 2 000 bp 序列作为启动子区,利用植物顺式作用元件数据库 SOGO (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?sid=&lang=en&pj=640&action=page&page=newplace#opennewwindow>) 分析基

因的顺式作用元件。

### 1.6 银杏 *bHLH* 家族基因表达分析

银杏基因表达数据下载于 GigaDB, 通过 Heatmap 2.0 作图, 对采集于浙江省天目山的银杏胚(雌树)、雄蕊(雄树)和幼苗(茎和叶混合样)的 *bHLH* 基因表达进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 银杏 *bHLH* 转录因子筛选与理化性质分析

根据 Pfam 数据库 *bHLH* 家族的保守域 PF00010 特征文件, 在银杏基因组数据库中共检索到 133 条可能的 *bHLH* 转录因子序列。候选序列用 NCBI-CDD 和 SMART 在线程序对保守结构域进行检测, 剔除结构域不完整的序列, 最后得到 72 个银杏 *bHLH* 转录因子家族成员。这些成员在 GigaDB 数据库中的登录号见表 1。

利用 ExPASy 在线程序对银杏 *bHLH* 蛋白质的理化特性进行分析。由表 1 可见, 银杏 *bHLH* 转录因子家族成员蛋白质氨基酸序列含有氨基酸数目为 181~1 471, 平均值为 498; 预测其分子量为  $2.022 0 \times 10^4 \sim 1.614 1 \times 10^5$ , 平均值为  $5.524 0 \times 10^4$ ; 理论等电点在 4.75 至 9.38 范围内。从整体看, 有 64% 的银杏 *bHLH* 家族蛋白质等电点小于 7, 等电点在酸性范围内, 蛋白质分子中富含酸性氨基酸。蛋白质疏水性分析结果表明, 72 条序列的疏水性均小于 0, 说明银杏 *bHLH* 蛋白质均为亲水蛋白质, 但是不同蛋白质之间亲水性存在差异。另外, 银杏 *bHLH* 蛋白质含有大量脂肪族氨基酸, 其中脂肪族氨基酸指数最大的是 Gb\_15579。

### 2.2 银杏 *bHLH* 转录因子保守域分析

利用 DNAMAN 9.0 对银杏 *bHLH* 家族蛋白质保守域进行多序列比对, 发现银杏 *bHLH* 家族保守域长度多数在 60 个氨基酸左右, 其中最长的有 69 个氨基酸, 最短的有 51 个氨基酸(图 1)。在结构域序列保守性方面, 除了 Loop 区没有保守位点, 其他区域都有不同数量的保守位点。在银杏 *bHLH* 蛋白质的保守域中共有 24 个位点上保守氨基酸的出现频率高于 50%, 与其他植物类似, 其中谷氨酸 Glu-12、精氨酸 Arg-13、精氨酸 Arg-15、精氨酸 Arg-16、亮氨酸 Leu-26、脯氨酸 Pro-32、酪氨酸 Tyr-65、亮氨酸 Leu-69 保守性均高于 86%, 其中精氨酸 Arg-15、精氨酸 Arg-16 保守性为 100%。

表 1 银杏中 *bHLH* 转录因子的理化性质

Table 1 The physicochemical properties of *bHLH* transcription factors in ginkgo

蛋白质	氨基酸数	分子量 ( $\times 10^4$ )	理论 等电点	脂肪族氨 基酸指数	蛋白质疏水 性平均值
Gb_30387	691	7.496	7.11	61.51	-0.640
Gb_32265	743	8.419	6.17	84.99	-0.490
Gb_21415	727	8.151	5.68	77.92	-0.514
Gb_19402	464	5.205	6.56	76.25	-0.779
Gb_01625	1 471	16.141	4.75	69.78	-0.528
Gb_36294	630	7.072	6.39	75.81	-0.564
Gb_28786	585	6.563	6.17	75.16	-0.575
Gb_13867	831	8.894	6.49	61.05	-0.583
Gb_10001	732	8.070	4.97	75.83	-0.440
Gb_07156	753	8.006	6.30	64.24	-0.475
Gb_17737	822	9.187	5.51	70.71	-0.611
Gb_35259	250	2.830	4.78	76.08	-0.572
Gb_26391	351	3.884	5.14	80.85	-0.418
Gb_26399	536	5.988	6.49	76.47	-0.521
Gb_04727	1 315	14.845	8.65	88.40	-0.184
Gb_15579	212	2.393	8.85	99.76	-0.309
Gb_20754	335	3.656	6.50	69.67	-0.515
Gb_28850	520	5.608	7.15	60.21	-0.648
Gb_13728	413	4.547	6.36	78.89	-0.429
Gb_40304	394	4.336	6.51	73.58	-0.525
Gb_18877	627	6.791	5.76	72.70	-0.581
Gb_05320	585	6.220	6.75	63.23	-0.694
Gb_37017	558	6.054	6.29	65.23	-0.596
Gb_22201	557	5.889	6.55	67.15	-0.597
Gb_12744	333	3.612	7.71	80.03	-0.471
Gb_04341	245	2.810	5.07	89.92	-0.571
Gb_27302	239	2.636	8.88	73.05	-0.477
Gb_30839	641	7.105	6.99	73.93	-0.493
Gb_27869	372	4.056	6.71	62.77	-0.513
Gb_12264	750	8.350	7.73	71.56	-0.464
Gb_15096	573	6.418	5.12	72.37	-0.685
Gb_06182	287	3.158	8.56	61.81	-0.634
Gb_15442	651	7.344	9.38	88.80	-0.296
Gb_22275	403	4.561	6.79	82.46	-0.499
Gb_20300	488	5.360	6.41	78.79	-0.550
Gb_13550	538	5.910	6.52	60.04	-0.619
Gb_39491	248	2.857	9.05	74.31	-0.583

续表 1 Continued 1

蛋白质	氨基酸数	分子量 ( $\times 10^4$ )	理论 等电点	脂肪族氨 基酸指数	蛋白质疏水 性平均值
Gb_35908	553	6.216	7.67	84.41	-0.301
Gb_24992	619	6.764	6.45	65.56	-0.616
Gb_17233	484	5.420	5.18	75.21	-0.549
Gb_21105	469	5.269	5.26	73.86	-0.573
Gb_10697	338	3.770	6.87	77.28	-0.547
Gb_05277	262	3.035	5.34	90.73	-0.646
Gb_36369	332	3.740	7.61	67.65	-0.681
Gb_37668	273	3.067	6.31	89.41	-0.382
Gb_39758	611	6.537	8.12	56.69	-0.631
Gb_12493	1 269	14.054	8.93	87.49	-0.130
Gb_37667	288	3.254	7.07	90.45	-0.392
Gb_05276	188	2.181	5.05	76.76	-0.856
Gb_32351	471	5.290	5.47	77.24	-0.629
Gb_41424	236	2.637	6.14	65.00	-0.743
Gb_05232	1 335	14.697	4.96	77.62	-0.467
Gb_31785	266	3.026	6.25	83.57	-0.423
Gb_05233	181	2.022	6.5	95.86	-0.234
Gb_33185	371	4.072	8.06	64.42	-0.701
Gb_09710	373	4.261	7.74	75.60	-0.636
Gb_07223	472	5.214	9.28	76.29	-0.442
Gb_01096	377	4.207	5.61	88.99	-0.389
Gb_10570	285	3.227	9.28	86.88	-0.272
Gb_40829	422	4.713	6.12	64.00	-0.764
Gb_05307	438	4.777	8.16	68.81	-0.671
Gb_29750	432	4.818	9.36	71.20	-0.464
Gb_33928	390	4.488	6.49	82.03	-0.650
Gb_19517	303	3.462	8.49	87.79	-0.541
Gb_20471	234	2.623	6.35	61.84	-0.790
Gb_31175	280	3.166	9.35	81.82	-0.424
Gb_33765	287	3.243	5.82	92.72	-0.196
Gb_13123	340	3.845	7.12	79.76	-0.524
Gb_26737	279	3.170	8.90	90.47	-0.347
Gb_26735	312	3.492	6.37	85.58	-0.376
Gb_31407	254	2.947	7.75	94.92	-0.461
Gb_11960	304	3.462	6.59	85.59	-0.395

## 2.3 银杏 bHLH 转录因子系统发生树分析

根据预测到的银杏 bHLH 蛋白质和随机选择的拟南芥 bHLH 各亚家族蛋白质保守结构域氨基酸序列的相似性,利用 MEGA 5.1 构建系统发育树。参考拟南芥和水稻的 bHLH 家族转录因子的亚家族分类结果<sup>[9]</sup>,预测得到的银杏 72 个 bHLH 转录因子和随机选择的拟南芥 bHLH 转录因子被分成了 21 个亚家族,其中第 II、Va、VI 和第 X 亚家族只含有拟南芥 bHLH 转录因子。也就是说,银杏的 72 个 bHLH 转录因子被分成了 17 个亚家族(图 2)。在所有含有银杏 bHLH 蛋白质的 17 个亚家族中,第 Ib 亚家族中的银杏 bHLH 成员数量最多,共 16 个;第 IVb、VIIIc、IVc、Vb、XI 和 IX 亚家族中的成员数量相对较少,数量仅为 1~2 个。根据进化树分类结果以及各亚家族某些成员在模式植物拟南芥和水稻中的作用,初步判断银杏 bHLH 蛋白质的功能。比如 Ia 亚家族蛋白质可能与细胞分裂和器官分化相关,Ib 亚家族蛋白质可能与铁代谢调控相关,IIIb 亚家族可能在植物的抗低温胁迫中起重要作用等<sup>[32]</sup>。银杏 bHLH 转录因子在其各种生理过程中的具体功能,还需要进一步研究。

## 2.4 银杏 bHLH 转录因子保守基序分析

为了进一步研究银杏中 bHLH 蛋白质结构的多样性,通过 MEME 在线程序对银杏 72 个 bHLH 蛋白质进行保守基序(Motif)分析,识别获得 20 个保守基序(图 3)。由图 3 可见,属于同一个亚家族的 bHLH 基因家族成员有着十分相似的 Motif 类型和数量,但同时同一个亚家族成员的 Motif 模式也存在差异。在所有保守基序中,Motif 1、Motif 2 和 Motif 12 是 bHLH 蛋白质保守结构域的特征保守基序。在所有银杏 bHLH 蛋白质中,序列 Gb\_31407 的 Motif 类型最为简单,仅有 2 个成员,最复杂的是 IIIId+e 亚家族成员,其 Motif 数量为 9~10 个,且该亚家族成员除 Gb\_31407 没有 Motif 13 以外,各成员含有的 Motif 类型完全相同。有一些 Motif 具有亚家族特异性,比如 Motif 15、Motif 16 和 Motif 18 仅在亚家族 Ib 中含有;Motif 17 是 IVd 亚家族特有的保守基序;而 Motif 8 和 Motif 11 只在亚家族 IId+e 被发现;XII 亚家族中特有的 Motif 有 4 个,分别是 Motif 7、Motif 9、Motif 19 和 Motif 20。



Gb_01096	VESQRKTHIEVERFRKCMNEHLNVLRSIMERSYI.....PRGDCASIIGCAIDIVKELEISL	58
Gb_01625	RSFVTEISNQSERFRDRINEKMSLRLLIEDCSK.....SDKASVIDEAIYELKMLQIQV	56
Gb_04341	QPTSLSKNVDAERNFRKKNLSLYALRAVVENISK.....MDKASIVKLAAGYIVDLKKQV	56
Gb_04727	GREEPINHVEAERQPREKLNCKFYELRAVVENVSK.....MDKASLIGLAVTYITLLRSKQ	56
Gb_05232	TPSHRCMHGCTERFRHAMNEMLTTLHSLLE.DFPR.....KADKITIVDEAINYIKSLQIM	57
Gb_05233	.....MHICNERVFRANKMSTLHSHLE.GFHG.....KANKITIVDEAIAVYIKSLQSIM	51
Gb_05276	VECKTCRNLSERKFRQKLNETLYKLRAAVEKISK.....MNKQSIIVSLAISYVLELQKEE	56
Gb_05277	VECKQSRNLYSERKFRQKLNETLYKLRAAVEKISK.....MNKQSIIVSLAISYVLELQKEV	56
Gb_05307	ITARKVLKADREKFRDRLENEQFSELGSALCPDRP.....KNDKATIIIGLAVQILQILTAEV	57
Gb_05320	RGCATCPHSIAERLFRERIAERMALQELVENSNN.....TDKASMLDEIIEYVVKFLQIQV	56
Gb_06182	QKLSVCPQSIAARHFRHRISKRFRVQLSMVEGGSK.....MDTASMLDEAIQYVVKFLKMQI	56
Gb_07156	RSFAAEVHNQSERFRDRINEKMFALQELIENCNK.....SDKASMLDEAIEYVVKFLQIQV	56
Gb_07223	RGEATLHSLAERFAFRKIKERMRLLEELVGGCHKA.....SGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	57
Gb_09710	QDFAAFHMHIAERNFRVVKLCHFSSLSLLEN.NT.....KKDKHSIILNATRYLNLKLHI	56
Gb_10001	GREEPINHVEAERQPREKLNCRFYALRAVVENVSK.....MDKASLIGLAVTYITLLRSKQ	56
Gb_10570	EPFMRENHSLSERFRKCMNERLIALQSLLEFVMCP.....KNNRIIIEASRNYYIIMLIAQL	58
Gb_10697	TQIQRENHILAEIRFREEMNEKFSVLSRFVEKP.....IKKDKASIVGETIDYVTEMERTL	56
Gb_11960	EISQRETHIQSERFRKCMNHLFERMRSLL.NASQ.....KVNIIICRYLILIIPESLPIHG	57
Gb_12264	VRISSCPQTVAARQFRERISHRIRILQRLVGGTK.....MDTASMLDEAVNYLKFELKMQV	56
Gb_12493	RGCATLHSLAERFRERKISERMKFLQLLVGCSKV.....TGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	57
Gb_12744	AAAPASKSHSEARFRERINSHLATLRTLLSTTK.....TDKASLIAEVIDHVKDLKRRRA	56
Gb_13123	GLSGRIDHILREFRPDIMS YKFMLEALLERR.....PKRDRIATVDCAINFVTEMQKTL	56
Gb_13550	RGCATLHSLAERFRERKINERMKFLQLLVGCSKV.....TGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	57
Gb_13728	TLGHTCDHIMAEKFRKLSQRFIALSAVIEGLKK.....MDKASVIGLAIYVVKFLQIRL	56
Gb_13867	RSFAAEVHNQSERFRDRINEKMFALQELIHCNK.....SDKASMLDEAIEYVVKFLQIQV	56
Gb_15096	NKQFQAKNIMAEFRFRKRLNERLCMLRSVVTISK.....MDRTSIIISDTIDYMKELLQCV	56
Gb_15442	VSSSQVHMISERKFRKLEKESFCALRSLLP.ST.....RKDKASVIATREYLGSLLSRV	56
Gb_15579	KRSKLSKNVVSERFRQFMNKLTYLRLALVEKISK.....MDKASIIALADYVDELKNQV	56
Gb_17233	VESQRMTHIAVERFRKCMNEHLNVLRSIMESSFI.....QRGDCASIIGCAIDFVKELECLL	58
Gb_17737	GRLEPINHVEAERQPREKLNCRFYALRAVVENVSR.....MDKASLIGLAVTYITLLRSKQ	56
Gb_18877	KKGLFAKNIMAEFRFRKLNRLYMLRSVVEKISK.....MDRASIIIGLAIYVVKFLQIRI	56
Gb_19402	QDELNVHVIARFRFRKLNRFIVLRSVLFVTK.....MDKASIIIGLAIYVVKFLRRRT	56
Gb_19517	LKYSKEKLFAERQFRKFMKLLFTTLKSVLE.SAHL.....RLDKCSLLEETYNIGFLQIDL	57
Gb_20300	RGCATLHSLAERFAFRKISERMKFLQLLVGCSKV.....TGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	57
Gb_20471	SCSRAGTKACREKFRDRLNCRFMELSAILEPGKPP.....KTDKATIIICDTLSVMNQLRALA	58
Gb_20754	ALPASKSHSEARFRERINSHLATLRTLLSTTK.....TDKASLIAEVIDHVKDLKRRRA	56
Gb_21105	VESQRMTHIAVERFRKCMNEHLNVLRSIMEGSYI.....QRGDCASIIGCAIDFVKELECLL	58
Gb_21415	QDLSVSHVMAERFRERKLNRFIVLRSVLFVTK.....MDKASIIIGDTIEYVVKFLERRV	56
Gb_22201	RGCATLPHSIAERLFRERIAERMALQELVENSNN.....TDKASMLDEIIVYVVKFLQIQV	56
Gb_22275	TTSKRHNHVLSEFRQFMNKSFAFRMRSLL.NFDQ.....KIDKATIVFEMINYYIQTLLQHV	57
Gb_24992	RGCATLHSLAERFRERKISERMKFLQLLVGCSKV.....TGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	57
Gb_26391	GRSAVAKNIVSERFRKLNRLYALRALVELISK.....MDKASIVGLAIRYIQLQKQV	56
Gb_26399	GRSAESKTLISERFRGRNLRLYTLRALVEKITK.....MDKASIVGLAIRYIQLQKQV	56
Gb_26735	ANSNGNIHKLIERRFRNMRLTYLSTLSLLEENLKACYSLSHLSFTGKRSLSQIQEVVNYIYQLEKKV	69
Gb_26737	CNSRNVRKVIERRFRNMKALYSVLSLIEESIK.....GKRSLSQIQEAINYIHHLLKRV	59
Gb_27302	SKLSVCPQSVAARHFRHRISKRFRKILQKLVGGTK.....MDTASMLDEAIQYVVKFLTKQI	56
Gb_27869	VKISKCPQSVAARHFRERISERIRILQRLVGGTK.....MDTASMLDEAIHYVVKFLKMQV	56
Gb_28786	GREEPINHVEAERQPREKLNCRFYALRAVVENISK.....MDKASLIGLAIYVVKFLQKQV	56
Gb_28850	RGCATPHRSIAERFRTRISERMKFLQELVENMCKQ.....TNTAEMLEAVDYIKFLQIQV	57
Gb_29750	RGCATLHSLAERFAFRKINERMKFLQLLVGCSYKA.....FAKTVIIIEIINYVVALRNQV	57
Gb_30387	RSFAAAVHNQSERFRDRINEKMFALQELIENSCK.....TDKASMLDEAIEYVVKFLKHLQAL	56
Gb_30839	QGSACCPQSVAARHFRERISERLKLQLLVGCSK.....VDLVIMLEKAINYVVKFLQIQV	56
Gb_31175	ATNKQRIHFAVERFRQEMKTYLCRLSLLEENIK.....GKRSISDQILEAVGYIKHLQKQV	59
Gb_31407	KATRNQRIVFSQLEFRRVGGLFAALESLE.IEAN.....KVARYGLIETCKYIHNLSQL	57
Gb_31785	IPERDCSASFALQFRKFMNCLFTTLKSLLE.SALP.....KDRCGLIEETCNIRKIQIDL	57
Gb_32265	RNCFNAGHVLAERFRERKLNRFIVLRSVLFVTK.....ADKASIIEDTIDYVVKFLQKQV	56
Gb_32351	VESQRMTHIAVERFRKCMNEHLNVLRSIMEGSYV.....QRGDCASIIGCAIEFVRELECLL	58
Gb_33185	RGCATLHSLAERFRERKISERMKFLQLLVGCSKV.....TGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	57
Gb_33765	VSMKKLCHNANERFRKKNLSLYSKMQSLLEDPN.....RKRKLSIESTVCRVLKVIPELRNQI	59
Gb_33928	LTTKKLSHNANERFRKKNLVLSKLSLLEATSAFI.....TKKKLSIFAVVCRVLKVIPELRKQI	62
Gb_35259	DCIMSFKNSFRERFRNLRLYALRAIVTISK.....MSKASIIIGCAINYIQLQKQV	56
Gb_35908	EISQRETHIQSERFRKCMNHLFERMRSLL.NASQ.....KADKSTIVSEIINYIQLSHLQV	57
Gb_36294	GREEPINHVEAERQPREKLNCRFYALRSVVENISK.....MDKASLIGLAIYVVKFLQKQL	56
Gb_36369	RGEATLHSLAERFAFRIRERMFLRLVGGCSNK.....VTGKAVMLDEIINYVQSLQKQI	58
Gb_37017	RGCATPHRSIAERFRTRISERMKFLQELVENMCKQ.....TNTAEMLEAVDYIKFLQKQV	57
Gb_37667	SNKIAIHHVIAERFRKCMNHIFSLRALLPLNP.....KKSRTATIIILQTKYLIQKMKRI	57
Gb_37668	SNKIAIHHVIAERFRKCMNHIFSLRALLPLNP.....KKSRTATIIILQTKYLIQKMKRI	57
Gb_39491	PQNKRRHATVAEKFRERINLALFALQSRLE.NSII.....KDRCGLIEETCNIRKIQIDL	57
Gb_39758	RGCATNSHSLAERFRERKISERMKFLQLLVGCSKV.....TGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	57
Gb_40304	KNGMFAKNIMAEFRFRKLNRLYMLRSVVEKISK.....MDRASIIIGLAIYVVKFLQIRI	56
Gb_40829	RGCATLHSLAERFRERKISERMKFLQLLVGCSKVNAGVHF..IQITGKAVMLDEIINYVQSLQKQV	67
Gb_41424	LSSGPGTKACREKFRDRLNCRFMELSSVLEPGRPP.....KTDKATIIICFARVNLQRAEA	58

图1 银杏 bHLH 家族蛋白质保守结构域分析

Fig.1 Conservative domain structures analysis in ginkgo bHLH proteins



图2 银杏 bHLH 蛋白质家族的系统进化树分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of bHLH proteins from ginkgo

## 2.5 银杏 bHLH 家族基因的基因结构分析

运用 GSDS 2.0 软件绘制银杏基因内含子-外显子结构图并对其结构进行分析和整理。由图 4 可知,银杏 bHLH 基因家族分为内含子富集和内含子缺失 2 类,其中 *Gb\_06182*、*Gb\_11960*、*Gb\_12264*、*Gb\_17737*、*Gb\_27302*、*Gb\_27869*、*Gb\_28786*、*Gb\_36294* 无内含子,*Gb\_39491*、*Gb\_37668*、*Gb\_37667*、*Gb\_31785*、*Gb\_20754*、*Gb\_12744*、*Gb\_10001*、*Gb\_*

*05276* 仅 1 个内含子,以上成员均属于内含子缺失组;*Gb\_30839* 含 9 个内含子(占比 1%),*Gb\_15442*、*Gb\_39758* 含 8 个内含子(占比 3%),*Gb\_40829*、*Gb\_36369*、*Gb\_33185*、*Gb\_32265*、*Gb\_30387*、*Gb\_29750*、*Gb\_24992*、*Gb\_13867*、*Gb\_13550*、*Gb\_12493*、*Gb\_07223* 含 7 个内含子(占比 15%),*Gb\_65320*、*Gb\_07156*、*Gb\_20300*、*Gb\_21415*、*Gb\_22201* 含 6 个内含子(占比 7%),*Gb\_37017*、*Gb\_28850* 含 5 个内含子

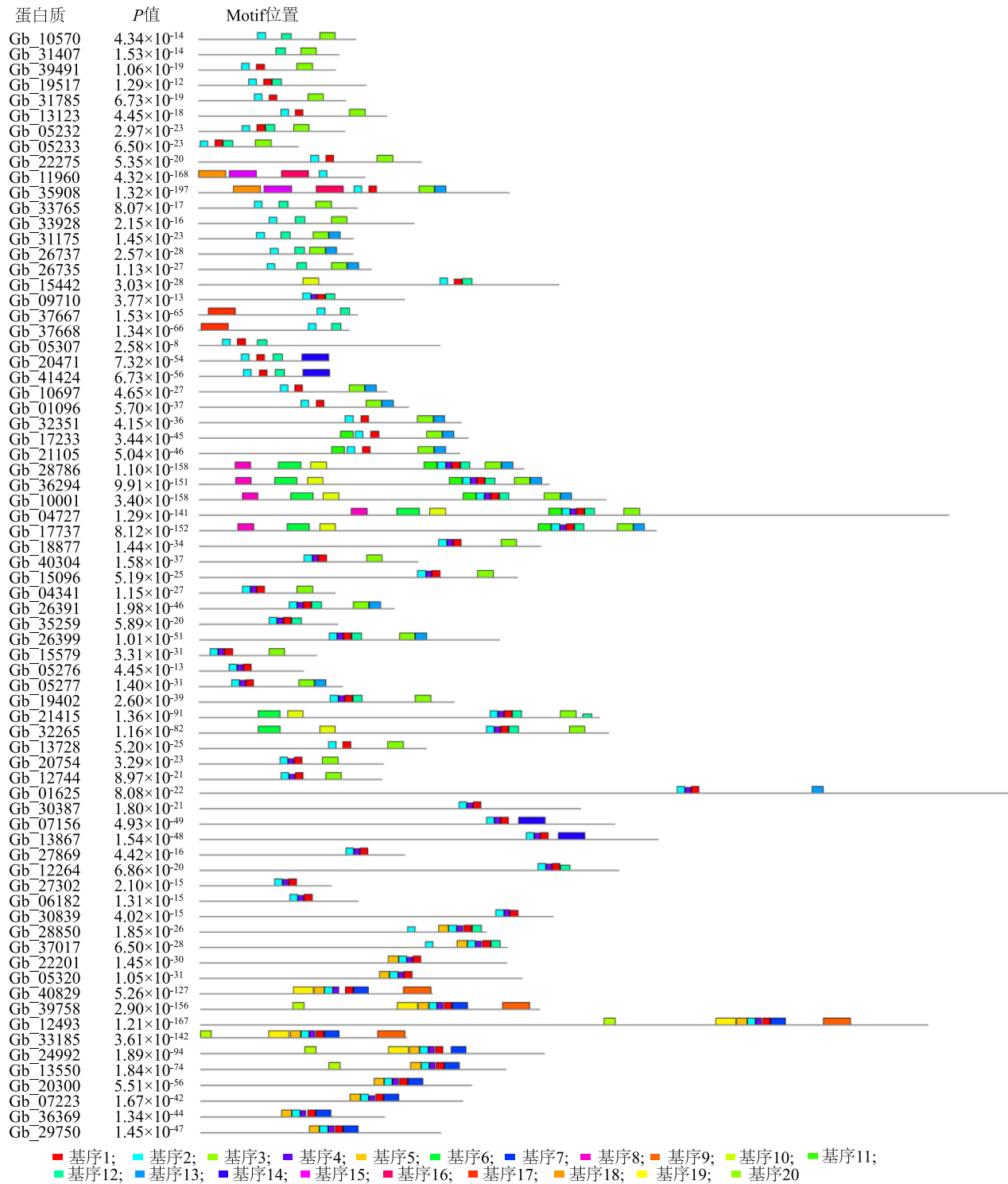


图3 银杏中 bHLH 转录因子预测的 Motif 分布图

Fig.3 Predictive motif information of bHLH transcription factor in ginkgo

(占比3%),以上成员均属内含子富集组。其中含有2个内含子的 *bHLH* 基因17个,所占成员总数比例最多,达24%。此外,基因结构分析结果表明,银

杏 *bHLH* 基因家族各成员基因长度具有明显的差异。其中最短的 *Gb\_05276* 只有859 bp;而 *Gb\_01625* 序列最长,达到了257 612 bp。



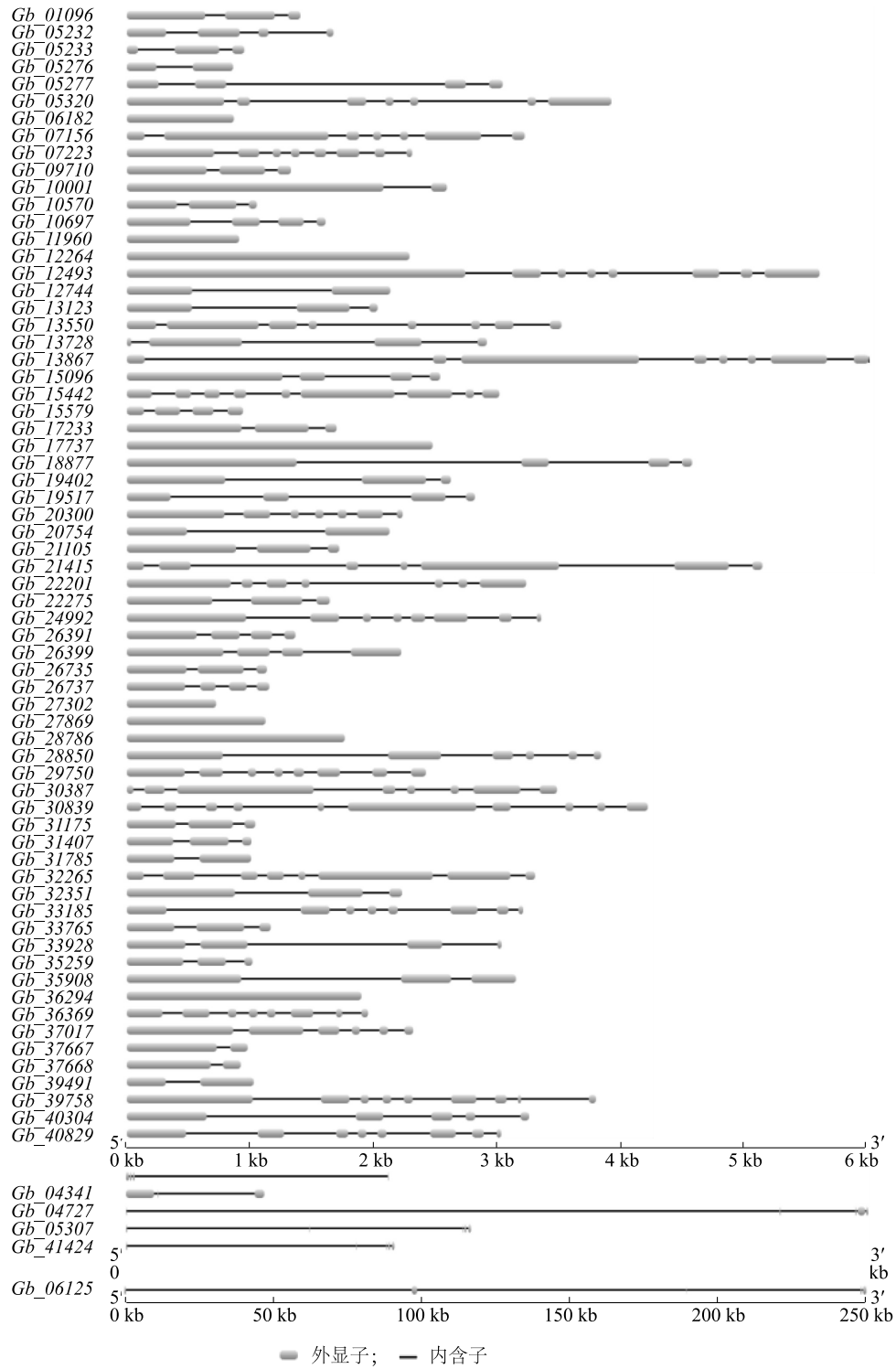


图4 银杏 *bHLH* 家族基因外显子与内含子基因结构分布  
Fig.4 The distribution of exon and intron gene of bHLH transcription factor in ginkgo

2.6 银杏 *bHLH* 家族基因启动子分析

银杏 *bHLH* 基因启动子序列分析结果(表2)显示,72 个 *bHLH* 基因的启动子调控区域均含有与光

调控、脱落酸、叶肉特异性表达、花粉特异性表达、茎特异性表达有关的转录因子作用元件,例如 GT1CONSENSUS、EBOXBNNAPA、CACTFTPPCA1、



POLLEN1LELAT52 和 NODCON2GM。统计结果表明,有 63%和 79%的银杏 *bHLH* 基因成员含有植物生长激素响应元件(ARFAT 和 NTBBF1ARROLB),65%的 *bHLH* 基因含脱落酸响应元件(ABRELATERD1),71%和 68%的 *bHLH* 基因含有赤霉素响应元件(GAREAT 和 CAREOSREP1),57%的 *bHLH* 基因含有乙烯响应元件(ERELEE4),92%的 *bHLH* 基

因含有与根瘤菌有关的特异性保守序列响应元件(NODCON1GM),96%的 *bHLH* 基因含有胁迫响应元件(CCAATBOX1),99%的 *bHLH* 基因含有疾病防御响应元件(BIHD1OS),97%的 *bHLH* 基因含有糖响应元件(WBOXHVIS01),57%的 *bHLH* 基因含有种子特异性表达元件(SEF1MOTIF)。说明各 *bHLH* 基因的表

表 2 银杏 *bHLH* 基因家族启动子保守顺式元件

Table 2 Conservative cis-elements of *bHLH* genes in ginkgo

元件名称	核心序列	出现频率 (%)	特性
ARFAT	TGTCTC	63	植物生长素、植物生长激素
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	79	植物生长素、植物生长激素
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	69	植物生长素、植物生长激素
ABRELATERD1	ACGTG	65	ABA(脱落酸)
EBOXBNNAPA	CANNTG	100	ABA(脱落酸)
GAREAT	TAACAAR	71	GA(赤霉素)
CAREOSREP1	CAACTC	68	GA(赤霉素)
ERELEE4	AWTTCAAA	57	Ethylene(乙烯)
WBOXATNPRI	TTGAC	99	Stress(非生物胁迫)
NODCON1GM	AAAGAT	92	根瘤菌有关的特异性保守序列、在植物细胞被感染后对基因转录起调节作用
CCAATBOX1	CCAAT	96	胁迫响应元件
BIHD1OS	TGTCA	99	疾病防御响应
GT1CONSENSUS	GRWAAW	100	光响应
WBOXHVIS01	TGACT	97	糖响应
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	85	生物钟
CACTFTPPCA1	YACT	100	叶肉特异性表达相关元件、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶相关元件
POLLEN1LELAT52	AGAAA	100	花粉特异性表达、花药生长相关元件
SEF1MOTIF	ATATTTAWW	57	种子特异性表达元件
NODCON2GM	CTCTT	100	茎特异性表达相关元件

出现频率是指含有该顺式作用元件的基因数量与 *bHLH* 总数的比值。

## 2.7 银杏 *bHLH* 家族基因表达分析

从银杏基因组数据库中下载基因表达数据,将其中 *bHLH* 基因的表达数据用 heatmap 2.0 作图(图 5)。由图 5 可知,在银杏所有 *bHLH* 家族基因中有 8 个在胚、雄蕊和幼苗 3 个器官中都没有检测到表达,另外有 7 个基因的表达具有组织特异性。由图 5 可以看出,在胚中表达水平较高的有 *Gb\_20471* (36.86)、*Gb\_41424* (81.93) 和 *Gb\_15579* (40.27),另外 *Gb\_05307*、*Gb\_28786* 和 *Gb\_01625* 表达量(*RPKM* 值)也达到 10 以上;雄蕊中表达量超过 10 的基

因有 19 个,需要特别指出的是 *Gb\_41424* 和 *Gb\_15579* 基因的表达量分别高达 79.48 和 297.03,而且 *Gb\_15579* 在 3 个样品中表达量都比较高,在雄蕊中表达量是所有测试基因中表达最高的;在银杏幼苗中表达量超过 10 的基因有 17 个,其中 *Gb\_20471*、*Gb\_41424*、*Gb\_21105* 和 *Gb\_15579* 的表达量分别高达 36.61、57.86、64.26 和 70.70。总体来看 *Gb\_20471*、*Gb\_41424*、*Gb\_28786* 和 *Gb\_15579* 在 3 个样品中表达水平都比较高。其中 *Gb\_28786* 和 *Gb\_15579* 分别属于 IIIId+e 和 IIIa+c 亚家族,可能参

与银杏中茉莉酸代谢的调控;*Gb\_20471* 和 *Gb\_41424* 属于 IVc 亚家族,可能参与植物金属稳态的调节。

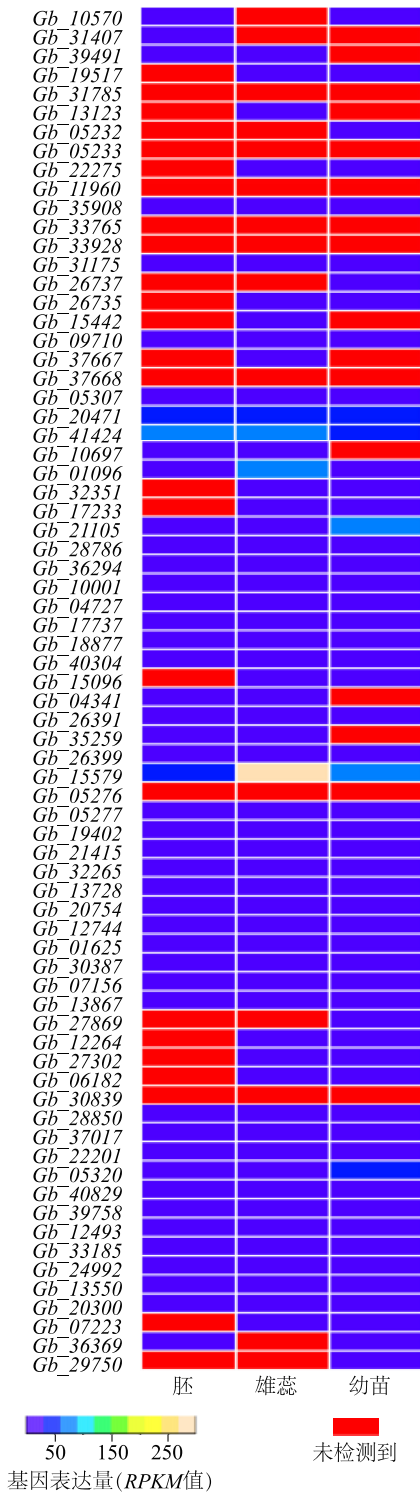


图 5 银杏不同组织 *bHLH* 基因的表达模式  
Fig.5 Expression patterns of the ginkgo *bHLH* genes in different tissues

3 讨论

本研究通过对银杏全基因组进行搜索,最终筛选出了 72 个 *bHLH* 基因,并且对它们的理化性质、保守结构域、基因结构、系统进化和基因表达等情况进行了详细的分析。银杏 *bHLH* 转录因子的保守区域中有 His、Glu、Arg 和 Leu 等高度保守的氨基酸残基<sup>[33]</sup>。通过系统发育分析可将银杏和拟南芥的 *bHLH* 成员分为 21 个亚家族<sup>[11,34-35]</sup>。本研究对筛选的银杏 *bHLH* 的表达模式进行了分析,发现有些基因在胚(雌树)、雄蕊(雄树)和幼苗(茎和叶混合样)3 种样品中都未被检测到表达,可能这些基因在特定时间或某种胁迫条件下才会表达。还有些基因的表达具有组织特异性,也有几个基因在 3 种样品中的表达水平都比较高,说明有些 *bHLH* 基因在某些特定组织中才会发挥作用,也有些基因在所有组织中都发挥作用。

近年来,*bHLH* 转录因子在植物次生代谢调控中的作用受到许多研究者的关注,相关研究取得很大进展。Gonzalez 等<sup>[36]</sup> 和 Xie 等<sup>[37]</sup> 发现了多个 *bHLH* 转录因子与拟南芥花青苷代谢相关。Dombrecht 等<sup>[38]</sup> 和 Schweizer 等<sup>[39]</sup> 还发现多个 *bHLH* 转录因子在黄酮代谢中发挥重要调控作用。此外,*bHLH* 家族转录因子还在吡啶类生物碱代谢、糖苷生物碱代谢、紫杉烷类代谢、异喹啉类生物碱代谢和萜类代谢等多种植物代谢途径中被发现<sup>[40-41]</sup>。黄酮和萜类是银杏中主要的药用成分,其代谢通路中多数关键基因已经被研究,但是其转录调控研究还在摸索阶段。*bHLH* 转录因子在银杏黄酮和萜类代谢中的调控作用是将来研究的一个重要方面。

总之,转录因子是一类重要的基因调控蛋白质,生物体的一系列生理生化活动都离不开转录因子的调节,它不仅可以调节生物体的新陈代谢和生长发育,而且在响应外界胁迫方面也起着重要的作用<sup>[42]</sup>。本研究利用生物信息学方法,对银杏 *bHLH* 基因家族进行了系统深入的分析,为未来的基因克隆提供了丰富的资源,可为将来深入研究该家族基因的表达调控、结构和功能等提供参考。

参考文献:

[1] BUCK M J, ATCHLEY W R. Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins [J]. J Mol Evol, 2003, 56(6):742-750.

- [2] MURRE C, MCCA W P, BALTIMORE D. A new DNA binding and dimerizing motif in Immunoglobulin enhancer binding, Daughterless, MyoD, and Myc proteins[J]. Cell, 1989, 56(5): 777-783.
- [3] 王勇江,陈克平,姚勤. bHLH 转录因子家族研究进展[J]. 遗传, 2008, 30(7): 821-830.
- [4] 王勇,姚勤,陈克平. 动物 bHLH 转录因子家族成员及其功能[J]. 遗传, 2010, 34(4): 307-330.
- [5] 刘晓月,王文生,傅彬英. 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.
- [6] ATCHLEY W A, 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.
- [7] TOLEDO O G, HUQ E, QUAIL P H. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family (w) [J]. Plant Cell, 2003, 15(8): 1749-1770.
- [8] BAILEY P C, MARTIN C, TOLEDO O G, et al. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in Arabidopsis thaliana [J]. The Plant Cell, 2003, 15(11): 2497-2501.
- [9] LI X, DUAN X, JIANG H, et al. Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix transcription factor family in rice and arabidopsis1 [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [10] CARRETERO P L, GALSTYAN A, ROIG V I, et al. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae1 [J]. Physiologia Plantarum, 2010, 153(3): 1398-1412.
- [11] 杨金华. 苹果 bHLH 转录因子家族的鉴定及表达分析 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2017.
- [12] 李晓刚,李慧,杨青松,等. 杜梨 bHLH 转录因子家族两成员的序列特征及对非生物胁迫的转录响应[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(22): 40-45.
- [13] 李永强,应朱,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(14): 1-13.
- [14] 黄宁,刘朋,霍俊伟,等. 蓝果忍冬果实花青素含量及合成相关基因表达分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(7): 1139-1147.
- [15] 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.
- [16] 裴苓荃. 甘薯 bHLH 基因家族的鉴定与初步分析 [D]. 徐州:江苏师范大学, 2017.
- [17] SONG X M, HUANG Z N, DUAN W K, et al. Genome-wide analysis of the bHLH transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2014, 289(1): 77-91.
- [18] 王翠,兰海燕. 植物 bHLH 转录因子在非生物胁迫中的功能研究进展[J]. 生命科学研究, 2016, 20(4): 358-364.
- [19] 刘文文,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.
- [20] WANG W S, ZHU J, LU Y T. Overexpression of AtbHLH112 suppresses lateral root emergence in Arabidopsis [J]. Functional Plant Biology, 2014, 41(4): 342-352.
- [21] LIU Y, JI X, NIE X, et al. Arabidopsis AtbHLH112 regulates the expression of genes involved in abiotic stress tolerance by binding to their E-box and GCG-box motifs [J]. New Phytologist, 2015, 207(3): 692-709.
- [22] YUAN Y, WU H, WANG N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis [J]. Cell Res, 2008, 18(3): 385-397.
- [23] HUQ E, QUAIL P H. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis [J]. The EMBO Journal, 2002, 21(10): 2441-2450.
- [24] WANG Y J, ZHANG Z G, HE X J, et al. A rice transcription factor OsbHLH1 is involved in cold stress response [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(8): 1402-1409.
- [25] 曹福亮. 中国银杏 [M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2002: 406.
- [26] 何昌文,朱丽,沈珊,等. 银杏 bHLH91 转录因子基因的克隆及表达分析[J]. 广西植物, 2018, 38(2): 202-209.
- [27] LIN X, ZHANG J, LI Y, et al. Functional genomics of a living fossil tree, Ginkgo, based on next-generation sequencing technology [J]. Physiol Plant, 2011, 143(3): 207-218.
- [28] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015 [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(D1): 257-260.
- [29] BAILEY T L, WILLIAMS N, MISLEH C, et al. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(suppl\_2): 369-373.
- [30] JIN J, TIAN F, YANG D C, et al. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): 1040-1045.
- [31] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [32] NIU X, GUAN Y, CHEN S, et al. Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors in *Brachypodium distachyon* [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 619.
- [33] 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.
- [34] 陈媿颖,刘娟,袁媛,等. 黄芩 bHLH 转录因子基因家族生物信息学及表达分析[J]. 中草药, 2018, 49(3): 671-677.
- [35] 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.
- [36] GONZALEZ A, ZHAO M, LEAVITT J M, et al. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb tran-

- scriptional complex in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant J*, 2008, 53(5):814-827.
- [37] XIE Y, TAN H, MA Z, et al. DELLA proteins promote anthocyanin biosynthesis via sequestering MYBL2 and JAZ suppressors of the MYB/bHLH/WD40 complex in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(5):711-721.
- [38] DOMBRECHT B, XUE G P, SPRAGUE S J, et al. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(7):2225-2245.
- [39] SCHWEIZER F, FERNANDEZ-CALVO P, ZANDER M, et al. *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(8):3117-3132.
- [40] GOOSSENS J, MERTENS J, GOOSSENS A. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(6):1333-1347.
- [41] PATRA B, PATTANAIK S, SCHLUTTENHOFER C, et al. A network of jasmonate-responsive bHLH factors modulate monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *New Phytol*, 2018, 217(4):1566-1581.
- [42] Arce A L, Cabello J V, Chan R L. Patents on plant transcription factors [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2008, 2(3):209-217.

(责任编辑:张震林)