

青钱柳 bHLH 基因家族的鉴定及盐胁迫响应分析

张子洁

南京林业大学, 南京, 210037

摘要:【目的】在青钱柳全基因组范围内鉴定 bHLH 家族成员, 分析基因和蛋白序列结构特点及在盐胁迫下的表达特征, 筛选响应盐胁迫的 *bHLH* 基因, 为进一步研究它们在盐胁迫响应分子途径中的功能提供参考, 以期推动青钱柳耐盐性遗传育种的进展, 为在东南沿海盐碱区发展青钱柳人工林提供理论依据。【方法】利用 bHLH 蛋白序列的隐马尔科夫模型 (pfam00010) 鉴定具有特定保守结构域的 *bHLH* 基因, 对获得的青钱柳 *bHLH* 基因利用 MEGA X、ClustalX、TBtools、GSDS2.0、MEGA、MEME、CD-Search 等软件进行基因结构、定位分析、蛋白理化性质、序列特征分析以及进化树构建, 及蛋白互作网络分析。采用一年生青钱柳幼苗进行盐胁迫水培实验, 并提取叶 RNA 进行转录组测序分析青钱柳 *bHLH* 基因在盐胁迫下的表达特征, 筛选重点基因。随后对两年生青钱柳幼苗进行土培盐胁迫实验, 采取叶片对筛选出的差异表达基因进行 qPCR 分析。【结果】共鉴定到 159 个 bHLH 基因, 根据其在染色体上的位置将其命名为 CpbHLH1~159。159 个 bHLH 基因个在各染色体上均有分布, 内含子数目在 1~28 之间, 蛋白分子质量在 10.45~175.49 kDa 之间。所有 CpbHLH 均含有保守的 bHLH 结构域。根据进化树分析将 159 个 *bHLH* 基因分为 26 个亚类, 根据命名法命名为 Ia~XV 亚类。基于对保守基序和内含子/外显子的分析, 结果显示系统发育进化树相同亚家族中的 *CpbHLHs* 在遗传和基序结构上相似, 进一步证实了系统进化树分类的准确性。GO 分析和启动子结构分析表明 CpbHLH 蛋白可能具有多种生物学功能, 并鉴定出大量响应胁迫的顺式作用元件。根据转录组分析筛选 12 个高度响应盐胁迫的基因。通过 qRT-PCR 分析及蛋白互作网络预测最终筛选出 3 个响应盐胁迫的候选基因。【结论】基于青钱柳的全基因组, 本研究系统地鉴定了 159 个青钱柳 *bHLH* 基因, 将其分为 26 个亚家族。除了研究它们的结构和 DNA 结合能力外, 还进行了盐处理下盆栽和水培实验的基因表达和调控网络分析, 以筛选出高度响应青钱柳盐胁迫的基因。通过盆栽实验 PCR 实验和蛋白质相互作用网络分析, 共筛选出 12 个候选基因, 进一步证实其中 3 个基因 (*CpbHLH36/68/146*) 参与调控青钱柳的耐盐性。我们的研究结果不仅为进一步了解 bHLH 转录因子的调控机制提供了基础, 而且为青钱柳耐盐性的遗传改良提供理论依据。

关键词: 青钱柳; bHLH 家族基因; 盐胁迫; 基因表达; 蛋白调控网络。

Genome-wide identification of bHLH transcription factors and their response to salt stress in *Cyclocarya paliurus*

Zijie Zhang

Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037

Abstract:

As a highly valued and multiple function tree species, the leaves of *Cyclocarya paliurus* are enriched in diverse bioactive substances with healthy function. To meet the requirement for its leaf production and medical use, the land with salt stress would be a potential resource for developing *C. paliurus* plantations due to the limitation of land resources in China. The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor protein family, the second largest protein family in plants, has been found to play essential roles in the response to multiple abiotic stresses, especially salt stress. However, the *bHLH* gene family in *C. paliurus* has not been investigated. In this study, 159 *CpbHLH* genes were successfully identified from the whole-genome sequence data, and were classified into 26 subfamilies. Meanwhile, the 159 members were also analyzed from the aspects of protein sequences alignment, evolution, motif prediction, promoter cis-acting elements analysis and DNA binding ability. Based on transcriptome profiling under a hydroponic experiment with four salt concentrations (0%, 0.15%, 0.3%, and 0.45% NaCl), 9 significantly up- or down-regulated genes were screened, while 3 genes associated with salt response were selected in term of the GO annotation results. Totally 12 candidate genes were selected in response to salt stress. Moreover, based on expression analysis of the 12 candidate genes sampled from a pot experiment with three salt concentrations (0%, 0.2% and 0.4% NaCl), *CpbHLH36/68/146* were further verified to be involved in the regulation of salt tolerance genes, which is also confirmed by protein interaction network analysis. This study was the first analysis of

the transcription factor family at the genome-wide level of *C. paliurus*, and our findings would not only provide insight into the function of the *CpbHLH* gene family members involved in salt stress but also drive progress in genetic improvement for the salt tolerance of *C. paliurus*.

Key words: Wheel wingnut, *bHLH* family genes, salt tolerance, expression analysis, regulation network

植物不断受到环境胁迫的挑战, 据估计, 高达 70% 的植物会受到各种的非生物胁迫的影响。其中盐胁迫是影响植物生长的主要非生物胁迫之一, 影响了 83.1 亿 hm^2 的土地 (Mantri *et al.*, 2012a)。为了维持植物的正常生长和生存, 植物通过转录因子调控许多基因来调节生理生化过程以应对外部环境的变化。研究发现 6 个主要的转录因子家族 (TFs) 在植物对各种非生物胁迫的抗性中具有重要的调节功能, 包括 MYBs、bHLHs、ERFs、DREBs、WRKYs 和 bZIPs. (Kavas *et al.*, 2016)。据报道, bHLH 转录因子广泛存在于所有真核生物中, 是植物中数量第二多的 TF 家族, 而 bHLH 成员具有高度保守的 bHLH 结构域, 由两个功能不同的区域组成, 大约有 60 个氨基酸。基本区位于 n 端, 包含约 10-17 个氨基酸和一个结合位点, 用于结合特定的 E-box (CANNTG) DNA 序列。相反, 在 c 端, 螺旋-环-螺旋 (HLH) 区域由大约 40 个氨基酸组成, 作为二聚化结构域, 负责促进蛋白质之间的二聚化 (Atchley *et al.*, 1999)。由于结合序列的多样性, 动物 bHLH 转录因子被分为 6 组, 而植物 bHLH 蛋白的分类尚未确定, 但根据目前的研究, 建议将其分类为 15-32 组 (Pires and Dolan, 2010)。

多年来, 许多植物 bHLH 蛋白已被鉴定和系统分析。此外, 一些关于 bHLH 蛋白作用的研究表明, 植物 bHLH 家族参与了的许多过程, 包括花青素生物合成, 植物生长发育和胁迫反应 (Babitha *et al.*, 2013)。其中, bHLH 蛋白通过结合下游基因启动子调节胁迫耐受性的功能已经在 bHLH 蛋白中得到了很好的证明。例如, *MdbHLH104* 被认为通过快速结合 *MdAHA8* 启动子的 P3 顺式作用元件来响应苹果的缺铁胁迫 (Zhao *et al.*, 2016), 而 *ICE1* (*AtbHLH116*) 可以通过激活冷响应 (*COR*) 基因的表达来提高拟南芥的耐寒性 (Chinnusamy *et al.*, 2003)。

青钱柳 (*Cyclocarya paliurus*) 是核桃科的一种多功能树种 (Fang, 2022)。虽然现在自然分布在中国的亚热带山区, 但其在北美、欧洲和东亚都有很长的果实化石记录, 而在北美和欧洲则在新生代灭绝 (Manchester *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2017)。青钱柳叶在中国被用作茶叶、传统食品和药物已有数千年的历史 (Fang *et al.*, 2006), 2013 年起被国家卫生和计划生育委员会列为新型食品原料。许多研究表明, 青钱柳叶提取物具有抗氧化活性、抗增殖活性和抗糖尿病活性 (Kurihara *et al.*, 2003;), 一些从叶子中提取的产品已经被开发出来并投入市场。但目前, 青钱柳资源主要分布在天然林中, 人工林只能建立在土壤较深疏松、排水良好、湿润肥沃的场地上, 导致其叶片数量无法满足市场需求。因此, 由于中国土地资源有限, 在沿海盐碱地等有潜力的土地资源上进行定向培育, 以满足其产叶和药用的需要, 是一种可行的选择。然而, 到目前为止, 还没有系统地在青钱柳全基因组中鉴定出转录因子家族。本研究全面系统地分析了 159 个青钱柳 bHLH 转录因子, 鉴定出了一些与耐盐性相关的重点基因。本研究结果不仅有助于深入了解青钱柳 bHLH 基因家族成员参与盐胁迫的功能, 同时, 也推动了用遗传手段改良青钱柳耐盐性的进展, 为在东南沿海盐碱区发展青钱柳人工林提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验在南京林业大学白马实验基地 (北纬 $31^{\circ}35'$, 东经 $119^{\circ}09'$) 进行。2018 年 10 月, 在广西壮族自

治区的金钟山 (北纬 24°58', 东经 110°09') 采集了青钱柳的种子。经外源赤霉素分层处理后, 于 2019 年 4 月将发芽的种子播种在无纺布容器 (高 10.0cm, 直径 8.0cm) 中。

水培试验: 3 个月后, 选择株高为 40±2.79 cm 的均匀苗, 移栽至聚丙烯容器 (50 L) 内, 用 1/2 的 Hoagland's 营养液 (pH 6.0±0.2) 处理。水培移植后两周, 在完全随机设计中实施四种盐浓度 (0% , 0.15% , 0.3% 和 0.45% NaCl) 处理, 每种处理具有三个生物学重复。

盆栽试验: 2020 年初春, 在无纺布容器中生长一年后, 将幼苗移栽到 25cm 高、20cm 直径的大型无纺布容器中, 修剪成 3-5cm 高。2022 年 2 月, 选择大小相似的树苗, 将所有树干修剪至 120cm 高, 2022 年 4 月初, 选择的树苗从无纺布容器中移植到含泥炭:珍珠岩基质:腐烂鸟粪:土壤=5:2:2:1(v/v/v/v)的塑料盆 (高 26 cm, 顶部直径 26 cm, 底部直径 20 cm) 内。土壤为壤土, pH 为 6.4, 土壤全氮、全磷和全钾含量分别为 79.7、66.5、2.40 和 9.7g·kg⁻¹。

盐处理于 2022 年 5 月初进行, 采用完全随机设计, 每个处理 3 个重复, 每个重复 6 个植株。建立了三个水平的 NaCl 浓度: CK (对照组, 蒸馏水), T1 (0.2% NaCl) 和 T2 (0.4% NaCl)。1L 溶液每三天逐步加入土壤中, 同时监测基质中的电导率, 以保持土壤盐分浓度相对稳定。在处理 45 天, 从每株采样树的上部、中部和下部分别收集 6 片完整和成熟的叶片, 并立即在液氮中冷冻并储存在-80℃的环境中, 直到需要进一步分析。

1.2 *CpbHLH* 基因的鉴定与序列分析

青钱柳的全基因组数据由本课题组提供, 已上传到 Genome Sequence Archive (GSA) 资料库 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa>)。从 Pfam 数据库(30.0 版本)获得 HLH 结构域(PF00010)的隐马尔可夫模型(HMM), 并被用作查询全基因组中具有默认 E 值的所有蛋白质序列, 并通过 HMMER 软件(<http://hmmer.org/>) 鉴定具有特定保守结构域的基因。将所有筛选的序列与在线工具 Batch CD-search、Pfam 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 进行比对和检查, 以验证保守的 bHLH 结构域的存在。使用 ExPASy 软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分别获取这些 bHLH 基因的基本物理和化学特征。

1.3 基因结构、保守序列和启动子分析

通过 TBtools 软件(版本 1.098774)可视化 *CpbHLH* 基因的外显子/内含子结构, 而使用在线软件 MEME (<http://MEME-suite.org/>) 获得 15 个保守基序 (识别基序的上限为 20, 最小基序宽度为 6, 最大基序宽度为 50, zoops)。使用在线工具 PLACE 分析 *CpbHLH* 基因的顺式作用元件。

2.4 RNA-seq 数据分析、GO 注释和蛋白质相互作用网络预测

原始数据通过水培实验中不同盐浓度处理的叶片的 RNA 测序获得。为了进一步分析所有转录组数据, 收集每百万个映射读数中来自于每千碱基长度的读数 (RPKM) 或每千个碱基转录每百万映射读取的碎片数(FPKM)>1 的 *CpbHLHs*。运行 TBtools 以产生热图。GO 分析由 Blast2GO 程序进行, 选择 NCBI 数据库作为参考数据库。结果分为三类, 即分子功能、生物过程和细胞组分。使用 NCBI 数据库 (<https://www.NCBI.nlm.nih.gov/>) 搜索 *AtbHLHs* 的功能, 这些功能被预测为 *CpbHLHs* 的同源基因。STRING (<https://STRING-db.org/>) 被用来预测的候选基因的相互作用网络。

2.5 RNA 提取及实时荧光定量 RT-PCR 分析

使用 Trizol 试剂盒从 3 个处理的 9 个样品 (CK、0.2% NaCl、0.4% NaCl) 中提取 RNA, 随后, 按照制造商的说明使用试剂盒 (MonScript RTIII All-in-One Mix) 提取 cDNA。qRT-PCR 分析在 Biosystems™ 7500 实时 PCR 系统上进行。使用 Primer Premier 6.0 设计 12 个基因的 qRT-PCR 引物。应用 SYBR PreMix Ex Taq 试剂盒进行 qRT-PCR 分析。分别以 20 倍稀释的 cDNA 和 *18sRNA* 基因作为模板和内标。PCR 反应

条件为：95℃反应 3min，95℃变性 5s，60℃反应 30s，循环 40 次。每个样品使用三个技术和生物学重复。反应后，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因和内参照基因的相对表达水平。

2.6 数据处理

单因素方差分析 (ANOVA) 用于鉴定处理间相关基因表达的显著差异，然后进行邓肯多重比较检验。所有统计分析均使用 IBMSPSS Statistics Version 进行。数据以平均值±标准差(SD)表示。

2 结果与分析

2.1 *CpbHLH* 基因的鉴定与序列分析

利用默认参数的 HMMER 软件，基于 *C. paliurus* 的全基因组数据，共发现 174 个 *CpbHLH* 蛋白。随后运用 SMART 和 CD-Search 软件确认 bHLH 保守结构域的存在。去除冗余序列后，获得了 159 条具有典型完整 bHLH 结构域的青钱柳 bHLH 蛋白序列，并根据其在染色体上的位置将其命名为 *CpbHLH1* 至 *CpbHLH159* (图 1)。序列分析表明，*CpbHLH* 蛋白平分子量(Nw)范围为 10454.72 Da (*CpbHLH39*) ~ 175494.7 Da (*CpbHLH86*)，等电点(pI)范围为 4.65 (*CpbHLH48*) ~ 9.66 (*CpbHLH66*)。

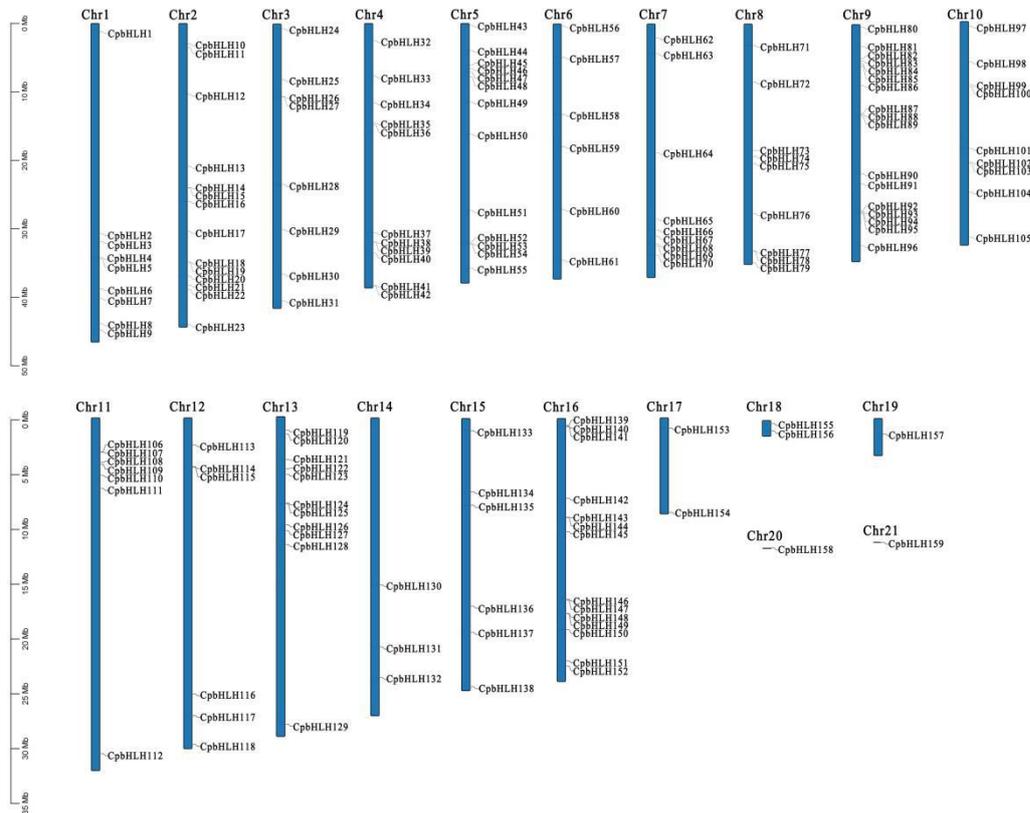


图 1 青钱柳 bHLH 基因在染色体上的分布。

Fig. 1 Chromosomal locations of the *CpbHLH* genes.

159 个 *CpbHLH* 基因根据其位置分布在青钱柳 21 条染色体上。The 159 *CpbHLH* genes were distributed on 21 pseudo-chromosomes of *C. paliurus* based on their physical positions.

3.2 *CpbHLH* 基因的保守结构域分析及 DNA 结合能力预测

为了深入了解 *CpbHLH* 的功能，我们搜索了 *CpbHLH* 蛋白的 bHLH 结构域，并基于多序列比对分析了保守氨基酸残基的存在。如图 2 所示，*CpbHLH* 结构域由 4 个保守区组成，即 1 个基本区域、

2 个螺旋区和 1 个环区。与前人的研究一致 (Heim *et al.*, 2003), 基本区域和螺旋区的保守性高于环区。青钱柳 bHLH 结构域由 79 个氨基酸残基组成, 其中 24 个是高度保守的(保守率>50%)和 8 个极端保守(保守率>50%)。在 24 个高度保守的氨基酸残基中, 在碱性区域发现 6 个保守残基 (His-9、Ala-12、Glu-13、Arg-14、Arg-16、Arg-17), 在第一螺旋区发现 7 个保守残基 (Ile-20、Asn-21、Arg-23、Leu-27、Leu-30、Val-31、Pro-32), 在环区发现 1 个保守残基 (Asp-64), 在第二螺旋区发现 10 个保守残基 (Lys-65、Ala-66、Ser-67、Leu-69、Ala-72、Ile-73、tyrr -75、Val-76、Lys-77、Leu-79)。

一般认为基本区域具有 DNA 结合功能, 是 bHLH 家族实现其生物学功能的关键区域(Carretero-Paulet *et al.*, 2010)。因此, 根据基本区的保守氨基酸残基预测了 159 个 CpbHLH 蛋白的 dna 结合能力(补充表 S3)。根据之前报道的分类方法(Katiyar *et al.*, 2012), 将剩余的 159 个 CpbHLH 成员分为 G-box (His/Lys-9、Glu-13 和 Arg-17)、E-box (Glu-13 和 Arg-16)和 non-E-box (Glu-13 和 Arg-16 不同时出现) 三类。预测结果显示, 159 个 CpbHLHs 中存在 93 个 G-box 结合蛋白, 43 个非 G-box 结合蛋白和 23 个非 E-box 结合蛋白。

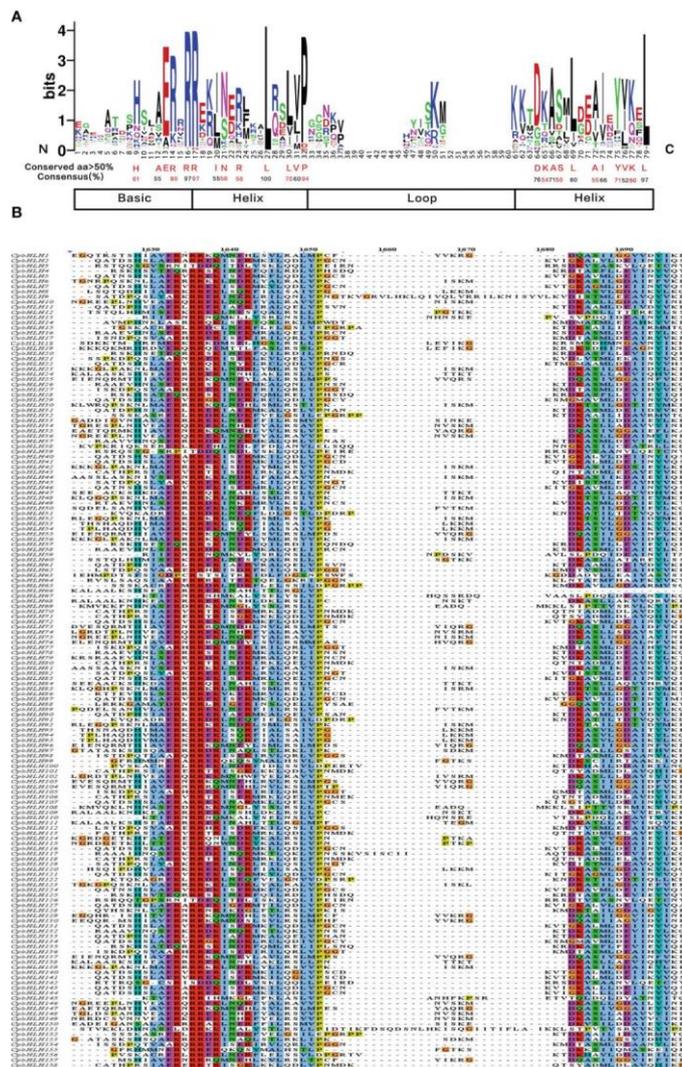


图 2 青钱柳 bHLH 蛋白的 bHLH 结构域的多序列比对。

Fig. 2 Multiple sequence alignments of the bHLH domains in CpbHLH proteins.

(A) CpbHLH 蛋白 bHLH 结构域的保守氨基酸可视化。保守度大于 50 的氨基酸及其保守度用红色和黑色标记, 没有特殊意义。(B) 159 个 CpbHLH 蛋白的 bHLH 结构域的多个序列比对, 使用 Clustal

配色方案。(A) Visualization of conserved amino acids of bHLH domains of CpbHLH proteins. Amino acids with a conserved degree of more than 50 and their conserved degree were labeled using red and black colors for easy recognition which had no special meaning. (B) Multiple sequence alignments of the bHLH domains of 159 CpbHLH proteins, using the Clustal color scheme.

3.3 CpbHLH 基因的系统发育分析及分类

为了探索 CpbHLH 成员之间的进化关系，我们将 159 个 CpbHLH 蛋白与拟南芥中的 140 个 bHLH 蛋白进行比对，然后根据比对结果构建 299 个 bHLH 蛋白的系统发育树(图 3)。根据拟南芥和其他植物 bHLH 蛋白的分类，299 条 bHLH 蛋白序列被分为 26 个亚科，从 Ia 到 XV 命名。图 4 显示，最大的是 XII 亚家族(含有 35 个 CpbHLH 蛋白)，而最小的亚家族(VI)只含有 1 个 CpbHLH 蛋白。根据 Heim et al. (Heim et al., 2003)的研究结果，同一亚家族的 CpbHLH 蛋白具有相似的功能，因此系统发育树的聚类结果有助于预测 CpbHLH 蛋白的功能。

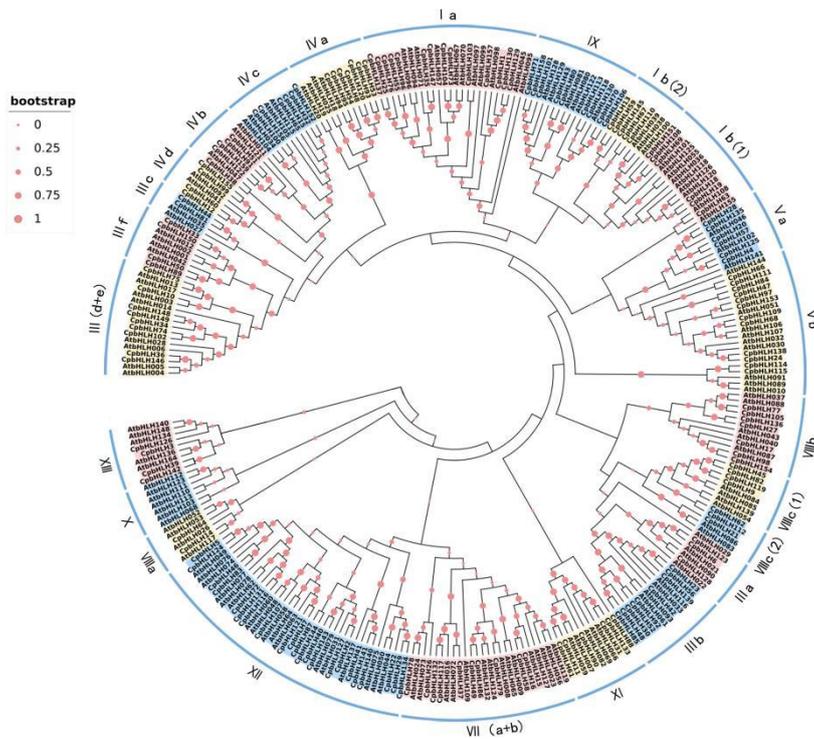


图 3 青钱柳和拟南芥 bHLH 家族蛋白的系统进化树和分类。

Fig. 3 Phylogenetic tree and classification of bHLH subfamily proteins in *A. thaliana* and *C. paliurus*.

拟南芥 bHLH 蛋白数为 140 个，青钱柳 bHLH 蛋白数为 159 个。红点表示引导值，点越大，引导值就越大。罗马数字代表不同组别。 The number of bHLH proteins of *A. thaliana* and *C. paliurus* is 140 and 159, respectively. The red dots represent boot values—the larger the dot, the larger the bootstrap value. Roman numerals line up with the bHLH subfamily.

3.4 CpbHLH 基因结构及保守基序分析

对 CpbHLH 家族的基因结构特征的研究结果表明，159 个 CpbHLH 基因的外显子数从 1 到 13 不等(图 5C)。20 个(12.6%)基因为无内含子基因，分布在 IIIId、IIIe、viiia、VIIIb 和 VIIIc 亚家族中(2)，其中 13 个

(8.2%) 基因含有一个内含子, 其余基因当然含有两个或更多内含子。不同家族的 159 个基因在结构上差异很大, 包括内含子和外显子的数量和相对位置 (图 4C)。相反, 同一亚家族中基因的内含子/外显子结构具有高度相似性 (图 4C)。

为了进一步了解这些 CpbHLH 蛋白之间的进化关系, 我们利用 MEME 分析了它们的保守基序。共鉴定出 20 个基序, 并统计其序列和长度 (图 4B)。此外, 20 个 motif 中有 8 个通过 Pfam 和 CDsearch 进行了注释。显然, 其分组与我们的系统进化树和基因结构的结果趋于一致, 同一组内的基序结构相似, 但不同组之间差异很大 (图 4)。159 个 CpbHLHs 的基序数量从 1 个 (CpbHLH66) 到 9 个 (CpbHLH50) 不等。159 个 CpbHLH 基因均含有基序 1 和基序 2, 除了 CpbHLH66 只含有基序 1 (图 4B)。有趣的是, 一些保守的基序只存在于在特定的组中。例如基序 13 只存在于 Ia 组, 基序 16 只存在于 VIIIb 组, 基序 18 只存在于 XII 组, 基序 19 只存在于 IX 组 (图 4B)。这种现象可能是由于同一组的 CpbHLH 蛋白的具有相似的功能。

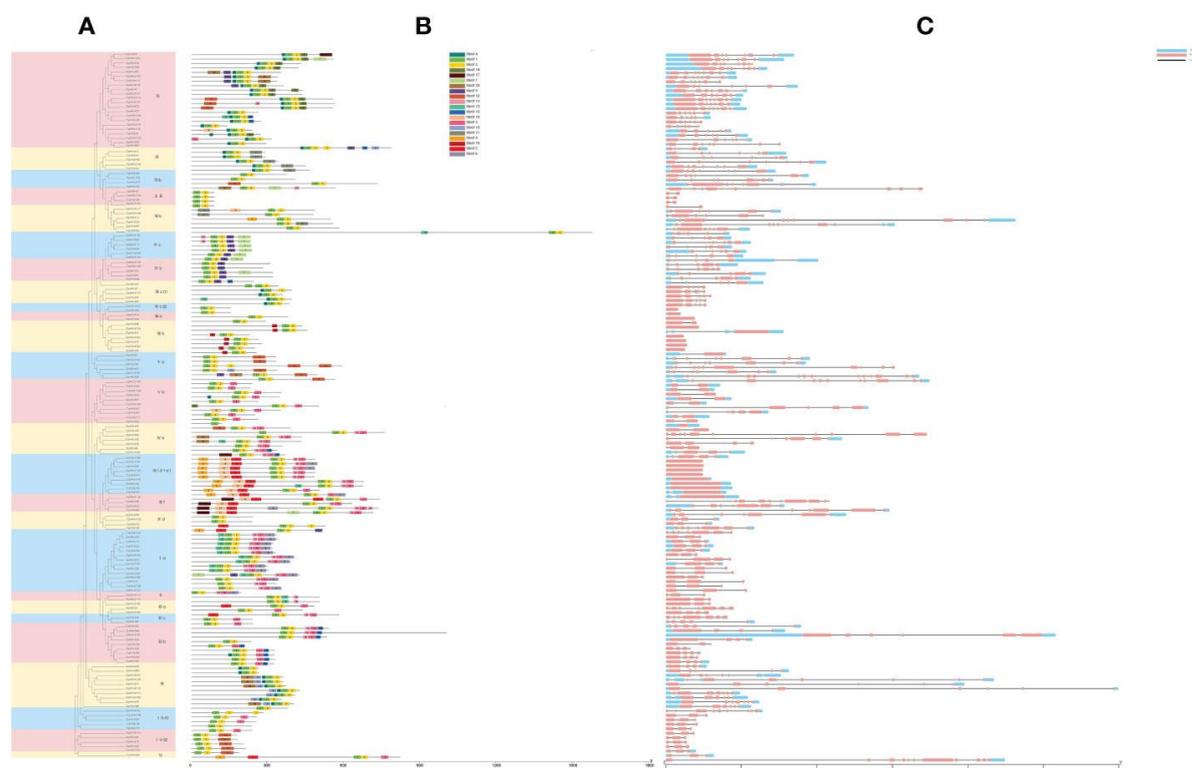


图 4 159 个 CpbHLH 蛋白的保守基序和基因结构分析。

Fig. 4 Analysis of conserved motifs and gene structure for 159 CpbHLH proteins.

(A) 系统发进化树树。(B) 保守基序的分布。20 个基序由 20 种不同颜色的方块表示。每个方块的位置代表图案的位置。(C) 基因结构。灰线的长度表示一个序列相对于所有其他序列的长度。(A) Phylogenetic tree. (B) Distribution of conserved motifs. Twenty motifs were represented by twenty kinds of colored blocks. The position of each block represents the location of the motif. (C) organization of gene structure. The length of the gray line represents the length of a sequence relative to that of all the other sequences.

3.5 CpbHLHs 的 GO 注释和顺式作用元件分析

bHLH 保守结构域外的高度分化序列提示 CpbHLH 蛋白可能具有多种生物学功能。对这 159 个蛋白进行 GO 注释, 以了解与 CpbHLH 基因相关的生物学过程。结果如图 5 所示, 将鉴定的 CpbHLH 蛋白分为三个主要的基因本体 (GO) 术语, 即 CC (细胞成分)、MF (分子功能) 和 BP (生物过程)。在 MF 类别中,

大多数 CpbHLH 蛋白分别被标注为“分子功能”(139/159)、“核酸结合”和“DNA 结合”。这些功能与 tf 的主要作用密切相关。在 CC 类别中，大多数 CpbHLH 蛋白被分配到细胞成分和细胞核中(139/159)。但也有少量 CpbHLH 蛋白分布在细胞质 (8/159)、细胞器部分 (7/159)、细胞质 (4/159)、共质体 (*CpbHLH37/117/132*) 和叶绿体 (*CpbHLH68/109*) 中(图 5)。此外，BP 方面表明 CpbHLH 蛋白参与了多种生物过程。被标注为多生物合成和代谢相关的蛋白拥有最多的 *CpbHLHs* (141/159)。此外，CpbHLH 蛋白还可能在调控细胞过程 (111/159)、转录 (109/159)、和基因表达 (109/159) 等生物过程中发挥作用。BP 分析还显示，许多 *CpbHLHs* 可以对刺激 (46/159) 产生反应，包括不同类型的生物和非生物应激源，而 *CpbHLH38/68/109* 被预测参与对盐胁迫的反应 (图 5)。

位于基因启动子区域的保守基序是蛋白质的识别和结合位点。本研究鉴定了大量 *CpbHLH* 基因的顺式调控元件，并根据其作用将其分为植物生长发育、植物激素响应以及非生物和生物胁迫三大类 (图 6)。我们的研究表明 CAT-box (105) 和 O2-site (86)，它们分别参与分生组织表达和玉米蛋白代谢调控，是最常发现的与植物生长发育相关的基序。相反，HD-Zip 1 (栅栏叶肉细胞的分化) 和 AACA-motif (参与胚乳特异性负表达) 数量分别为 8 个和 3 个。植物激素响应类中最常见的元件是 ABRE (脱落酸响应元件)、CGTCA-motif 和 TGACG-motif (参与茉莉酸甲酯响应的元件)和 TCA 元件 (水杨酸响应元件) (图 6)。在最后一类中，检测到许多与植物非生物胁迫相关的重要元件。其中多的是 ABRE (干旱响应元件)、ARE (厌氧诱导响应元件)、MBS (干旱诱导响应元件) 和 LTR (低温响应元件)。其他应激反应元件，如 GC-motif (缺氧特异性诱导元件)，TC-rich (防御和应激反应元件) 和 ERE 元件(氧化应激反应元件)也被确定(图 6)。

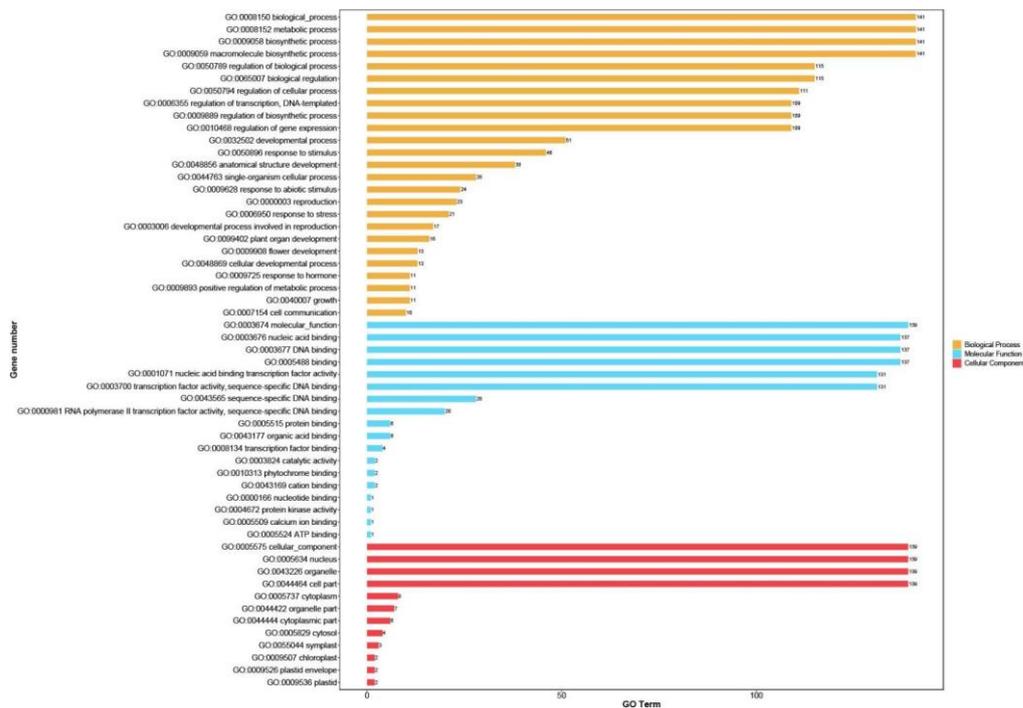


图 5 CpbHLH 蛋白的 GO 注释。

Fig. 5 Gene ontology (GO) distribution of CpbHLH proteins.

使用 $p \leq 0.05$ 的 GO 注释显示 GO 项目包括分子功能 (MF)，生物过程 (BP) 和细胞成分 (CC)，而选择显著富集的 GO 项目来可视化结果。GO annotation using a cut-off value of $p \leq 0.05$ showed that GO items including molecular function (MF), biological process (BP), and cellular component (CC), while predominant GO items was selected to visualize the result.

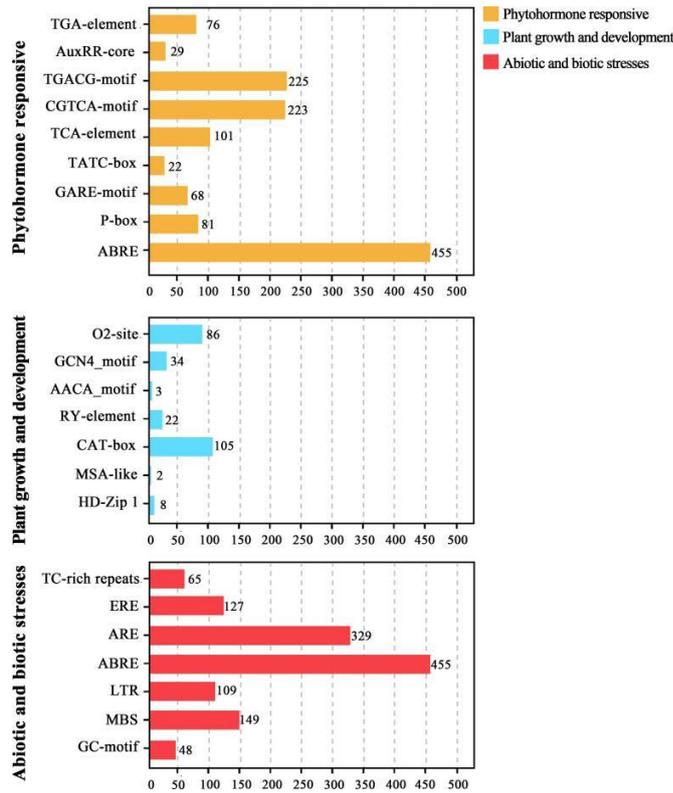


图 6 CpbHLH 基因启动子区的顺式调控元件。

Fig. 6 Cis-regulatory elements in the promoter region of CpbHLH genes.

该图表示 CpbHLH 基因启动子序列中每种类型基序的数量。 The figure represents the number of each type of motifs identified in the promoter sequence of CpbHLH genes.

3.6 盐胁迫下水培试验中 *CpbHLH* 基因的表达模式

基因表达模式分析是确定基因功能的有效方法。因此，在不同盐浓度(0%、0.15%、0.3%和 0.45% NaCl)的水培试验中，对 30 天的青钱柳叶片进行了测序和分析。原始测序数据提交至 NCBI BioProject 数据库，项目编号为 PRJNA700136。从转录组数据中获得 159 个 *CpbHLH* 基因的 RPKM (Reads Per Kilobase Per Million mapped Reads)值，以估计 bHLH 家族成员的表达水平。然而，由于转录组数据中缺乏或低水平表达，*CpbHLH119/121/138/151* 未被分析。图 8 显示，这些基因中有 155 个在不同浓度 NaCl 处理下均有表达，且表达模式不同，证明 *CpbHLH* 基因受盐胁迫影响显著。

根据表达模式的相似性，将 155 个 *CpbHLH* 基因聚为 8 个组，命名为 A1- A8 (图 8)。A1 组中基因主要在中 (0.30% NaCl) 和高 (0.45% NaCl) 盐条件下表达，在低 (0.15% NaCl) 盐条件下变化不显著。与此形成鲜明对比的是 A6、A7 和 A8 中的 *CpbHLHs* 在低盐浓度下优先表达，在高盐浓度下表达下调。在 A2 组中，*CpbHLH* 基因在低、中盐胁迫下表达量变化不显著，但在高盐胁迫下达到最高值。而 A4 组中大部分基因的表达随盐浓度的变化而变化，这些基因的表达均在盐浓度处理下下调，并在 0.45% NaCl 处理时达到最低。然而，在中盐和高盐胁迫下，这些基因在 A3 和 A5 组中的表达水平分别很低(图 7)。在这 155 个基因中，一些基因在盐胁迫下的表达被强烈诱导或抑制。例如，与对照相比，A4 组中 *CpbHLH36/74/75* 在低盐 (0.15% NaCl) 处理下的表达量下调了近 3 倍，*CpbHLH74* 在高盐 (0.45% NaCl)处理下的表达量下调了近 9 倍。同样，在 A5、A6 和 A7 中也发现了 7 个差异表达基因 (*CpbHLH68/69/71/108/146/152/158*)，表明 A5、A6 和 A7 组的基因对盐胁迫有响应 (图 7)。

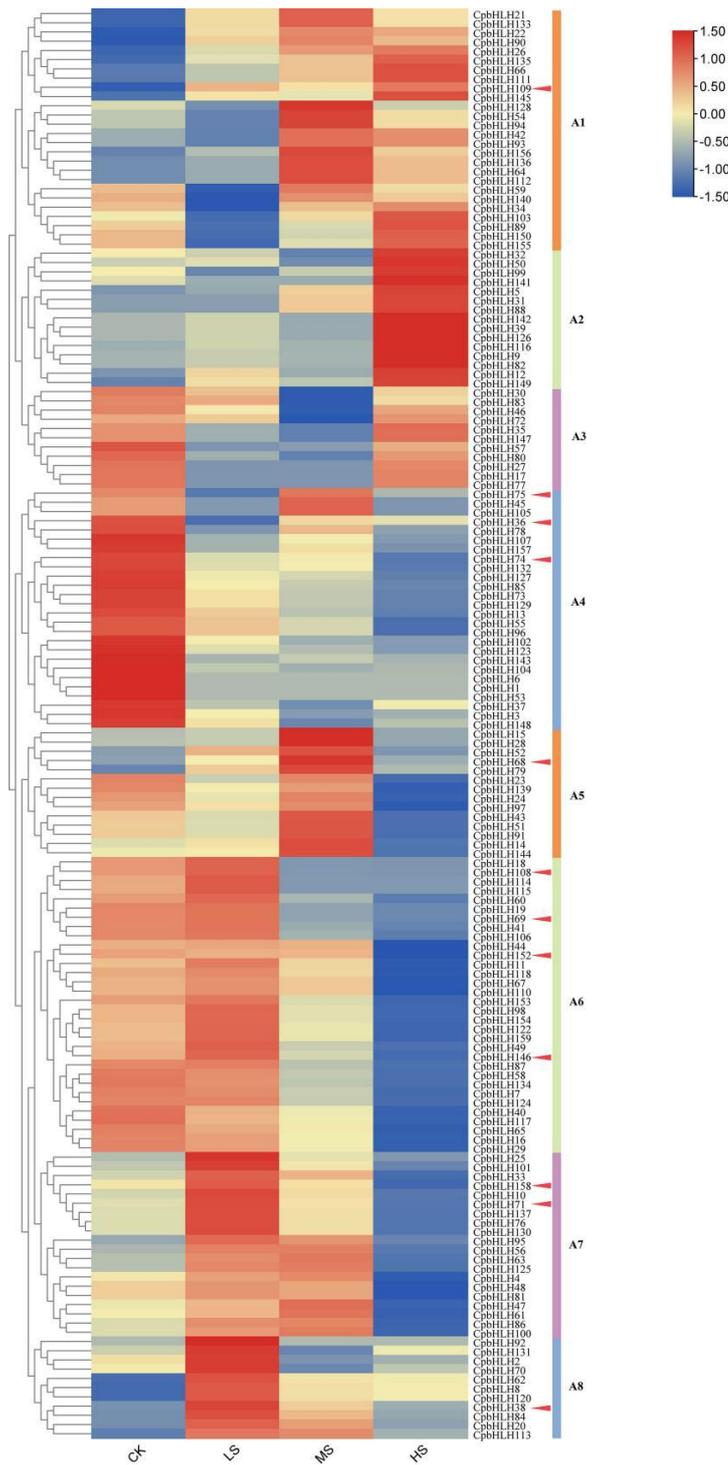


图 7 基于水培实验的 159 个 CpbHLH 基因在盐胁迫下的表达分析。

Fig. 7 Clustering expression analysis of 159 CpbHLH genes in salt stress based on hydroponic experiments.

CK、LS、MS 和 HS 分别代表 NaCl 浓度为 0%、0.15%、0.3%和 0.45%。通过不同处理基因间的 \log_2 (FPKM + 1)比较，对转录本丰度水平进行归一化和分层聚类。用色标表示表达值，红色表示高表达，蓝色表示低表达。A1-A8 代表不同的组。为了更直观地区分 A1-A8 组，在右侧使用了不同颜色的线条进行区分。 The CK, LS, MS and HS represent the NaCl concentrations of 0%, 0.15%, 0.3% and 0.45% respectively. The transcript abundance level was normalized and hierarchically clustered by using the \log_2 (FPKM + 1) comparison

among genes of different treatments. The expression value is presented on the color scale, with red representing high expression and blue representing low expression. A1-A8 represent different clusters. In order to distinguish A1-A8 clusters more intuitively, lines of different colours were used in the right.

3.7 盆栽试验中候选基因对盐的表达分析

结合 GO 注释和水培实验表达谱分析结果，选择 12 个盐诱导候选基因 (*CpbHLH36/38/68/69/71/74/75/108/109/146/152/158*), 并采取盆栽实验中的叶片进行 qRT-PCR 分析(图 9)。值得注意的是，8 个候选基因(*CpbHLH36/68/71/75/109/146/152/158*)在盐胁迫下表达量有显著变化。8 个基因中，4 个基因(*CpbHLH36/146/152/158*)在盐胁迫下表达下调，其中 3 个基因(*CpbHLH146/152/158*)在 0.4% NaCl 处理下表达最低，1 个基因(*CpbHLH36*)在 0.2% NaCl 处理下表达最低。相反，3 个基因(*CpbHLH68/71/109*)受盐胁迫诱导显著(图 9)，其中 3 个基因(*CpbHLH36/68/146*)对盐胁迫反应强烈。与对照相比，盆栽试验与水培试验的表达量变化趋势高度一致(图 8;图 9)，表明它们在盐胁迫下的重要功能。例如，两种实验中 *CpbHLH36* 的表达水平在盐胁迫下均受到强烈抑制，且在低盐浓度下抑制程度大于高盐浓度。

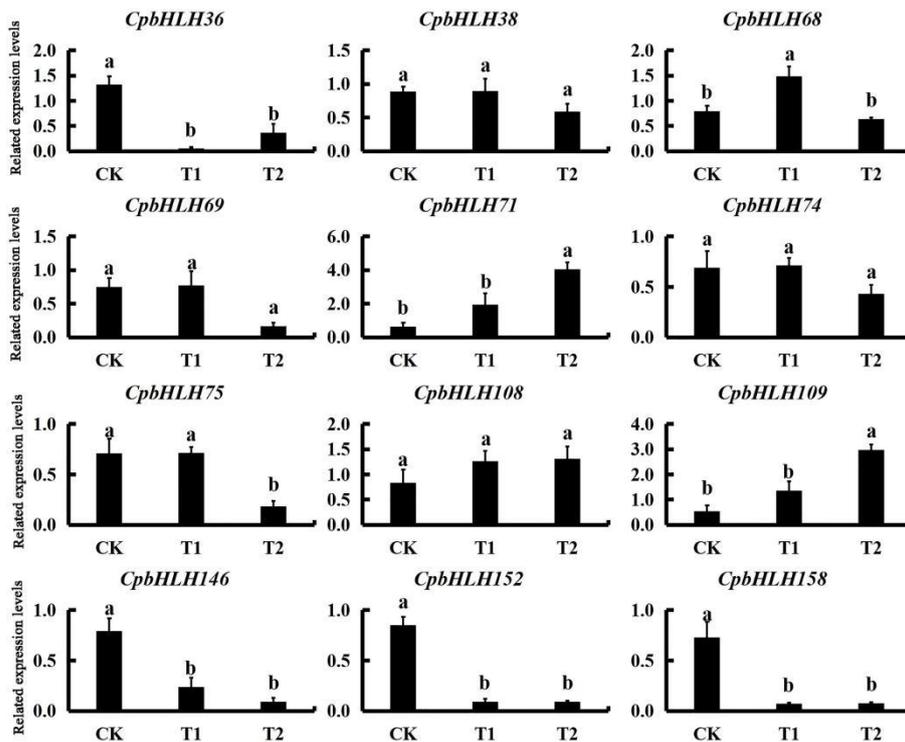


图 8 基于盆栽实验的 12 个 CpbHLH 候选基因在盐胁迫下的表达分析。

Fig. 8 Expression profiles of the 12 candidate *CpbHLH* genes responding to salt stress treatments in pot experiment.

3.8 候选基因互作网络预测

有报道称 bHLH 蛋白通过在 bHLH 蛋白之间或 bHLH 与非 bHLH 蛋白之间形成同型二聚体或异源二聚体来发挥调节作用 (Herold *et al.*, 2002)。因此，通过 STRING 预测了三个候选基因的相互作用网络(图 9)。对 *CpbHLH146* 的研究表明，它参与光、脱落酸和茉莉酸信号通路 (图 9B)。在与 MYC2 相互作用的蛋白

中, 与 JA 信号通路相关的蛋白占多数, 包括 JAZ1、JAZ3、JAZ5、JAZ8、JAZ10、JAZ12 和 TIFY7。PFT1 是光敏色素和花期调节蛋白, EIN3 是光敏色素和花期调节蛋白可能在乙烯反应途径中起到正向调节作用 (图 9A)。Cp**H**LH36 的预测网络表明, 它在调节多种蛋白质中发挥核心作用, 并且巧合的是, 其中一些蛋白质也参与茉莉酸信号通路 (JAZ1 和 JAZ10) (图 9A)。其他蛋白质, 如 GSTU1 和 GSTU2, 可能参与还原性谷胱甘肽与大量外源性和内源性疏水亲电试剂的结合的过程, 而 bHLH11 和 TRFL8 都参与 DNA 结合 (图 9A)。最后, 预测网络的结果 (图 9C) 也表明, Cp**H**LH68 在 DNA 结合中起着至关重要的作用, 其功能与大多数与其相互作用的蛋白质相同。此外, 一些相互作用的基因可能调节光反应, 例如 CRY1 和 CPY2, UVR2 和 UVR3 参与紫外线辐射诱导的 DNA 损伤修复。然而, PRMT4B 已被确定

为氧化应激耐受性的正调节因子, 可促进抗氧化酶如 APX1 和 GPX1 的表达 (图 9A)。总的来说, 蛋白质相互作用网络分析结果表明, 这三个候选基因与多种功能的蛋白质相互作用, 使它们在调节植物生长和胁迫反应中发挥重要作用。

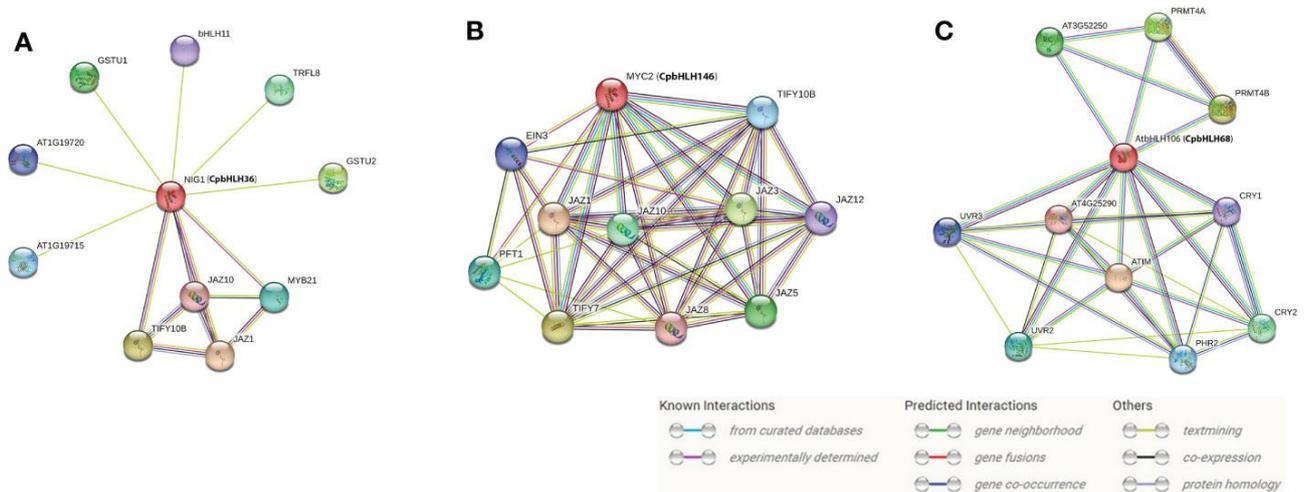


图 9 CpbHLH36 (A)、CpbHLH146 (B)和 CpbHLH68 (C)的相互作用网络分析。

Fig. 9 Interaction network analysis for CpbHLH36 (A), CpbHLH146 (B) and CpbHLH68 (C).

预测结果基于其在拟南芥中的同源基因, 在括号中显示了同源基因名称。The predicted results are based on the orthologous gene in Arabidopsis. Cp**H**LH genes are shown in brackets.

3 讨论

3.1 青钱柳 bHLH 基因的系统鉴定与特征分析

本研究在全基因组的基础上, 系统鉴定了 159 个青钱柳 bHLH 基因。Cp**H**LH 基因数量与番茄 (Sun *et al.*, 2015) 相同, 但少于拟南芥 (162 个基因) (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003) 和苹果 (175 个基因) (Yang *et al.*, 2017), 而多于葡萄 (94 个基因) (Wang *et al.*, 2018a)和草莓 (113 个基因) (Zhao *et al.*, 2018)。根据拟南芥和拟南芥 bHLH 蛋白命名法的系统进化树 (Heim *et al.*, 2003), 总体而言, 159 个 Cp**H**LH 蛋白被进一步划分为 26 个亚科 (图 3), 与先前的研究结果一致 (Pires and Dolan, 2010; Sun *et al.*, 2015)。此外, 我们的研究结果表明, 在 X 亚家族中没有发现 Cp**H**LH, 而在 XII 亚家族中检测到最多的 Cp**H**LH 成员 (图 3), 该家族的成员数量从拟南芥的 17 个增加到拟南芥中的 22 个。植物物种之间 bHLH 基因数量的差异可能是由于基因复制事件或基因组大小或进化过程中的基因丢失 (Li *et al.*, 2020b)。通过对保守基序和内含子/外显子的分析 (图 4B, C), 结果显示同一系统进化树亚家族的 Cp**H**LHs 在遗传和基序结构上相似, 进一步证实了

系统进化树分类的准确性 (图 3; 图 4)。在 159 个 CpbHLH 蛋白中共鉴定出 20 个基序(图 4B)。但其中基序 1 和基序 2 几乎存在于每一个 CpbHLH 蛋白中, 是 bHLH 结构域的主要组成部分, 具有较高的 DNA 保守结合能力, 这表明这两个基序对 bHLH 基因的功能具有非常重要的意义 (Zhang *et al.*, 2020b)。尽管如此, 其余 18 个保守的非 bHLH 结构域在亚家族中发挥特定功能, 与其他植物物种相似 (Chu *et al.*, 2018)。例如, 人参 III 亚家族 (d+e) 的大多数 bHLH 基因含有 MYC-N 结构域 (bHLH-myc_n 结构域, Pfam: PF14215), 已被证明在调节苯丙烷的生物合成中起作用。在本研究中, III(d+e)的所有 CpbHLHs 也含有 MYC-N 结构 (motif 5,8,10) (图 4B), 这意味着同一亚群的 CpbHLHs 可能具有相似的作用。据报道, 外显子和内含子的获得/丢失可能导致基因家族的功能多样化, 而内含子与基因进化有关, 特别是内含子少或无内含子的基因在植物中表达更高 (Chung *et al.*, 2006)。在本研究中, 无内含子的 CpbHLHs 分布在 III(d+e)亚族和 VIII 和 Ib 亚族 (图 4C) 中, 与人参 (Chu *et al.*, 2018)、苹果 (Yang *et al.*, 2017) 中的现象一致, 表明这些亚族的 CpbHLHs 可以促进对各种胁迫的快速及时响应。

3.2 CpbHLHs 耐盐基因的功能预测与鉴定

转录调控是基因响应胁迫信号的基本调控过程, 大量的 TF 参与调控植物对给定胁迫的反应 (Riechmann *et al.*, 2000)。本研究 GO 注释结果显示, CpbHLH 基因的功能是多种多样的(图 5), 在调节植物生长发育和胁迫响应中发挥关键作用。多项证据表明, 盐胁迫对青钱柳的光合作用和次生代谢物积累有不利影响 (Zhang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022a)。因此, 从 CpbHLHs 中检测盐胁迫响应基因, 将有助于实现青钱柳的耐盐育种。

水培盐处理的转录组测序分析提供了 CpbHLHs 的特异性表达数据, 为进一步研究这些基因的功能提供了可能。我们水培的 RPKM 值显示, NaCl 胁迫下大量 CpbHLH 基因被诱导/抑制(图 7)。根据 RPKM 数据, 预测 10 个差异表达基因(CpbHLH36/68/69/71/74/75/108/146/ 152/158)响应盐胁迫(图 7)。此外, 159 个 CpbHLHs 的分子功能注释表明, 3 个基因 (CpbHLH38/68/109) 对盐胁迫响应强烈。因此, 我们预测上述 12 个基因是盐胁迫响应的候选基因, 并利用盆栽试验中采集的叶片进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 结果显示, 3 个基因(CpbHLH36/68/146)的表达对盐胁迫反应强烈(图 8), 且在两个盐胁迫实验中其表达水平的变化趋势高度相似(图 7;图 8), 说明这些基因特异性调控了青钱柳的耐盐性。

系统进化分析可用于推导基于序列相似性和蛋白质结构的正交关系, 而系统进化树中关系最密切的 bHLH 基因可能具有相似的功能 (Wang *et al.*, 2021)。已有研究表明, *AtbHLH106* 可以通过直接与耐盐基因 G-box 相互作用增强植物的耐盐性 (Ahmad *et al.*, 2015), 而 CpbHLH68 与 *AtbHLH106* 在进化树分类中属于同一亚组 (图 3), 表明 CpbHLH68 可能参与了对盐胁迫的响应。此外, DNA 序列是决定转录因子与其基因组靶点结合特异性的决定性因素, 我们对 159 个 CpbHLHs 的 DNA 结合能力的结果表明, CpbHLH68 是 G-box 结合蛋白, 这进一步表明, CpbHLH68 与 *AtbHLH106* 类似, 可能通过结合靶基因的 G-box 来响应盐胁迫。此外, 据报道, *AtbHLH6* (*AtMYC2*) 对盐和干旱胁迫表现出显著的响应 (Abe *et al.*, 1997), 而 *AtNIG1* (盐胁迫应答基因) 是已知的第一个通过结合钙离子参与盐胁迫信号并与 E-box 序列 (CANNTG) 结合的转录因子 (Kim and Kim, 2006)。我们的研究表明, CpbHLH36、CpbHLH146 与 *AtbHLH6* (*MYC2*) 和 *AtbHLH28* (*AtNIG1*) 聚在同一个进化支中 (图 3), 同时 CpbHLH36 和 CpbHLH146 也是 E-box 蛋白, 表明它们很可能参与盐胁迫信号通路的调控。

一般来说, 给定基因的功能可以从其同源基因中推断出来 (Qu *et al.*, 2022)。因此, 本研究利用拟南芥中的同源基因预测这候选基因 (CpbHLH36/68/146) 的蛋白调控网络。之前的一些研究表明, *AtMYC2* 参与干旱胁迫条件下 ABA 诱导基因的调控, 并可能在 ABA 信号传导和 JA 信号传导之间提供一种可能的机制

联系(Abe *et al.*, 1997)。预测到的与 *CpbHLH146* 互作的基因主要参与 JA 信号的调控 (图 9A,)。植物激素 ABA 和 JA 的相互作用在非生物胁迫耐受中起着重要作用 (Xiong *et al.*, 2002)。ABA 依赖通路是重要的非生物应激反应信号转导通路之一, 大多数 ABA 调控基因的启动子区域包含许多 ABA 响应元件 (Leonhardt *et al.*, 2004)。在本研究中, 在 *CpbHLH146* 的启动子中检测到大量的 ABA 响应元件 ABRE 和 CGTC motif (图 6), 由此可以推断, 该基因可能通过调控 ABA 信号通路中关键基因的表达, 在调控抗逆性中发挥重要作用。此外, *CpbHLH36* 和 *CpbHLH68* 的互作基因大部分主要参与 DNA 结合 (图 9A,) , 这进一步支持了我们的假设, 即这两个基因主要通过识别靶基因 G-box 调控植物盐胁迫。此外, *CpbHLH36* 也与一些 JA 信号通路蛋白相互作用(图 9A), 并与 *CpbHLH146* 在系统进化树的同一分支 (图 3)。此外, 盆栽试验和水培试验中 *CpbHLH36* 的表达趋势与 *CpbHLH146* 相似 (图 7;图 8)。因此, 可以得出结论, *CpbHLH36* 和 *CpbHLH146* 在蛋白水平上存在间接相互作用, 这两个基因协调控制下游基因的表达, 而植物的耐盐性可能依赖于这两个基因的共同表达。综上所述, *CpbHLH36/68/146* 可能是青钱柳中响应盐胁迫的关键候选基因。然而, 这三个参与盐耐受性调控的基因的特征各不相同。*CpbHLH36/68/146* 均为 G-box 蛋白, 可能通过与靶基因 G-box 结合来应对盐胁迫。其次, *CpbHLH36* 可能通过结合钙离子, 调控 JA 信号通路中关键基因的表达参与盐胁迫信号。第三, *CpbHLH146* 极有可能参与盐胁迫 ABA 信号通路的调控。此外, *CpbHLH36* 和 *CpbHLH146* 在蛋白水平上存在间接的相互作用, 因此我们推测, 青钱柳的耐盐性可能与这两个基因的共表达有关。

4 结论

综上所述, 这是首次基于全基因组对青钱柳中的转录因子家族进行系统的分析。本研究在青钱柳中共检测到 159 个 *CpbHLH* 基因, 并根据其进化特征将其划分为 26 个亚家族。除了研究它们的结构和 DNA 结合能力外, 还通过盆栽和水培实验以及调控网络进行了表达分析, 以确定哪些基因在盐胁迫反应中最强烈。在盐胁迫下, 共筛选到 12 个候选基因, 通过盆栽试验和蛋白互作网络分析, 进一步验证了 3 个基因 (*CpbHLH36/68/146*) 参与了青钱柳耐盐性调控。本研究结果不仅为进一步了解 bHLH 转录因子家族的调控机制提供了基础, 也将推动青钱柳耐盐基因改良的进展。

参考文献

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K. (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9 (10), 1859–1868. doi: 10.1105/tpc.9.10.1859
- Atchley, W. R., Terhalle, W., and Dress, A. (1999). Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. *J. Mol. Evol.* 48 (5), 501–516. doi: 10.1007/PL00006494
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., et al. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, W202–W208. doi: 10.1093/nar/gkp335
- Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J. F., Bilbao-Castro, J. R., and Robertson, D. L. (2010). Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol.* 153 (3), 1398–1412. doi: 10.1104/pp.110.153593
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B. H., Hong, X., Agarwal, M., et al. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in arabidopsis. *Genes Dev.* 17 (8), 1043–1054. doi: 10.1101/gad.1077503
- Chu, Y., Xiao, S., Su, H., Liao, B., Zhang, J., Xu, J., et al. (2018). Genome-wide characterization and analysis of bHLH transcription factors in *Panax ginseng*. *Acta Pharm. Sin. B.* 8 (4), 666–677. doi: 10.1016/j.apsb.2018.04.004
- Chung, B., Simons, C., Firth, A., Brown, C., and Hellens, R. (2006). Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 7, 120. doi: 10.1186/1471-2164-7-120

- Fang, S. (2022). A review on the development history and the resource silviculture of *Cyclocarya paliurus* industry. J. Nanjing For. Univ. (Nat. Sci. Ed.) 46 (6), 115–126. doi: 10.12302/j.issn.1000-2006.202206019
- Fang, S., Wang, J., Wei, Z., and Zhu, Z. (2006). Methods to break seed dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal)Iljinskaja. Sci. Hortic. 110 (3), 305–309. doi: 10.1016/j.scienta.2006.06.031
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P. C.(2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. Mol. Biol. Evol. 20 (5), 735–747. doi: 10.1093/molbev/msg088
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., et al. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by myc through association with miz-1. Mol. Cell 10 (3), 509–521. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00633-0
- Kavas, M., Baloğlu, M. C., Atabay, E. S., Ziplar, U. T., Daşgan, H. Y., and Ünver, T. (2016). Genome-wide characterization and expression analysis of common bean bHLH transcription factors in response to excess salt concentration. Mol. Genet. Genom. 291(1), 129–143. doi: 10.1007/s00438-015-1095-6
- Kurihara, H., Fukami, H., Kusumoto, A., Toyoda, Y., Shibata, H., Matsui, Y., et al. (2003). Hypoglycemic action of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) iljinskaja in normal and diabetic mice. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 (4), 877–880. doi: 10.1271/bbb.67.877
- Leonhardt, N., Kwak, J. M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., and Schroeder, J. I. (2004). Microarray expression analyses of arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant[W]. Plant Cell 16 (3), 596–615. doi: 10.1105/tpc.019000
- Li, Y., Li, L., Ding, W., Li, H., Shi, T., Yang, X., et al. (2020b). Genome-wide identification of *Osmanthus fragrans* bHLH transcription factors and their expression analysis in response to abiotic stress. Environ. Exp. Bot. 172. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.103990
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., and Pang, E. 2012a. Abiotic stress responses in plants: Present and future. Springer New York 1-19. doi: 10.1007/978-1-4614-0634-1_1
- Pires, N., and Dolan, L. (2010). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. Mol. Biol. Evol. 27 (4), 862–874. doi: 10.1093/molbev/msp288
- Qu, Y., Chen, X., Mao, X., Huang, P., and Fu, X. (2022). Transcriptome analysis reveals the role of GA3 in regulating the asynchronism of floral bud differentiation and development in heterodichogamous *Cyclocarya paliurus* (Batal.) iljinskaja. Int. J. Mol.Sci. 23, 6763. doi: 10.3390/ijms23126763
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., et al. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290 (5499), 2105–2110. doi: 10.1126/science.290.5499.2105
- Sun, H., Fan, H. J., and Ling, H. Q. (2015). Genome-wide identification and characterization of the *bHLH* gene family in tomato. BMC Genom. 16 (1), 9. doi: 10.1186/s12864-014-1209-2
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P. H. (2003). The arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. Plant Cell 15 (8), 1749–1770. doi: 10.1105/tpc.013839
- Wang, P., Su, L., Gao, H., Jiang, X., Wu, X., Li, Y., et al. (2018a). Genome-wide characterization of *bHLH* genes in grape and analysis of their potential relevance to abiotic stress tolerance and secondary metabolite biosynthesis. Front. Plant Sci. 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00064
- Wang, Y., Zhang, Y., Fan, C., Wei, Y., Meng, J., Li, Z., et al. (2021). Genome-wide analysis of MYB transcription factors and their responses to salt stress in *Casuarina equisetifolia*. BMC Plant Biol. 21 (1), 328. doi: 10.1186/s12870-021-03083-6
- Wu, J. Y., Wilf, P., Ding, S. T., An, P. C., and Dai, J. (2017). Late miocene *Cyclocarya* (Juglandaceae) from southwest China and its biogeographic implications. Int. J. Plant Sci. 178, 580–591. doi: 10.1086/692765
- Xiong, L., Schumaker, K. S., and Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell 14 Suppl (Suppl), S165–S183. doi: 10.1105/tpc.000596
- Yang, J., Gao, M., Huang, L., Wang, Y., van Nocker, S., Wan, R., et al. (2017). Identification and expression analysis of the apple (*Malus × domestica*) basic helixloop-helix transcription factor family. Sci. Rep. 7 (1), 28. doi: 10.1038/s41598-017-00040-y
- Zhang, L., Zhang, Z., Fang, S., Liu, Y., and Shang, X. (2022a). Metabolome and transcriptome analyses unravel the molecular regulatory mechanisms involved in photosynthesis of *Cyclocarya paliurus* under salt stress. Int. J. Mol. Sci. 23(3):1161.doi:

10.3390/ijms23031161

Zhang, L., Zhang, Z., Fang, S., Liu, Y., and Shang, X. (2021). Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals molecular regulatory mechanism of flavonoid biosynthesis in *Cyclocarya paliurus* under salt stress. *Ind. Crops Prod.* 170. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113823

Zhang, Z., Liu, X., Wang, X., Zhou, M., Zhou, X., Ye, X., et al. (2012b). An R2R3 MYB transcription factor in wheat, TaPIMP1, mediates host resistance to *Bipolaris sorokiniana* and drought stresses through regulation of defense- and stress-related genes. *New Phytol.* 196 (4), 1155–1170. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04353.x

Zhao, Q., Ren, Y. R., Wang, Q. J., Yao, Y. X., You, C. X., and Hao, Y. J. (2016). Overexpression of *MdbHLH104* gene enhances the tolerance to iron deficiency in apple. *Plant Biotechnol. J.* 14 (7), 1633–1645. doi: 10.1111/pbi.12526