



# 大豆耐涝 bHLH 转录因子筛选及生物信息学分析

林延慧<sup>1</sup>, 徐冉<sup>2</sup>, 朱红林<sup>1</sup>, 唐力琼<sup>1</sup>, 侯本军<sup>1</sup>, 徐靖<sup>1</sup>

(1. 海南省农业科学院 粮食作物研究所/海南省农作物遗传育种重点实验室/农业部作物基因资源与种质创制海南科学观测实验站, 海口 571100; 2. 山东省农业科学院 作物研究所, 山东 济南 250100)

**摘要:**为研究大豆 bHLH 转录因子与涝害响应相关性, 为大豆耐涝性研究提供理论基础, 本研究对强耐涝性品种齐黄 34 进行没顶淹水处理, 分析转录组测序结果, 筛选差异表达的 bHLH 转录因子并对其进行生物信息学分析, 采用荧光定量 PCR 方法验证主要差异表达 bHLH 转录因子编码基因的表达情况, 并通过生物信息学方法分析基因结构和互作蛋白。结果显示: 涝害胁迫下共发现 7 个差异表达的 bHLH 转录因子, 它们的同源性并不高, 属于不同类型的 bHLH。主要差异表达 bHLH 基因 *GmbHLH25-15* (Glyma. 15G06680) 的表达量变化情况与转录组数据趋势一致, 呈现下调表达。预测到 10 个蛋白可与该蛋白互作, 互作蛋白都是铵转运蛋白, 其中 4 个蛋白编码基因的表达量在转录组测序结果中呈现显著性差异。推测在无氧条件下, *GmbHLH25-15* 可能通过调控铵转运蛋白进而调节铵态氮的吸收来供给自身营养, 进而抵御涝害胁迫。

**关键词:**大豆; 耐涝; 转录组; bHLH 转录因子; *GmbHLH25-15*; 铵转运蛋白

## Selection and Bioinformatics Analysis of bHLH Transcription Factor Response to Submergence Stress in Soybean

LIN Yan-hui<sup>1</sup>, XU Ran<sup>2</sup>, ZHU Hong-lin<sup>1</sup>, TANG Li-qiong<sup>1</sup>, HOU Ben-jun<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Crops, Hainan Academy of Agricultural Sciences/Hainan Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding/Hainan Scientific Research Station of Crop Gene Resource & Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, Haikou 571100, China; 2. Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

**Abstract:** In order to study the correlation between bHLH transcription factors and waterlogging responses of soybean, and to provide theoretical basis for the study of waterlogging tolerance of soybean, in this study, Qihuang 34, a soybean variety with strong submergence resistance, was treated with submergence stress. We analyzed the transcriptome sequencing results, selected and took bioinformatics analysis on the differentially expressed bHLH transcription factors. We used fluorescence quantitative PCR to verify the expression of bHLH transcription factor genes, and analyzed the structure and interacting proteins of the gene. The results showed that seven differentially expression bHLH transcription factors were selected, the domain of these protein sequences were not highly homologous, and they belonged to different types of bHLH combining with the transcriptome data. *GmbHLH25-15* (Glyma. 15G06680) showed the most significant expression changes and the quantitative PCR analysis result was consistent with the trend of transcriptome data, showing down-regulated expression. Furthermore, all the 10 proteins interacting with Glyma. 15G06680 were ammonium transporters. Among them, the coding genes of 4 proteins showed significantly different expression in transcriptome sequencing results. It was speculated that soybean mainly absorbed ammonium nitrogen as its own nutrient supply in the absence of oxygen, and the bHLH transcription factor *GmbHLH25-15* might regulate the absorption of ammonium nitrogen by regulating the ammonium transporter, further resist submergence stress.

**Keywords:** Soybean; Submergence tolerance; Transcriptome; bHLH transcription factor; *GmbHLH25-15*; Ammonium transporter

气候的改变使很多地区降雨量发生变化, 连续降雨会引发涝害。大豆耐涝性较差, 遭受涝害会导致根系缺氧, 产量下降甚至整株死亡<sup>[1-3]</sup>。近年来,

我国黄淮海南部、南方及海南等地频繁遭受涝害的侵袭, 致使大豆大幅减产, 损失惨重。因此, 研究大豆响应淹水胁迫的机理, 进而培育耐涝大豆新品种

收稿日期: 2020-12-21

基金项目: 2020 年海南省省属科研院所技术创新专项 (jsxc202004); 2019 年海南省基础与应用基础研究计划 (自然科学领域) 高层次人才项目 (2019RC357)。

第一作者: 林延慧 (1984—), 博士, 助理研究员, 主要从事大豆分子育种研究。E-mail: lyh\_1012@163.com。

通讯作者: 徐靖 (1981—), 硕士, 副研究员, 主要从事旱粮分子育种研究。E-mail: jing\_jing\_xu@163.com。

对农业生产具有重要意义。在植物生长发育过程中会遭受各种非生物胁迫(冷害、干旱、低温、高盐等),转录因子介导的基因表达调控网络在植物抵御逆境中起重要作用。目前鉴定的与植物抗逆相关的转录因子及家族主要有:bZIP、MYB、bHLH、AP2/EREBP、WRKY 和 NAC 等<sup>[4]</sup>。这些转录因子行使的主要功能是与特定的顺式作用元件结合,从而调控抗性基因的表达,提高植物对逆境的适应性。

Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) 转录因子家族是在动植物基因组中发现的一个较大的基因家族<sup>[5]</sup>,其成员在多种代谢、生理和发育过程中起着非常关键的作用<sup>[6-9]</sup>。bHLH 结构域由 60 个氨基酸组成,包含1个基本的 N 端区域和 1 个 HLH 区域。形成“碱性区域-α螺旋-环-α螺旋”结构(basic—Helix-Loop—Helix, bHLH),其中与 DNA 结合相关的是碱性区域,HLH 结构是其形成同源或异源二聚体所必需的结构<sup>[10]</sup>。

一些 bHLH 家族成员也被报道与非生物胁迫相关,如冷害、干旱和盐胁迫等。过表达 bHLHs 可以提高拟南芥对盐害、干旱、冻害及渗透等非生物胁迫的耐受性。拟南芥中,在高盐、干旱及渗透等非生物胁迫条件下, *AtbHLH122* 被诱导表达,过表达 *AtbHLH122* 可以增加拟南芥的抗逆性<sup>[11]</sup>。拟南芥中,过表达 *AtbHLH92* 可适度增加拟南芥对盐胁迫和渗透应力的耐受性,并通过寡聚核苷酸芯片获得 *AtbHLH92* 下游的 19 个靶基因<sup>[12]</sup>。过表达怪柳的 *ThbHLH1* 基因可以通过提高渗透势、降低活性氧的积累来增加拟南芥对高盐和干旱的耐受性<sup>[13]</sup>。西红柿中,bHLH 转录因子 *SlHCE1a* 可以赋予植物对冷害、渗透和盐胁迫的抗性<sup>[14]</sup>。水稻中,过表达 *OrbHLH001* 基因可以显著提高水稻耐寒和耐盐性<sup>[15]</sup>。干旱胁迫时, *OsbHLH148* 通过参与茉莉酸信号途径调节水稻对干旱的耐受性<sup>[16]</sup>。绵羊草中,通过转录组测序(RNA-Seq)的方法鉴定了很多响应干旱胁迫的 bHLH 转录因子家族成员<sup>[17]</sup>。拟南芥中过表达葡萄 *VvbHLH1* 基因可以提高拟南芥的耐旱和耐盐性<sup>[18]</sup>。前人的研究表明植物中 bHLH 参与冷害、盐害及干旱等多种非生物胁迫,但其与大豆涝害胁迫相关的报道较少,调控机理尚不清楚。

本研究以强耐涝性的大豆品种齐黄 34 作为供试材料,对其设置不同没顶淹水时间处理,进行转录组测序分析,筛选与耐涝相关的差异表达 bHLH 转录因子并进行生物信息学分析。研究旨在为进一步研究 bHLH 转录因子在涝害胁迫中的作用机制提供基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究选用耐涝性极强的大豆品种齐黄 34 作为供试材料,该品种由山东省农业科学院作物研究所提供。

### 1.2 方法

1.2.1 转录组测序 将大豆品种齐黄 34 种在装有沙土(沙:土=85:15)的花盆中,大约长至 14 d 左右,待其两片真叶展开时,将花盆放入大白塑料盒子内,往盒子内加水,直至大豆叶片顶端被完全淹没。设置 4 个取样时间点:淹水 3,6,12 和 24 h。每个时间点设置不淹水对照处理,每个样品 3 个重复,共 24 个样品。取根部组织样品置于液氮中速冻后放在 -80 ℃ 冰箱保存。

通过植物总 RNA 提取试剂盒(天根公司)提取总 RNA,使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测总 RNA 的浓度、RIN 值、28S/18S 和片断大小,构建文库。测序所得的数据称为 raw reads,去除包含接头、未知碱基 N 含量大于 10% 和低质量的 reads,最终获得 clean reads。文库构建、转录组测序及数据分析工作由深圳华大基因科技服务有限公司完成,以 Wm82.a2.v1 作为参考基因组进行转录组测序。

1.2.2 bHLH 转录因子筛选 根据转录组测序结果,挑选出 4 个时间点交集中与耐涝相关的差异表达 bHLH 基因。基因相对表达量对数值 Log<sub>2</sub>FoldChang≥2 为上调的差异表达基因,Log<sub>2</sub>FoldChang≤-2 为下调的差异表达基因。

1.2.3 转录因子的 bHLH 结构域特点分析 在 Phytozome(<http://phytozome.jgi.doe.gov>)上获取差异表达 bHLH 转录因子的蛋白序列,将其提交至 NCBI 的 Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>),分析保守结构域,并通过 DNAssit 软件对 bHLH 结构域蛋白序列进行比对分析。利用 Clustal 2.1 对 bHLH 结构域蛋白序列进行多重比较分析。

1.2.4 进化树分析 通过 MEGA 6.0 软件,利用最大似然作图法,构建筛选到的差异表达 bHLH 转录因子蛋白序列的进化树。

1.2.5 qRT-PCR 分析 以转录组测序剩余返回的 RNA 样品作为模板,利用天根反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA。根据 *GmbHLH25-15* (Glyma.15G06680) 的基因序列,利用 Primer 5 软件设计荧光定量 PCR 引物。以 *ELF1B* 作为内参基因。*GmbHLH25-1* 的引物序列: q*GmbHLH25-15-F*: AGG-GCTACCTGAACTGGG; q*GmbHLH25-15-R*: TTTGGG-



表2 7个差异表达 bHLH 转录因子结构域序列多重比较百分比矩阵图

Table 2 The percent identity matrix for multiple comparisons of consistent domain sequences of seven bHLH transcription factors

基因 ID Gene ID	Glyma. 06G43560	Glyma. 06G09670	Glyma. 03G41901	Glyma. 03G25280	Glyma. 17G16720	Glyma. 15G06680	Glyma. 17G16741
Glyma. 06G43560	100.00	33.87	35.14	30.43	37.14	38.81	32.35
Glyma. 06G09670	33.87	100.00	43.55	30.65	40.32	37.70	39.34
Glyma. 03G41901	35.14	43.55	100.00	40.58	41.67	47.14	45.07
Glyma. 03G25280	30.43	30.65	40.58	100.00	60.29	60.00	59.09
Glyma. 17G16720	37.14	40.32	41.67	60.29	100.00	65.71	64.79
Glyma. 15G06680	38.81	37.70	47.14	60.00	65.71	100.00	74.65
Glyma. 17G16741	32.35	39.34	45.07	59.09	64.79	74.65	100.00

2.3 bHLH 转录因子的聚类分析

如图2所示,GmbHLH25-15(Glyma. 15G06680)和 Glyma. 17G16741 的亲缘关系最近,其余 bHLH 转录因子都分别处于不同聚群中,说明它们属于不同

类型的 bHLH 转录因子。该结果与转录组测序分析结果一致,即 GmbHLH25-15 和 Glyma. 17G16741 属于相同 bHLH 转录因子类型,而其他 5 个转录因子分属不同的 bHLH 类型。

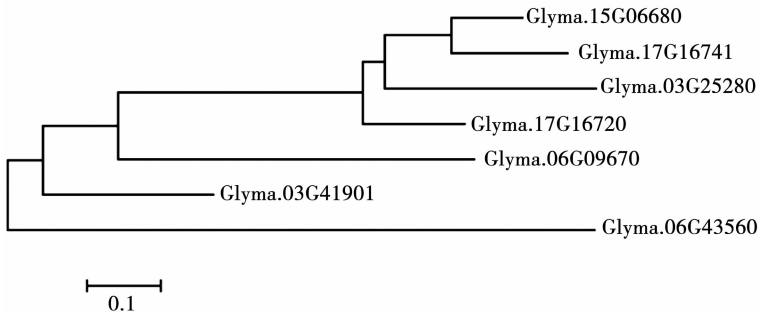


图2 差异表达 bHLH 转录因子进化树分析

Fig.2 The phylogenetic anaylsis of bHLH transcription factors

2.4 GmbHLH25-15 表达分析

qRT-PCR 分析结果显示,在根部组织中,GmbHLH25-15 在淹水胁迫 3, 6, 12 和 24 h 的表达

量变化趋势与转录组测序一致,都呈现下调表达趋势(图3)。

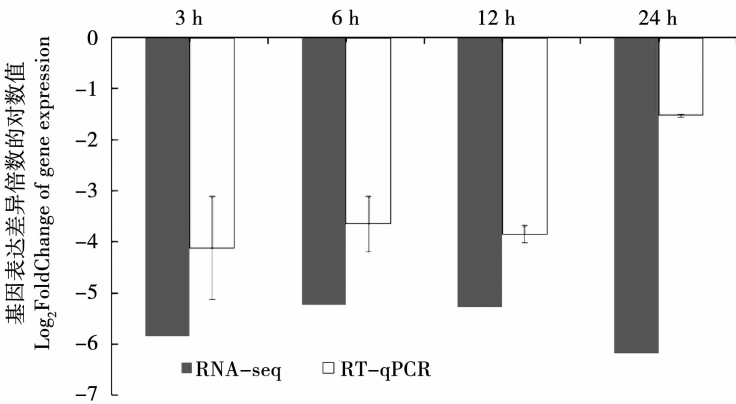


图3 涝害胁迫下 GmbHLH25-15 基因在淹水不同时间表达量分析

Fig.3 The expression patterns of GmbHLH25-15 at different submergence stress times

2.5 GmbHLH25-15 蛋白理化性质分析

GmbHLH25-15 蛋白的分子量为 41 696.69 kD, pI7.66。组成 GmbHLH25-15 的 20 种氨基酸中,丝

氨酸所占比例最高,为 11.1%,色氨酸所占比例最低,仅为 1.1%(表3)。

表 3 GmbHLH25-15 的氨基酸组成及比例

Table 3 The amino acid composition and ratio of GmbHLH25-15

氨基酸 Amino acid	数目 Number	比例 Ratio/%	氨基酸 Amino acid	数目 Number	比例 Ratio/%
丙氨酸 Alanine	22	6.0	亮氨酸 Leucine	33	8.9
精氨酸 Arginine	15	4.1	赖氨酸 Lysine	30	8.1
天冬酰胺 Asparagine	19	5.1	甲硫氨酸 Methionine	11	3.0
天冬氨酸 Aspartic acid	15	4.1	苯丙氨酸 Phenylalanine	19	5.1
半胱氨酸 L-Cysteine	5	1.4	脯氨酸 Proline	10	2.7
谷氨酰胺 Glutamine	20	5.4	丝氨酸 Serine	41	11.1
谷氨酸 Glutamic acid	29	7.9	苏氨酸 Threonine	19	5.1
甘氨酸 Glycine	16	4.3	色氨酸 Tryptophan	4	1.1
组氨酸 Histidine	9	2.4	酪氨酸 Tyrosine	5	1.4
异亮氨酸 Isoleucine	29	7.9	缬氨酸 Valine	18	4.9

2.6 GmbHLH25-15 蛋白结构分析

2.6.1 保守结构域分析 在 NCBI 的 Conserved Domain Database 进行的保守结构域分析结果显示,

GmbHLH25-15 蛋白内部第 163 ~ 265 位氨基酸序列为 bHLH 结构域(图 4)。

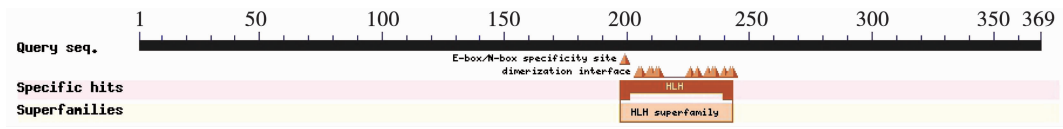
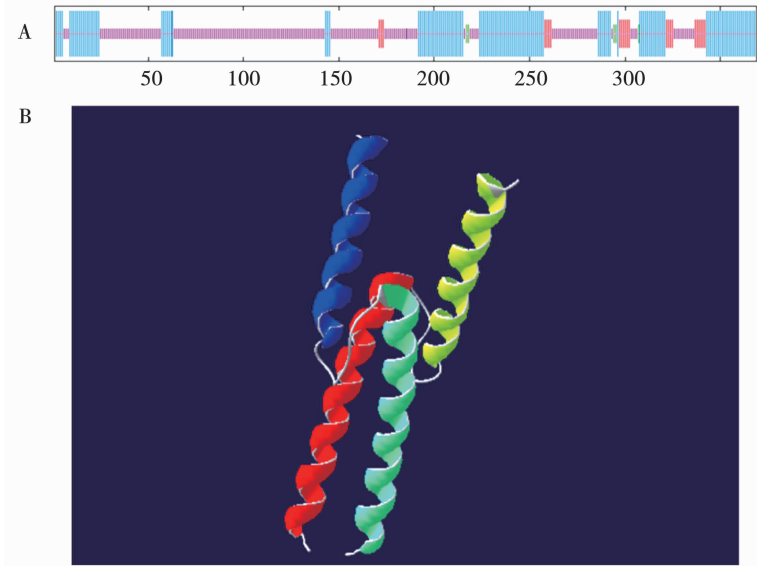


图 4 GmbHLH25-15 的保守结构域

Fig.4 The conserved domain analysis of GmbHLH25-15

2.6.2 高级结构分析 二级结构预测分析结果显示;GmbHLH25-15 蛋白主要以  $\alpha$  - 螺旋和无规则卷

曲结构为主,二者分别占 37.4% 和 55.01% ,延长链和  $\beta$  - 转角分别占 6.23% 和 1.36% (图 5A)。



绿色线条表示  $\beta$  - 转角,红色线条表示延长链,蓝色线条表示  $\alpha$  - 螺旋,紫色线条表示无规则卷曲。  
The green lines indicate the beta turn, the red lines indicate the extended strand, the blue lines indicate alpha helix, and the purple lines indicate random coil.

图 5 GmbHLH25-15 的二级 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig.5 The secondary (A) and tertiary (B) structure prediction of GmbHLH25-15



通过 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线蛋白数据库比对获得 1 个与 GmbHLH25-15 的一致性为 55% 的模板序列 5gnj. 3. I, 三维结构中 bHLH 保守结构域主要由两个相邻的  $\alpha$  螺旋组成。第一个  $\alpha$  螺旋也被称为识别螺旋,第二个  $\alpha$  螺旋位于第一个之上,基本平行于双螺旋链,这种结构有利于氢键形成和范德华力作用,为与其他转录

因子互作形成同源或异源二聚体提供平台(图 5B)。

### 2.7 互作蛋白分析

#### 2.7.1 互作蛋白预测

利用 SMART 软件的预测分析结果显示,与 GmbHLH25-15 互作的蛋白共有 10 个,都是铵转运蛋白(图 6)。说明在无氧条件下,GmbHLH25-15 可能是通过与铵转运蛋白互作,调控铵态氮的吸收,为大豆植株提供营养。

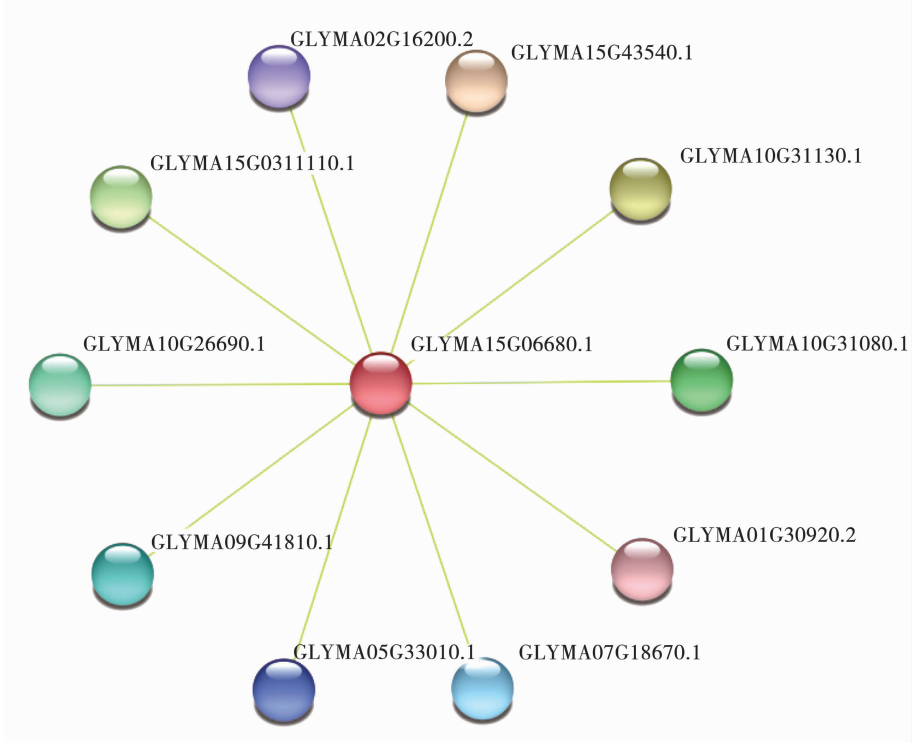


图 6 GmbHLH25-15 蛋白的互作分析

Fig. 6 The interaction analysis of GmbHLH25-15 protein

#### 2.7.2 互作蛋白表达量分析

依据转录组测序数据对编码互作蛋白基因的表达量的分析结果显示,有 4 个基因在淹水胁迫不同取样时间点的表达量呈现显著性差异,Glyma. 10G26690 和 Glyma. 01G30920 显著上调表达,Glyma. 02G16200 和 Glyma. 05G33010 显著下调表达(表 4)。说明在涝害胁迫下,这些铵转运蛋白编码基因可能与 *GmbHLH25-15* 发生互作,表达量呈正相关或者负相关。

### 3 讨论

本研究对大豆品种齐黄 34 进行没顶淹水处理,通过转录组数据分析,筛选出 7 个与耐涝相关的差异表达 bHLH 家族 MYC2 (KO:13422) 转录因子,将表达量变化最明显的 *GmbHLH25-15* 作为研究对象。MYC2 属于植物 bHLH 转录因子家族,是 JA 信号转导过程中的核心转录因子之一,受 JAZ 蛋白调控<sup>[19]</sup>。MYC 在响应多种信号途径(包括生物、非生物、发育、光照及激素)中起主要的调控作用<sup>[20-22]</sup>。在拟南芥响应盐胁迫的过程中,MYC2 通过抑制 *P5CS1* 的表达来调控脯氨酸的生物合成,而 MYC2 的活性又被 MKK3-MPK 所调节<sup>[23]</sup>。

通过 *GmbHLH25-15* 蛋白的互作网可以看出,与其互作的 10 个蛋白都是铵转运蛋白。转录组分析结果显示,4 个铵转运蛋白编码基因的淹水处理与对照相比,2 个上调表达,2 个下调表达。氮是植物必要的营养素,因此也是植物生长发育的主要限制因素。土壤中,氮素主要以硝态氮  $\text{NO}_3^-$  和铵态氮  $\text{NH}_4^+$  的形态存在<sup>[24]</sup>。在通风良好的农业土壤中,

表 4 淹水胁迫下表达量存在显著差异的互作蛋白编码基因及相对表达量对数值

Table 4 The coding genes of interaction protein with significantly different expression under waterlogging stress and the Log<sub>2</sub> FoldChange

基因 ID Gene ID	Log <sub>2</sub> FoldChange			
	3 h	6 h	12 h	24 h
Glyma. 10G26690	3. 17	3. 82	4. 45	4. 35
Glyma. 01G30920	4. 00	3. 81	3. 84	5. 68
Glyma. 02G16200	-3. 95	-6. 21	-2. 87	-5. 12
Glyma. 05G33010	-4. 70	-5. 76	-5. 37	-6. 62

作物主要吸收硝态氮,相反,在厌氧的土壤中,铵态氮是无机氮的主要形式,比如水稻整个种植季节很大程度上都是吸收铵态氮作为营养。在水田中,铵态氮同化比硝态氮需要更少的能量,铵态氮的利用效率要优于硝态氮<sup>[25-26]</sup>,而铵态氮的吸收受到 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 转运蛋白 (AMT) 的调控<sup>[27-28]</sup>。拟南芥中分离到6 个 *AMT* 基因:*AtAMT1 ; 1 ~ AtAMT1 ; 5* 和 *AtAMT2 ; 1*。*AtAMT1 ; 1* 在根、茎叶中均有表达,*AtAMT1 ; 2*、*AtAMT1 ; 3*、*AtAMT1 ; 5* 和 *AtAMT2 ; 1* 主要在根中特异表达<sup>[29-32]</sup>。敲除 *AtAMT1 ; 1* 或 *AtAMT1 ; 3*,拟南芥缺氮根系对铵的吸收下降了 30%,而且这两个基因的功能表现出加性效应<sup>[33]</sup>。水稻中,分离到 12 个 *AMT* 基因<sup>[44-46]</sup>,*OsAMT1 ; 1* 和 *OsAMT2 ; 1* 在根和叶中表达,*OsAMT1 ; 1* 和 *OsAMT1 ; 3* 主要在根中表达。由于水稻长期种植于淹水条件下,在水稻中鉴定出的铵转运蛋白较多,这也是水田植物和旱地植物在不同环境中进化的结果。没顶淹水是一种比水田作物更加极端的缺氧环境,大豆为了节省能量也可能主要通过吸收铵态氮作为自身的营养供给。因此,推测 bHLH 转录因子 *GmbHLH25-15* 可能通过正向或者负向调控铵转运蛋白进而调节铵态氮的吸收,供给自身营养,抵御涝害胁迫。

4 结 论

本研究通过转录组学、生物信息学和 qRT-PCR 等分析方法,筛选到 7 个响应大豆涝害的 bHLH 基因,7 个转录因子 bHLH 结构域蛋白序列的同源性不高,*GmbHLH25-15* 和 Glyma. 17G16741 属于 bHLH25 转录因子,Glyma. 06G09670 属于 bHLH93 转录因子,Glyma. 03G41901 属于 bHLH13 转录因子,Glyma. 17G16720 属于 bHLH1 转录因,Glyma. 06G43560 属于 bHLH30 转录因子。表达量变化最为明显的 *GmbHLH25-15* 在 4 个取样时间点的表达量变化与转录组测序结果一致,都呈现下调表达趋势。与该蛋白的互作的 10 个蛋白都是铵转运蛋白,4 个铵转运蛋白在转录组中呈现显著性差异表达,2 个上调表达,2 个下调表达。推测 bHLH 转录因子 *GmbHLH25-15* 可能通过正向或者负向调控铵转运蛋白进而调节铵态氮的吸收,供给自身营养,抵御涝害胁迫,但其调控机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Min S K, Zhang X, Zwiers F W, et al. Human contribution to more-intense precipitation extremes [J]. *Nature*, 2011, 470 (7334): 378-381.

[2] Schiermeier Q. Increased flood risk linked to global warming[J].

*Nature*, 2011, 470 (7334): 316.

[3] Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs D J, et al. Making sense of low oxygen sensing[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(3):129.

[4] Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance [J]. *Planta*, 2003, 218( 1): 1-14.

[5] Zhang X, Luo H M, Xu Z C, et al. Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11244.

[6] 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.

[7] Ledent V, Vervoort M. The basic helix-loop-helix protein family: Comparative genomics and phylogenetic analysis [J]. *Genome Research*, 2001, 11(5): 754-770.

[8] 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.

[9] Sonnenfeld M J, Delvecchio C, Sun X. Analysis of the transcriptional activation domain of the *Drosophila tango* bHLH-PAS transcription factor [J]. *Development Genes and Evolution*, 215(5): 221-229.

[10] Massari M E, Murre C. Helix-Loop-Helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2): 429-440.

[11] Liu W W, Tai H H, Li S S, et al. *bHLH122* is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism[J]. *New Phytologist*, 2014, 201 (4): 1192-1204.

[12] Jiang Y, Yang B, Deyholos M K. Functional characterization of the *Arabidopsis bHLH92* transcription factor in abiotic stress [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 282(5):503-516.

[13] Ji X Y, Nie X G, Liu Y J, et al. A bHLH gene from *Tamarix hispida* improves abiotic stress tolerance by enhancing osmotic potential and decreasing reactive oxygen species accumulation[J]. *Tree Physiology*, 2016, 36:193-207.

[14] Feng H L, Ma N N, Meng X, et al. A novel tomato MYC-type ICE1-like transcription factor, SlICE1a, confers cold, osmotic and salt tolerance in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 73: 309-320.

[15] Li F, Guo S Y, Zhao Y, et al. Overexpression of a homopeptide repeat-containing bHLH protein gene ( *OrbHLH001* ) from Dongxiang wild rice confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(9): 977-986.

[16] Seo J S, Joo J, Kim M, et al. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 65(6): 907-921.

[17] Zhao P C, Liu P P, Yuan G X, et al. New insights on drought stress response by global investigation of gene expression changes in sheepgrass ( *Leymus chinensis* ) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 954.

[18] Wang F B, Zhu H, Chen D H, et al. A grape bHLH transcription

factor gene, *VvbHLH1*, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 125 (2): 387-398.

[19] Du M, Zhao J, Tzeng D, et al. MYC2 orchestrates a hierarchical transcriptional cascade that regulate jasmonate-mediated plant immunity in tomato [J]. *The Plant Cell*, 2017, 29:1883-1906.

[20] Mallappa C, Yadav V, Negi P, et al. A basic leucine zipper transcription factor, G-box-binding factor 1, regulates blue light-mediated photomorphogenic growth in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(31): 22190-22199.

[21] Kazan K, Manners J M. MYC2: The master in action [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(3): 686-703.

[22] Gangappa S N, Maurya J P, Yadav V, et al. The regulation of the Z- and G-Box containing promoters by light signaling components, SPA1 and MYC2, in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e62194.

[23] Verma D, Jalmi S K, Bhagat P K, et al. A bHLH transcription factor, MYC2, imparts salt intolerance by regulating proline biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *The FEBS Journal*, 2020, 287 (12): 2560-2576.

[24] 李新鹏, 童依平. 植物吸收转运无机氮的生理及分子机制 [J]. *植物学报*, 2007, 24(6): 714-725. (Li X P, Dong Y P. Physiological and molecular basis of inorganic nitrogen transport in plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, 24 (6): 714-725.)

[25] Bloom A J, Sukrapanna S S, Warner R L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99(4): 1294-1301.

[26] Yoshida S. *Fundamentals of rice crop science* [M]. Philippines: International Rice Research Institute, 1981.

[27] Kaiser B N, Rawat S R, Siddiqi M Y, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA “knockout” of the high-affinity NH<sub>4</sub> (+) transporter *AtAMT1;1* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130 (3): 1263-1275.

[28] Sohlenkamp C, Wood C C, Roeb G W, et al. Characterization of *Arabidopsis* *AtAMT2*, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130 (4): 1788-1796.

[29] Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation - induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 937-948.

[30] Sheldon M C, Dong B, de Bruxelles G L, et al. *Arabidopsis* ammonium transporter, *AtAMT1;1* and *AtAMT1;2*, have different biochemical properties and functional roles [J]. *Plant and Soil*, 2001, 231(1): 151-160.

[31] Neuhauser B, Dynowski M, Mayer M, et al. Regulation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143: 1651-1659.

[32] Yuan L, Loque D, Kojima S, et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters [J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 2636-2652.

[33] Loqué D, Ludewig U, Yuan L X, et al. Tonoplast intrinsic proteins *AtTIP2;1* and *AtTIP2;3* facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(2): 671-680.

[34] Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice [J]. *Plant Cell Physiology*, 2003, 44: 726-734.

[35] Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, et al. Constitutive expression of a novel type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants [J]. *Plant Cell Physiology*, 2003, 44(2): 206-211.

[36] 邓若磊, 谷俊涛, 路文静, 等. 水稻铵转运蛋白基因 *OsAMT1;4* 和 *OsAMT5* 的特征分析、功能和表达 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(11): 2395-2402. (Deng R L, Gu J T, Lu W J, et al. Characterization, function and expression analysis of ammonium transporter gene *OsAMT1;4* and *OsAMT5* in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40 (11): 2395-2402.)