

鹌鹑 *MyoD* 基因多态性与生长性状的相关性分析

汪保¹, 朱梦婷^{2,3}, 杨华^{2,3*}, 杨永林², 余乾², 张文喆² (1.新疆生产建设兵团第四师创锦农业开发集团有限公司, 新疆可克达拉 835209; 2.新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 新疆石河子 832000; 3.石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要 [目的]研究 *MyoD* 基因与鹌鹑生长性状的相关性。[方法]以朝鲜鹌鹑为研究对象,应用 HRM 技术检测群体中 *MyoD* 基因的多态性,测定其生长性状,并进行关联分析;qPCR 检测 3 种基因型胚胎肌肉组织中 *MyoD* 基因的表达量。[结果]*MyoD* 基因在群体中存在 AA、Aa 和 aa 3 种基因型,AA 和 Aa 基因型个体的胸围显著高于 aa 基因型 ($P < 0.05$)。胚胎发育的 7~15 d 均能检测到 *MyoD* 基因表达,*MyoD* 基因的表达量从 11 d 开始升高,15 d 达到峰值。AA 和 Aa 基因型 *MyoD* 基因表达量提高速度高于 aa 基因型。[结论]*MyoD* 基因 A 等位基因为朝鲜鹌鹑胚胎生长发育的优势基因,可用于生长发育快的个体基因型育种选择。

关键词 鹌鹑;*MyoD* 基因;多态性;生长性状;相关性分析

中图分类号 S837 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)24-0093-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.24.020

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The Polymorphism Detection of *MyoD* Gene and Correlation Analysis with Growth Traits in Quail

WANG Bao¹, ZHU Meng-ting^{2,3}, YANG Hua^{2,3} et al (1.The 4th division ChuangJin Agricultural Development Group Co., Ltd. of Xinjiang Production and Construction Corps, Kekedala, Xinjiang 835209; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi, Xinjiang 832000; 3. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract [Objective] The purpose of this study was to explore the correlation between the different genotypes of *MyoD* gene and growth traits in quails. [Method] Korean quails were chosen as the research object, HRM technology was used to detect the polymorphism of *MyoD* gene in quails, and the growth traits were measured. The correlation analysis between growth traits and *MyoD* gene were analyzed. The mRNA expression of *MyoD* three genotypes were analyzed by qPCR in muscle tissue in embryonic stage of quail. [Result] The results showed that three genotypes (AA, Aa and aa) of *MyoD* gene were detected in the quail population. The chest circumference was significantly higher in AA and Aa genotype than aa genotype ($P < 0.05$). The results of qPCR showed that *MyoD* gene expression could be detected at 7-15 d of embryonic development, the level of *MyoD* gene expression was increased on day 11, and reached a peak on day 15 of embryonic development. The expression level of AA and Aa genotypes was significantly faster than that of aa genotype. [Conclusion] It is speculated that A allele of *MyoD* gene may be the dominant genotype during the embryonic growth and development of Korean quail, and can be used to genotype selection for rapid growth in quail breeding.

Key words Quail; *MyoD* gene; Polymorphism; Growth trait; Correlation analysis

鹌鹑作为第二大禽类肉制品,在我国及世界各地都有广阔的市场。随着消费者对于肉质要求的日益多样化,人们不再一味地追求瘦肉率,而是喜欢独特的口感。鹌鹑具有肉质鲜美、营养价值高及独特的风味,深受消费者欢迎^[1]。动物肌肉组织的生长发育从微观的角度分析是蛋白质增加和细胞增长分化的结果,其过程相对较为复杂,涉及多基因分子网络调控过程。*MyoD* 是生肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)基因家族成员中唯一在所有的肌细胞中都能够表达的基因,参与成肌细胞的分化和特化过程,是一种对肌肉组织的生长发育具有重要作用的转录因子^[2]。

研究表明,*MyoD* 基因参与早期成肌细胞分化和发育,在家禽早期细胞发育中起着重要作用^[3]。张久盘等^[4]对固原鸡 CDS 区的 SNP 进行检测,发现 *MyoD* 基因 126A>C 突变位点可能是影响固始鸡生长发育的重要 SNP。朝鲜鹌鹑的肌肉纤维早在胚胎时期就已经发育完成,可能受到 *MyoD* 等相关基因的调控,但有关其作用机理的研究较少^[5]。因此,笔者以朝鲜鹌鹑为研究材料,研究 *MyoD* 基因的多态性,分析不同基因型与生长性状的相关性,利用 qPCR 技术检测子代

MyoD 基因型胚胎肌肉组织中的 mRNA 表达水平,探讨 *MyoD* 基因与鹌鹑胚胎肌肉发育之间的关系,以期为鹌鹑的分子育种提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲养管理 120 只体重接近、健康状况良好的 8 周龄朝鲜鹌鹑购自莒南县鹌鹑养殖场,包括公鹌鹑 20 只和母鹌鹑 100 只。公母分笼饲养,待母鹌鹑体内精液排尽之后用于后续试验。采用 50 cm×60 cm×40 cm 折叠式饲喂笼,饲养密度为 0.3 m²/只,自由采食和饮水(开始饲喂的前饮水中添加多维缓解应激),鹌鹑日粮为天康饲料科技有限公司的全价配合饲料进行喂养。日粮组成:玉米 63.45%,豆粕 28.40%,骨粉 2.00%,石粉 2.00%,预混料 1.00%,鱼粉 3.00%,DL-蛋氨酸 0.15%;营养成分:钙 3.00%,总磷 0.30%,粗纤维 2.00%,粗蛋白 19.85%,代谢能 11.56 MJ/kg。

夜间提供光照,舍内温度维持 20~23 ℃,每天清扫一次并用消毒剂杀菌,保证良好的空气质量,确保相同的饲喂环境。试验期间每日 10:00 和 20:30 定时定量饲喂,确保每日剩余饲料量不超过饲喂量的 5%。

1.2 主要仪器与试剂 电子天平(赛多利斯有限公司,德国),PCR 仪(SeneoQuest 公司,德国),凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国),电泳仪(北京六一生物科技有限公司,北京),高速台式离心机(日立公司,日本),Light Cycler96 荧光

基金项目 兵团中青年科技创新领军人才计划项目(2019CB019)。

作者简介 汪保(1976—),男,新疆伊犁人,高级畜牧师,从事动物遗传育种研究。*通信作者,研究员,博士,从事动物遗传育种与繁殖研究。

收稿日期 2022-12-16

定量PCR仪(Roche公司,美国),DNA提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司,中国),LC Green饱和荧光染料(Lidaho公司,美国)。

1.3 样品采集和指标测定 试验开始第1天随机分笼后佩戴脚标,并在禁食12 h后测定生长性状(体重、体斜长、龙骨长、胸围、胫长、胫围)。具体测定方法参考《NY/T 823—2004家禽生产性能名词术语和度量统计方法》进行^[6-8]。第20天开始将公鹌鹑与母鹌鹑进行自然交配,并于配种后7 d内开始收集种蛋,分批收集不同分组的种蛋,并转移到孵化箱内。在7~15日胚龄开始采集胚胎肌肉组织,并迅速转移到-80℃冰箱备用。

1.4 引物的设计与合成 参照鸡*MyoD*基因序列(GenBank登录号:XM_046943766.1),选取β-actin基因作为内参基因。使用Primer Premier 5.0软件设计4对引物,其中*MyoD*-1、*MyoD*-2用于多态性分析,*MyoD*-3用于qRT-PCR试验,引物在生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

表1 *MyoD*基因引物序列
Table 1 Primer sequence of *MyoD* gene

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'—3') | 退火温度 Annealing temperature /℃ | 产物长度 Production length//bp |
|---------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------|
| <i>MyoD</i> -1 | F: CACGCAGGCTTGAGTAATG R: GGATGCTTGTCCCAGAAC | 59 | 270 |
| <i>MyoD</i> -2 | F: CACGCAGGCTTGAGTAATG R: CAGGATGCTTGTCCCAGA | 60 | 272 |
| <i>MyoD</i> -3 | F: GCAATGGCAGCAAGAAG R: CAATGTTACAGAGGTTGAGAA | 59 | 123 |
| β-actin | F: GAGAAATTTGCGTGACATCA R: CCTGAACCTCTCATTTGCCA | 57 | 152 |

1.5 *MyoD*基因多态性检测 翅下静脉采集亲本朝鲜鹌鹑1 mL全血,参照DNA提取试剂盒的说明书提取血液基因组DNA,通过高分辨率溶解曲线(HRM)分析*MyoD*基因的群体多态性。PCR反应体系:PCR Mix 10.0 μL,上、下游引物各

0.5 μL,模板DNA 1.0 μL,LC Green饱和荧光染料0.3 μL,dd H₂O 12.7 μL。PCR扩增程序:95℃预变性5 min,94℃变性30 s,引物对应的退火温度30 s,72℃延伸30 s,共40个循环;72℃ 10 min。HRM程序:95℃变性5 min;40℃冷却1 min形成杂合体;从60℃开始升至95℃进行荧光信号的收集,每秒收集25次信号。收集完后冷却至40℃,所有反应只重复1次。

选取3个有多态性的基因PCR扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果与*MyoD*基因序列进行对比分析。

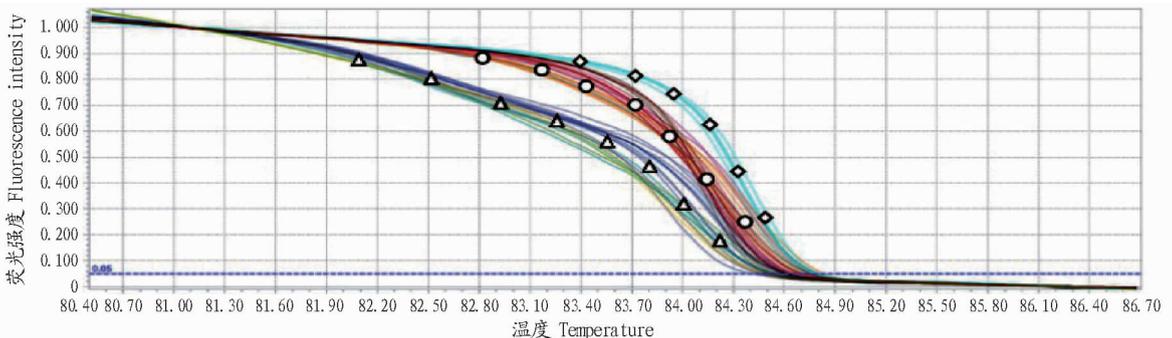
1.6 *MyoD*基因表达的qRT-PCR分析 将公鹌鹑与母鹌鹑进行杂交试验,根据基因型组建I组(AA和Aa基因型)和II组(aa基因型)子代胚胎,采集胚胎肌肉样品,使用Trizol法提取组织总RNA,参照反转录试剂盒使用说明反转录为cDNA,反应体系:5×PrimeScript RT Master Mix 8 μL,RNA约1 800 ng(根据浓度计算),加入RNase-free ddH₂O补至40 μL。cDNA合成的条件:37℃ 15 min;85℃ 5 s;合成的cDNA置于4℃保存。

利用qRT-PCR检测*MyoD*基因的相对表达量。20 μL反应体系:SYBR Premix ExTaq (2×) 10 μL,cDNA 1 μL,上、下游引物各1 μL,ddH₂O 7 μL。反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环,每个样品设3次重复。

1.7 数据分析 构建最小二乘线性模型: $Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$,其中, Y_{ij} 为性状观察值, μ 为群体性状均值, G_i 为基因型固定效应, e_{ij} 为随机误差。使用SPSS 21.0统计软件对基因型与生长性状进行关联分析。2组基因型*MyoD*基因表达量采用t检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 亲本鹌鹑*MyoD*基因多态性 从图1可见,HRM分型结果,公母鹌鹑群体中*MyoD*基因均存在AA、Aa和aa 3种基因型。



注:○表示AA基因型,△表示Aa基因型,□表示aa基因型。

Note:○ indicates AA genotype,△ indicates Aa genotype,□ indicates aa genotype.

图1 *MyoD*基因分型结果

Fig.1 The result of *MyoD* genotyping

2.2 *MyoD*基因测序结果 对*MyoD*基因PCR产物测序结果进行比对,发现*MyoD*基因存在A700G的同义突变(图2)。

2.3 *MyoD*基因的遗传多态性 由表2可知,在亲本鹌鹑群体中,AA基因型个体数高于其他基因型,为优势基因型,AA基因型频率为0.56。而母鹌鹑的AA、Aa和aa的基因型频率分别

为 0.56、0.28 和 0.16。亲本公母鹌鹑的等位基因 A 为优势等位基因,基因频率分别为 0.67 和 0.70。 χ^2 检验表明,公母鹌鹑该基因座偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态($P < 0.05$)。

2.4 *MyoD* 基因多态性与生长性状的关联分析 由表 3 可知,对朝鲜鹌鹑 *MyoD* 基因 AA、Aa 和 aa 3 种基因型与生长性状的关联分析发现,AA 和 Aa 基因型个体的胸围显著高于 aa 基因型个体($P < 0.05$),3 种基因型个体的体斜长、龙骨长、胫长和胫围均差异不显著($P > 0.05$)。

2.5 子代鹌鹑胚胎期 *MyoD* 基因的相对表达量 从图 3 可见,I 组和 II 组鹌鹑在胚胎肌肉发育的 7~15 d 均检测到 *MyoD* 基因的表达,第 7~10 天表达水平较低,从 11 d 开始显著升高,在 15 d 达到最高峰;I 组(AA 和 Aa 基因型)鹌鹑在 11 d 之后的表达量增长显著高于 II 组(aa 基因型)个体($P < 0.05$)。

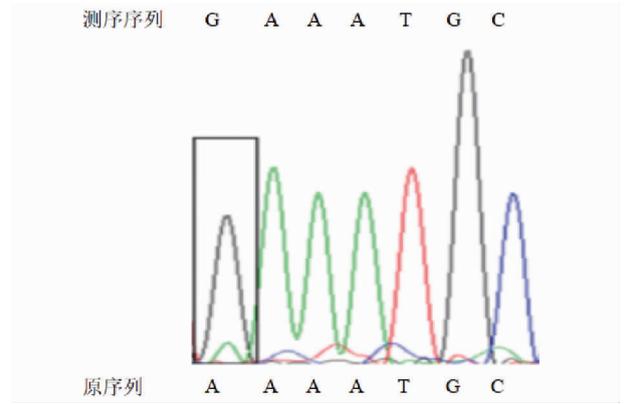


图 2 *MyoD* 基因测序结果

Fig.2 The result of *MyoD* gene sequencing

表 2 鹌鹑 *MyoD* 基因型频率和基因频率分析

Table 2 The results of genotype frequency and gene frequency in quail

| 性别 Sex | 基因型频率 Genotype frequency | | | 基因频率 Gene frequency | | χ^2 |
|---------------|--------------------------|----------|----------|---------------------|----------|----------|
| | AA | Aa | aa | A | a | |
| 公(20) Male | 0.56(10) | 0.22(4) | 0.22(4) | 0.67(16) | 0.33(4) | 4.50 |
| 母(100) Female | 0.56(56) | 0.28(28) | 0.16(14) | 0.70(77) | 0.30(23) | 11.11 |

注:括号中为个体数量。

Note: Number of individuals in brackets.

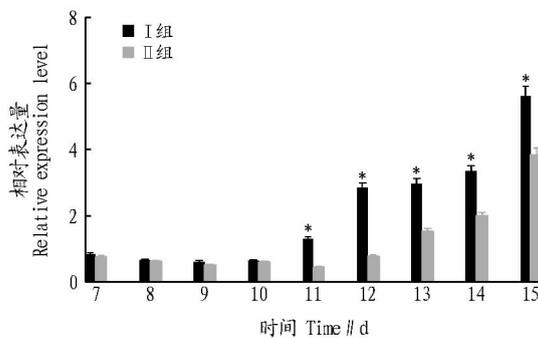
表 3 *MyoD* 基因多态性与生长性状的相关分析

Table 3 Correlation between growth traits and polymorphism of *MyoD* gene

| 基因型 Genotype | 体斜长 Oblique body length//cm | 龙骨长 Keel length//cm | 胸围 Chest circumference//cm | 胫长 Shank length//cm | 胫围 Shank circumference//cm |
|-----------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| AA | 9.23±0.34 a | 4.98±0.27 a | 15.38±0.67 a | 3.27±0.37 a | 1.53±0.08 a |
| Aa | 7.33±0.11 a | 4.27±0.36 a | 15.24±0.97 a | 3.11±0.28 a | 1.46±0.27 a |
| aa | 6.38±0.02 a | 5.32±0.19 a | 14.99±1.38 b | 2.76±0.51 a | 1.33±0.24 a |

注:同列不同小写字母表示基因型间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different superscript lowercase letters in same column indicate significant difference among different genotype($P < 0.05$).



注: * 表示 I 组和 II 组 *MyoD* 基因表达差异显著($P < 0.05$)。

Note: * indicate significant difference of relative expression of *MyoD* gene between I group and II group($P < 0.05$).

图 3 子代鹌鹑胚胎期 *MyoD* 基因的相对表达量

Fig.3 The relative expression of *MyoD* gene at embryonic stage in offspring quails

3 讨论

MyoD 是典型的肌肉发育调节因子,其表达水平与胎儿胚胎期的肌肉生长发育密切相关。*MyoD* 基因调控自身的表达,与其他的生肌因子互相作用,控制或抑制彼此的表达^[2,8-9]。*MyoD* 的基因型与基因频率对肌纤维的发育起着重

要的调节作用,并对产肉量和肉品质有重要影响。魏岳^[10]对边鸡 *MyoD* 基因多态性和生长和屠宰性状关联分析发现,MD-4 位点对生长性状有显著或极显著的影响,且 AA 和 CC 为优势基因型。该研究通过检测朝鲜鹌鹑 *MyoD* 基因多态性,测序发现 *MyoD* 基因存在 A700G 的同义突变位点存在 AA、Aa 和 aa 3 种基因型。关联分析发现,*MyoD* 基因不同基因型与生长性状之间有一定相关性,AA 和 Aa 基因型个体的胸围显著高于 aa 基因型个体。因此,推测 AA 基因型是参与调控鹌鹑胚胎期肌肉发育的优势基因型,这与魏岳^[10]的研究一致。

在家禽胚胎早期,肌纤维的分化就已经完成,*MyoD* 基因控制成肌细胞分化和发育^[11-13]。Mok 等^[14]研究发现,在体节中 Myf5 首先在 HH 第 9 阶段的体节和近轴中胚层中表达,随后在 HH 第 12 阶段表达 *MyoD*,在 HH 第 14 阶段表达 Mgn 和 MRF4;在四肢肌肉中 HH 第 22 阶段前肢中首先检测到 Myf5 表达,在 HH 第 23 阶段检测到 *MyoD* 表达,在 HH 第 24 阶段检测到 Mgn 表达,在 HH 第 30 阶段检测到 MRF4 表达。该研究结果表明,I 组鹌鹑和 II 组鹌鹑在胚胎肌肉发育的 7~15 d 均检测到 *MyoD* 基因表达,但 7~10 d 表达水平较低,从 11 d 开始显著升高,在 15 d 达到最高峰。AA 和 Aa 基因型

鹌鹑在 11 d 之后 *MyoD* 基因的表达量显著高于 aa 基因型个体,并且 2 组个体 *MyoD* 基因的表达均表现出相似的增长趋势,但 AA 和 Aa 基因型的增长幅度较为显著。

4 结论

朝鲜鹌鹑 *MyoD* 基因存在 A700G 同义突变位点,AA 和 Aa 基因型个体的胸围显著高于 aa 基因型个体,*MyoD* 基因在胚胎肌肉发育的 11 d 以后开始发挥作用,携带 A 等位基因的个体 *MyoD* 基因表达量高,生长发育快。

参考文献

[1] 刘佩,庞有志,张小辉,等.朝鲜鹌鹑 *OCA2* 基因克隆及其多态性与羽色的相关性[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(2):7-14,25.

[2] 范心凤,金四华,高斌,等.不同日龄皖南三黄鸡肌肉中 *MyoD* 基因表达及相关分析[J].安徽农业大学学报,2019,46(5):785-790.

[3] 何明亮,张欣超,陈福祥,等.京海黄鸡 *MyoD* 基因外显子 1 多态性对生长和繁殖性状的遗传效应[J].中国家禽,2019,41(24):53-55.

[4] 张久盘,王锦,张娟,等.固原鸡生肌调节因子 *MyoD* 基因克隆及其组织表达分析[J].中国家禽,2018,40(21):11-16.

[5] YANG Z Q, QING Y, ZHU Q, et al. Genetic effects of polymorphisms in myogenic regulatory factors on chicken muscle fiber traits[J]. Asian-Australian journal of animal sciences, 2015, 28(6): 782-787.

[6] FENG X, WANG Z Y, WANG F, et al. Dual function of *VGLL4* in muscle regeneration [J]. *Embo journal*, 2019, 38(17): 1-16.

[7] 陈宽维,高玉时,王志跃,等.中华人民共和国农业行业标准 家禽生产

性能名词术语和度量统计方法[J].中国禽业导刊,2006,23(15):45-46.

[8] 家禽生产性能名词术语和度量统计方法[C]//中国畜牧业协会禽业分会.首届中国黄羽肉鸡行业发展大会会刊.广州:中国畜牧业协会,2008:240-246.

[9] VELLEMAN S G, COY C S, EMMERSON D A. Effect of the timing of post-hatch feed restrictions on broiler breast muscle development and muscle transcriptional regulatory factor gene expression[J]. *Poultry science*, 2014, 93(6): 1484-1494.

[10] 魏岳.边鸡 *MSTN* 基因、*MyoD* 家族部分基因和 *Smad3* 基因多态性与生长和屠体性状的相关性分析以及表达的研究[D].扬州:扬州大学,2014.

[11] MCFARLAND D C, PESALL J E, COY C S, et al. Effects of 17 β -estradiol on turkey myogenic satellite cell proliferation, differentiation, and expression of glypican-1, *MyoD* and myogenin[J]. *Comparative biochemistry and physiology. Part A: Molecular and integrative physiology*, 2013, 164(4): 565-571.

[12] COLE N J, HALL T E, MARTIN C I, et al. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. [J]. *Journal of experimental biology*, 2004, 207(24): 4239-4248.

[13] ALVES H J, ALVARES L E, GABRIEL J E, et al. Influence of the neural tube/notochord complex on *MyoD* expression and cellular proliferation in chicken embryos[J]. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2003, 36(2): 191-197.

[14] MOK G F, MOHAMMED R H, SWEETMAN D. Expression of myogenic regulatory factors in chicken embryos during somite and limb development [J]. *Journal of anatomy*, 2015, 227(3): 352-360.

(上接第 92 页)

[16] ARNAUD N, GIRIN T, SOREFAN K, et al. Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(19): 2127-2132.

[17] 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 Phytol*, 2014, 201(4): 1192-1204.

[18] FENG X M, ZHAO Q, ZHAO L L, et al. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene *MdC1bHLH1* encodes an ICE-like protein in apple[J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 1-14.

[19] KOMATSU K, MAEKAWA M, UJIE S, et al. *LAX* and *SPA*: Major regulators of shoot branching in rice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20): 11765-11770.

[20] 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.

[21] KONDOU Y, NAKAZAWA M, KAWASHIMA M, et al. RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth[J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1924-1935.

[22] 郑玲,代琪芳,陈雪冬.森林草莓 bHLH 家族基因的鉴定与分析[J].江苏农业科学,2022,50(2):47-52.

[23] 杨梦婷,张春,王作平,等.玉米 *ZmbHLH161* 基因的克隆及功能研究[J].作物学报,2020,46(12):2008-2016.

[24] 李格,孟小庆,李宗芸,等.甘薯盐胁迫响应基因 *lbMYB3* 的表达特征及生物信息学分析[J].植物学报,2020,55(1):38-48.

[25] 樊铸珊,罗兴录,单忠英,等.木薯 *SCARECROW-LIKE (SCL)* 基因克隆、

生物信息学及非生物胁迫下表达分析[J].南方农业学报,2020,51(8):1888-1895.

[26] YANG T R, YAO S F, HAO L, et al. Wheat bHLH-type transcription factor gene *TabHLH1* is crucial in mediating osmotic stresses tolerance through modulating largely the ABA-associated pathway[J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(11): 2309-2323.

[27] KIRIBUCHI K, SUGIMORI M, TAKEDA M, et al. *RERJ1*, a jasmonic acid-responsive gene from rice, encodes a basic helix-loop-helix protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(3): 857-863.

[28] LEE S M, LEE S, YANG K Y, et al. Overexpression of *PRE1* and its homologous genes activates Gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(5): 591-600.

[29] ZHAI Y Q, ZHANG L C, XIA C, et al. The wheat transcription factor, *TabHLH39*, improves tolerance to multiple abiotic stressors in transgenic plants[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1321-1327.

[30] LI J L, WANG T, HAN J, et al. Genome-wide identification and characterization of cucumber *bHLH* family genes and the functional characterization of *CsbHLH041* in NaCl and ABA tolerance in *Arabidopsis* and cucumber [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 1-20.

[31] ZHAO Q, FAN Z H, QIU L N, et al. *MdbHLH130*, an apple bHLH transcription factor, confers water stress resistance by regulating stomatal closure and ROS homeostasis in transgenic tobacco [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 1-16.

[32] DONG Y, WANG C P, HAN X, et al. A novel bHLH transcription factor *PebHLH35* from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 453-458.