

Research Article

Identification and expression analysis of the *bHLH* transcription factor genes in saffron corms infected with *Fusarium oxysporum*

Fatemeh Moradi Ara, Farhad Nazarian-Firouzabadi , Seyed Sajad Sohrabi, Mitra Khademi



Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Corresponding author

 nazarian.f@lu.ac.ir

Abstract

Keywords

Fusarium oxysporum, Gene expression, Transcriptome, Saffron, *bHLH* transcription factor

Saffron *Crocus sativus* L, is one of the most valuable medicinal plants that can be propagated only vegetatively by its corm. Various soil-borne pathogens, especially *Fusarium oxysporum*, the causal agent of corm rot, seriously damage saffron cultivation worldwide. Transcription factors (TFs) such as Helix Loop Helix (*bHLH*), regulate the expression of many genes including those involved in resistance against pathogens. In this study, the transcriptome of saffron corms infected with *F. oxysporum* was evaluated 48 and 72 hours post-inoculation. Arabidopsis *bHLH* sequences were used to identify the *bHLH* members in saffron transcriptomic data. Finally, the expression pattern of the candidate *bHLH* genes was assessed using the Real-Time qRT-PCR method under biological stress and control. The results of this study led to the identification of 49 *bHLH* encoding sequences in the transcriptome of saffron corms. Analysis of the expression of selected *bHLH* genes showed that the highest and the lowest expression levels were found in the lateral bud and root tissues, respectively. Additionally, the expression analysis of candidate genes from the *bHLH* family in response to corm rot disease revealed a pattern consistent with the RNA-seq data. According to the results of the present study, corm rot disease in saffron increased the expression of *bHLH* genes, suggesting that *bHLH* genes are involved in resistance against corm rot disease in saffron. Thus, the findings of this study may help in identify key effective *bHLH* transcription factors involved in responding to biotic stresses in saffron. Furthermore, the results of present study can be applied in saffron future breeding programs.

Received: 9 August 2024

Revised: 14 October 2024

Accepted: 19 October 2024

Available online: 16 April 2025

Cite this article:

Moradi Ara F, Nazarian-Firouzabadi F, Sohrabi SS, Khademi M, 2025. Identification and expression analysis of the *bHLH* transcription factor genes in saffron corms infected with *Fusarium oxysporum*. *J Appl Res Plant Prot* 14 (2): 143–155. <https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2025.19614>



Copyright© 2025 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.

This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

شناسایی و بررسی ژن‌های فاکتورهای نسخه‌برداری bHLH در بنه‌های زعفران آلوده به عامل بیماری پوسیدگی بنه، *Fusarium oxysporum*

فاطمه مرادی آرا، فرهاد نظریان فیروزآبادی[✉]، سید سجاد سهرابی، میترا خادمی

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

نویسنده مسئول: nazarian.f@lu.ac.ir[✉]

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۹ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۸

چکیده

زعفران *Crocus sativus*، یکی از ارزشمندترین گیاهان دارویی است که تنها از طریق بنه تکثیر می‌شود. بیمارگرهای خاکزاد مختلفی، به ویژه بیمارگر عامل پوسیدگی بنه، *Fusarium oxysporum* خسارت قابل توجهی به کشت زعفران در سراسر جهان وارد می‌کنند. فاکتورهای رونویسی (TF) مانند Helix-Loop-Helix (*bHLH*) بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های دخیل در مقاومت در برابر بیمارگرها را تنظیم می‌کنند. در این مطالعه ترنسکریپتوم بنه‌های زعفران آلوده به بیمارگر فوزاریومی در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. از توالی‌های *bHLH* گیاه آراییدوپسیس برای شناسایی اعضای این خانواده در پروفایل بیانی ژن‌های سرهم‌بندی شده زعفران استفاده شد. در نهایت، تغییرات بیان ژن‌های کاندید با استفاده از روش qRT-PCR تحت تنش زیستی و شاهد بررسی گردید. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی ۴۹ توالی کدکننده *bHLH* در رونوشت بنه‌های زعفران شد. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های انتخابی *bHLH* نشان داد که بیشترین و کمترین میزان بیان به ترتیب در بافت جوانه جانبی و ریشه مشاهده شد. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کاندید از خانواده *bHLH* در پاسخ به بیماری پوسیدگی بنه، الگوی مشابهی را در مقایسه با داده‌های RNA-seq نشان داد. با توجه به مطالعه حاضر، بیماری پوسیدگی بنه در زعفران باعث افزایش بیان ژن‌های *bHLH* شد که نشان می‌دهد ژن‌های *bHLH* در مقاومت علیه بیماری پوسیدگی بنه زعفران نقش دارند. بنابراین، از یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان برای شناسایی عوامل مهم و موثر رونویسی *bHLH* در پاسخ به تنش‌های بیولوژیکی زعفران در برنامه‌های بهنژادی آینده استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بیمارگر پوسیدگی بنه، بیان ژن، ترنسکریپتوم، زعفران، فاکتور نسخه‌برداری *bHLH*

مقدمه

به‌عنوان یک اندام زیرزمینی و به‌دلیل ماندگاری چندساله در خاک، بیشتر مستعد حمله قارچ‌ها و باکتری‌های خاکزی است (Tehrani et al. 2020; Gupta et al. 2021). بیماری پوسیدگی بنه زعفران، توسط *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* ایجاد می‌شود به طوری که محصول این گیاه را به میزان چشمگیری کاهش می‌دهد (Tehrani et al. 2020). برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری، علاوه بر شناسایی و درک نقش ژن‌های مختلف، باید مکانیسم‌های مولکولی دفاعی گیاهان را شناخت تا از این طریق بتوان روابط گیاه - بیمارگر را بررسی نمود و راهکار مناسب را برای ایجاد مقاومت در گیاه به کار بست (Ng et al. 2018). به طور کلی، مبارزه گیاهان علیه بیمارگرها بر اساس پاسخ‌های دفاعی اولیه و القایی استوار است. این واکنش‌ها شامل القاء شبکه‌های پیام‌رسانی هستند که در نهایت سبب راه اندازی پاسخ‌های دفاعی سراسری در تمام پیکره گیاه می‌شوند

زعفران *Crocus sativus* L.، گیاهی علفی و پایا و متعلق به خانواده زنبقیان است که در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی کاربردهای متنوعی دارد (Ramezani et al. 2022; Slimani et al. 2022). زعفران به دلیل تولید آلکالوئیدهای ارزشمندی همچون پیکرکروسین، کروسین و سافرانال در اکثر فارماکوپه‌ها به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم یاد شده است (Frusciante et al. 2014). در حال حاضر ایران بزرگترین تولید کننده و صادرکننده زعفران در جهان است و سهم عظیمی از تولید جهانی این محصول گران‌بها به ایران اختصاص دارد (Hatami et al. 2024). تکثیر زعفران به دلیل تریپلوئید بودن و خودناسازگاری در سیستم گل‌دهی به صورت رویشی و از طریق بنه‌ها امکان‌پذیر است (Koocheki & Seyyedi 2015; Kour et al. 2021; Ghanbari & Khajoei-Nejad 2018). بنه زعفران

مکانیسم تنظیمی گیاهان را در پاسخ به آلودگی بیمارگر مورد تجزیه و تحلیل قرار داد (Naidoo et al. 2018). از این رو هدف پژوهش حاضر شناسایی ژن‌های *bHLH* در گیاه زعفران به منظور تعیین دخالت یا عدم دخالت آن‌ها در مقاومت این گیاه به بیماری فوزاریوم و بررسی بیوانفورماتیکی این خانواده ژنی در ترنسکریپتوم بنه‌های زعفران آلوده به بیمارگر *F. oxysporum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

جمع‌آوری و پردازش داده‌های خام

در این مطالعه از داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکریپتوم بنه زعفران آلوده به *F. oxysporum* از مطالعات Luo et al. (2023) و (Darvishnia et al. 2022) استفاده شد. علاوه بر این، به‌منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات بیان ژن‌های شناسایی شده، داده‌های ترنسکریپتومی مربوطه از پایگاه SRA دانلود و پروفایل بیانی ژن‌های مورد مطالعه در بافت‌های مختلف زعفران شامل بنه، برگ، گل‌برگ، پرچم و کلاله، جوانه اپیکال، جانبی و انتهایی، استفاده شد. به منظور بررسی کیفیت خوانش‌های کوتاه خام از نرم‌افزار FastQC (Version 0.11.6) استفاده شد. برای انجام فرآیند تریمنینگ شامل حذف توالی آداپتور باقی مانده در توالی‌های موجود، توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phred score کمتر از ۳۰)، توالی‌های با میزان بالای نوکلئوتیدهای خاوش نشده (N) و توالی‌های با اندازه کمتر از ۱۰۰ جفت باز از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰) استفاده شد. سرهم‌بندی (اسمبلی) خوانش‌های تمیز شده (clean reads) با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench بر اساس پارامترهای پیش فرض انجام شد.

شناسایی خانواده ژنی *bHLH*

به منظور شناسایی اعضای خانواده *bHLH* در زعفران، ابتدا توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی مرتبط با خانواده ژنی *bHLH* آرآبیدوپسیس از پایگاه داده TAIR به آدرس <https://www.arabidopsis.org> دریافت شدند. سپس جهت شناسایی توالی‌های شامل دمین *bHLH* در زعفران، توالی‌های دریافت شده علیه داده‌های ترنسکریپتوم زعفران (حاصل از سرهم‌بندی نوپدید داده‌های بیانی موجود زعفران در پایگاه داده SRA)، با استفاده از ابزار بلاست نرم‌افزار TBtools مورد جستجو قرار گرفتند. توالی‌های پروتئینی شناسایی شده براساس دمین

(Robson 2021). از جمله این پاسخ‌ها می‌توان به تولید پروتئین‌های مرتبط با بیمارگر (Pathogenesis Related Protein)، واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive Response)، بیان ژن‌های مقاومت R و همچنین تولید ترکیباتی همچون سالیسیلیک اسید SA (Salicylic acid)، اتیلن و فیتوالکسین‌ها اشاره کرد. این ترکیبات فعال کننده‌های پاسخ‌های دفاعی گیاه را افزایش داده و در نهایت منجر به استحکام دیواره سلولی و افزایش تشکیل لیگنین می‌شوند. بیان این پروتئین‌ها به شدت توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌شود (Feller et al. 2011). حدود ۵۸ خانواده از عوامل رونویسی در گیاهان شناسایی شده‌اند که از میان، تعداد هفت خانواده اصلی شامل AP2 ERF، AP2ALA2، WRKY، NAC، MYB، bHLH، و همچنین CUC2، در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارند (Hao et al. 2021). به‌عنوان تنظیم کننده‌های اصلی پاسخ دفاعی گیاهان، بیان و فعالیت این عوامل رونویسی در سطوح مختلف از جمله رونویسی و پس از رونویسی و همچنین تغییرات پس از ترجمه، در مواجهه با تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی تغییر می‌کند (Ng et al. 2018).

خانواده پروتئین‌های *bHLH* یکی از مهم‌ترین خانواده‌های عوامل رونویسی هستند که در تنظیم بیان تعداد زیادی ژن در جریان بروز تنش‌ها دخالت دارند. همچنین این فاکتورهای نسخه‌برداری در تنظیم فرآیندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان همانند؛ رشد ساقه (Ledent & Vervoort 2001)، تنظیم گلدهی (Ledent & Vervoort 2001) رشد ریشه (Fisher & Caudy 1998) تشکیل کلروپلاست (Toledo-Ortiz et al. 2003) الگوی آوندی گره (Heim et al. 2003) و انتقال سیگنال ناشی از تنش (Toledo-Ortiz et al. 2003) تکثیر سلولی، تمایز سلولی و تعیین پیشینه سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند (Belhadjali 2022). در حال حاضر، چگونگی روابط زیستی بین گیاه زعفران و بسیاری از بیمارگرها از جمله قارچ *F. oxysporum* هنوز نامشخص است. اگرچه دانشمندان متعددی به روابط بین گیاه زعفران و برخی از بیمارگرها پرداخته‌اند، اما هنوز اطلاعات ما از منظر مولکولی چندان زیاد نیست. از این‌رو، لازم است از روش‌های نوین مولکولی در کنار تعیین توالی RNA با استفاده از فناوری RNA-Seq برای روشن شدن بخش‌های مبهم پاسخ مولکولی زعفران به بیمارگرهای مختلف استفاده شود. با استفاده از این فناوری می‌توان به‌طور جامع و پویا تغییرات مکانی-زمانی بیان ژن‌ها تحت تنش حاصل از حمله بیمارگر را تشخیص داد، به‌طوری که پس از آن می‌توان ژن‌های عملکردی را استخراج و

اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی بنه‌ها استفاده شد. به منظور اعمال تیمار، ابتدا با استفاده از نوک یک سوزن استریل، منافذی برای تلقیح سوسپانسیون قارچ ایجاد و سپس مقدار پنج میکرولیتر از محلول سوسپانسیون قارچ توسط سرنگ به بنه‌ها تزریق شد. شایان ذکر است در نمونه‌های شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. بنه‌های گروه تیمار و شاهد در سه تکرار جداگانه در ظروف شیشه‌ای قرار داده شدند و سپس در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان‌های ۰، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار نمونه‌برداری انجام شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی آغازگرها

جهت بررسی بیان خانواده *bHLH* از بنه‌های زعفران تلقیح شده با بیمارگر به همراه بنه‌های عاری از آلودگی به عنوان شاهد، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت گرفت. برای استخراج RNA از کیت ترایزول (شرکت NEB به شماره T2010S) و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل یک درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر مورد بررسی گرفت. به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی موجود در نمونه‌ها، از آنزیم DNase I استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت سینا کلون مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. ابتدا توالی ناحیه کدکننده ژن‌های انتخاب شده از فایل اسمبلی استخراج و سپس به منظور طراحی آغازگرها برای تکثیر بخشی از ژن‌های مذکور از نرم‌افزار AlleleID (نسخه ۶) استفاده شد. مشخصات آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

bHLH با استفاده از الگوریتم CLUSTAL W همردیف شدند. علاوه بر این، برای اطمینان از صحت توالی‌های شناسایی شده، تمام ORFs برای وجود دمین‌های پروتئینی *bHLH* با استفاده از پایگاه CDD مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند. علاوه بر این توالی پروتئینی ژن‌های شناسایی شده بر اساس آنالیز موتیف Pfam طبقه‌بندی شدند.

بررسی بیان *bHLH* In silico ژن‌های

پس از نقشه‌یابی خوانش‌های تمیز شده علیه مرجع ترنسکرپتومی ساخته شده، مقادیر بیان ژن‌های شناسایی شده در مقیاس TPM (Transcripts Per Million) در هر بافت-تیمار محاسبه شد. پس از کمی‌سازی بیان ژن‌ها، توالی‌های با مقادیر logFC بزرگ‌تر مساوی $|\pm 1|$ و FDR کوچک‌تر از ۰/۰۵ به عنوان ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) شناسایی شدند. در نهایت به منظور گروه‌بندی ژن‌ها در تیمارهای مورد مطالعه، از تحلیل خوشه‌ای به همراه ترسیم نقشه حرارتی مبتنی بر مقادیر Log (TPM+1) استفاده شد.

تهیه و ضدعفونی بنه‌ها زعفران

بنه‌های زعفران از مزارع کشت زعفران در مشهد تهیه و سپس ضدعفونی شدند. بدین منظور ابتدا بنه‌ها به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون، شستشو شدند و پس از آن بنه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و سپس آب مقطر شستشو داده شدند.

مایه‌زنی قارچ فوزاریوم به بنه‌های زعفران

از جدایه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* با غلظت 10^6

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-time PCR.

Table 1. Characteristics of primers used for Real-time PCR analysis.

Primer	Sequence (5'-3')	T _m (°C)
Contig_1641	F1: TGATAGCCACAGCCTTG R1: CCGAGGATTCACCGTTGC	55
Contig_25629	F1: ATCTTGCTTCGTCTTGTC R1: ATGGAGGCTATTGGTTATATC	58.8
<i>Elf1-a</i>	F: TGAACCATCCAGGACAGATTG R: TCTTAACCATAACCAGCATCACC	57

(2x) شرکت سینا کلون صورت گرفت. ترکیب و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط آماده Master Mix (2x) PCR، ۱ میکرولیتر

بررسی الگوی بیان ژن‌های *bHLH*

بررسی بیان ژن‌های منتخب، به کمک روش Real-time PCR و با استفاده از کیت SinaSYBR Blue IIS-qPCRMix

نتایج

سرهم‌بندی نوپدید ترنسکریپتوم زعفران

سرهم‌بندی پروفایل بیانی زعفران با استفاده از ادغام خوانش‌های پردازش شده با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench منجر به ایجاد ۶۳۳۲۶ توالی منحصر به فرد شد. همچنین حجم کل پروفایل بیانی زعفران ۶۴/۶۵ Mb محاسبه شد (جدول ۲). نتایج بلاست اسمبلی ساخته شده علیه پایگاه NR نشان داد که تعداد ۳۵۳۹۴ (۵۵/۸۹ درصد) رونوشت با حد آستانه $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ ، دارای رکورد مشابه در پایگاه NR بودند. همچنین نتایج بلاست اسمبلی در مطالعه حاضر نشان داد که زعفران بیشترین شباهت را با گیاه مارچوبه باغی *Asparagus officinalis* و پس از آن با نخل خرما *Phoenix dactylifera* داشت. مستندسازی رونوشت‌های ایجاد شده علیه پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری نشان داد که ۵۵/۸۹ درصد از رونوشت‌ها با حد آستانه $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ ، دارای حداقل یک رکورد مشابه در پایگاه پروتئین‌های غیر تکراری بودند (شکل ۱).

آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت هر یک با غلظت ۱۰ پیکومول، هشت میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA با غلظت ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و واکنش‌ها در دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen انجام گرفت. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن‌ها شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به الگو به مدت ۲۰ ثانیه (دمای این مرحله از چرخه بسته به ترکیب آغازگر بر اساس جدول ۱ و برای هر جفت آغازگر متغیر بود) و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در این آزمایش ژن کنترل داخلی *elf1-α* جهت نرمال‌سازی مقادیر بیان ژن‌ها استفاده شد (Livak & Schmittgen 2001). این آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار LinRegPCR و Microsoft Excel (نسخه ۲۰۲۰) انجام شد.

جدول ۲. خلاصه‌ای از کمیت و کیفیت داده‌های خوانش شده مرجع ترنسکریپتومی زعفران.

Table 2. A summary of the quantity and quality of read data of saffron transcriptome reference.

Parameters	Value
Number of transcripts	63326
Size of the smallest transcript (nt)	200
Size of the largest transcript (nt)	16256
Number of bases (nt)	64651404
Mean length of the transcripts (nt)	1020.93
Number of transcripts greater than 1kb	23146
Number of transcripts with ORF	22388
N90	482
N70	935
N50	1413
N30	2100
N10	3571
%GC	43.36

شناسایی اعضا خانواده ژنی *bHLH*

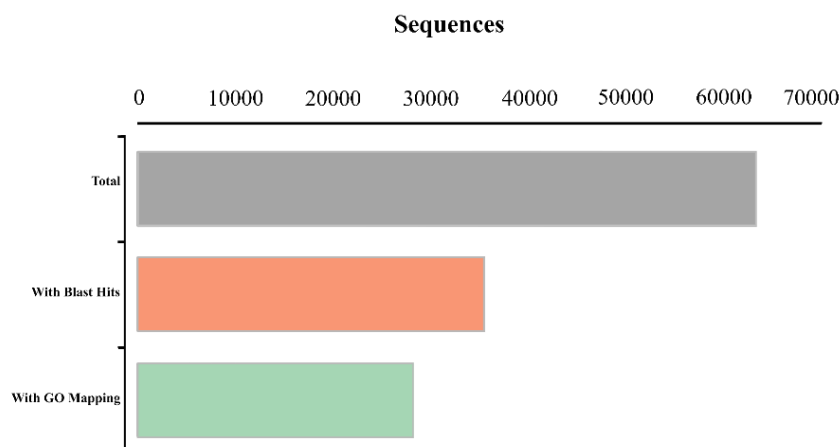
تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی رونوشت‌های زعفران منجر به شناسایی ۴۹ پروتئین *bHLH* در پروفایل بیانی این گیاه شد. بطور میانگین این رونوشت‌ها شامل ۱ تا ۲ دامین *bHLH* با میانگین ۴۰ تا ۶۰ اسیدآمینه بودند. بیشترین تعداد دامین مربوط به توالی‌های با شناسه ژنی contig_1148 و contig_13373 با دو دامین *bHLH*، و بیشترین تعداد اسیدآمینه مربوط به توالی با شناسه contig_62381 با ۸۳ اسیدآمینه بود. بیشترین تعداد موتیف مربوط به توالی با شناسه contig_13360 با ۲۲ موتیف بود. همچنین تجزیه و تحلیل ژن‌های شناسایی شده با استفاده

از پایگاه pfam منجر به شناسایی ۳ موتیف حفاظت شده گردید (شکل ۲).

به‌طور کلی بافت‌های مورد مطالعه از نظر بیان ژن‌های *bHLH* در دو دسته متفاوت قرار گرفتند. به‌طوری که بافت ریشه در یک گروه و سایر بافت‌ها در گروه مجزای دیگری قرار گرفتند. علاوه بر این، نتایج بررسی بیان ژن‌های *bHLH* شناسایی شده نشان داد که ژن‌های مورد بررسی در پنج گروه مجزا قرار گرفتند. با توجه به نقشه حرارتی (شکل ۳)، در میان ژن‌های مورد بررسی، توالی ژنی با شناسه contig-1664 دارای کم‌ترین میزان بیان در تمامی بافت‌ها و توالی ژنی با شناسه contig-1111 دارای

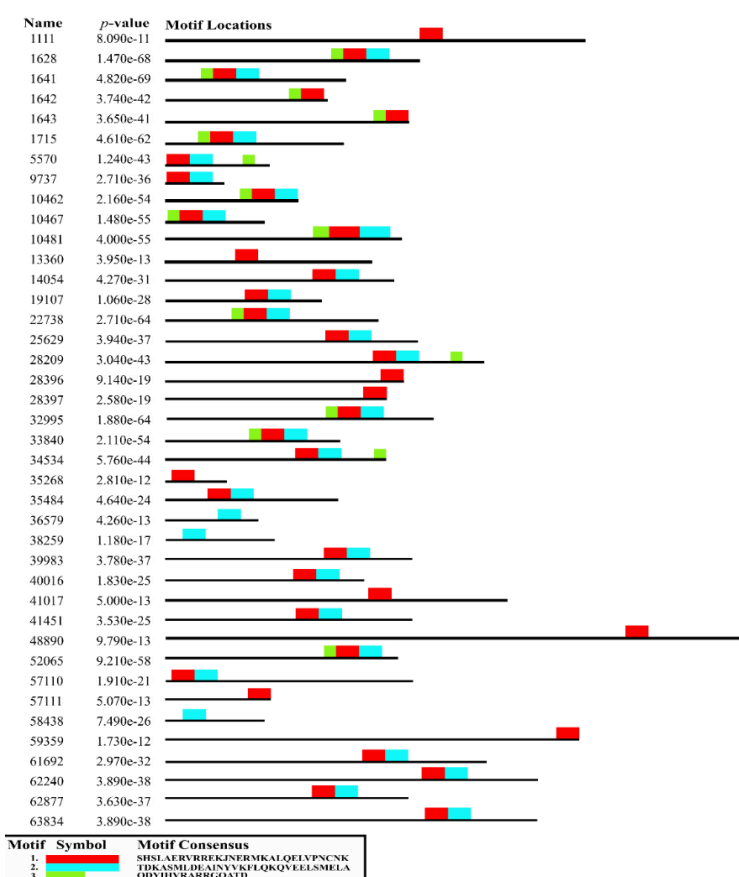
تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز بافت ریشه دور از سایر بافت‌های مورد بررسی در گروه مجزایی قرار گرفت، هر چند گروه‌بندی سایر بافت‌ها در این روش با تفکیک بهتری انجام شد.

بیشترین میزان بیان در بافت‌های جوانه‌ی جانبی و بنه بود. نتایج گروه‌بندی بافت‌های مختلف از طریق تجزیه به مولفه‌های اصلی (شکل ۴) نیز در مطابقت با تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بود. در نتایج



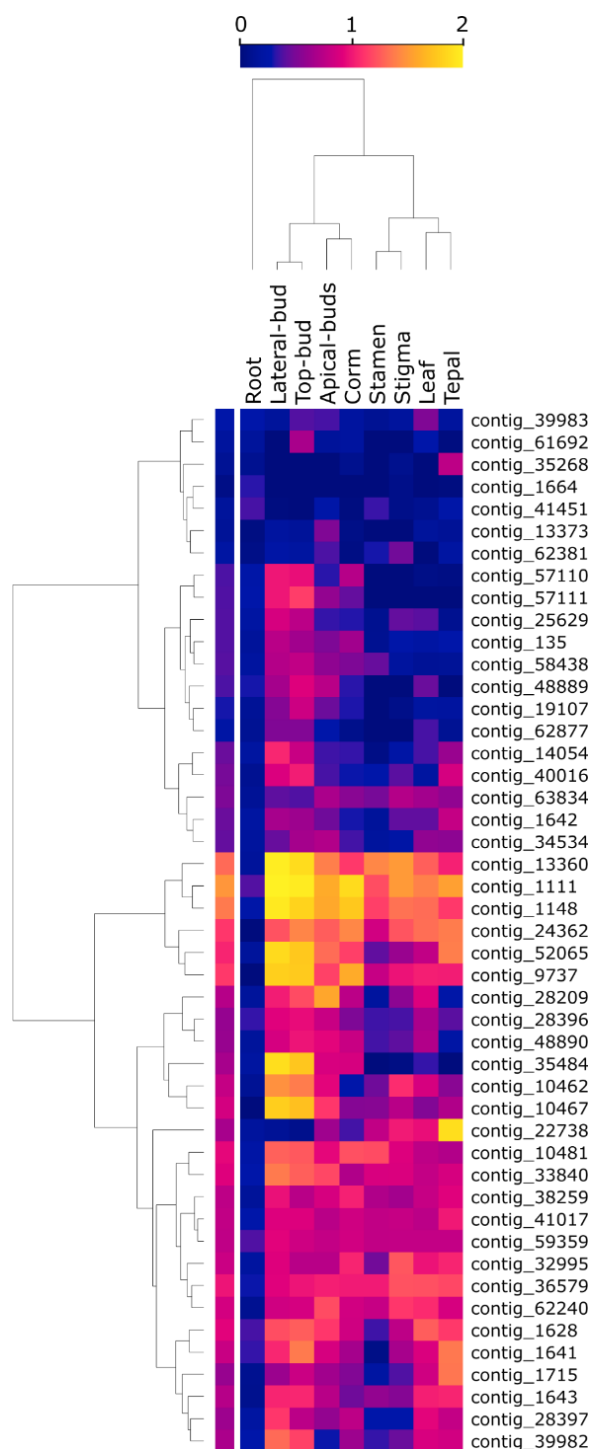
شکل ۱. نتایج BLASTX ترنسکرپتوم زعفران علیه پایگاه داده NR و نقشه‌یابی آن‌ها علیه پایگاه GO.

Figure 1. BLASTX results of saffron transcriptome against NR database and their mapping against gene ontology database.



شکل ۲. نمای شماتیکی از موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌ها خانواده bHLH در گیاه زعفران.

Figure 2. Schematic representation of the conserved motifs of bHLH family proteins in the saffron plant.

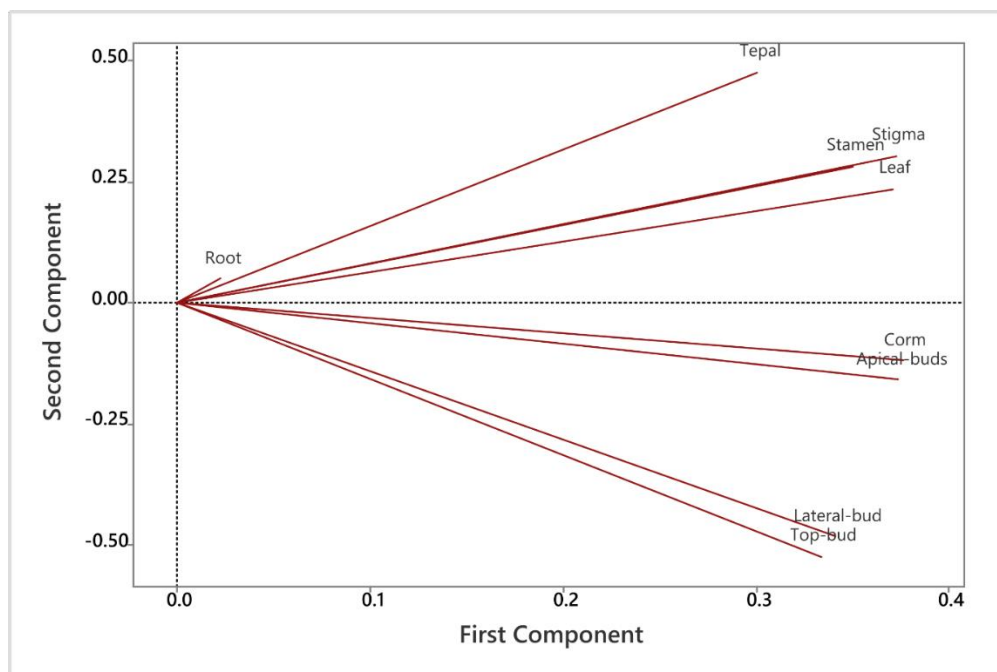


شکل ۳. نقشه حرارتی بیان ژن‌های خانواده *bHLH* در بافت‌های مختلف زعفران.

Figure 3. Heat map of the expression of *bHLH* family genes in different tissues of saffron.

زوایای بین خطوط میزان همبستگی را نشان می‌دهد و هرچه زاویه بین خطوط کمتر باشد میزان همبستگی بیشتر است بطوری که میزان بیان ژن‌های مد نظر در دو بافت برگ و پرچم (Stamen stigma) دارای همبستگی بسیار بالایی هستند.

همانطور که مشاهده می‌شود، نمودار (شکل ۴) گروه‌بندی بافت‌ها را براساس میزان بیان ژن‌ها به‌طور دقیق‌تر نشان می‌دهد. در این نمودار نیز همچون نقشه حرارتی، میزان بیان ژن‌های ذکر شده در بافت ریشه بسیار متفاوت‌تر از سایر بافت‌ها بود. کسینوس

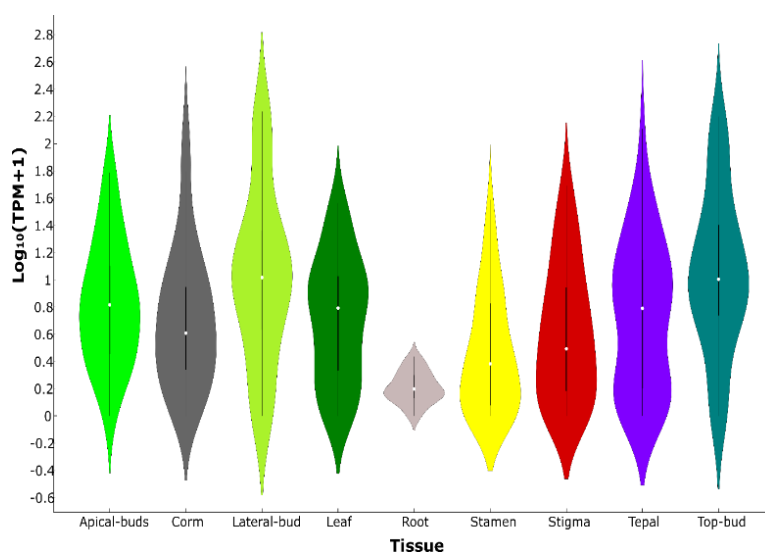


شکل ۴. گروه‌بندی بیان ژن‌های شناسایی شده در بافت‌های مختلف گیاه زعفران مبتنی بر تجزیه به مولفه‌های اصلی.

Figure 4. Grouping of gene expression identified in different tissues of saffron plant based on principal component analysis (PCA).

بیان ($\text{LogTPM}+1$) به جوانه راسی (top-bud) و برگ‌های اولیه (lateral-bud) تعلق گرفت. با توجه به شکل ظاهر و نسبت ایجاد شده در ویولون پلات می‌توان گفت که توزیع بیانی ژن‌های شناسایی شده در بافت‌های جوانه انتهایی (apical-bud) و بنه (corm) تقریباً مشابه بود. با توجه به نتایج این بخش همچنین می‌توان گفت که بافت ریشه کمترین میزان بیان ژن‌های *bHLH* را در میان بافت‌های مورد مطالعه به خود اختصاص داد.

توزیع پراکندگی بیان ژن‌های شناسایی شده *bHLH* در بافت‌های مختلف زعفران در شکل پنج نشان داده شد. ویولون پلات نشان می‌دهد که در بافت برگ‌های اولیه (lateral-bud) بیان ژن‌های شناسایی شده از پراکندگی بالایی برخوردار بوده و در مقابل بافت ریشه از نظر بیان ژن‌های شناسایی شده کمترین پراکندگی را دارد. قسمت‌های شکمی نشان دهنده فراوانی بیشتر مقادیر بیان در آن مقدار می‌باشد، بر این اساس بیشترین مقادیر

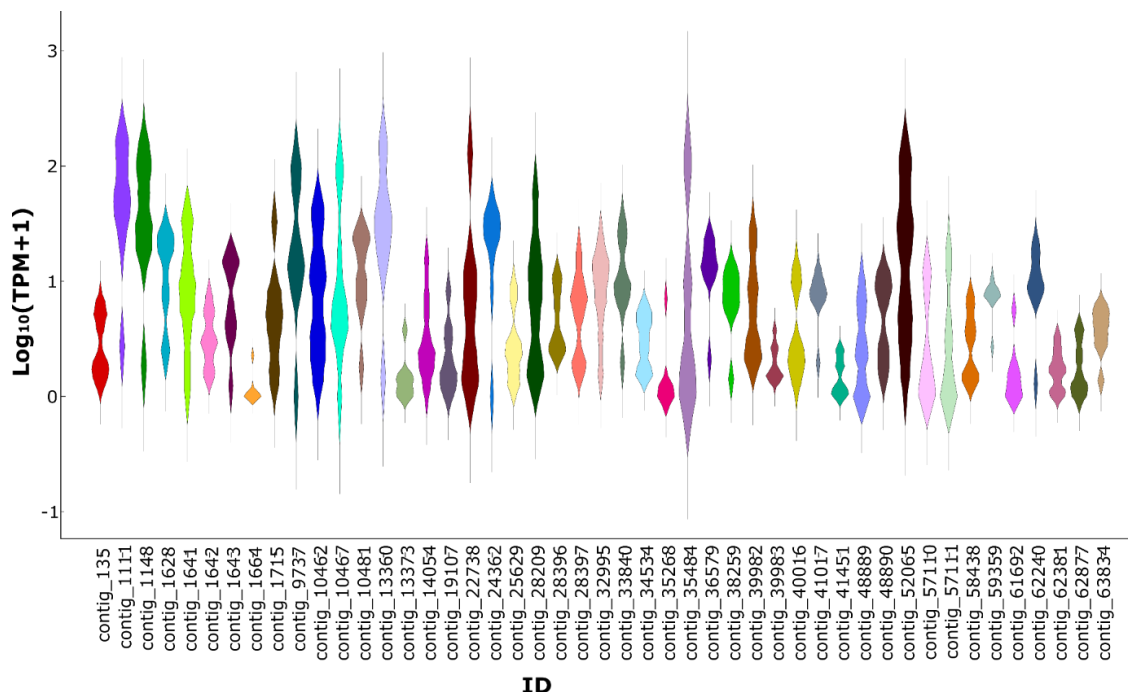


شکل ۵. توزیع پراکندگی بیان ژن‌های *bHLH* شناسایی شده در بافت‌های مختلف زعفران.

Figure 5. Distribution of *bHLH* gene expression distribution in different tissues of saffron

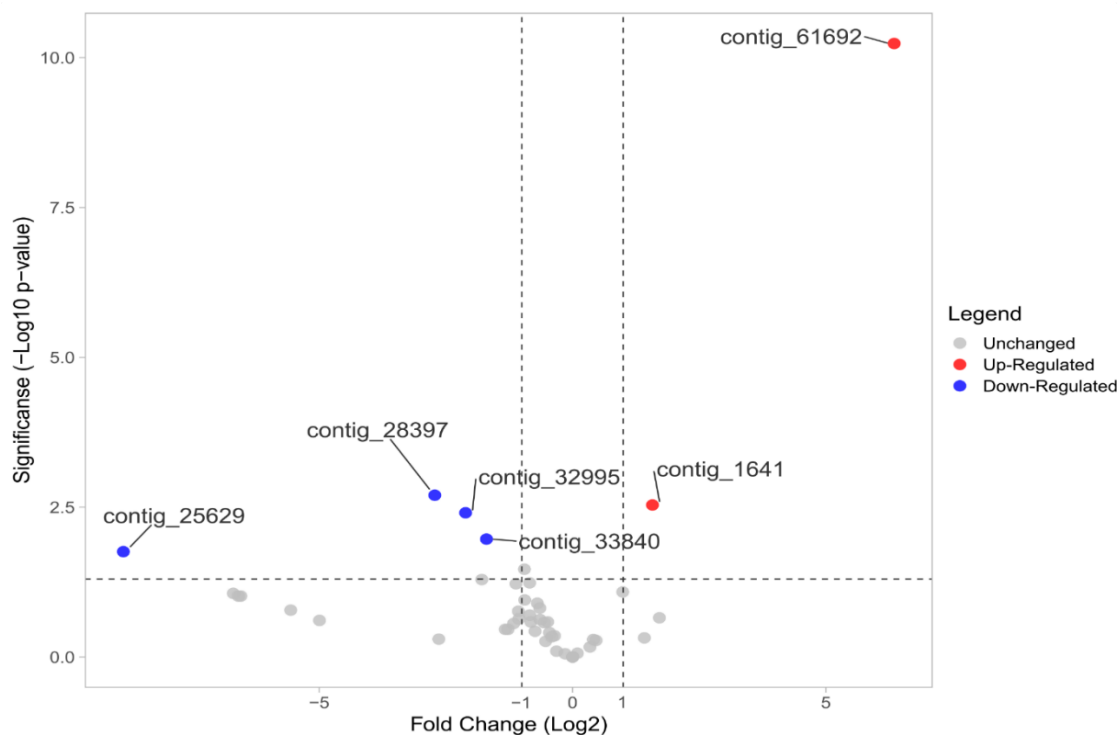
براین اساس بیشترین میزان بیان ژن‌های شناسایی شده مربوط به ژنی با شناسه contig-35484 و در مقابل کمترین میزان بیان ژن‌های شناسایی شده مربوط به ژن با شناسه contig-1664 بود.

توزیع پراکندگی بیان ژن‌های شناسایی شده از خانواده *bHLH* در زعفران در شکل ۶ نشان داده شد. قسمت‌های شکمی نشان دهنده فراوانی بیشتر مقادیر بیان در آن مقدار می‌باشد



شکل ۶. مقایسه توزیع پراکندگی بیان ژن‌های شناسایی شده از خانواده *bHLH* در زعفران.

Figure 6. A comparison of the expression patterns of the identified *bHLH* family genes in saffron.

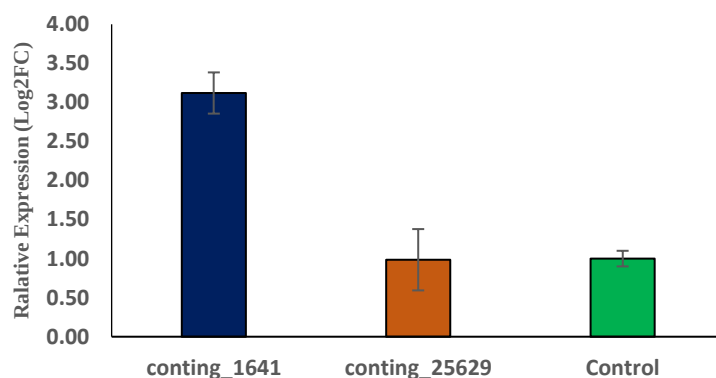


شکل ۷. توزیع ژن‌های *bHLH* با بیان افتراقی. حدود آستانه برای تعیین ژن‌های DEG شامل $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$ و $E\text{-Value} < 0.05$ بود.

Figure 7. Distribution of differentially expressed *bHLH* genes. Threshold values for determining DEG genes included $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$ and $E\text{-Value} < 0.05$.

تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ژن‌های کاندید *bHLH* براساس نمودار آتش‌فشانی بیشترین میزان بیان به ترتیب مربوط به توالی با شناسه‌های contig_1641 و contig_25629 و contig_25629 بود. بنابراین جهت تایید نتایج حاصل، میزان بیان دو ژن کاندید مورد نظر دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ *F. oxysporum* نسبت به شاهد مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۸). روند بیان نسبی ژن contig_1641 در ۴۸ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش بود، در صورتی که میزان بیان این ژن در ۷۲ ساعت پس از تلقیح نسبت به شاهد افزایش یافت.

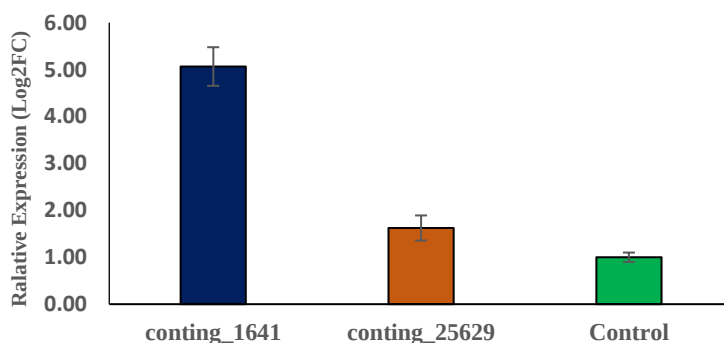
به منظور بررسی تغییرات بیان ژن‌های شناسایی شده در پاسخ به عامل پوسیدگی بنه زعفران پس از برآورد مقادیر بیان ژن‌های شناسایی شده، بیان نسبی هر ژن نسبت به حالت شاهد سنجیده و در نهایت ژن‌های دارای افتراق بیان (Down-Regulated و UP-Regulated) نمودار تغییرات برای خانواده ژنی *bHLH* ترسیم شد (شکل ۷). بر اساس نمودار آتش‌فشانی، بیشترین میزان بیان به ترتیب مربوط به ژن‌های با شناسه‌های contig-61692 و contig-1641 و کمترین میزان بیان به ترتیب مربوط به ژن‌های با شناسه‌های contig-33840، contig-25629، contig-28397 و contig-32995 بود.



شکل ۸. بیان نسبی ژن‌های *bHLH* مربوط به بنه زعفران در تیمارهای ۴۸ ساعت پس از تلقیح با *Fusarium oxysporum*.
Figure 8. Relative expression of *bHLH* genes in saffron corms 48 hours post inoculation with *Fusarium oxysporum*.

(شکل ۹). بر اساس نتایج می‌توان گفت روند بیان ژن contig_25629 با گذشت زمان افزایشی بوده است. همچنین می‌توان چنین اظهار نمود که این ژن در هر دو زمان نمونه‌برداری نسبت به حالت شاهد افزایش بیان نشان داده است.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های contig_1641 و contig_25629 در تیمار ۷۲ ساعت نیز نشان داد که میزان هر دو ژن نسبت به شاهد بیشتر بود. داده‌های حاصل از بررسی بیان در دو تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که به طور کلی در تیمار ۷۲ ساعت میزان بیان ژن‌ها نسبت به تیمار ۴۸ ساعت بیشتر بود.



شکل ۹. بیان نسبی ژن‌های *bHLH* مربوط به بنه زعفران در تیمارهای ۷۲ ساعت پس از تلقیح با *Fusarium oxysporum*.
Figure 9. Relative expression of *bHLH* genes in saffron corms 72 hours post inoculation with *Fusarium oxysporum*.

بحث

زعفران یکی از مهم‌ترین محصولات مهم زراعی در دنیا است که تحت تاثیر تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرد (Ahrazem et al. 2010). در میان تنش‌های زیستی، بیماری پوسیدگی بنه زعفران که توسط قارچ *F. oxysporum* ایجاد می‌شود، یک تهدید جدی برای تولید این محصول است (Gupta et al. 2021). برای مقابله با بیمارگرها، گیاهان مکانیسم‌های مختلفی را از طریق تنظیم ژن‌های مهم درگیر در مقاومت به بیماری، توسط فاکتورهای نسخه‌برداری اتخاذ می‌کنند. نقش بالقوه عوامل نسخه‌برداری *bHLH* در مقاومت گیاهان علیه بیمارگر قارچی *F. oxysporum* انگیزه اولیه این مطالعه بود (Hudson & Hudson 2015). در همین راستا، در مطالعه‌ای که توسط Kaushal & Swennen (2021) به بررسی بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ گیاه علیه بیمارگر *F. oxysporum* در دو رقم مقاوم و حساس گیاهچه موز پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۳۰۳۴ ژن با بیان متفاوت وجود دارد که از این بین، ۵۸ ژن متعلق به خانواده *bHLH* بودند (Kaushal & Swennen 2021). عوامل نسخه‌برداری همچون *MYB*، *bHLH* و *NAC* عمدتاً در پاسخ به تنش‌های زیستی، افزایش بیان یا به عبارت دیگر تنظیم مثبت داشتند، در حالی که عامل نسخه‌برداری *AP2/EREBP* عمدتاً کاهش بیان نشان داد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که عوامل رونویسی *bHLH* در تنظیم بیوسنتز فنیل پروپانویید، فلاونوئید، آنتوسیانین و پاسخ گیاه به تنش‌های بیمارگر دخالت دارند (Kaushal et al. 2021). تجزیه و تحلیل بیان *CmbHLH87* در گیاه تنباکو آلوده به سفیدک سطحی که توسط عامل بیماری *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun & Shishkoff ایجاد می‌شود، نشان داد که *CmbHLH87* در گیاهان تنباکو تراریخته آلوده علائم بیماری را در برگ‌ها کاهش می‌دهد، علاوه بر این نکرور سلولی را تسریع و تجمع H_2O_2 را افزایش می‌دهد (Guo et al. 2020). تعداد اعضای خانواده *bHLH* در گونه‌های مختلف متفاوت است، بطوریکه تعداد بررسی‌های ژنومی در برخی از گیاهان نشان داد که در آرابیدوپسیس ۱۶۲ ژن (Toledo-Ortiz et al. 2003)، در سیب ۱۷۵ ژن (Yang et al. 2017)، در توت فرنگی ۱۱۳ ژن (Zhao et al. 2018) و در انگور ۹۴ ژن (Wang et al. 2018) از اعضای خانواده *bHLH* وجود دارند. در مطالعه حاضر ۴۹ توالی ژنی متعلق به خانواده *bHLH* در ترنسکرپتوم زعفران شناسایی شدند. آنالیزهای حاصل از توزیع پراکندگی بیان ژن‌های شناسایی شده *bHLH* و ویولون پلات در بافت‌ها مختلف

زعفران نشان دهنده افزایش بیان در بافت‌های برگ‌های اولیه و جوانه راسی و در مقابل کاهش بیان در ریشه بود. تفاوت در تعداد ژن‌ها *bHLH* شناسایی در گونه‌های مختلف گیاهی ضمن ماهیت و پویایی این خانواده ژنی در قلمرو گیاهی، می‌توان به رویدادهای تکثیر و تکراری ژن، اندازه ژنوم و از دست دادن ژن در طول تکامل نسبت داد (Li et al. 2020; Tan et al. 2023). همچنین روند بیان متفاوت ژن‌های شناسایی شده *bHLH* در بافت‌های مختلف نشان از نقش متفاوت این خانواده ژنی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Guo et al. 2024). بیان هر ژن به ساختار ژنی آن بستگی دارد (Liu et al. 2022)، برای این منظور تعداد دمین، موتیف خانواده ژنی *bHLH* مورد بررسی قرار گرفت تا ویژگی‌های ژنتیکی و عملکردی آن‌ها مشخص شود. در این مطالعه بیشترین تعداد دمین و موتیف در ساختارهای ژنی به ترتیب ۳ و ۲۲ عدد مشاهده شد که توزیع پراکندگی بیان این ژن‌ها در اندام‌های مختلف به جز ریشه از پراکندگی بالایی برخوردار بود. بنابراین بیان کانتیگ‌های شناسایی شده با فراوانی بالا می‌تواند نشان دهنده مسیر خاص بیان ژن‌ها *bHLH* در ایجاد پاسخ کارآمد به تنش‌های زیستی در طول تکامل باشد. نتایج مطالعه حاضر در مطابقت با نتایج مطالعه Kaushal & Swennen (2021) بود.

بیمارگر فوزاریوم همی‌بیوتروف و فاقد فاز علائم بیماری است ممکن است فاز بیوتروف آن چند روز طول بکشد، روند تغییرات بیان این ژن‌ها در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی با استفاده از واکنش‌های Real-time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مقایسه‌ی بیان این دو ژن در بازه زمانی مورد مطالعه در مقایسه‌ی با شاهد متفاوت است به طوریکه در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش میزان بیان ژن *conting_1641* نسبت به شاهد به ترتیب ۳ و ۴/۲ بود در حالی که روند بیانی ژن *conting_25629* نسبت به شاهد، ابتدا پس از تلقیح بنه با بیمارگر قارچی کاهش یافته اما پس از ۷۲ ساعت دوباره افزایش بیان ژن بیان مشاهده شد که نشان دهنده نقش کارآمد خانواده ژنی *bHLH* در ایجاد پاسخ به تنش‌های زیستی می‌باشد.

در مطالعه Miao et al. (2023) بر روی گل‌های داوودی *Chrysanthemum* رقم جینا در بازه ۳، ۰ و ۷۲ ساعت بعد از تلقیح با *F. oxysporum* آنالیز RNA-seq صورت گرفت مشخص شد که میزان بیان *MDA*، *PPO*، *PAL*، *POD*، فنل و محتوای پرولین در گل داوودی در مراحل اولیه افزایش و میزان قند محلول کاهش یافته است. همچنین عوامل نسخه‌برداری *bHLH* به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل نسخه‌برداری در پاسخ به

نشان دادند. در نتیجه یک عفونت بیماری‌زا، الگوی بیان ژن‌های *MsbHLH* ممکن است متفاوت باشد، که نشان می‌دهد زمان پاسخ و مسیرهای آن‌ها متفاوت است (Jia *et al.* 2023). طبق تجزیه و تحلیل و بررسی بیان ژن‌های *bHLH* شناسایی شده در مطالعه حاضر، می‌توان گفت که این خانواده از عوامل نسخه‌برداری در تنظیم مثبت پاسخ به تنش ناشی از *F. oxysporum* دخیل هستند. در نهایت می‌توان چنین اظهار نمود که تجزیه و تحلیل‌های انجام شده و یافته‌های پژوهش حاضر دید جامعی از خانواده عوامل رونویسی *bHLH* ارائه می‌دهد و می‌توان از آن به‌عنوان پایه‌ای برای مطالعات عملکردی آینده اعضای این خانواده استفاده نمود.

تلقیح *F. oxysporum* شناسایی شدند (Miao *et al.* 2023). افزایش بیان عوامل نسخه‌برداری در روزهای اولیه بعد از تلقیح با قارچ نشان دهنده نقش اولیه و مهم این ژن‌ها در پاسخ گیاه به بیمارگر است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین در مطالعه دیگری، آنالیز بیان ژن‌های *bHLH* در گیاه سیب مالوس سیورسی *Malus sieversii* آلوده به بیماری شانکر *V. mali* منجر به شناسایی ۹۴ ژن *bHLH* در ترنسکرپتوم این گیاه شد که به چهار خوشه اصلی طبقه‌بندی شدند. ژن‌های خوشه اول در روزهای ۵-۰ بیان بالایی را نشان دادند در صورتی که ژن‌های خوشه دوم کاهش بیان نشان دادند. ژن‌های خوشه سوم در روزهای ۲-۰ افزایش بیان داشته و ژن‌های خوشه چهارم در روزهای ۱-۰ کاهش بیان داشته و از روز دوم به بعد افزایش بیان

References

- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Castillo-López R, Trapero-Mozos A, Gómez-Gómez L, 2010. Crocus sativus pathogens and defense responses. *Functional Plant Science & Biotechnology* 81-90.
- Belhadjali L, 2022. Characterization of phenotypic traits related to loss-of-function and ectopic expression of *bHLH093* and *bHLH061* in *Arabidopsis thaliana*. *WWU Graduate School Collection* 1073.
- Darvishian A, 2022. Transcriptome analysis of saffron corm in response to the most important fungal infection. PhD thesis, Production Engineering and Plant Genetics, Lorestan University, Iran.
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E, 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal* 66(1): 94-116
- Fisher A, Caudy M, 1998. The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays* 20: 298-306.
- Frusciante S, Diretto G, Bruno M, Ferrante P, Pietrella M, *et al.*, 2014. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 12246-12251.
- Ghanbari J, Khajoei-Nejad G, 2021. Integrated nutrient management to improve some soil characteristics and biomass production of saffron. *Industrial Crops & Products* 166: 113447.
- Guo F, Meng X, Hong H, Liu S, Yu J, *et al.*, 2024. Systematic identification and expression analysis of *bHLH* gene family reveals their relevance to abiotic stress response and anthocyanin biosynthesis in sweet potato. *BMC Plant Biology* 24: 156.
- Guo WL, Chen BH, Guo YY, Chen XJ, Li QF, *et al.*, 2020. Expression of pumpkin CmbHLH87 gene improves powdery mildew resistance in tobacco. *Frontiers in Plant Science* 11: 163.
- Gupta V, Sharma A, Rai P, Gupta S, Singh B, *et al.*, 2021. Corm Rot of Saffron. *Epidemiology & Management* 11: 339.
- Hao Y, Zong X, Ren P, Qian Y, Fu A, 2021. Basic Helix-Loop-Helix (*bHLH*) transcription factors regulate a wide range of functions in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 7152.
- Hatami F, Nazarian-Firouzabadi F, Sohrabi SS, Khademi M, (2024). Identification and expression analysis of rlp and rlk gene family members in transcriptome of saffron infected with *Fusarium Oxysporum* corm rot. *Plant Genetic Researches*, 11(1): 121-136.
- Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B. *et al.*, 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology & Evolution* 20: 735-747.
- Hudson KA, Hudson ME, 2015. A classification of basic helix-loop-helix transcription factors of soybean. *International Journal of Genomics* 2015(3): 603182.
- Jia S, Liu X, Wen X, Waheed A, Ding Y, *et al.*, 2023. Genome-Wide identification of bHLH transcription factor family in *Malus sieversii* and functional exploration of MsbHLH155. 1 gene under valsa

- canker infection. *Plants* 12: 620.
- Kaushal M, Mahuku G, Swennen R, 2021. Comparative transcriptome and expression profiling of resistant and susceptible banana cultivars during infection by *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 3002.
- Koocheki A, Seyyedi SM, 2015. Phonological stages and formation of replacement corms of saffron (*Crocus sativus* L.) during growing period. *Journal of Saffron Research* 3(2): 134–154. (In Persian with English abstract)
- Kour R, Ambardar S, Vakhlu J, 2018. Plant growth-promoting bacteria associated with corm of *Crocus sativus* during three growth stages. *Letters in Applied Microbiology* 67: 458–464.
- Ledent V, Vervoort M, 2001. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Research* 11: 754–770.
- Li J, Wang T, Han J, Ren Z, 2020. 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. *BMC Plant Biology* 20: 1–20.
- Liu S, Zhang C, Guo F, Sun Q, Yu J, *et al.*, 2022. A systematical genome-wide analysis and screening of WRKY transcription factor family engaged in abiotic stress response in sweet potato. *BMC Plant Biology* 22: 616.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402–408.
- Luo J, Zhang A, Tan K, Yang S, Ma X, *et al.*, 2023. Study on the interaction mechanism between *Crocus sativus* and *Fusarium oxysporum* based on dual RNA-seq. *Plant Cell Reports* 42: 91–106.
- Miao W, Yang Y, Wu M, Huang G, Ge L, *et al.*, 2023. Potential pathways and genes expressed in *Chrysanthemum* in response to early *Fusarium oxysporum* infection. *BMC Plant Biology* 23: 312.
- Naidoo S, Visser EA, Zwart L, Du Toit Y, Bhadauria V, *et al.*, 2018. Dual RNA-seq to elucidate the plant-pathogen duel. *Current Issues in Molecular Biology* 27: 127–142.
- Ng DW, Abeysinghe JK, Kamali M, 2018. Regulating the regulators: the control of transcription factors in plant defense signaling. *International journal of molecular sciences* 19: 3737.
- Ramezani M, Dourandish A, Jamali Jaghdani T, Aminizadeh M, 2022. The influence of dense planting system on the technical efficiency of saffron production and land use sustainability: *Empirical Evidence from Gonabad* 12: 92. (In Persian with English abstract)
- Robson JK, 2021. Shedding light on the role of bHLH transcription factors in *Arabidopsis thaliana* male reproductive development. PhD thesis. Plant pathology, University of Nottingham, England.
- Slimani C, Goumi EL, Chaimae Y, Ghadraoui R, Benjelloun L, *et al.*, 2022. Micropropagation and potential of bioactive compounds of saffron (*Crocus sativus* L.) for nutrition and health. *Notulae Scientiae Biologicae* 14: 11278–11278.
- Tan Z, Lu D, Yu Y, Li L, Dong W, *et al.*, 2023. Genome-Wide Identification and Characterization of the bHLH Gene Family and Its Response to Abiotic Stresses in *Carthamus tinctorius*. *Plants* 12: 3764.
- Tehrani MM, Esfahani MN, Mousavi A, Mortezaeinezhad F, Azimi MH, 2020. Regulation of related genes promoting resistance in Iris against root rot disease, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Genomics* 112: 3013–3020.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH, 2003. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell* 15: 1749–1770.
- Wang P, Su L, Gao H, Jiang X, Wu X, *et al.*, 2018. Genome-wide characterization of bHLH genes in grape and analysis of their potential relevance to abiotic stress tolerance and secondary metabolite biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* 9: 64.
- Yang J, Gao M, Huang L, Wang Y, van Nocker S, *et al.*, 2017. Identification and expression analysis of the apple (*Malus× domestica*) basic helix-loop-helix transcription factor family. *Scientific Reports* 7: 28.
- Zhao F, Li G, Hu P, Zhao X, Li L, *et al.*, 2018. Identification of basic/helix-loop-helix transcription factors reveals candidate genes involved in anthocyanin biosynthesis from the strawberry white-flesh mutant. *Scientific Reports* 8: 2721.