

苦荞转录因子基因 *FtbHLH4* 的 克隆及其对非生物胁迫的应答

周 婧, 高 飞, 张润敏, 雒晓鹏, 黄云吉, 李成磊*, 吴 琦

(四川农业大学 生命科学院, 四川雅安 625014)

摘 要: 根据苦荞花期转录组数据, 克隆得到 1 个苦荞 bHLH 类转录因子基因, 命名为 *FtbHLH4*。采用实时荧光定量 PCR 技术, 分析了非生物胁迫对苦荞芽期 *FtbHLH4* 基因表达的影响。序列分析表明, 苦荞 *FtbHLH4* 基因 DNA 全长 1 852 bp, 由 7 个外显子和 6 个内含子构成, 符合 GT-AG 剪接原则; cDNA 序列包含 1 个 1 062 bp 的开放阅读框, 编码 353 个氨基酸, 具有 bHLH 类蛋白典型的螺旋-环-螺旋保守结构域。在脱落酸(ABA)、NaCl 和 PEG 模拟干旱胁迫下, 苦荞芽期 *FtbHLH4* 基因表达量均持续上升, 至 48 h 时达最大, 分别为胁迫前的 11.3 倍、12.0 倍和 6.1 倍。而在冷胁迫和 UV-B 胁迫下, 苦荞芽期 *FtbHLH4* 基因表达量迅速下降, 分别于 6 h 和 12 h 降低至胁迫前的 24% 和 23%。研究推测 *FtbHLH4* 基因以不同机制参与了苦荞对非生物胁迫的应答过程。

关键词: 苦荞; 转录因子 bHLH; 基因克隆; 非生物胁迫

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Expression of *FtbHLH4* in *Fagopyrum tataricum* and Response to Abiotic Stresses

ZHOU Jing, GAO Fei, ZHANG Runmin, LUO Xiaopeng, HUANG Yunji, LI Chenglei*, WU Qi

(College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: According to transcriptome data of *Fagopyrum tataricum* at flowering stage, we cloned a bHLH transcription factor gene and designated as *FtbHLH4*. The expression patterns of *FtbHLH4* under abiotic stresses were determined by qPCR. The results showed that the DNA sequence of *FtbHLH4* was 1 852 bp in length and contained 7 exons and 6 introns, and in line with the principle of GT-AG splicing principle. The cDNA of *FtbHLH4* contains a 1 062 bp ORF, which encoded 353 amino acids residues, and a conserved Helix-Loop-Helix domain. The expression of *FtbHLH4* was up-regulated under ABA, NaCl and PEG stresses. After being treated with ABA, NaCl or PEG for 48 h, the expression level of *FtbHLH4* increased to the maximum, which was 11.3, 12.0 and 6.1 folds of the control, respectively. However, the expression of *FtbHLH4* was down-regulated under cold and UV-B stresses. The expression level decreased to 24% and 23% of the control after 6 h and 12 h stress treatments, respectively. These results suggested that *FtbHLH4* participate in the response process of *F. tataricum* under the abiotic stresses in different mechanisms.

Key words: *Fagopyrum tataricum*; transcription factor bHLH; gene cloning; abiotic stress

收稿日期: 2015-08-20; 修改稿收到日期: 2015-10-22

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目(2015HH0047)

作者简介: 周 婧(1992—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: z594613489@163.com

* 通信作者: 李成磊, 博士, 讲师, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: 32841110@qq.com

植物在生长发育过程中,经常会受到多种非生物胁迫,包括干旱、高盐、低温和紫外等,导致生长发育迟缓,产量和品质降低^[1]。在漫长的进化过程中,植物对非生物胁迫的适应性应答主要是通过复杂的信号通路,最终激活大量胁迫相关的基因,合成多种功能性蛋白,从而产生不同的生理和代谢应答以适应和抵御自然界中的各种逆境^[2]。

植物转录因子作为一类重要的调控蛋白,它们通过与靶基因互作以及和其他转录因子形成复合物激活许多抗逆相关基因的表达,以应答激素刺激和逆境胁迫。bHLH 类转录因子构成了植物中最大的转录因子家族之一^[3]。bHLH 结构域由 60 个氨基酸组成,形成‘碱性区域- α 螺旋-环- α 螺旋’结构(basic-helix-loop-helix, bHLH),其中碱性区域与 DNA 结合相关,能够识别不同形式的 E-box (CANNTG)核心序列,HLH 结构是其形成同源或异源二聚体所必需^[4]。bHLH 广泛参与植物的生长发育、次生代谢产物的合成以及抗非生物胁迫等多种生理生化过程的调控^[5]。目前,已从拟南芥和水稻中分离得到耐盐^[6-7]、抗旱^[8-9]、耐冷^[10]和耐营养缺乏^[11]等参与逆境应答相关的 bHLH 类转录因子,并通过 ABA 依赖型途径和 ABA 非依赖型途径激活下游抗逆相关基因的表达,参与植物的抗逆生理过程^[12]。

苦荞(*Fagopyrum tataricum*)是一种食药兼用的小杂粮,富含黄酮类化合物,极具作为功能性食品原料开发的潜力^[13]。苦荞抗逆能力强,适应高寒、高海拔、强紫外和干旱等恶劣环境^[14]。目前,关于苦荞抗逆方面的研究主要集中在黄酮类化合物和抗氧化酶对活性氧(ROS)的清除方面。Tatsuro 等^[15]研究表明,苦荞在受到干旱、紫外和冷胁迫时,叶片中的芦丁和槲皮素含量以及芦丁葡萄糖苷酶活性显著上升,以此来清除胁迫条件下产生的 ROS。董新纯等^[16]证明苦荞通过提高抗氧化酶活性,清除因 UV-B 胁迫产生的大量 ROS,在胁迫中后期主要通过清除 H₂O₂ 等活性氧来抑制过氧化作用而保护细胞。然而,对于苦荞抗逆分子机制,特别是转录因子参与抗逆生理方面的研究报道甚少。本研究根据获得的苦荞花期转录组数据,采用 RT-PCR 和 PCR 技术克隆了苦荞抗逆相关转录因子基因 *FtbHLH4*,通过脱落酸(ABA)、NaCl、PEG 模拟干旱、冷和 UV-B 胁迫等非生物胁迫处理芽期苦荞,分析了 *FtbHLH4* 基因表达对非生物胁迫的响应特征。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

‘西荞二号’苦荞种植于光照培养箱,培养基为 1/2 Hogland 培养液,培养条件为光照 14 h/黑暗 10 h、温度(25±2)℃、相对湿度 60%,培养至 10 日龄备用。

ABA 胁迫:使用含 100 μ mol/L ABA 的 1/2 Hogland 培养液处理 10 d 龄苦荞。NaCl 胁迫:使用含 150 mmol/L NaCl 的 1/2 Hogland 培养液处理 10 d 龄苦荞。PEG 胁迫:使用含 30% PEG-6000 的 1/2 Hogland 培养液处理 10 d 龄苦荞。UV-B 胁迫:使用 10 W UV-B(308 nm)LED 灯照射 10 d 龄苦荞,光照距离 30 cm。4℃冷胁迫:将 10 d 龄苦荞转移至培养条件为光照 14 h/黑暗 10 h,温度 4℃,相对湿度 60%的光照培养箱。分别于胁迫前 0 h、胁迫后 6、12、24 和 48 h 分别取样品叶片,液氮冷冻后置于-80℃储存备用。

1.2 方法

1.2.1 苦荞 *FtbHLH4* 基因克隆 采用改良 SDS 法^[17]提取苦荞叶片总 DNA,采用植物 RNAout 试剂盒提取各胁迫样品的总 RNA,并以其为模板,使用 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒反转录制备 cDNA 第一链。根据本实验室获得的苦荞花期转录组数据,设计 1 对特异引物 *FtbHLH4*f(5'-ACAGCAACAAC-CCAAAAAGTCAA-3')和 *FtbHLH4*r(5'-ATTG-TAAACTTATATCTTCTTACGTGT CCT-3'),分别以苦荞总 DNA 和 cDNA 第一链为模板,PCR 扩增 *FtbHLH4* DNA 和 cDNA 序列。PCR 产物回收纯化后连接至 pMD19-T 载体,阳性克隆送上海英骏生物公司测序。

1.2.2 苦荞 *FtbHLH4* 基因的生物信息学分析 利用 DNAMAN (Version 5.22)确定 *FtbHLH4* 的开放式阅读框(ORF)序列并推导相应的氨基酸序列;利用 NCBI 在线工具 Blast 对 *FtbHLH4* 氨基酸序列进行同源比对;使用 DNAMAN 进行多重序列比对;采用 MEGA 5.0 软件,根据邻接法(neighbor-joining, NJ)重复 10 000 次构建 *FtbHLH4* 的系统进化树。

1.2.3 苦荞 *FtbHLH4* 基因表达检测 根据 *FtbHLH4* 基因序列,设计 1 对实时荧光定量 PCR 特异引物 *FtbHLH4*Qf (5'-CCAAAACCTCAAAC-CCGAAAAAC-3')和 *FtbHLH4*Qr (5'-CAAAAAG-

GTGATACCAATTGCTGCA-3′)。以 cDNA 第一链为模板,采用 Takara 公司实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time),建立 15 μ L 的反应体系,每个样品 3 个重复。以苦荞组蛋白 *H3* 基因^[18]为内参基因,引物为 H3Qf (5′-GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG-3′)和 H3Qr (5′-CCAACAAGGTATGCCTCAGC-3′),采用 BIO-RAD 公司的 CFX96 Real-Time System 进行荧光定量 PCR,并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[19] 计算检测数据。

2 结果与分析

2.1 苦荞 *FtbHLH4* 基因克隆

以苦荞 cDNA 为模板,经 PCR 扩增后得到了 1 条约 1 000 bp 的特异条带(图 1)。测序结果表明,该 cDNA 序列全长 1 062 bp,与转录组数据完全一致,命名为 *FtbHLH4* 基因,上述序列已提交 GenBank,登录号为 KT359569。以苦荞总 DNA 为模板,经 PCR 扩增后得到 1 条约 2 000 bp 的特异条带(图 1)。测序结果表明,*FtbHLH4* 基因的 DNA 全长 1 852 bp。

根据已获得的苦荞 *FtbHLH4* 基因 cDNA 和 DNA 序列,利用在线软件 NCBI 进行 nucleotide blast 比对,确定其全长 DNA 序列为 1 852 bp,由 7 个外显子,6 个内含子构成(图 2),符合标准的 GT-

AG 剪切原则。苦荞 *FtbHLH4* cDNA 序列包含 1 个 1 062 bp 的 ORF,编码 353 个氨基酸(图 3)。Blastp 比对结果表明,苦荞 *FtbHLH4* 氨基酸序列与其它 bHLH 蛋白在 bHLH 结构域处具有较高的保守性。选取 bHLH 家族中蒺藜苜蓿 bHLH112、拟南芥 bHLH112 和拟南芥 bHLH123 的保守结构域进行多重序列比对(图 4),发现苦荞 *FtbHLH4* 具有 bHLH 类蛋白典型的螺旋-环-螺旋(helix-loop-

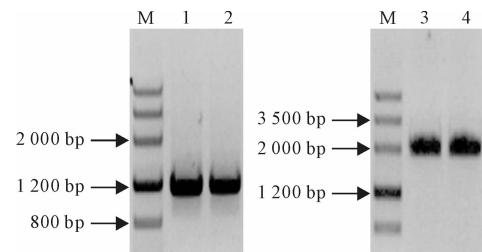


图 1 苦荞 *FtbHLH4* 基因的扩增

Fig. 1 Amplification of *FtbHLH4*

1, 2. cDNA; 3, 4. DNA; M. Marker III

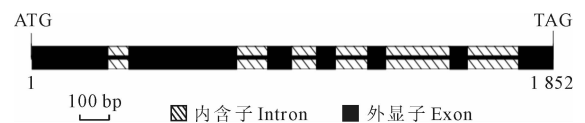


图 2 苦荞 *FtbHLH4* 基因结构示意图

ATG 表示起始密码子;TAG 表示终止密码子

Fig. 2 Structure diagram of *FtbHLH4*

The ATG means initiator codon;TAG means stop codon

```

1 ATGAACATGCGAGATGAGTTGTTTCAGACGGGTATTTTCAGCGGATGACATGGTGGAACTAATTCGAGAAATTTCTTCOCGGC
1 M N M A D E L F Q T G I F D G M T W W N T N P T K N F F S G
91 GGAGGTTTATCGTCGCGTACTGTTCGACGGCGCCGAGGTGATGGATTGGGGATGGGTGGTCAACTCTATCAAAGTCAAACCTCTGTT
31 G G L S S P Y C S T A A G G D G L G M A W S T L S K S N S V
181 AGCTTGTGATGATCATCAATGGTGGATCTCTAATACCTTACAAGCTATGGGATTTGATGATGTCAGCTGGAATCATCAACGATC
61 S L F D D P S M V D S S N T L Q A M G F D D V S W N H Q P I
271 ATTAATGGAGATTATGTAATACAATGATTCAAGCTGAAGAAATGGAGCTCTCTCGCGCGGGCCATGAACCTCAACGGGAATAGTTCC
91 I N G D Y V N T M I Q A E E W S S S P P A A M N S T G N S S
361 GGTACGGAGCGGTCCACCTATCTTGTGATGCTCTCGCAGTGGTCAACAGCTTTCOCGTGACCCATCATCTTTATTTCAAAACACTATA
121 G T D G S T L S C D A L A V V N S F P V D P S S L F T N T I
451 CTCAATCAAGAACATGAAATACTCCTCTCTGATTTGGACTCATAATGTCATGATCAAGTACTAGGATCTTGTTCGATAATCATCAT
151 L N Q E H E I L P P C D W T H N V N D Q V L G S S F D N H H
541 CAACAACAACAACAGATCATCAATCATATTGAGCCACCTTACTAGGCGGCTCTCTGCTCTCTTTACCTCTCTTGGCCAAAACCTCAA
181 Q Q Q Q Q I I N H I R A T L L G G S P A P S L P P S P K P Q
631 ACCCGAAAACTACCAACGCAAGGCAAAACAGAGGGAAGAAAGGAAGCGATTCCGAGCGTGGATCAAGCGCAAGAAATGAAATCCCA
211 T R K T I N A K A N K R E E G S D S E P S I K R Q R I E T P
721 TCTCCATTGCCAATTTAAGGTTGAAAAGAGAAGCTAGGAGACAGAATAACTGCACCTGCAGCAATTTGGTATCACTTTTGGCAAGACT
241 S P L P T F K V R K E K L G D R I T A L Q Q L V S P F G K T
811 GATACTGCATCTGTCTTCACGAAAGCTATCGAATATATCAAATTCCTGCATGATCAAGTCAATGGTCTAAGCACTCCATACAGAAAAAT
271 D T A S V L H E A I E Y I K F L H D Q V N G L S T P Y T K N
901 GGAGCTCCAAATTCACATCATCATCAGCATAAGCAGCAGGCTAAAGGGGAAGCAACAAATCAAGATCTTCGAAGCCGAGGATTATGCTTG
301 G A P I Q H H H Q H K Q Q A K G E A T N Q D L R S R G L C L
991 GTTCGATATCGAGTACCTTTCGGTAGCACAAGAACTCCGCGGATTCTTGGACTCCGAGTAAAGTAG
331 V P I S S T F P V A H E T P A D F W T P T L R *

```

图 3 *FtbHLH4* 的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA and deduced amino acid sequences of *FtbHLH4*

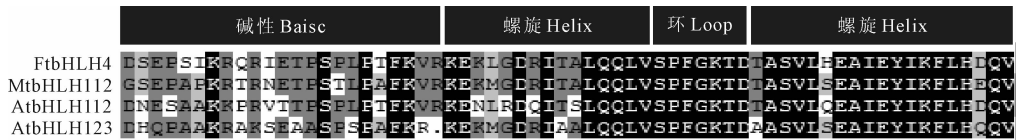


图 4 *FtbHLH4* 保守结构域的多重序列比对

MtbHLH112. 蒺藜苜蓿; AtbHLH112、AtbHLH123. 拟南芥

Fig. 4 Clustal W alignment of *FtbHLH4* on conserved domains

MtbHLH112. *Medicago truncatula*; AtbHLH112, AtbHLH123. *Arabidopsis thaliana*

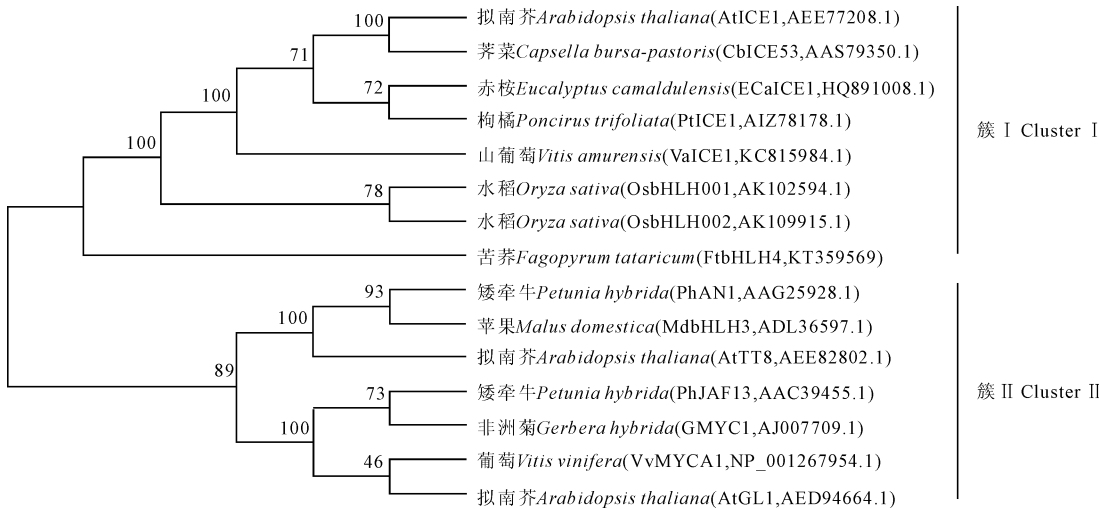


图 5 *FtbHLH4* 与其他植物 bHLH 蛋白的系统进化树

分支上的数值代表自举置信度

Fig. 5 Phylogenetic tree of *FtbHLH4* in context with other related bHLH proteins

The numbers in the branch indicated bootstrap value

helix)保守结构域。以上表明,本研究获得的基因序列属于 *bHLH* 基因家族。

2.2 苦荞 *FtbHLH4* 基因的系统发育树的构建

根据 Blast 比对结果,选取与 *FtbHLH4* 编码的氨基酸序列相似性较高的其它几种植物的 bHLH 进行进化树分析,这些植物 bHLH 的生物学功能均已鉴定。结果显示,该进化树聚为两大簇,Cluster I 和 II (图 5)。Cluster I 由不同植物参与胁迫应答相关的 bHLH 蛋白组成。例如,在拟南芥中过表达中国野生型山葡萄(*Vitis amurensis*)*VaICE1* 转录因子能提高其抗冻性^[20]。Cluster II 由矮牵牛、苹果、拟南芥等植物参与花青素合成相关的转录因子组成。例如,矮牵牛(*Petunia hybrida*)*PhAN1* 在花的形态建成中是参与花青素合成的转录起始调控所必须的一个转录因子^[21]。

2.3 苦荞 *FtbHLH4* 基因在不同胁迫下的表达分析

在非生物胁迫下,苦荞 *FtbHLH4* 基因的表达结果(图 6)显示,*FtbHLH4* 在 ABA、NaCl 和 PEG-6000 胁迫下表达量上升,而在冷胁迫和 UV-B 胁迫

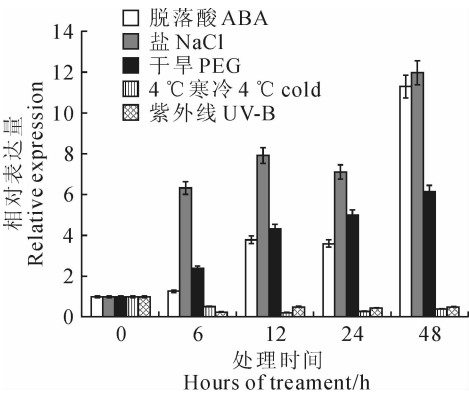


图 6 *FtbHLH4* 基因在非生物胁迫下的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *FtbHLH4* treated with various abiotic stresses

后下降。在 ABA 和 NaCl 胁迫下,*FtbHLH4* 基因表达量在 6~48 h 趋势一致,总体随处理时间呈现逐渐增加的趋势,而 *FtbHLH4* 表达量在 PEG-6000 胁迫后 6~48 h 持续上升,但均在 48 h 时达到最大值,分别为胁迫前的 11.3、12.0 和 6.1 倍。可见,苦荞 *FtbHLH4* 对 ABA、NaCl 和 PEG-6000 胁迫有着

相似的应答模式,但应答程度仍存在明显差异。在冷胁迫和 UV-B 胁迫 6 h 后, *FtbHLH4* 基因表达量均有所下降,分别于 6 和 12 h 迅速降低至最小值,约为处理前的 24% 和 23%,之后略有上升,但均在 12 h 后趋于稳定,表现出对持续性冷胁迫和 UV-B 胁迫的适应性。

3 讨 论

高等植物对非生物胁迫的适应性应答最终通过编码多种功能性蛋白来实现。Zhu^[22] 研究表明,植物在受到高盐和干旱胁迫时,会通过一系列信号转导途径进行渗透调节,最终激活大量抗逆相关基因的表达,合成多种功能性蛋白,来实现植物的抗逆生理应答。植物应答胁迫的调控机制表明,通过在早期激活体内转录因子的表达,进而与各类胁迫相关基因启动子区域内的顺式作用元件相结合,通过转录因子在转录水平上对下游耐受性效应基因进行激活或抑制。显然,转录因子在非生物胁迫中扮演了重要的角色。

近年来,植物转录因子参与植物抗逆已成为研究热点。关于植物参与逆境胁迫的转录因子家族中,研究较多的有 bZIP 类、锌指蛋白(WRKY)类、AP2/EREBP 类、NAC 类和 MYB 类转录因子 5 大类^[23]。目前对于 bHLH 类的转录因子参与植物抗逆方面的研究主要集中在拟南芥和水稻等模式植物,对于苦荞中该类蛋白的功能研究报道尚少。本实验根据苦荞花期转录组数据克隆得到的 bHLH 类蛋白基因 *FtbHLH4* 的 cDNA 和 DNA 序列,其编码蛋白具有 bHLH 类蛋白的典型特征保守基序。多序列比对结果表明, *FtbHLH4* 和其它 bHLH 蛋

白仅在 bHLH 结构域处保守性较高,而在其它区域保守性较低,这也决定了该类蛋白质功能的多样性。系统进化树分析表明,苦荞 *FtbHLH4* 与抗逆相关的 bHLH 蛋白聚为一簇,推测 *FtbHLH* 可能和 AtICE1 等 bHLH 蛋白具有类似的功能,参与苦荞抗逆的调控。

bHLH 转录因子参与的胁迫应答信号通路可根据对 ABA 的依赖情况分为两类:ABA 依赖型途径和 ABA 非依赖型途径^[12]。研究表明,隶属于 bHLH 家族的 AtAIB 转录因子受到外源 ABA 诱导后表达量上升,过表达和基因敲除均改变了植物对 ABA 的敏感性,表明 AtAIB 可能通过 ABA 获得胁迫信号,进而参与 ABA 依赖型信号途径^[24]。本研究获得的苦荞 *FtbHLH4* 基因在 ABA 处理芽期苦荞后其表达量上升,可能对 ABA 的诱导起到了正调控的作用。与 NaCl 和 PEG 胁迫后 *FtbHLH4* 基因表达量的变化趋势分析表明, *FtbHLH4* 对 NaCl 和 PEG 胁迫与 ABA 胁迫有着相似的应答模式,这与 Meng 等^[25] 关于陆地棉 *GhbHLH1* 基因被 NaCl 和 PEG 胁迫后其参与 ABA 或 ABA 介导应激信号通路的研究结果相似。此外,本研究发现苦荞 *FtbHLH4* 基因表达在冷胁迫和 UV-B 胁迫下与 ABA 胁迫有着相反的应答模式,其可能存在其他的应答调控机制来实现抗逆生理过程。可见,在不同逆境条件下,苦荞转录因子 *FtbHLH4* 基因响应性表达的复杂性。因此,本研究拟进一步开展抗逆相关生理生化和效应基因的深入研究,为从分子水平理解苦荞抗逆生理机制和分子育种奠定基础。

参考文献:

- [1] GUANG Y Q(光杨其), SONG G CH(宋桂成), ZHANG J F(张金凤), *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *GhbHLH130*, encoding a novel bHLH transcription factor in upland cotton(*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Cotton Science*(棉花学报), 2014, **26**(4): 363—370(in Chinese).
- [2] SCHWECHEIMER C, ZOURELIDOU M C, BEVAN M W. Plant transcription factors studies[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, **49**(6): 127—150.
- [3] MA P, ROULD M, WEINTRAUB H, *et al.* Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation[J]. *Cell*, 1994, **77**: 451—459.
- [4] MASSARI M E, MURRE C. Helix-Loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, **20**(2): 429—440.
- [5] HEIM M A, JAKOBY M, WERBER M, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity[J]. *Mol. Biol. Evol.*, 2003, **20**(5): 735—747.
- [6] JIANG Y Q, DEYHOLOS M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of re-

- sponsive genes[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6: 25.
- [7] 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.
- [8] KIRIBUCHI K, SUGIMORI M, TAKEDA M, *et al.* RERJ1, a jasmonic acid-responsive gene from rice, encodes a basic helix-loop-helix protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325(3): 857–863.
- [9] KIRIBUCHI K, JIKUMARU Y, KAKU H, *et al.* Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69(5): 1 042–1 044.
- [10] WANG Y J, ZHANG Z G, HE X J, *et al.* A rice transcription factor OsbHLH1 is involved in cold stress response [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2003, 107(8): 1 402–1 409.
- [11] OGO Y, NAKANISHI I R, NAKANISHI H, *et al.* The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions[J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(3): 366–377.
- [12] WANG X J(王昕嘉), LI K ZH(李昆志). Progress of plant bHLH transcription factors involved in abiotic stress signaling pathways[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences(生命科学)*, 2015, 27(2): 208–216(in Chinese).
- [13] CALABRO M L, TOMMASINI S, DONATO P, *et al.* The rutin/beta-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution; spectroscopic studies and biological assays[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 36(5): 1 019–1 027.
- [14] KITABAYASHI H, UJIHARA A, HIROSE T, *et al.* On the genotypic differences for rutin content in tatar buckwheat, *Fagopyrum tataricum* Gaertn[J]. *Breeding Sci.*, 1995, 45(2): 189–194.
- [15] SUZUKI T, HONDA Y, MUKASA Y J. Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves[J]. *Plant Science*, 2005, 168: 1 303–1 307.
- [16] DONG X CH(董新纯), ZHAO SH J(赵世杰), GUO SH SH(郭珊珊), *et al.* Role of flavonoids on stress injury and antioxydative enzymes in *Fagopyrum tataricum* seed lings under enhanced UV-bradiation[J]. *Journal of Shandong Agricultural University(山东农业大学学报)*, 2006, 37(2): 157–162(in Chinese).
- [17] SHAN ZH(单志), WU H L(吴宏亮), LI CH L(李成磊), *et al.* Improved SDS method for general plant genomic DNA extraction[J]. *Guangdong Agricultural Sciences(广东农业科学)*, 2011, 38(8): 113–115(in Chinese).
- [18] BAI Y C, LI C L, ZHANG J W, *et al.* Characterization of two tartary buckwheat R2R3-MYB transcription factors and their regulation of proanthocyanidin biosynthesis[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 152(3): 431–440.
- [19] THOMAS D S, KENNETH J L. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1 101–1 108.
- [20] XU W R, JIAO Y T, LI R M, *et al.* Chinese wild-growing *Vitis amurensis* ICE1 and ICE2 encode MYC-type bHLH transcription activators that regulate cold tolerance in *Arabidopsis*[J]. *PLOS One*, 2014, 9(7): 1–12.
- [21] SPELT C, QUATTROCCHIO F, *et al.* Anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12: 1 619–1 631.
- [22] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, 53(1): 247–273.
- [23] LIU L S, WHITE M J, MACRAE T H. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation[J]. *Eur. J. Biochem.*, 1999, 262: 247–257.
- [24] LI H M, SUN J Q, XU Y X, *et al.* The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2007, 65(5): 655–665.
- [25] MENG C M, ZHANG T Z, GUO W Z. Molecular cloning and characterization of a novel *Gossypium hirsutum* L. bHLH gene in response to ABA and drought stresses[J]. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2009, 27: 381–387.

(编辑:宋亚珍)