

## 研究报告

### Research Report

# 苦荞转录因子基因 *FtbHLLH3* 的克隆及其非生物胁迫下的表达分析

姚攀锋<sup>1</sup> 赵学荣<sup>1</sup> 李茂菲<sup>1</sup> 王安虎<sup>2</sup> 吴琦<sup>1\*</sup>

1 四川农业大学生命科学院,雅安,625014; 2 西昌学院,西昌,615000

\*通讯作者, wuqi@sicau.edu.cn

**摘要** 根据苦荞花期转录组数据,采用 RT-PCR 技术和 PCR 技术克隆得到一条新的 bHLH 类蛋白基因 *FtbHLLH3* (登录号: KU296217),并分析了逆境胁迫下该基因在芽期苦荞胚轴和子叶中的表达量。结果显示, *FtbHLLH3* 基因 cDNA 全长 1 273 bp,包含一个 957 bp 的开放阅读框,编码蛋白含 318 个氨基酸。蛋白结构域分析表明, *FtbHLLH3* 编码蛋白 N-端和 C-端分别含有一个 bHLH 家族典型的结构域。系统进化树分析表明, *FtbHLLH3* 与其它植物参与抗逆的 bHLH 蛋白聚为一簇。荧光定量 PCR 分析表明,UV-B 处理苦荞后,胚轴中 *FtbHLLH3* 相对表达量在 6 h 内缓慢增加至 1.08,12 h 后显著上升至 48 h 的 2.96;而子叶中 *FtbHLLH3* 相对表达量在 3 h 后就显著上升,至 24 h 达到最大值 6.64 后趋于稳定。4℃冷处理苦荞后,胚轴和子叶中 *FtbHLLH3* 相对表达量均随时间持续上升,并在 48 h 后达到最大值,分别为 3.22 和 10.27。可见,本研究克隆的 *FtbHLLH3* 基因可能参与了苦荞对 UV-B 和寒冷等非生物胁迫的应答反应。

**关键词** 苦荞, bHLH 转录因子, 基因克隆, 非生物胁迫

## Cloning and Expression Analysis of Transcription Factor Gene *FtbHLLH3* from *Fagopyrum tataricum* under Abiotic Stress

Yao Panfeng<sup>1</sup> Zhao Xuerong<sup>1</sup> Li Maofei<sup>1</sup> Wang Anhu<sup>2</sup> Wu Qi<sup>1\*</sup>

1 College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 2 Xichang College, Xichang, 615000

\* Corresponding author, wuqi@sicau.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.035.000429

**Abstract** Based on the transcriptome data of *Fagopyrum tataricum* at flowering, a novel *FtbHLLH3* (GenBank accession number: KU296217) bHLH-like protein gene was amplified from *Fagopyrum tataricum* by using RT-PCR and PCR techniques. Meanwhile, *FtbHLLH3* expression profiles was analyzed when tartary buckwheat at the stage of germination was treated under abiotic stress. The result indicated that *FtbHLLH3* was 1 273 bp in length, and open reading frame of 957 bp encoding a protein of 318 amino acids residues. Sequence analysis showed that the *FtbHLLH3* gene owned the characteristics of bHLH transcriptional factor known. Seen from the phylogenetic trees, *FtbHLLH3* was gathered into the same cluster with other bHLH protein related to the stress resistance. The quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis indicated the *FtbHLLH3* expression was increased persistently and obviously after UV-B radiation and 4℃ cold treatment. Accordingly, *FtbHLLH3* gene would be involved in the abiotic stress response such as UV-B radiation and cold presumably.

**Keywords** Tartary buckwheat, bHLH transcription factor, Gene cloning, Abiotic stress

苦荞(*Fagopyrum tataricum*)也称鞑靼荞麦,属蓼科植物,原产于我国及印度等地。由于抗逆性强,其主要分布在四川、云南、贵州和西藏等西部省区的一些干旱高寒山区、少数民族地区和边远山区。随着对苦

荞营养价值和保健功能的深入研究,对苦荞的利用和开发也越来越受到重视(Kim et al., 2001)。具有均衡营养结构和药食两用的苦荞逐渐作为一种健康食品被加工为各种面食、糕点和调味品等,受到消费者

的广泛青睐(Bonafaccia et al., 2003)。

非生物胁迫是当前植物生长以及粮食产出的主要制约因素之一(Zhou et al., 2015)。干旱、UV-B 和极端温度是导致农作物品质和产量下降的主要非生物因素。植物在遭受非生物胁迫后通过体内生理生化和分子机制调节,从而快速修复逆境胁迫所造成的损伤,以此适应不断变化的环境(沙伟等, 2015)。在众多调控机制中,转录因子所介导的环境适应性变化至关重要,如 MYB、HLH 和 WRKY 等转录因子都广泛参与调控与干旱、UV-B、极端温度、激素和病原反应等相关基因的表达(李田等, 2015)。

bHLH 转录因子在多种植物中广泛存在,是构成真核生物蛋白的一个大家族,因含有 bHLH 结构域而得名。研究证明该家族具有特有的碱性区域/螺旋-环-螺旋基序(bHLH, basic helix-loop-helix),其中碱性区域能识别靶基因启动子区域中顺式作用元件 E-box (5'-CANNTG-3')核心序列,与 DNA 结合相关,而 HLH 结构域是同其他相关蛋白形成杂合二聚体所需的(周华等, 2015)。

近年来,已经从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)等多种植物中分离、克隆出 bHLH 基因(Ding et al., 2009; Salvatierra et al., 2013),并对其调控功能进行了研究,发现 bHLH 在植物生长发育和形态建成、胁迫响应以及植物次生代谢中发挥着重要作用(Ding et al., 2009; Matus et al., 2010)。目前,有关苦荞转录因子的研究主要集中在参与类黄酮代谢(Bai et al., 2014)和非生物胁迫应答(Zhou et al., 2011; 黄云吉等, 2015)的 MYB 转录因子家族,进一步挖掘参与苦荞抗逆的 bHLH 等其他转录因子可加深对苦荞抗逆机制的理解。本实验根据获得的苦荞花期转录组数据,采用 RT-PCR 技术克隆苦荞抗逆相关的 *FtbHLH3* 基因,探究 *FtbHLH3* 基因的表达对 UV-B 和 4℃冷胁迫处理的应答关系,为其进一步的功能鉴定奠定基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 苦荞 *FtbHLH3* 基因 cDNA 序列的克隆

以苦荞 cDNA 为模版,采用特异引物 *FtbHLH3*f 和 *FtbHLH3*r,PCR 扩增得到一条大小约为 1 kb 的特异条带(图 1)。测序结果表明该片段大小为 957 bp,编码 318 个氨基酸残基的蛋白 *FtbHLH3* (图 2)。经过 NCBI 中的 Pro-BLAST 比对显示:该蛋白与其它植物 bHLH 的同源性在 46%~68%之间,表明克隆得到

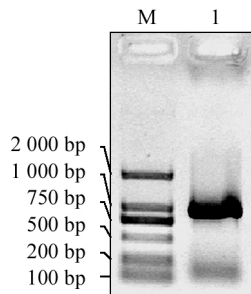


图 1 苦荞 *FtbHLH3* 基因的扩增

Figure 1 Amplification of *FtbHLH3* gene from *F. tataricum*

的序列属于类 bHLH 基因家族。将该基因命名为 *FtbHLH3*,其在 GenBank 中的注册号为 KU296217。

### 1.2 编码蛋白 *FtbHLH3* 的理化性质预测

用 ExPASy-ProtParam 对编码蛋白 *FtbHLH3* 的理化性质分析表明,其编码蛋白分子式为  $C_{1588}H_{2517}N_{425}O_{503}S_{16}$ ,相对分子质量为 36.12 kD,理论 pI 值为 4.89,其中有 37 个氨基酸残基(Arg+Lys)带正电荷,49 个氨基酸残基(Asp+Glu)带负电荷,不稳定系数为 78.77,是不稳定性蛋白(<40 为稳定性蛋白),平均亲水性数为 -0.488。Signal P 的信号肽预测显示,该蛋白序列无信号肽位点,属于非分泌性蛋白质。TmPred 的跨膜结构域预测分析表明,该蛋白为跨膜蛋白。Target P 软件预测得知 *FtbHLH3* 的 mTP 值为 0.050,SP 值为 0.128,远远低于其它细胞器 0.913。蛋白质二级结构预测表明,该蛋白由 36.48%的  $\alpha$ -螺旋(alpha helix)、16.67%的延伸链(extended strand)、7.23%  $\beta$ -转角(beta turn)和 39.62%的无规则卷曲(random coil)组成(图 3)。SWISS-MODEL 三维建模表明,该蛋白含有一个螺旋-环-螺旋结构,具有 bHLH 家族典型的结构域(图 4)。

### 1.3 编码蛋白 *FtbHLH3* 的结构分析

Protein BLAST 分析表明,*FtbHLH3* 序列其它植物的 bHLH 蛋白同源性在 50%~60%。DNAMAN 进行的多重比对和 NCBI 在线工具 CD Search 分析结果显示(图 5;图 6),*FtbHLH3* 与其他植物 bHLH 转录因子在 N 端和 C 端都存在着明显的保守序列,其 N 端包含有一个可以特异性结合靶基因启动子区域中顺式作用元件 E-box 元件 (5'-CANNTG-3') 的保守域。下游 C 端含有一个由 2 个含有疏水性氨基酸的偶极性  $\alpha$  螺旋组成 HLH 结构域。

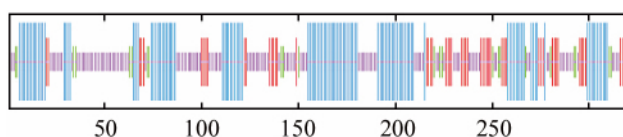
### 1.4 编码蛋白 *FtbHLH3* 的系统进化分析

将编码蛋白 *FtbHLH3* 序列与 BLAST 结果中相

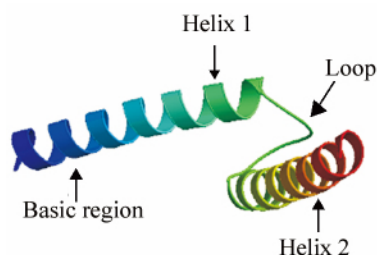
```

1  ATGGAGGTAATGAAGATGGGTTTTTGGAGAATTGGTATCACTAGGAAGAGAAGCATGGGAAGTCAATAACTCAACACAATTT
   M E V N E D G F L E E L V S L G R E A W E V N N S T Q I
85  AATGATTTTCCTTACAACAATTGGGGATTGACCCTTCTCCTCCTCCAATTTACCAACCCCTTTTCGAGTGCTTTTCTCCCCA
   N D F L T N N W G F D P L P P P I S P T P F E C F S S P
169  ATTAGACCCACCTTGTITAGATTCTCATTCAGTGACCTCTTTCTAAGCCACATTTGGCTGATGAATTTACTTCTTACCATAAT
   I R P T L L D S S F S D L F L S P H L A D E F T S Y H N
253  CTCAAGAAGCTCGAAACGCCGTCGTTTCAAAGTCAAGATGAATTCTCAATCCCAATTGTAGATGATGAGTCCGGGTTTAAATTG
   L K K L E T P S F Q S Q D E F S I P I V D D E S G F K L
337  GAAAACAATGTCTCCAAGCTGCATGCAAGTAGAAGTGGCCCAACCATGGAAATCCCGAGTTTTAACATGGAATTTTGCATG
   E N N V L Q A A C K V E V A P T M E I P S F N M E F C M
421  GAGAAGAAGAACAAGAAGAGGAAGCTTGAAGGACAGCCTTCCAAGAATCTAATGGCGGAGAGGAGAAGGAGAAAGAGATTG
   E K K K N K K R K L E G Q P S K N L M A E R R R R K R L
505  AATGATCGCCTTTTCGATGCTAAGATCGGTTGTTCTTAAGATAAGCAAGATGGATAGAAGTCTTACTAGGATACAATAGAT
   N D R L S M L R S V V P K I S K M D R T S I L G D T I D
589  TACATGAAGGAGCTTTTACAAGGATTAACAATCTGCAAGAGGAAACCGATGTGAATTCAACCATATTCAAGAACAATAAGCCA
   Y M K E L L Q R I N N L Q E E T D V N S T I F K N I K P
673  GATGATGTACTGCTAAGGACTACCCCAAGTTTGTAGTAGAGAGGCGAAATGCGGATACCCGGATCGAGATCTACTCCACTGGG
   D D V L L R T T P K F D V E R R N A D T R I E I Y S T G
757  AAACCGGGTCTATTGCTGTCAACTATGACTACCTTAGAAGCACTAGGACTGGAAATCAACAATGTGTTATCAGCTGTTTCAAT
   K P G L L L S T M T T L E A L G L E I Q Q C V I S C F N
841  GACTTCTCACTGCAAGCTTCTCCTGCTCCGAGGAATCAGATGGAGGAACATTAGTGAGCTCTGAAGATATAAAGCAAGCACTGTT
   D F S L Q A S C S E E S D G G T L V S S E D I K Q A L F
925  CAAAATGCAGGTTATGGAGGAAAGTATATGTAG
   Q N A G Y G G K Y M *

```

图2 *FtbHLH3* 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Figure 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *FtbHLH3*图3 苦芥转录因子 *FtbHLH3* 的二级结构预测注: 竖线从短至长依次表示无规则卷曲,  $\beta$ -转角, 延伸链和  $\alpha$ 螺旋Figure 3 Secondary structure prediction for transcription factor *FtbHLH3* from *F. tataricum*

Note: The vertical lines from short to long mean random coil, beta turn, extended strand and alpha helix

图4 苦芥 *FtbHLH3* 蛋白三维空间结构预测Figure 4 Tertiary structure prediction of *FtbHLH3* proteins from *F. tataricum*

相似性较高的其他植物已知 bHLH 序列经采用 MEGA 5.0 邻接法构建系统发育进化树(图 7)。结果表明, 该进化树从功能上分为两个大簇, 紫苏 *PfMYC-RP*、金鱼草 *AmDEL*、拟南芥 *AtGL3*、苦芥 *FtbHLH1*、葡萄

*VvMYC1* 共聚于 Cluster 1, 该簇均是参与植物花青素代谢调控。而苦芥 *FtbHLH3* 跟参与植物在非生物逆境胁迫条件的应答相关的拟南芥 *PttrbHLH*、拟南芥 *AtICE1/AtICE1* 和亚麻 *CsICE1* 转录因子归于 Cluster 2, 推测苦芥 *FtbHLH3* 具有相似功能。

## 1.5 非生物逆境胁迫下苦芥 *FtbHLH3* 的表达分析

### 1.5.1 UV-B 对苦芥 *FtbHLH3* 表达的影响

荧光定量 PCR 对 *FtbHLH3* 在 UV-B 处理后芽期苦芥胚轴和子叶中的相对表达量分析表明(图 8), 处理后 6 h 内, 胚轴中 *FtbHLH3* 的表达量缓慢增加, 至处理 12 h 后明显上升至相对表达量 1.95, 48 h 时达到最大值 2.93; 而子叶中 *FtbHLH3* 的表达量变化则更为明显, 1~24 h 内该基因的表达量持续显著升高, 24 h 时达到最大值 6.64, 之后趋于稳定。

### 1.5.2 冷胁迫对苦芥 *FtbHLH3* 表达的影响

4°C 冷胁迫处理后, 芽期苦芥胚轴和子叶中 *FtbHLH3* 表达量分析显示(图 9), 胚轴 *FtbHLH3* 的表达量在处理 3 h 内缓慢上升, 至 6 h 时明显上升至相对表达量 2.21, 48 h 时达到最大值 3.22, 而在子叶中 *FtbHLH3* 的表达量则表现出对冷胁迫更强更迅速的应答, 3 h 即上调至 1.81, 随后持续大幅度升高, 48 h 时表达量达最大值 10.27。

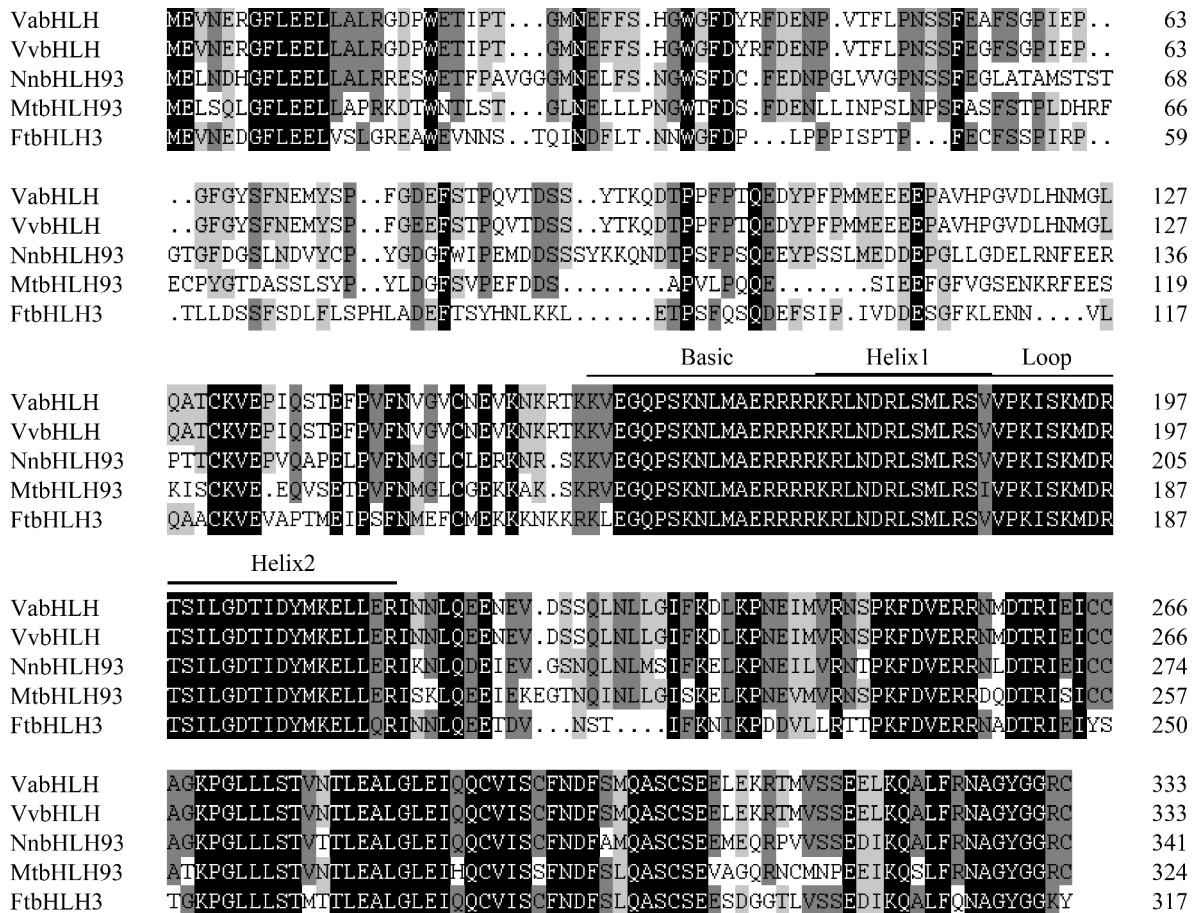


图 5 苦荞转录因子 FtbHLH3 与其他植物 bHLH 多重序列比对

注: 多重序列比对对植物的蛋白序列分别为: 山葡萄: VabHLH (AFH68208); 葡萄: VvbHLH (AFR78197); 莲: NnbHLH93 (XP\_010-254652); 苜蓿: MtbHLH93 (XP\_003612938)

Figure 5 Multiple sequence alignment between tartary buckwheat FtbHLH3 and other plant bHLHs

Note: The amino acid sequences used to multiple sequence alignment: *Vitis amurensis*: VabHLH (AFH68208); *Vitis vinifera*: VvbHLH (AFR78197); *Nelumbo nucifera*: NnbHLH93 (XP\_010254652); *Medicago truncatula*: MtbHLH93 (XP\_003612938)

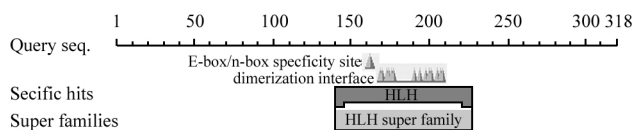


图 6 FtbHLH3 保守结构域分析

Figure 6 FtbHLH3 conserved domains search

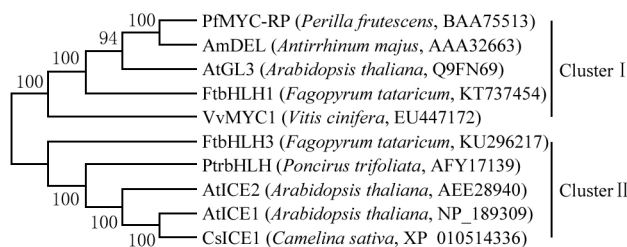


图 7 苦荞 FtbHLH3 与其他植物 bHLH 蛋白序列的系统进化树

Figure 7 Phylogenetic tree based on amino acids equences of FtbHLH3 and other plants

## 2 讨论

bHLH 转录因子作为植物中庞大的转录因子家族之一, 在植物代谢和发育的各个方面起着十分重要的调控作用。本研究根据苦荞花期转录组数据, 克隆得到苦荞转录因子基因 *FtbHLH3* 的 cDNA 序列。该基因编码蛋白含有 bHLH 类转录因子特有的保守域, 含有一个螺旋 - 环 - 螺旋结构, 结构上属于 bHLH 转录因子家族。系统进化树分析显示 *FtbHLH3* 与参与植物抗逆调控的 AtIC1 (NP\_189309) (Grant et al., 2000)、PtrbHLH (AFY17139) (Huang et al., 2013) 等蛋白共聚一簇, 而 *FtbHLH3* 基因在芽期苦荞胚轴和子叶中对 UV-B 和冷胁迫的表达变化也进一步说明该蛋白可能参与了苦荞非生物胁迫的调控。

已有研究证明, 植物对外界非生物胁迫的应答是一个复杂的过程, 植物通过转录因子参与调解的

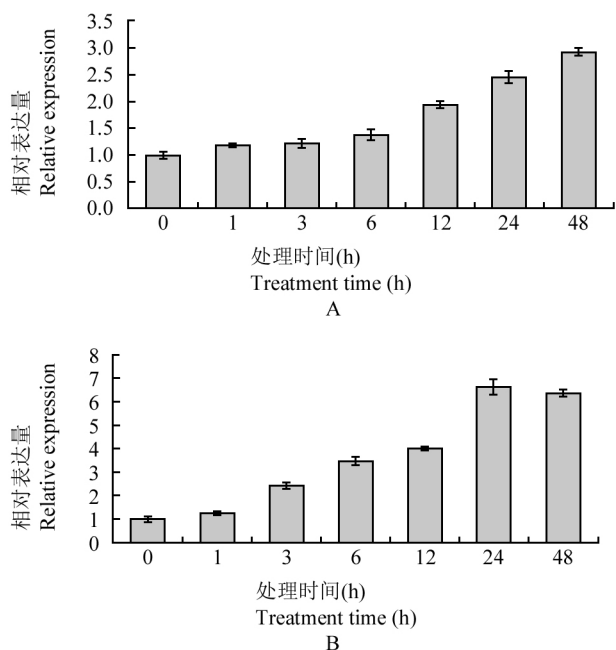


图8 UV-B 处理条件下 *FtbHLH3* 在苦荞胚轴(A)和子叶(B)中的基因表达量

Figure 8 Expression levels *FtbHLH3* gene in hypocotyl (A) and cotyledon (B) under UV-B treatment

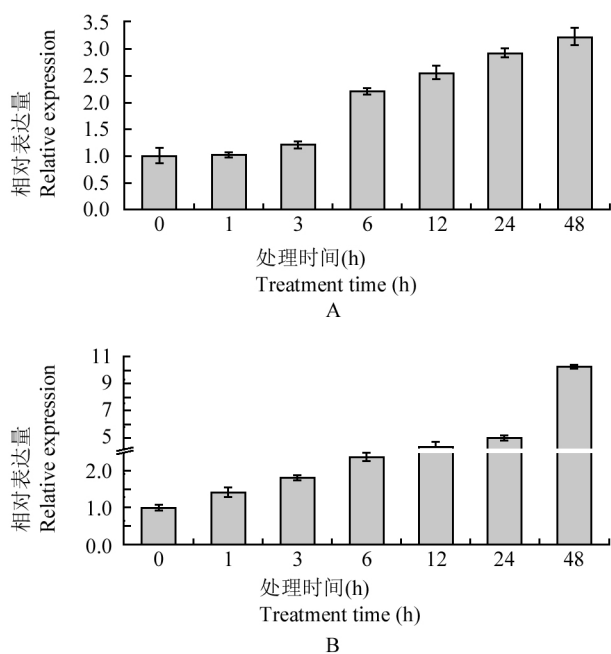


图9 4°C冷处理条件下 *FtbHLH3* 在苦荞胚轴(A)和子叶(B)中的基因表达量

Figure 9 Expression levels *FtbHLH3* gene in hypocotyl (A) and cotyledon (B) under 4°C cold treatment

对非生物逆境胁迫的应答受两大类信号通路调控：ABA 介导途径与 ABA 非依赖途径(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997)。Kiribuchi 等(2005)报道外源 JA 诱

导水稻 bHLH 类转录因子 *RERJ1* 基因在营养生长期的叶片、叶鞘和根中表达,而低温伤害和干旱胁迫下 *RERJ1* 基因在叶片中上调表达。另外,在拟南芥中发现 bHLH 蛋白 rd22BP1 能够参与 ABA 信号途径的脱水胁迫反应(Abe et al., 1997)。本研究也显示了类似结果,即在 UV-B 和 4°C 冷两种胁迫处理下苦荞 *FtbHLH3* 基因在胚轴和子叶中的表达量均呈持续增长的趋势。此外, *FtbHLH3* 基因在子叶的表达量随着胁迫的处理变化程度则更为显著,这可能是由于植物幼苗在 UV-B 与冷胁迫下,子叶相比胚轴来说总是以更大的面积受到逆境刺激(Kim et al., 2007)。

苦荞主要分布在我国西南山区,气候干旱、昼夜温差大、紫外线强,而苦荞表现出了良好的抗逆性。本研究克隆得到一条与苦荞抗逆相关的 *FtbHLH3* 基因,分析了其在 UV-B 胁迫和 4°C 冷胁迫下的响应,为进一步探究苦荞的抗逆机制奠定了基础。

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料及主要试剂

在西昌学院购买的“西荞 2 号”作为实验品种,培养条件为光照 16 h,黑暗 8 h,温度(22±2)°C,相对湿度 70%左右的光照培养箱。植物 RNAout 试剂盒(天泽基因),Prime Script RT reagent Kit with GdnA Eraser (Perfect Real Time, 宝生物),YBR Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus, 宝生物)。其他化学药品均为进口或国产分析纯试剂。

#### 3.2 苦荞 RNA 提取及 *FtbHLH3* cDNA 序列的克隆

参照天泽基因公司“植物 RNAout 试剂盒”的使用方法来提取花期苦荞子叶的总 RNA。再按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明,反转录获得第一链 cDNA。根据苦荞花期转录组数据,设计一对特异引物 *FtbHLH3f* 和 *FtbHLH3r*,以苦荞 cDNA 第一条链为模板,PCR 扩增 *FtbHLH3* cDNA 序列,PCR 反应条件:98°C 10 s,98°C 10 s,59°C 10 s,72°C 15 s,30 个循环,72°C 10 min。PCR 产物经 T 载体克隆,筛选阳性菌落,送擎科基因有限公司测序。

#### 3.3 *FtbHLH3* 基因核酸与蛋白质序列分析

通过 NCBI 在线工具 BLAST 进行 *FtbHLH3* 核酸序列分析;利用 Prot Param 软件对氨基酸序列的多个物理和化学参数(分子量,等电点,吸光系数等)进行计算。氨基酸亲疏水性特征分析采用 Prot Scale 程

序;蛋白信号肽预测用 Signal P 程序;利用 Tmpred 软件预测蛋白跨膜区域;亚细胞定位采用 Target P 程序进行预测。使用 GOR 软件进行蛋白质二级结构的预测;采用 SWISS-MODEL 预测蛋白的三级结构;使用 DNAMAN 进行多序列比对,利用 MEGA5.0 将比对结果采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。

### 3.4 芽期苦荞的胁迫处理

UV-B 处理:使用 10 W UV-B (308 nm) LED 灯照射芽期苦荞,光照距离 30 cm,4℃冷处理:将芽期苦荞转移至培养条件为光照 16 h,黑暗 8 h,温度 4℃,相对湿度 60%的光照培养箱进行冷胁迫。以上处理均于处理前 0 h、处理后 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 分别取供试样品的胚轴和子叶,液氮冷冻后置于 -80℃备用。

### 3.5 苦荞 *FtbHLH3* 基因表达量的检测

提取各处理样品的总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,再以 RNA 为模板反转录合成 cDNA。设计一对实时定量 PCR 特异引物 *FtbHLH3*qf 和 *FtbHLH3*qr,以苦荞组蛋白 *H3* 基因为内参基因,引物为 *H3*qf 和 *H3*qr (表 1)。PCR 反应体系(15 μL)为:SYBR II 7.5 μL,模板 1 μL,上下游引物各 0.5 μL,10.5 μL ddH<sub>2</sub>O,反应参数 95℃ 3 min,95℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环,在温度为 65~95℃之间绘制溶解曲线,每个反应重复 3 次后求其平均值,再使用 2<sup>-ΔΔct</sup> 算法来计算基因的相对表达量。

### 作者贡献

姚攀锋负责苦荞 *FtbHLH3* 基因的克隆、数据分析及撰写,并参与整个实验过程,赵学荣负责苦荞非生物胁迫处理,李茂菲负责荧光定量 PCR,王安虎提

供试验材料,吴琦负责论文设计、指导和论文修改;全体作者均已阅读并同意发表。

### 致谢

本研究由四川省国际合作项目(2015HH0047)基金资助。

### 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, *The Plant Cell*, 9(10): 1859-1868
- Bai Y.C., Li C.L., Zhang J.W., Li S.J., Luo X.P., Yao H.P., Chen H., Zhao H.X., Park S.U., and Wu Q., 2014, Characterization of two tartary buckwheat R2R3-MYB transcription factors and their regulation of proanthocyanidin biosynthesis, *Physiologia Plantarum*, 152(3): 431-440
- Bonafaccia G., Marocchini M., and Kreft I., 2003, Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat, *Food Chemistry*, 80(1): 9-15
- Ding W.N., Yu Z.M., Tong Y., Huang W., Chen H.M., and Wu P., 2009, A transcription factor with a bHLH domain regulates root hair development in rice, *Cell Research*, 19(11): 1309-1311
- Grant D., Cregan P., and Shoemaker R.C., 2000, Genome organization in dicots: genome duplication in Arabidopsis and synteny between soybean and Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(8): 4168-4173
- Huang Y.J., Deng R.Y., Gao F., Luo X.P., and Wu Q., 2015, Cloning and expression analysis of transcription factor gene *FtMYB21* from tartary buckwheat under abiotic stress, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(9): 1939-1945 (黄云吉, 邓仁榆, 高飞, 雒晓鹏, 吴琦, 2015, 苦荞转录因子基因 *FtMYB21* 的克隆及其非生物胁迫下的表达分析, *基因组学与应用生物学*, 34(9):

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

扩增基因 Gene amplification	引物名称 Name of primers	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>FtbHLH3</i>	<i>FtbHLH3</i> f	TTAATCAAGCATCAAAGTGAGCAGA
	<i>FtbHLH3</i> r	TTCATTTGAGGAATATATTACATAT
<i>FtH3</i>	<i>H3</i> qf	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG
	<i>H3</i> qr	CCAACAAGGTATGCCTCAGC
<i>FtbHLH3</i>	<i>FtbHLH3</i> qf	GCATGGGAAGTCAATAACTCAACA
	<i>FtbHLH3</i> qr	GAGGAATCTAACAAGGTGGGTCTAA

- 1939-1945)
- Kim S.J., Maeda T., Sarker M.L., Takigawa S., Matsuura-Endo C., Yamauchi H., Mukasa Y., Saito K., Hashimoto N., Noda T., Saito T., and Suzuki T., 2007, Identification of anthocyanins in the sprouts of buckwheat, *J. Agric. Food Chem.*, 55(15): 6314-6318
- Kim S.L., Hwang J.J., Kim S.K., Hur H.S., and Park C.H., 2001, Development and utilization of buckwheat sprouts as functional vegetables, *Fagopyrum*, 18: 49-54
- Kiribuchi K., Jikumaru Y., Kaku H., Minami E., Hasegawa M., Kodama O., Seto H., Okadad K., Nojiri H., and Yamane H., 2005, Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(5): 1042-1044
- Li T., Sun J.K., and Liu J.T., 2015, Role of different transcription factor families in the regulatory networks of drought and salinity tolerance in plants, *Shengming Kexue (Chinese Bulletin of Life Sciences)*, 27(2): 217-227 (李田, 孙景宽, 刘京涛, 2015, 植物转录因子家族在耐盐抗旱调控网络中的作用, *生命科学*, 27(2): 217-227)
- Matus J.T., Poupin M.J., Cañón P., Bordeu E., Alcalde J.A., and Arce-Johnson P., 2010, Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Plant Molecular Biology*, 72(6): 607-620
- Salvatierra A., Pimentel P., Moya-León M.A., and Herrera R., 2013, Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of *FcMYB1* gene, *Phytochemistry*, 90: 25-36
- Sha W., Suo L., Zhang M.J., Zhang C.L., and Zhou B., 2015, Cloning and expression analysis of MYB transcription factor gene *RcMYB* from *Racomitrium canescens*, *Jiyinzhexue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(4): 792-796 (沙伟, 索荔, 张梅娟, 张春蕾, 周伯, 2015, 砂藓 MYB 转录因子基因 *RcMYB* 的克隆及表达分析, *基因组学与应用生物学*, 34(4): 792-796)
- Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 1997, Gene expression and signal transduction in water-stress response, *Plant Physiology*, 115(2): 327
- Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki K., 1993, The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular and General Genetics MGG*, 238(1-2): 17-25
- Zhou H., Zhu Q., Yang Y.F., Liu H.W., Yu F.X., and Qiu D.Y., 2015, Cloning and sequence analysis of *bHLH* gene from *Taxus chinensis* var. *mairei*, (*Zhiwu Yanjiu (Bulletin of Botanical Research)*), 35(1): 52-59 (周华, 朱祺, 杨艳芳, 刘洪伟, 余发新, 邱德有, 2015, 南方红豆杉 *bHLH* 基因克隆与序列分析, *植物研究*, 35(1): 52-59)
- Zhou M.L., Hou H.L., Zhu X.M., Shao J.R., Wu Y.M., and Tang Y.X., 2011, Soybean transcription factor GmMYB22 represses catharanthine biosynthesis in hairy roots of *Catharanthus roseus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4): 1095-1105
- Zhou M.L., Wang C.L., Qi L.P., Yang X.B., Sun Z.M., Tang Y., Tang Y.X., Shao J.R., and Wu Y.M., 2015, Ectopic expression of *Fagopyrum tataricum FtMYB12* improves cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2): 362-371