

• 药材与资源 •

黄芩 bHLH 转录因子基因家族生物信息学及表达分析

陈媃颖, 刘娟*, 袁媛*, 周骏辉, 黄璐琦

中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700

摘要: 目的 通过生物信息学方法, 克隆黄芩 *Scutellaria baicalensis* bHLH 基因, 并初步探究其功能。方法 使用 BLAST 软件从黄芩 cDNA 文库中筛选出 bHLH 基因, 克隆其全长 cDNA 序列, 测序验证后使用 ORF Finder 预测开放阅读框, 并进行蛋白序列特征分析, 使用荧光定量 PCR 方法比较 bHLH 基因在不同器官以及受赤霉素刺激下的表达情况。结果 克隆的 6 个 bHLH 转录因子基因 (bHLH1~3, bHLH5~7), 分属 6 个亚家族, 其中 2 个有完整的开放阅读框。bHLH 基因相对表达水平分析发现, 100 $\mu\text{mol/L}$ GA₃ 处理后 bHLH2、bHLH3 表达量升高, bHLH1、bHLH5~7 表达量降低; bHLH 基因在黄芩的根与花中表达量较高, 其中 bHLH1、bHLH2、bHLH5、bHLH7 在花中表达量最高, bHLH3 在根中表达量最高; bHLH 基因与黄酮类成分生物合成及调控基因表达水平具有一定相关性。结论 为进一步完善黄芩黄酮类成分的分子调控网络奠定基础。

关键词: 黄芩; bHLH 转录因子; 生物信息学; 表达分析; cDNA 文库

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)03-0671-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.024

Analysis of bioinformatics and expression level of bHLH transcription factors in *Scutellaria baicalensis*

CHEN Ti-ying, LIU Juan, YUAN yuan, ZHOU Jun-hui, HUANG Lu-qi

National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective The information of bHLH transcription factor genes from transcriptome dataset of *Scutellaria baicalensis* was predicted by bioinformatics methods and the gene expression analysis was used to deduce its probable function. **Methods** The bHLH genes were screened from the transcriptome dataset of *S. baicalensis* by using BLAST comparison software. Then the open reading frames (ORFs) from the full-length of cDNA of bHLH genes were predicted by ORF Finder online tool, and its protein characteristics were analyzed using bioinformatic method. The expression of bHLH genes was detected by qPCR in different organs and treatments stimulated by Gibberellin A3 (GA₃). **Results** Six genes of bHLH transcription factors were obtained, which belonged to six subfamilies of bHLHs of *A. thaliana*, two of which had completed ORFs. The results of gene expression showed that: The expression of bHLH2 and bHLH3 increased after 100 $\mu\text{mol/L}$ GA₃ treatment, and the expression of bHLH1, bHLH5, bHLH6 and bHLH7 decreased. The bHLH gene had the highest expression level in roots and flowers of *S. baicalensis* of them, among which bHLH1, bHLH2, bHLH5 and bHLH7 had highest expression in flowers and bHLH3 had highest expression in root. There was a correlation between bHLH gene and expression of biosynthesis and regulation genes of flavonoid. **Conclusion** These results provided the basis for further improving the molecular regulation network of flavonoids of bHLH genes in *S. baicalensis*.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; bHLH transcription factors; bioinformatics; expression analysis; cDNA library

黄芩为唇形科多年生草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 其主要活性成分为黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类化合物。研究表明, 温度、水分、光照等适度环境胁迫能够促进黄芩活性成分的积累以及生物合成途径关键酶基因的表达^[1]。本课题组前期研究证明了内源赤霉素

(GA₃) 的变化与黄芩活性成分积累密切相关^[2], 通过对 MYB 转录因子的研究证明了 SbMYB2 和 SbMYB8 参与调控苯丙素类成分生物合成, 且 SbMYB2 对黄酮积累的影响受 GA₃ 信号转导的影响^[3], 构建了“GA-MYB-PAL/CHS-黄酮类活性成分”调控网络, 初步阐明了环境影响道地黄芩品质形成的分子机制。

收稿日期: 2017-05-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573522); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZZ10-008)

作者简介: 陈媃颖, 在读硕士, 研究方向为中药功能基因研究。E-mail: chenty1101@126.com

*通信作者 袁媛, 研究员。E-mail: y_yuan0732@163.com

刘娟, 助理研究员。E-mail: juanliu126@126.com

MYB 蛋白激活类黄酮合成途径中后期相关酶基因的表达, 需要依赖 bHLH 转录因子。bHLH 转录因子广泛存在于真核生物中, 因含有保守性较高的碱性/螺旋-环-螺旋 (basic/helix-loop-helix, bHLH) 结构而得名^[4]。bHLH 转录因子在高等植物组织中普遍存在, 参与调控了植物体生长发育、信号传导、次生代谢及抗逆反应等诸多生理生化进程^[5-8]。研究表明, bHLH 转录因子对植物次生代谢产物积累有重要影响, 如长春花中 bHLH 转录因子 CrMYC2 参与调控蒴类生物碱的合成^[9], 红豆杉中 bHLH 转录因子 TcJAMYC 参与调控紫杉醇生物合成通路^[10]。此外, 在拟南芥、矮牵牛、龙胆、紫苏等多种植物中均分离鉴定出了调控苯丙素类化合物次生代谢的 bHLH 转录因子基因^[11-12]。同时, bHLH 转录因子在植物对逆境的响应中也起到了重要作用, 参与了对干旱、低温、高盐、缺铁、低磷、低铝等多种非生物性胁迫的应答^[13-18]。目前关于 bHLH 转录因子的研究主要集中在拟南芥、水稻、葡萄等模式植物中, 黄芩中 bHLH 转录因子的功能及理化性质鲜见报道。本实验通过黄芩 bHLH 转录因子的生物信息学分析, 进一步比较 bHLH 与黄芩次生代谢产物合成基因的表达, 完善黄芩黄酮类成分的分子调控网络, 为阐明道地黄芩品质形成的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄芩 *S. baicalensis* 种子为中国中医科学院中药资源中心实验室保存, 由中国中医科学院袁媛研究员鉴定。

1.2 样品制备

将黄芩种子于湿润的滤纸上萌发, 萌发苗 2 周后移栽至花盆中, 25 °C、16 h 光照室温条件下培养。以 100 μmol/L GA₃ 喷施黄芩叶片, 并分别于喷施后的 0、1、2、3 h 取样, -80 °C 冰箱保存备用。夏季黄芩花期时, 于同一植株不同部位分别取花、根、茎、叶, 清水清洗后以滤纸除去多余水分, -80 °C

冰箱保存备用。

1.3 黄芩 bHLH 基因的调取

从 TAIR 数据库中下载拟南芥 bHLH 核酸序列, 以此作为探针, 通过 BLAST 比对, 在黄芩 cDNA 文库中搜寻同源序列, 识别标准为 $E \leq 1 \times 10^{-15}$, Score ≥ 100 , 匹配数 (b) = 1。

1.4 生物信息学分析

通过 ORF Finder 在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测 bHLH 片段的开放阅读框序列。运用在线软件 ProtParam (expasy.ch/tools/protparam.html) 预测 bHLH 编码蛋白的理化性质; 使用 WOLF PSORT (<http://wolfsort.org/>) 进行蛋白质亚细胞定位信号的预测; 使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行分泌蛋白的预测; 使用 CFSSP (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质二级结构的分析; 使用 MEGA 5.0 构建系统进化树 (neighbor-joining tree, NJ tree) (bootstrap 值设为 1 000)。

1.5 RNA 提取和 cDNA 合成

样品总 RNA 采用植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司) 提取, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测确定 RNA 完整性后, 用核酸定量仪测定 RNA 浓度, 按照 cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行反转录。

1.6 基因克隆

在黄芩 bHLH 基因序列的基础上设计 PCR 引物, 由生工生物工程 (北京) 有限公司合成, 见表 1。反应体系按照 TransStart[®] FastPfu DNA Polymerase 高保真酶 (全式金公司) 说明书配制, 50 μL 反应体系, 包括 5×TransStart[®] FastPfu Buffer 10 μL, dNTP 4 μL, 正、反向引物各 1 μL, TransStart[®] FastPfu DNA Polymerase 高保真酶 1 μL, cDNA 模板 1 μL, dd H₂O 32 μL。反应程序为 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 72 °C 复性 5 min。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers

基因名称	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
bHLH1	GGGGGTGCTGTGGGGAATCT	GCTGATAATTGGCACCAGTTTGT	878
bHLH2	GGGGGGCGCAAACTATGT	ATTTAAAGCGGAGCTTTCTATTAC	851
bHLH3	GGGGACACAAAACAACATATTCC	TTAGAGTACCTAATGGTGTATTAGG	822
bHLH5	GGGGGTCCTTCATTATTCATTGG	GCTTCTCATCTTTTCGCTAATCCT	1 318
bHLH6	TCCAAAAGGGTACATTCATGTAAGG	TCCTGATCAGGTCTACCCATGAAT	293
bHLH7	GGGAAGAAAACCATGGGC	TTGAGAATTGGGTGGTTCAACTT	893

1.7 实时荧光定量 PCR

依照黄芩 bHLH 基因序列设计实时荧光定量 PCR 引物, 由生工生物工程(北京)有限公司合成, 见表 2。反应体系按照 SYBR Premix Ex Taq™ Kit (Takara 公司) 说明书配制, 10 μL 反应体系, 包括正反向引物各 0.5 μL, SYBR Premix Ex Taq 5 μL, cDNA 模板

1 μL, ddH₂O 3 μL。每个反应重复 3 次(包括阴性对照), 在 Light Cycler 480 II 型 RT-PCR 仪(Roche 公司)上进行, 结束后进行熔解曲线分析, 反应程序参照 SYBR Premix Ex Taq™ Kit (Takara 公司) 说明书。各基因表达量以内参基因 Sb 18 S 作为标准进行相对定量^[19], 目的基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

Table 2 Real-time PCR primers sequences

基因名称	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
bHLH1	CAACGAAGGGATAGACTAAACGAC	CATACGGACAGCATCAACCAAA	111
bHLH2	CCAAGGAAACGAGGACGGA	ACAGCTCTTAGAGCATAGAAACGC	116
bHLH3	CGAAGATGGGAGAGAAGATAA	TTGGGCTACGAGGTTTCAT	240
bHLH5	AAATGGTAACGCTGCTAACGG	GGCAAGGGACTGAGTCTGGT	263
bHLH6	TCCAAAAGGGTACATTCATGTAAGG	TCCAAAAGGGTACATTCATGTAAGG	244
bHLH7	GGGGAAGAAAAACCATGGGC	TTGAGAAATTGGGTGGTTCAACTT	464
PAL1	GCGAATAGTGTTTCATGATGAGGAT	CAATGGCTGCCTTTCCAGTT	148
PAL2	GATTCTGCGTCCAACCTCAGTGA	GCGTCGGCATTATCCCTG	182
PAL3	GGCCACCAAGATGATCGA	CAATGGCCAATCTTGCATTG	143
CHS	GCAGTCCACTTATGCTGATTAC	GTGAAGTTGTCGTTCCTCCTTC	156
MYB2	GTAGTCCAAAAGCACTCACC	TCCAAAAAATAAACTAAGCA	233
MYB8	GATGAAAATCCCAAGAGCAACA	GCGTCGTCACCTCCACTATCC	174
Sb18S	CGTTGACTACGTCCCTGCCCTT	GTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGAC	130

2 结果

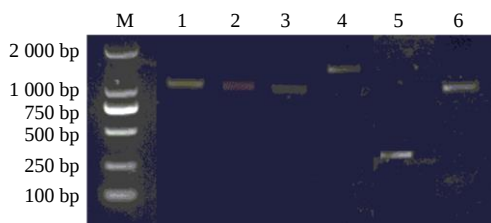
2.1 黄芩 bHLH 转录因子特性分析

从黄芩 cDNA 文库中比对得到 26 个 bHLH 基因片段, 拼接后全长测序验证, 产物电泳图如图 1 所示, 共获得 6 个 bHLH 基因。ORF Finder 预测表明, bHLH2、bHLH3 为全长 cDNA, bHLH1、bHLH5、bHLH6、bHLH7 读码框均不完整, 使用 ProtParam 预测读码框完整的 2 个黄芩 bHLH 转录因子的理化性质, 见表 3。

表 3 黄芩 bHLH 转录因子特性

Table 3 Characteristics of bHLH TFs of *S. baicalensis*

名称	长度/bp	全长 cDNA	相对分子质量	氨基酸数	等电点
bHLH1	624	否	—	—	—
bHLH2	723	是	26.731	232	8.94
bHLH3	699	是	26.716	372	5.29
bHLH5	1 116	否	—	—	—
bHLH6	222	否	—	—	—
bHLH7	825	否	—	—	—



1—6-bHLH1, bHLH2, bHLH3, bHLH5, bHLH6, bHLH7
M-Marker

图 1 黄芩 bHLH 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of bHLH genes PCR products of *S. baicalensis*

对于含有全长 cDNA 的 2 个黄芩 bHLH 转录因子, 使用 WOLF PSORT 进行蛋白质亚细胞定位的信号预测, 结果表明, bHLH2、bHLH3 均位于细胞核中。SignalP 4.1 Server 软件分析表明 bHLH2、bHLH3 均非分泌蛋白。

2.2 黄芩 bHLH 转录因子二级结构分析

使用 CFSSP 软件对黄芩中 bHLH2、bHLH3 转录因子二级结构预测, α -螺旋、 β -折叠、 β -转角所占比例见表 4。 α -螺旋在 bHLH 二级结构中所占比例最高, β -转角所占比例相对较低。

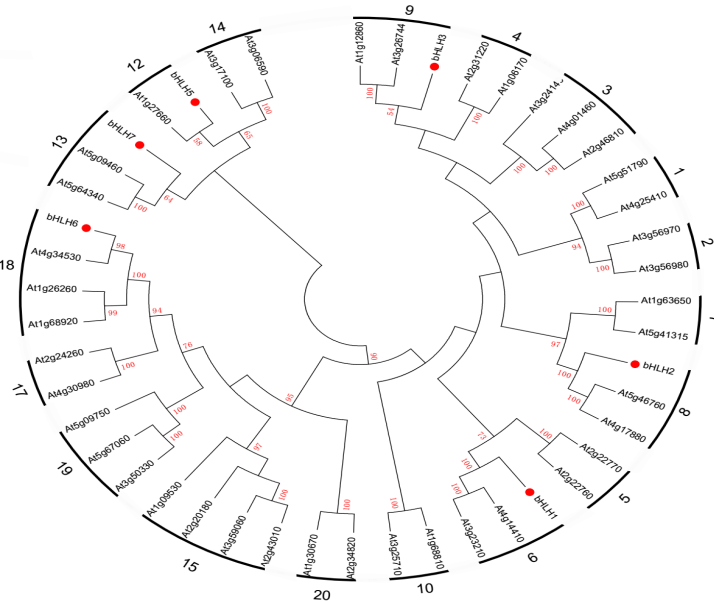
表 4 黄芩 bHLH 转录因子二级结构特性

Table 4 Secondary structure of bHLH TFs of *S. baicalensis*

名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%
bHLH2	77.5	21.7	13.8
bHLH3	81.5	53.0	13.8

2.3 系统进化树分析

选取拟南芥和黄芩中的 bHLH 转录因子氨基酸序列, 使用 MEGA 5.0 NJ 法构建黄芩 bHLH 转录因子系统进化树, 见图 2。Toledo-Ortiz 等^[20]将拟南芥中的 147 个 bHLH 基因分为 21 个亚组, 系统进化



At-拟南芥 圆点为黄芩序列; 进化树由 MEGA 5.0 软件构建, 在每个节点的数字为 1 000 次自引导值中该节点存在的百分数

At-*Arabidopsis thaliana*; dot, bHLH genes of *S. baicalensis*. The Phylogenetic analysis of the full-length sequences of the bHLH proteins from *S. baicalensis* and *A. thaliana* was constructed using NJ method. Bootstrap values (shown at the corresponding nodes) reported as percentages were obtained from 1000 replicates. The black arcs indicate different groups (or subgroups) of bHLH domains

图 2 黄芩 bHLH 转录因子系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of bHLH TFs of *S. baicalensis*

树结果表明, 黄芩 bHLH1 和 AT4G14410、AT3G23210 聚在第 6 亚组上, 可能参与铁稳态的调节^[21]; bHLH2 与 AT1G32640、AT5G46760、AT4G17880 聚在第 8 亚组上, 可能参与水分胁迫应激反应^[22]; bHLH3 与 AT3G26744 与 AT1G12860 聚在第 9 亚组上, 可能参与植物应对低温等非生物性胁迫功能^[23]; bHLH5 与 AT1G27660 聚在第 12 亚组上, 可能与植物昼夜节律调节有关^[24]; bHLH6 与 AT1G68920、AT1G26260、AT4G34530 聚在第 18 亚组上, 可能参与介导植物开花时间的光控制^[25], bHLH7 与 AT5G09460、AT5G64340 聚在第 13 亚组上, 可能与植物茎伸长调节有关^[26]。

2.4 基因表达分析

为了进一步了解黄芩 bHLH 基因的表达模式和表达水平, 通过实时荧光定量 PCR 分别分析了 6 个黄芩 bHLH 基因以及与黄芩黄酮类成分合成相关的 CHS、PAL1、PAL2、PAL3、MYB2、MYB8 基因在 100 $\mu\text{mol/L}$ GA₃ 处理下 0、1、2、3 h 表达量, 以及比

较其在根、茎、叶、花 4 个部位之间表达量的差异。

100 $\mu\text{mol/L}$ GA₃ 处理下, bHLH2、bHLH3、PAL2 基因表达量在处理后 1 h 显著升高, bHLH1、bHLH5、bHLH6、PAL3、MYB2 在处理 2 h 后表达量均下降, bHLH7、CHS、PAL1、MYB8 基因在处理 1 h 表达量降低, 随后又逐渐升高, 见图 3。经简单相关及偏相关分析后发现 100 $\mu\text{mol/L}$ GA₃ 处理下, bHLH1、bHLH5 与 CHS 基因相对表达水平显著正相关 ($r=0.911\ 9$ 、 $0.958\ 6$); bHLH2、bHLH3 与 PAL2 相对表达水平显著正相关 ($r=0.976\ 3$ 、 $0.984\ 6$); bHLH7 与 MYB8 基因相对表达水平呈正相关 ($r=0.962\ 5$)。

黄芩中 6 个 bHLH 转录因子在花、茎、叶、根 4 个部位中的表达量差异明显, 由图 4 可见, 一方面, 黄芩所有相关基因在花中均有较高的表达量, 显著高于茎和叶中的表达量; 另一方面, bHLH3、CHS 以及 MYB8 基因在黄芩主要药用部位根中有较高的表达量。此外, 黄芩中的 bHLH 转录因子在

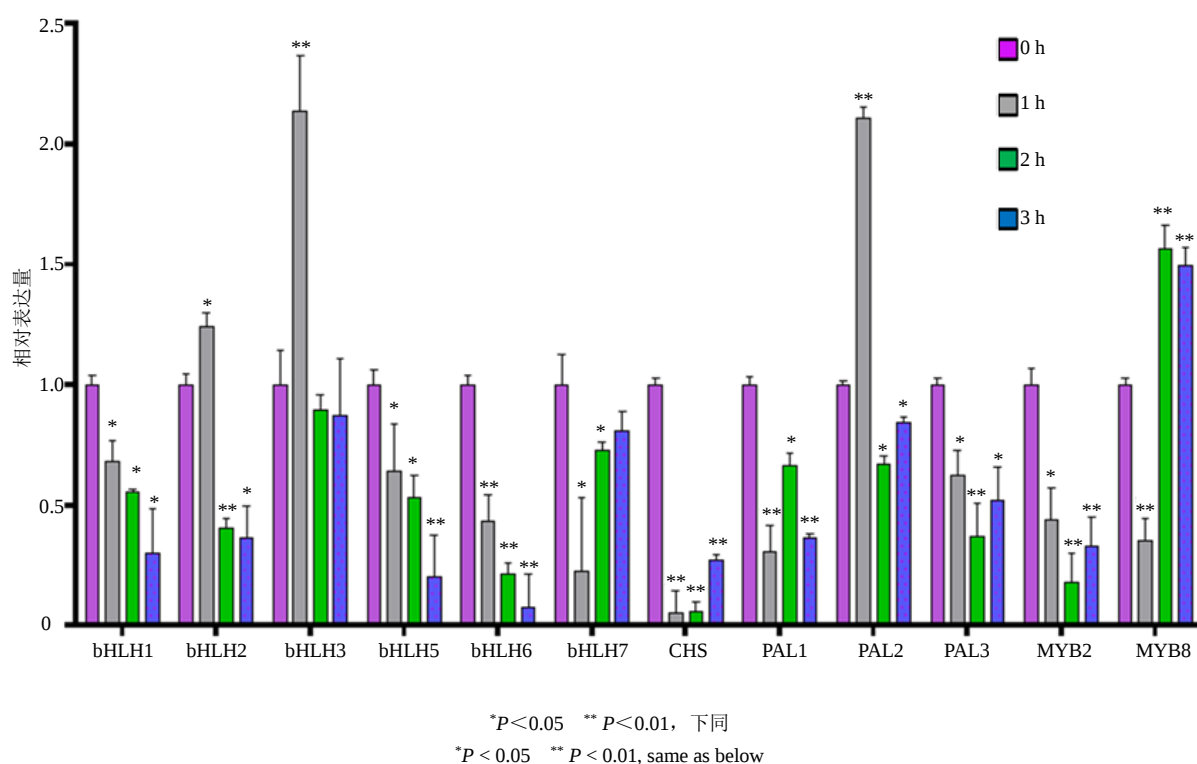


图 3 GA_3 处理下黄芩中 bHLH 和类黄酮物质合成相关基因表达变化 ($n = 3$)

Fig. 3 Effect of GA_3 treatment on expression of bHLH and flavonoids biosynthetic related genes in *S. baicalensis* ($n = 3$)

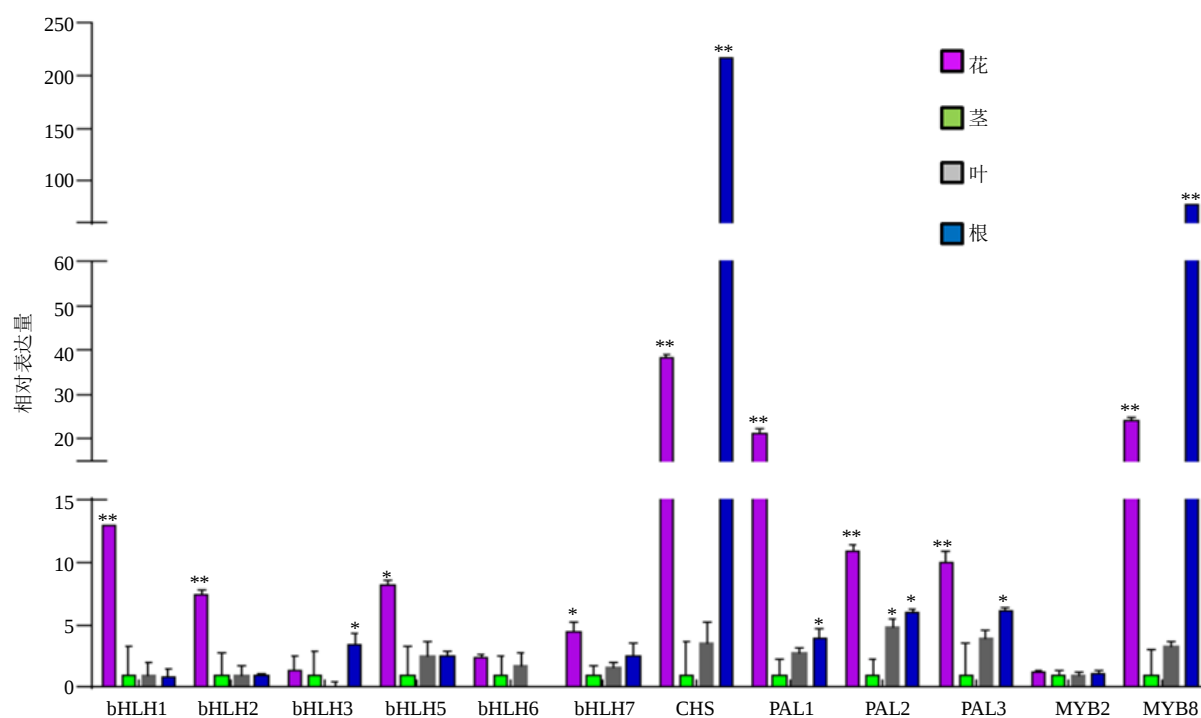


图 4 黄芩中 bHLH 和类黄酮物质合成相关基因不同部位表达变化 ($n = 3$)

Fig. 4 Expression levels of bHLH and flavonoid biosynthetic related genes in *S. baicalensis* in different organs ($n = 3$)

某些部位表达量极低,如 bHLH3 在叶中、bHLH6 在根中几乎不表达。经简单相关及偏相关分析后发现 bHLH1、bHLH2 和 bHLH5 与 PAL1 在黄芩不同部位中相对表达水平呈正相关 ($r=0.980\ 2$ 、 $0.984\ 3$ 、 $0.985\ 0$), bHLH3 与 MYB8 相对表达水平呈正相关 ($r=0.917\ 8$), bHLH7 及与 MYB2 相对表达水平正相关 ($r=0.999\ 1$)。

3 讨论

黄芩为中医临床常用中药材,其主要活性成分为黄酮类化合物,本项目组前期从“气候因子-基因调控-活性成分”关联入手,建立了黄芩“GA-MYB-PAL/CHS-黄酮类活性成分”的调控网络。在此基础上,本实验共获得了 6 个黄芩 bHLH 基因,分别命名为 bHLH1~3、bHLH5~7。系统进化树结果显示 bHLH3 与 AT5G43650 聚在一支上,AT5G43650 在拟南芥中过表达可以适度地增加植物体对脱水和冷处理的响应^[27]。低温处理会降低黄芩根中总黄酮和黄芩苷的含量,10% PEG 模拟脱水条件下,黄芩悬浮细胞中黄芩素量显著提高且 PAL 基因转录水平显著提高^[28-29],bHLH3 基因在 GA₃ 处理下与 PAL2 基因相对表达水平呈正相关,据此推测 bHLH3 转录因子可能参与调控黄芩黄酮类活性成分积累。bHLH2 与 AT1G32640 聚在一支上,AT1G32640 在拟南芥中参与调控水分胁迫应激反应^[30],且水分胁迫会增加黄芩根和叶中的黄酮含量^[31],bHLH2 与 PAL 基因表达水平也呈现正相关,据此推测 bHLH2 转录因子可能与水分胁迫影响黄芩中黄酮类成分积累有关。本实验研究结果为进一步了解转录因子调控黄芩活性成分生物合成分子机制奠定基础,并为完善黄芩中黄酮类活性成分调控网络提供了依据。

参考文献

- [1] Yuan Y, Hao J D, Yang B, *et al.* Climate change affected the best producing area of Chinese herbal medicine *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *J Tradit Med (Russia)*, 2010, 3s: 241-248.
- [2] Yuan Y, Qi L, Yang J, *et al.* A *Scutellaria baicalensis* R2R3-MYB gene, SbMYB8, regulates flavonoid biosynthesis and improves drought stress tolerance in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2015, 120(3): 961-969.
- [3] Yuan Y, Wu C, Liu Y, *et al.* The *Scutellaria baicalensis* R2R3-MYB transcription factors modulates flavonoid biosynthesis by regulating GA metabolism in transgenic tobacco plants [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77275.
- [4] Feller A, Machemer K, Braun E L, *et al.* Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 94-116.
- [5] Murre C, Mccaw P S, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins [J]. *Cell*, 1989, 56(5): 777-783.
- [6] Duek P D, Fankhauser C. HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling [J]. *Plant J*, 2003, 34(6): 827-836.
- [7] Smolen G A, Pawlowski L, Wilensky S E, *et al.* Dominant alleles of the basic helix-loop-helix transcription factor ATR2 activate stress-responsive genes in *Arabidopsis* [J]. *Genetics*, 2002, 161(3): 1235-1246.
- [8] Rajani S, Sundaresan V. The *Arabidopsis* myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(24): 1914-1922.
- [9] Zhang H, Hedhili S, Montiel G, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate responsive expression of the ORCA genes regulating alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant J*, 2011, 67(1): 61-71.
- [10] Nims E, Vongpaseuth K, Roberts S C, *et al.* Jasmonate-responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in *Taxus cuspidata* cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4 [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 115-119.
- [11] 袁媛,周骏辉,黄璐琦.黄芩道地性形成“逆境效应”的实验验证与展望 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(1): 139-143.
- [12] Baudry A, Caboche M, Lepiniec L. TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2006, 46: 768-779.
- [13] Lin Y, Zheng H, Zhang Q, *et al.* Functional profiling of EcaICE1 transcription factor gene from *Eucalyptus camaldulensis* involved in cold response in tobacco plants [J]. *J Plant Biochem Biot*, 2014, 23(2): 141-150.
- [14] Li H, Sun J, Xu Y, *et al.* The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(5): 655-665.
- [15] Liu W, Tai H, Li 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.

- [16] Ogo Y, Itai R N, Kobayashi T, *et al.* OsIRO2 is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 75(6): 593-605.
- [17] Yi K, Wu Z, Zhou J, *et al.* OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(4): 2087-2096.
- [18] 宋 倩, 钱绍方, 陈宣钦, 等. 丹波黑大豆 GmbHLH30 转录因子耐铝功能初步研究 [J]. *生命科学研究*, 2014, 18(4): 332-337.
- [19] Hui X, Park N I, Li X, *et al.* Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(24): 9715-9722.
- [20] Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail P H. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1749-1770.
- [21] Li X L, Zhang H M, Ai Q, *et al.* Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2016, 170(4): 2478-2493.
- [22] Liu N, Staswick P E, Avramova Z, *et al.* Memory responses of jasmonic acid-associated *Arabidopsis* genes to a repeated dehydration stress [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39(11): 2515-2519.
- [23] Lin Y Z, Guo H, Liu C X. Molecular cloning and expression analysis of cold-resistant transcription factor ICE1 from *Eucalyptus camaldulensis* L. [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 47(5): 488-494.
- [24] Ito S, Song Y H, Miller R J, *et al.* Flowering bHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. *Pnas*, 2012, 109(9): 3582-3587.
- [25] Eremina M, Unterholzner S J, Rathnayake A I, *et al.* Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants [J]. *Pnas*, 2016, 113(40): E5982-E5991.
- [26] Imai A, Hanzawa Y, Komura M, *et al.* The dwarf phenotype of the *Arabidopsis* acl5 mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene [J]. *Development*, 2006, 133(18): 3575-3585.
- [27] Jiang Y, Yang B, Deyholos M K. Functional characterization of the *Arabidopsis* bHLH92 transcription factor in abiotic stress [J]. *Mol Genet Genom*, 2009, 282(5): 503-516.
- [28] 杨兆春, 袁 媛, 陈 敏, 等. PEG 胁迫对黄芩黄酮类有效成分积累及相关基因表达的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(16): 2157-2161.
- [29] Yuan Y, Shuai L, Chen S, *et al.* Flavonoids and antioxidative enzymes in temperature-challenged roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Z Naturforsch C*, 2012, 67(1/2): 77-85.
- [30] Liu H, Yu X, Li K, *et al.* Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2008, 322(322): 1535-1539.
- [31] Yuan Y, Liu Y, Wu C, *et al.* Water deficit affected flavonoid accumulation by regulating hormone metabolism in *Scutellaria baicalensis* Georgi roots [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e42946.