

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.02.008

魔芋热处理响应基因 *AaHSP70* 启动子的克隆和功能分析

王映红, 张楠, 岳振宇, 刘海利, 牛义

西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 以白魔芋(*Amorphophallus albus*)为试材, 利用同源克隆法获得热处理响应基因 *AaHSP70*。qRT-PCR 结果表明: *AaHSP70* 基因对热胁迫较敏感, 41 °C 处理能够诱导 *AaHSP70* 在白魔芋不同器官中表达, 并在 1 h 时表达丰度最高; 利用 FPNI-PCR 法通过 3 轮步移扩增得到 1 062 bp 的 *AaHSP70* 启动子序列。生物信息学分析表明: *AaHSP70* 含有热胁迫响应元件 HSE 及多种与植物逆境应答相关的顺式作用元件。酵母单杂交试验结果和双荧光素酶系统均显示: *AaHSP70* 启动子可与 *AaHSFA1*, *AaHSFA2c* 相互作用。为进一步分析 *AaHSP70* 启动子的功能, 构建该启动子与 *GUS* 基因融合的植物表达载体, 利用农杆菌介导法转入拟南芥, 热处理后对转基因拟南芥进行 *GUS* 组织化学染色鉴定, 结果显示其在根、茎、叶中均可表达, 因此推测 *AaHSP70* 可能在白魔芋抗外界逆境特别是热胁迫中起着重要的作用。

关键词: 白魔芋; *AaHSP70*; 荧光定量; 启动子

中图分类号: S632.3; Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)02-0066-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and Functional Analysis of a Heat Treatment Response Factor Gene *AaHSP70* in *Amorphophallus*

WANG Yinghong, ZHANG Nan, YUE Zhenyu,
LIU Haili, NIU Yi

Collage of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University / Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China

Abstract: The heat treatment response gene *AaHSP70* was obtained by homologous cloning from *Amorphophallus albus*. The results of qRT-PCR showed that the *AaHSP70* gene was more sensitive to heat stress. Heat treatment at 41 °C can induce the expression of *AaHSP70* in different organs of *Amorphophallus*, with the highest expression appeared within 1 h. The 1 062 bp of *AaHSP70* promoter se-

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jcsx-gksbX0159, cstc2019jcsx-msxmX0404); 西南大学石柱创新基金项目(SZ201902)。

作者简介: 王映红, 硕士研究生, 主要从事魔芋耐热分子机制的研究。

quence was obtained by FPNI-PCR method. Bioinformatic analysis showed that *AaHSP70* contains heat stress response element HSE and a variety of cis-acting elements related to plant stress response. The results of yeast one-hybrid assay and the dual luciferase system showed that the promoter of *AaHSP70* could interact with AaHSFA1 and AaHSFA2c. To further analyze the function of the *AaHSP70* promoter, a plant expression vector fused with the promoter and *GUS* gene was constructed and transferred into *Arabidopsis* by Agrobacterium-mediated method. After heat treatment, the transgenic *Arabidopsis* was identified by GUS histochemical staining. The results showed that *AaHSP70* expressed in roots, stems and leaves. Therefore, it could be speculated that *AaHSP70* may play an important role in the resistance of *Amorphophallus* to external adversity, especially heat stress.

Key words: *Amorphophallus albus*; *AaHSP70*; qRT-PCR; promoter

植物热激蛋白(Heat shock proteins, HSPs)又称为热休克蛋白,最早在地中海果蝇中发现^[1],是哺乳动物和植物中广泛存在的一类保守蛋白质。热激蛋白在生物体对外界各种生物或非生物胁迫作出应答反应时作为分子伴侣发挥着关键作用^[2-4]。按照蛋白分子量的不同,热休克蛋白共分为 5 类,即 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 以及小分子热休克蛋白 sHSP。其中, HSP70 作为热激蛋白家族的重要成员之一,其典型结构包括高度保守的 N 端 44 kDa 的核苷酸结合结构域(nucleotide binding domain, NBD)和 C 端 18 kDa 的底物结合结构域(substrate binding domain, SBD),以及铰链(linker)结构^[5-6]。

研究表明, HSP70 在植物中主要参与细胞内蛋白质的合成、折叠、运输和降解修复等过程^[7-8],它在细胞内大量表达可以显著改善细胞的生存能力,进而明显提高植物抵御各种环境胁迫的耐受能力。如在拟南芥中,过表达 *HSP70* 基因可以增强拟南芥植株的耐热性,且经过热处理后,转基因幼苗对渗透、盐和氧化胁迫的耐受性比野生型更强^[9]。Song 等^[10]将菊花 *CgHSP70* 基因转入拟南芥中可以提高转基因植株对于干旱以及高盐的耐受能力。Batcho 等^[11]将龙舌兰 *AsHSP70* 基因转入棉花中可以提高陆地棉耐热性,可用于棉花热胁迫改良育种。在甘蓝型油菜中超表达 *BnA7HSP70* 基因能够提高植株对于干旱条件的耐受性^[12]。芍药 *PlHSP70* 基因在拟南芥中进行超表达,在热胁迫下转基因比野生型拟南芥的耐高温能力更强,植株生长更好^[13]。在高温胁迫下,热激蛋白的表达均受到热激转录因子(Heat shock transcription factors, HSFs)的调控, HSFs 与热激蛋白启动子区 HSEs(5'-AGAAAnnTTCT-3')元件结合,促进热激蛋白的表达^[14-16]。南瓜 *HSP70* 基因启动子中含有多个信号元件,说明南瓜 *HSP70* 基因可能参与多种功能的调控^[17]。利用荧光素酶(LUC)报告基因对转基因水稻 *OsHSP16.9C* 启动子进行缺失分析,发现含有不完全热激元件(HSE)的启动子片段在热诱导中起关键作用^[18]。魔芋含有大量的葡甘露聚糖(Konjac glucomannan, KGM),具有很高的营养和经济价值,喜冷凉不耐高温^[19]。目前对于魔芋的分子研究较少,多为生理方面的研究,比如低温诱导对白魔芋产生多叶,开花过程中内源激素变化,层积处理打破实生种子休眠以及魔芋软腐病拮抗放线菌的筛选等^[20-23]。本课题组已在前期的研究中同源克隆出白魔芋 *AaHSP70* 基因,并对其进行了生物信息学分析,NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线预测显示在 *AaHSP70* 蛋白 N 端 9-387 氨基酸是一个 *HSP70* 特有的核苷酸结构域 NBD,并发现其与野生稻(*Oryza brachyantha*, XM_006664054)的同源性最高^[24]。

然而 *HSP70* 是否对魔芋抵御热胁迫有促进作用,其启动子是怎样参与热胁迫调控还尚不清楚。因此,基于之前研究,从白魔芋中克隆 *AaHSP70* 的 CDS 和启动子序列,对其进行表达模式分析,以及酵母单杂交和双荧光素酶试验,并构建该 *prAaHSP70*-GUS 融合表达载体转化拟南芥。此研究探讨了 *HSP70* 启动子在魔芋耐热过程中的调控作用,为魔芋的耐热品种选育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与方法

试验于 2019 年 3 月—2020 年 10 月在西南大学魔芋研究中心进行,供试材料为白魔芋(*Amorphophal-*

lus albus), 展叶时移至光照培养箱, 25 °C 预培养 2 d 后进行 41 °C 高温处理. 分别在处理 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 和 24 h 后取植株叶片、幼嫩新根和球茎, 液氮速冻后 -80 °C 保存备用. 上述组织及处理均重复 3 次. 哥伦比亚野生型拟南芥株系(Columbia, Col-0)用于 GUS 染色. 本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)用来进行双荧光素酶试验. 基因克隆所用大肠杆菌(*Escherichia coli*)T1 感受态细胞购于 Beijing Transgen Biotech 公司, 农杆菌感受态 GV3101 和 GV3101(pSoup)均购于上海唯地生物技术有限公司, PCR 引物合成和 DNA 序列测定由北京六合华大基因科技有限公司完成.

1.2 DNA, RNA 的提取与 cDNA 的合成

白魔芋、拟南芥叶片基因组 DNA 以及白魔芋各组织总 RNA 提取, 参照北京华越洋新型植物 DNA, RNA 提取试剂盒(Cat. No: 0419-50, CB 型)说明书操作. 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa)进行反转录合成 cDNA, -20 °C 保存备用.

1.3 CDS 和启动子序列克隆及生物信息学分析

基于实验室前期研究结果以及同源克隆, 利用 Primer 3 Plus 设计两条特异引物 *HSP70*-F 和 *HSP70*-R(表 1), 获得 *AaHSP70* 基因序列. PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶和 DNA 凝胶回收试剂盒进行分离纯化. 将 PCR 产物连接克隆载体 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 并转化大肠杆菌 T1 感受态细胞, 获得阳性克隆.

根据白魔芋 *AaHSP70* 的 DNA 序列设计特异性引物 *HSP70*-SP1, *HSP70*-SP2, *HSP70*-SP3, 利用 FPNI-PCR 法通过 3 轮步移扩增 *AaHSP70* 启动子^[25]. 以白魔芋的基因组 DNA 为模板, 设计 *HSP70* 启动子的引物 *prHSP70*-F, *prHSP70*-R(表 1), 克隆 *HSP70* 启动子区 1 062 bp 的序列.

利用在线软件 Plant Care(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测启动子序列中的结构基序和调节元件.

1.4 *AaHSP70* 的荧光定量分析

根据 *AaHSP70* 的 ORF 序列, 利用 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物 *HSP70*-RT-F 和 *HSP70*-RT-R. 以白魔芋展叶期 3 个器官(叶、根、茎)在热处理不同时间下的 cDNA 为模板, 以 *EIF4A* 为内参基因^[26], 引物见表 1. 用 SYBR Green 荧光染料, 在 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行目标基因表达水平的检测. 参照 SsoFast EvaGreen Supermix 试剂说明书设置 PCR 反应程序. 设置 3 次重复, 比较 CT 法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)^[27]计算相对表达量.

1.5 酵母单杂交试验

分析 *AaHSP70* 启动子序列, 根据 HSE 元件及 *AaHSFA1*, *AaHSFA2c* 基因的 ORF 序列以及酵母单杂交载体 pLacZi 和 pJG4-5 上的酶切位点特征设计引物. 将 *prHSP70*-HSE 和 *prHSP70*-mHSE(对照)的 F/R 引物各吸取 10 μ L 进行 PCR 反应, 反应体系为 95 °C 10 min, 72 °C 5 min, 23 °C 30 s, 4 °C 保存, 然后对 PCR 产物进行纯化. 将已纯化的 PCR 产物分别与 pLacZi 空载质粒用 *Eco* R I 和 *Xho* I 进行酶切后进行连接. 测序引物为 *pLacZi*-F, *pLacZi*-R(表 1). 将构建成功的 pJG4-5-HSFA1, pJG4-5-HSFA2c 质粒分别和 *prHSP70*-HSE, *prHSP70*-mHSE 共转至 EGY48 酵母感受态细胞中, 选择阳性菌落涂布于 SD/-Ura/-Trp/X-gal 显色平板, 28~30 °C 培养 3~5 d 后观察显色反应. 酵母单杂交试剂均购于北京酷来搏科技有限公司.

1.6 双荧光素酶试验

将 *AaHSP70* 的启动子序列构建到 pGreen II 0800-LUC 载体上作为报告基因, 将 *AaHSFA1* 和 *AaHSFA2c* 基因全长重组到 pGreen II 62-SK 载体上作为效应基因, 引物序列见表 1. 将所构的双荧光素酶重组质粒转入农杆菌感受态 GV3101(pSoup)上, 然后再将 pGreenII0800-LUC-*prHSP70* 和 pGreenII62-SK-HSFA1, pGreenII62-SK-HSFA2c 的农杆菌菌液按相同 OD_{600} 值 1 : 9 的体积比混合; 将菌液 pGreenII0800-LUC-*prHSP70* 与菌液 pGreenII62-SK 按相同方法进行混合并作为阴性对照. 注射烟草叶背面培养 48~72 h 后在 GloMax®-Multi+ 多功能酶标仪上测定萤火虫荧光素酶(LUC)与海肾荧光素酶(REN)的活

性值, 并计算萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的比值来反映转录活性.

表 1 本研究中所使用的引物

目的	引物名称	引物序列(5'-3')
基因克隆	<i>HSP70</i> -F	ATGGCAGGCAAGGAAGAGGGCC
	<i>HSP70</i> -R	TTAGTCGACTTCCTCAATCTTGGGG
启动子克隆	<i>HSP70</i> -SP1	AGAGATTCCTCGGCAGCGAAC
	<i>HSP70</i> -SP2	CATAGCTTGATGTCGCTCTGAACAG
	<i>HSP70</i> -SP3	ACATAGGAGGGTGTGGTCCG
定量引物	<i>prHSP70</i> -F	GTCGCGTGTCTAAGGATGAGG
	<i>prHSP70</i> -R	TGCTGAGAGAGATAATGAGAGAGA
	<i>HSP70</i> -RT-F	GGCCGAGGAAAAACAGTTCCG
	<i>HSP70</i> -RT-R	AGTAAGCAGGAACCGTCACG
内参引物 表达载体构建	<i>EIF4A</i> -RT-F	ACAAGATGAGGAGCAGGG
	<i>EIF4A</i> -RT-R	GGTGATAAGGACACGAGA
	<i>prHSP70</i> -121-F	CCCAAGCTTGTCGCGTGTCTAAGGATGAGG
	<i>prHSP70</i> -121-R	TCCCCCGGGTGCTGAGAGAGATAATGAGAGAGA
	<i>prHSP70</i> -HSE-F	CCGGAATTTCGTGAGAACTTTCCAGAAACCTCGAGCGG
	<i>prHSP70</i> -HSE-R	CCGCTCGAGGTTTCTGGAAGTTCTCACGAATTCCGG
	<i>prHSP70</i> -mHSE-F	CCGGAATTTCGTGATAACTTTACATAAACCTCGAGCGG
	<i>prHSP70</i> -mHSE-R	CCGCTCGAGGTTTATGTAAAGTTATCACGAATTCCGG
	<i>HSFA1</i> -pJG4-5-F	CCGGAATTCATGAGTAGCCACCAGTTTC
	<i>HSFA1</i> -pJG4-5-R	CCGCTCGAGTCACCTCCTGGATTCCGA
	<i>HSFA2c</i> -pJG4-5-F	CCGGAATTCATGAATCTTCCGCATCATCCG
	<i>HSFA2c</i> -pJG4-5-R	CCGCTCGAGTCAGCATCTGCCCCCTCC
	<i>pLacZi</i> -F	TGCAGGTTTTTGTTCGTGCA
	<i>pLacZi</i> -R	GGACCTAATGTATAAGGAAAG
	<i>pJG4</i> -5-F	GATACCAGCCTCTTGCTGAGTG
	<i>pJG4</i> -5-R	TGTCAACAACGTATCTACCAACG
	<i>prHSP70</i> -0800-F	CGGGGTACCGTCGCGTGTCTAAGGATGAGG
	<i>prHSP70</i> -0800-R	CGCGGATCCTGCTGAGAGAGATAATGAGAGAGA
	<i>HSFA1</i> -SK-F	CGCGGATCCATGAGTAGCCACCAGTTTC
	<i>HSFA1</i> -SK-R	CCGGAATTCTCACCTCCTGGATTCCGA
	<i>HSFA2c</i> -SK-F	CCGGAATTCATGAATCTTCCGCATCATCCG
	<i>HSFA2c</i> -SK-R	CCGCTCGAGTCAGCATCTGCCCCCTCC

注: 划线部分为酶切位点.

1.7 *prAaHSP70* 转化拟南芥

根据农杆菌 GV3101 介导的花粉管侵染法^[28]将启动子用重组质粒 *prAaHSP70*-GUS 转化野生型拟南芥. 将 T1 代拟南芥种子消毒后播种在 MS 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)中, 初步筛选出绿色抗性苗, 并移入土中培养. 提取 T1 代抗性幼苗的 DNA^[29], 用引物(表 1)鉴定阳性转基因植株, 用相同方法筛选至获得 T3 代纯合子转基因植株.

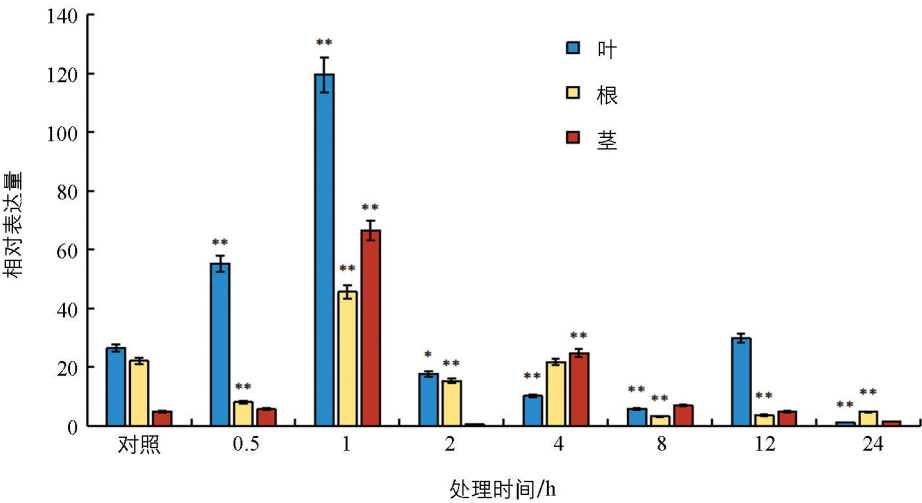
1.8 GUS 组织化学染色

将获得的 T3 代转基因拟南芥植株幼苗在 39 ℃ 高温下处理 2 h，根据华越洋 GUS 染色试剂盒进行组织染色，用 70%乙醇浸泡至完全脱色后在体式显微镜下观察拍照。以野生型拟南芥为阴性对照，转 pBI121 空载的拟南芥为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 AaHSP70 的不同组织表达热处理后模式分析

荧光定量结果表明(图 1)，白魔芋 *AaHSP70* 基因对热胁迫较敏感。在热处理 1 h 时，叶、根、茎中的表达量都达到峰值，且在叶片中的表达量最高，说明在 1 h 时其表达丰度最高。经过 8 h 热处理后，*AaHSP70* 基因的表达量相对较低。与对照相比，不同热处理时间都可以不同程度地调控 *AaHSP70* 基因的表达。此外，将 3 个组织的表达量进行比较，发现叶片中的相对表达量最高。

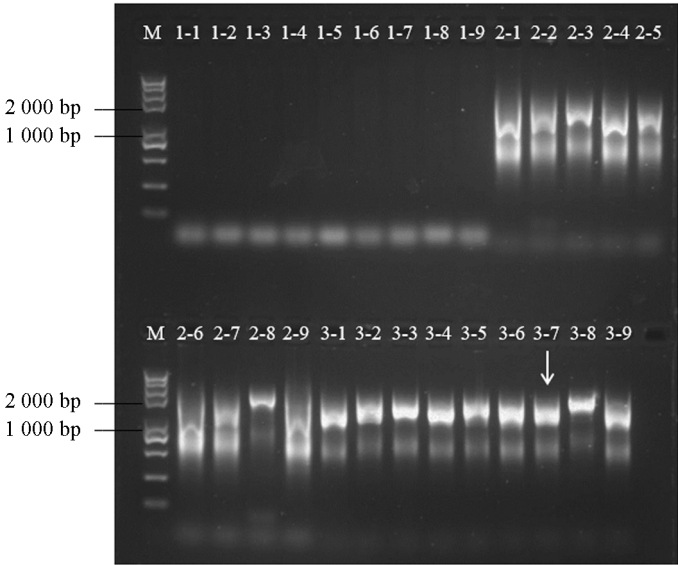


* 表示 $p < 0.05$ ，* * 表示 $p < 0.01$ ，差异有统计学意义。

图 1 热处理后 *AaHSP70* 在不同组织中的相对表达量

2.2 AaHSP70 启动子的克隆和序列分析

以白魔芋 gDNA 为模板，利用 FPN1-PCR 法 3 轮扩增后，在 1 000 bp 左右出现特异性条带(图 2)。通过胶回收，连接转化并测序得到 1 062 bp 的 *AaHSP70* 启动子区域。利用 Plant Care 在线分析 *AaHSP70* 启动子的顺式作用元件，结果发现该启动子含有多个 TATA-box 和 CAAT-box 启动子的基本核心元件，此外，含有热胁迫响应元件(Heat Shock Response Element, HSE)，脱落酸、茉莉酸调控应答元件，多种光应答元件等(图 3 和表 2)。



M 为 Trans2K Plus II DNA Marker(TransGen)，1-1~1-9 为第 1 轮 PCR 产物，2-1~2-9 为第 2 轮 PCR 产物，3-1~3-9 为第 3 轮 PCR 产物；箭头代表目标条带。

图 2 FPN1-PCR 法克隆 *AaHSP70* 启动子电泳图

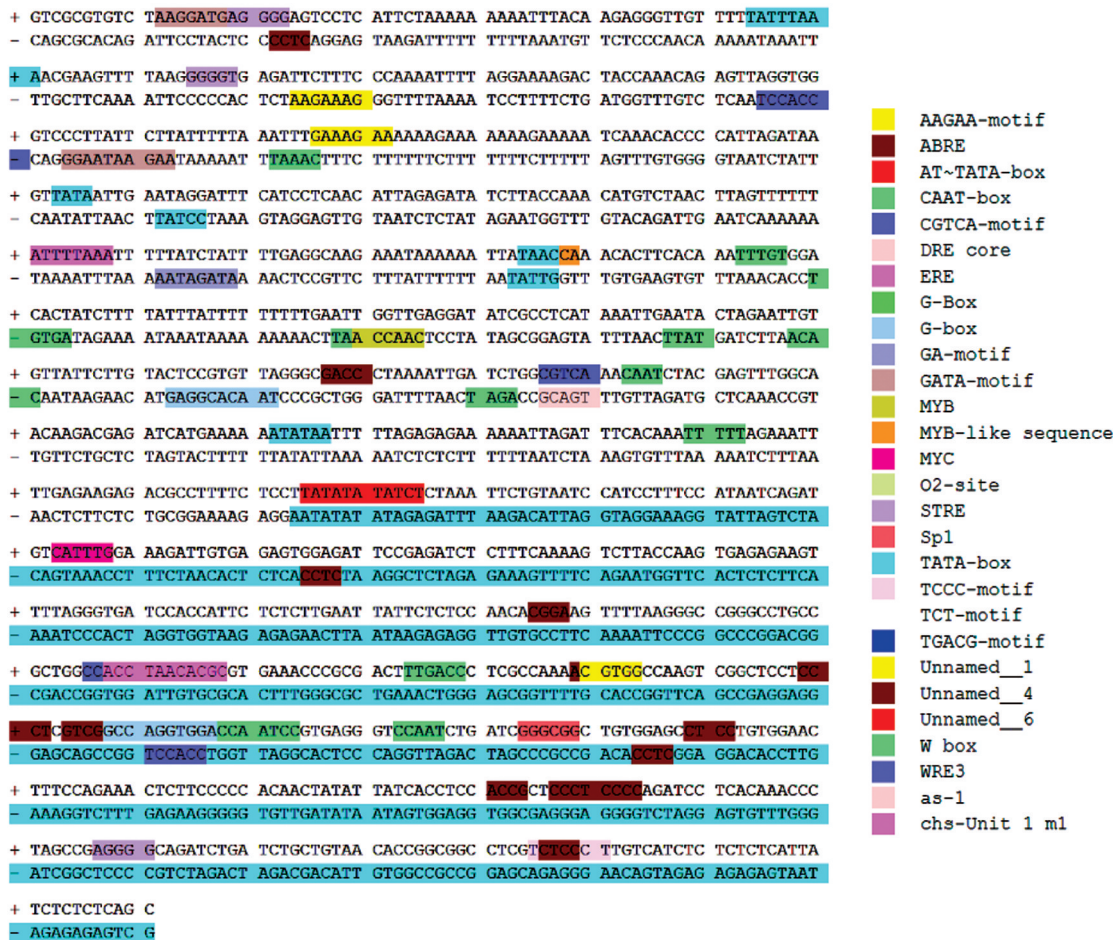


图 3 *AaHSP70* 启动子的顺式作用元件

表 2 *AaHSP70* 启动子序列重要顺式作用元件分析

顺式作用元件	特征序列	数量	生物学功能
HSE	GAAAnnTTC	1	参与热应激反应的顺式作用元件
ABRE	ACGTG	1	参与 ABA 的元件
CAAT-box	CAAAT	7	启动子和增强子区域常见顺式作用元件
CGTCA-motif	CGTCA	1	参与茉莉酸甲酯响应的顺式调节元件
G-box	CACGTT	1	光反应中的顺式调节元件
CGTA-motif	AAGGATAAGG	1	光响应元件的一部分
SP1	GGGCGG	1	光响应元件的一部分
TATA-box	TATA	6	转录起始元件
TGACG-motif	TGACG	1	参与茉莉酸甲酯响应的顺式调节元件
O2-site	GATGACATGG	1	参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式调控元件

2.3 *AaHSFA1*, *AaHSFA2c* 与 *AaHSP70* 启动子有相互作用

为分析 *AaHSP70* 的作用模式, 利用酵母单杂交和双荧光素酶系统检测 *AaHSFA1*, *AaHSFA2c* 与 *AaHSP70* 启动子的互作. 酵母单杂交结果表明, *AaHSFA1*, *AaHSFA2c* 与 *AaHSP70* 启动子 HSE 元件有互作, 但与对照 mHSE 无互作(图 4). 双荧光素酶试验结果进一步表明, *AaHSFA1*, *AaHSFA2c* 与

AaHSP70 启动子有相互作用(图 5).

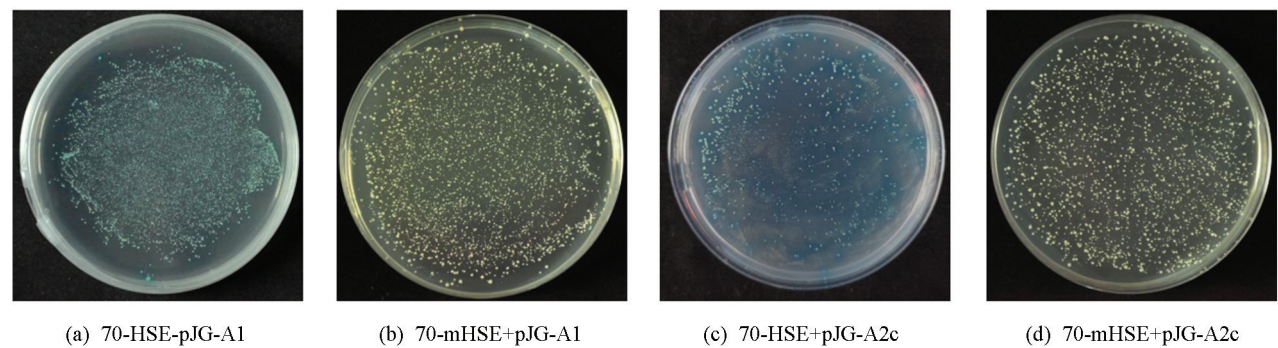


图 4 酵母单杂交检测 AaHSFA1, AaHSFA2c 与 *AaHSP70* 启动子的相互作用

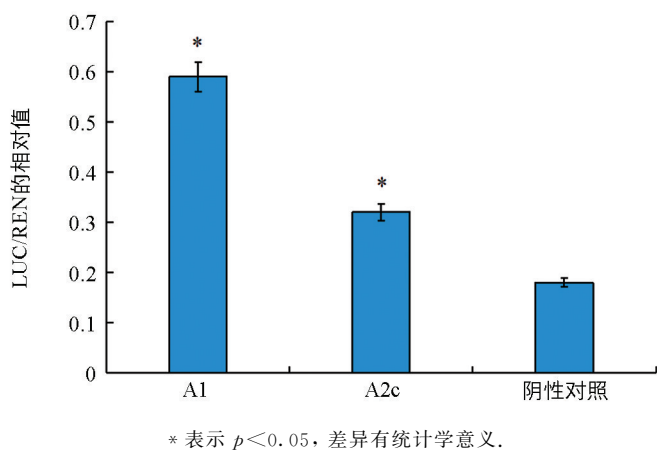
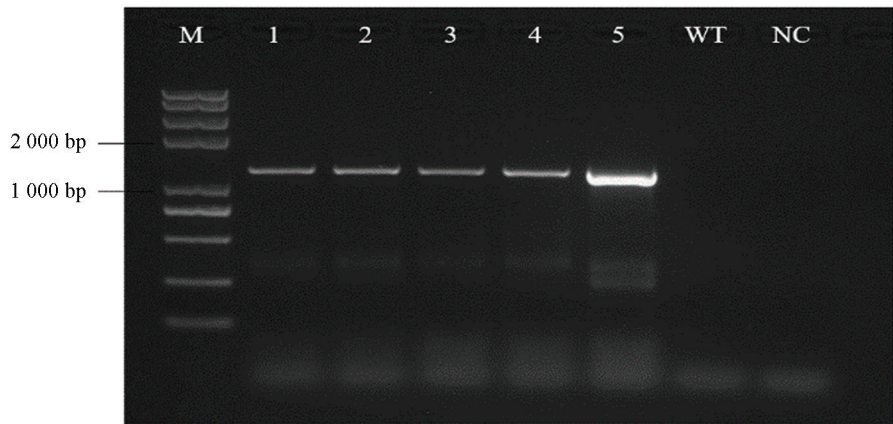


图 5 双荧光素酶检测 AaHSFA1, AaHSFA2c 与 *AaHSP70* 启动子的相互作用

2.4 *prAaHSP70*-GUS 拟南芥的获得及组织化学染色分析

提取 T3 代纯合转基因拟南芥叶片 DNA, 以引物 *prHSP70*-F, *prHSP70*-R 进行 PCR 检测, 成功获得了转 *prAaHSP70*-GUS 拟南芥纯合材料 5 株(图 6). 检测转 *prAaHSP70*-GUS T3 代拟南芥阳性植株 *GUS* 基因的表达情况(图 7), 结果显示, 转入空载 pBI121 的拟南芥阳性幼苗整个植株都呈蓝色, 野生型拟南芥植株无蓝色斑点, 未经处理的转 *prAaHSP70*-GUS 拟南芥阳性植株在根上出现少量蓝色斑点, 经过高温处理后整株都呈现蓝色, 说明 *prAaHSP70* 属于高温诱导型启动子.



M 为 Trans2K Plus II DNA marker(TransGen), 1~5 为转基因株系, WT 为野生型拟南芥, NC 为阴性对照(不加模板).

图 6 转基因拟南芥植株 PCR 检测图

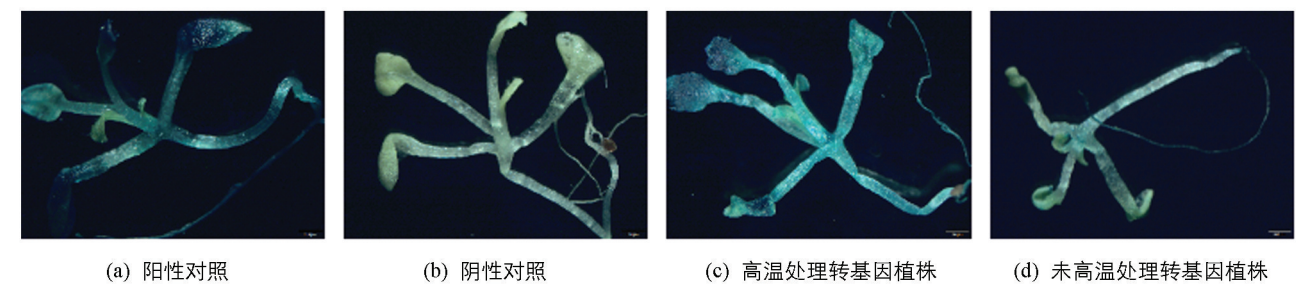


图 7 *prAaHSP70*-GUS 转基因拟南芥幼苗 GUS 活性分析

3 讨论

本研究是在实验室前期研究的基础上, 从白魔芋中克隆得到了 *AaHSP70* 基因 CDS 和启动子序列, 对其启动子序列特征进行了分析, 在拟南芥中对 *AaHSP70* 进行了初步的功能验证, 并对 *AaHSP70* 在白魔芋中的时空表达以及其启动子的转录活性进行了初步探索.

植物 HSPs 在不同组织中具有不同的表达模式, Guo 等^[30] 研究发现辣椒 *CaHSP70-1* 基因 40 ℃ 处理 2 h 后, 在叶和花中的相对表达量最高. 玉米在 42 ℃ 处理 2 h 后, *ZmHSP70* 基因的表达量达到最大值^[31]. 高温条件下, 中国南瓜成熟叶片中的 3 个 *CmHSP70* 基因均能够在短时间内(0~2 h)大量表达^[32]. 高温胁迫能够诱导叶用莴苣 *LsHSP70* 基因的表达^[33]. 本研究中, 白魔芋 *AaHSP70* 在 41 ℃ 高温处理 1 h 后叶、根、茎中的相对表达量都迅速达到最大值, 但在叶片中的表达量显著高于根和茎, 说明 *AaHSP70* 表达具有组织特异性.

目前报道的启动子主要分为 3 大类: 组成型、组织特异型和诱导型启动子^[34-35]. 已有研究表明, *HS-FA1*, *HSFA2* 可以调控 HSP 蛋白的表达^[36-37]. 在本试验中, 我们通过酵母单杂交和双荧光素酶试验发现, *AaHSFA1* 和 *AaHSFA2c* 蛋白可以与 *AaHSP70* 启动子发生相互作用, 表明 *AaHSFA1* 和 *AaHSFA2c* 参与调控 *AaHSP70*, 但具体调控通路有待进一步验证. 转基因拟南芥经过 GUS 化学染色后, 组织表达模式分析结果显示, 热处理前 *prAaHSP70*-GUS 在根部表达, 而热处理后整株拟南芥均表达, 说明 *AaHSP70* 启动子是一个能响应高温胁迫的诱导型启动子. 热处理后, *AaHSP70* 启动子活性明显增强, 对比定量结果(图 1), 可以看出白魔芋 *HSP70* 表达模式与其启动子活性分析结果一致.

前人研究发现水稻 *OsHSP70* 家族基因启动子中富集了 HSE, ABRE, DRE 等顺式元件, 这些元件与胁迫、激素调控有关^[38]. 将豌豆 *PsHSP70* 基因启动子与 GUS 报告子融合的嵌合基因导入烟草中, 该嵌合基因在成熟植物的茎和根的韧皮部特异性表达以应对热激^[39]. 启动子分析表明, 酸枣 *ZjHSP70* 和 *ZjHSP100* 启动子中均具有与非生物胁迫相关的多种功能^[40]. 魔芋 *AaHSP70* 启动子中含有多个启动子基本的核心元件 CAAT-box 和 TATA-box, 在该序列中, 还包含特定的调控元件, 如与热胁迫相关的 HSE 元件, 与光反应相关的 G-box, CGTA-motif, SP1 元件, 与激素相关的 ABRE, TGACG-motif, CGTCA-motif 元件等. 本研究推测 *AaHSP70* 基因及其启动子可能参与了植株抵御外界胁迫, 至于其如何调控热胁迫有待进一步研究.

参考文献:

[1] RITOSSA F. A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila* [J]. *Experientia*, 1962, 18(12): 571-573.

[2] SWINDELL W R, HUEBNER M, WEBER A P. Transcriptional Profiling of *Arabidopsis* Heat Shock Proteins and Transcription Factors Reveals Extensive Overlap between Heat and Non-Heat Stress Response Pathways [J]. *BMC Genomics*, 2007(8): 125-139.

- [3] 张楠, 王映红, 王志敏, 等. 植物热激转录因子家族的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1155-1167.
- [4] CHO E K, CHOI Y J. A Nuclear-Localized *HSP70* Confers Thermoprotective Activity and Drought-Stress Tolerance on Plants [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(4): 597-606.
- [5] 祁茂冬, 谢鑫, 魏凤菊. 禾本科植物 *HSP70* 研究进展 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(8): 1054-1062.
- [6] DRAGOVIC Z, BROADLEY S A, SHOMURA Y, et al. Molecular Chaperones of the *HSP110* Family Act as Nucleotide Exchange Factors of *HSP70s* [J]. The EMBO Journal, 2006, 25(11): 2519-2528.
- [7] KANG P J, OSTERMANN J, SHILLING J, et al. Requirement for *HSP70* in the Mitochondrial Matrix for Translocation and Folding of Precursor Proteins [J]. Nature, 1990, 348(6297): 137-143.
- [8] BOSTON R S, VIITANEN P V, VIERLING E. Molecular Chaperones and Protein Folding in Plants [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 32(1/2): 191-222.
- [9] MONTERO-BARRIENTOS M, HERMOSA R, CARDOZA R E, et al. Transgenic Expression of the *Trichoderma harzianum* *HSP70* Gene Increases *Arabidopsis* Resistance to Heat and other Abiotic Stresses [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(8): 659-665.
- [10] SONG A, ZHU X, CHEN F, et al. A Chrysanthemum Heat Shock Protein Confers Tolerance to Abiotic Stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(3): 5063-5078.
- [11] BATCHO A A, SARWAR M B, RASHID B, et al. Heat Shock Protein Gene Identified from *Agave sisalana* (*AsHSP70*) Confers Heat Stress Tolerance in Transgenic Cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 2021, 33(2): 141-156.
- [12] 万丽丽, 王转革, 辛强, 等. *BnA7HSP70* 分子伴侣结合蛋白超表达能够提高甘蓝型油菜耐旱性 [J]. 作物学报, 2018, 44(4): 483-492.
- [13] 苏江洪. 芍药 *HSP70* 基因克隆及其功能研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [14] 许声涛, 孙文香, 田进平, 等. 植物热激蛋白 *HSP100/ClpB* 及其在提高植物抗热性和抗寒性中的应用 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(4): 804-810.
- [15] NISHIZAWA A, YABUTA Y, YOSHIDA E, et al. *Arabidopsis* Heat Shock Transcription Factor A2 as a Key Regulator in Response to Several Types of Environmental Stress [J]. The Plant Journal, 2006, 48(4): 535-547.
- [16] SCHARF K D, BERBERICH T, EBERSBERGER I, et al. The Plant Heat Stress Transcription Factor (Hsf) Family: Structure, Function and Evolution [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819(2): 104-119.
- [17] 胡艳平, 周扬, 云天海, 等. 南瓜 *HSP70* 蛋白家族的鉴定和生物信息学分析 [J]. 北方园艺, 2019(17): 7-13.
- [18] ZHANG Y, ZOU B, LU S, et al. Expression and Promoter Analysis of the *OsHSP16.9C* Gene in Rice [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 479(2): 260-265.
- [19] 刘佩瑛. 魔芋学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [20] 石新龙, 王启军, 牛义, 等. 低温诱导对白魔芋产生多叶的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(6): 35-39.
- [21] 李莎莎, 刘海利, 牛义, 等. 白魔芋开花过程内源激素动态变化 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(7): 31-37.
- [22] 邓慧君, 刘海利, 牛义, 等. 层积处理对打破白魔芋实生种子休眠的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(7): 38-43.
- [23] 代雪凤, 朱丽, 张盛林, 等. 魔芋软腐病拮抗放线菌筛选 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(11): 9-17.
- [24] 白立伟. 魔芋耐热性鉴定及热激蛋白 *HSP* 基因的克隆与初步分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [25] WANG Z, YE S, LI J, et al. Fusion Primer and Nested Integrated PCR (FPNI-PCR): a New High-Efficiency Strategy for Rapid Chromosome Walking or Flanking Sequence Cloning [J]. BMC Biotechnology, 2011(11): 109.
- [26] WANG K, NIU Y, WANG Q, et al. Cloning and Evaluation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in *Amorphophallus* [J]. PeerJ, 2017(5): e3260.
- [27] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and

the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[28] CLOUGH S J, BENT A F. Floral Dip: a Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of Arabidopsis Thaliana [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.

[29] 张小明, 勾雪娇, 梁鹏, 等. 一种适用于批量筛选和鉴定拟南芥突变体的快速 DNA 提取方法 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2015, 37(6): 909-915.

[30] GUO M, ZHAI Y F, LU J P, et al. Characterization of *CaHsp70-1*, a Pepper Heat-Shock Protein Gene in Response to Heat Stress and some Regulation Exogenous Substances in *Capsicum annuum* L [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(11): 19741-19759.

[31] 李慧聪, 郭秀林, 王冬梅, 等. 玉米热激蛋白 70 基因对温度胁迫的响应 [J]. *河北农业大学学报*, 2010, 33(6): 12-15, 25.

[32] 陈敏氨, 王彬, 朱海生, 等. 中国南瓜 *CmHSP70* 基因的克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2019, 39(6): 1016-1023.

[33] 李婷, 韩莹琰, 郝敬虹, 等. 叶用莴苣 *LsHsp70* 基因的克隆及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2013, 40(6): 1081-1089.

[34] LI Y, LEE K K, WALSH S, et al. Establishing Glucose- and ABA-Regulated Transcription Networks in Arabidopsis by Microarray Analysis and Promoter Classification Using a Relevance Vector Machine [J]. *Genome Research*, 2006, 16(3): 414-427.

[35] CARNINCI P, SANDELIN A, LENHARD B, et al. Genome-Wide Analysis of Mammalian Promoter Architecture and Evolution [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(6): 626-635.

[36] 张蓓. 白魔芋热激调控因子 *HSF* 家族基因互作关系研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.

[37] ZHU B G, YE C J, LÜ H Y, et al. Identification and Characterization of a Novel Heat Shock Transcription Factor Gene, *GmHsfA1*, in Soybeans (*Glycine max*) [J]. *Journal of Plant Research*, 2006, 119(3): 247-256.

[38] SARKAR N K, KUNDNANI P, GROVER A. Functional Analysis of *HSP70* Superfamily Proteins of Rice (*Oryza sativa*) [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2013, 18(4): 427-437.

[39] DHANKHER O P, GATEHOUSE J A. Tissue-Specific and Developmental Regulation of a Stress-Induced *Pisum Sativum* *HSP70* Promoter in Transgenic Tobacco Plants [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2004, 10(1): 49-58.

[40] PANZADE K P, KALE SS, CHAVAN N R, et al. Genome-Wide Analysis of *HSP70* and *HSP100* Gene Families in *Ziziphus Jujuba* [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2021, 26(2): 341-353.

责任编辑 周仁惠