

曹 兴, 郭尚敬, 高祥斌, 等. 百合转录辅激活因子 *LIMBF1c* 基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 1120-1127.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.022

百合转录辅激活因子 *LIMBF1c* 基因的克隆与表达分析

曹 兴¹, 郭尚敬¹, 高祥斌¹, 吕福堂¹, 隋娟娟², 穆红梅¹, 吴 泽³, 义鸣放³,
张秀省¹

(1.聊城大学农学院, 山东 聊城 252059; 2.阜阳师范学院生物与食品工程学院, 安徽 阜阳 236037; 3.中国农业大学园艺学院, 花卉发育与品质调控北京市重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为了深入研究百合响应高温胁迫的分子机制, 本研究以麝香百合杂种系品种白天堂为试验材料, 从中分离得到 1 个 *MBF1c* 基因, 其开放阅读框为 438 bp, 编码 145 个氨基酸, 蛋白质分子量为 15 900, 理论等电点为 10.22。多序列同源比对和进化树分析表明百合 *MBF1c* 具有典型的 MBF1 和 HTH 结构域, 归属 c 亚型 MBF1, 因此将克隆到的基因命名为 *LIMBF1c*。亚细胞定位结果表明, *LIMBF1c* 可能介导了热激信号由细胞质向细胞核的转导。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *LIMBF1c* 在叶中的表达量最高, 根中次之, 鳞茎中最低; *LIMBF1c* 的表达受热激诱导。表明, *LIMBF1c* 基因可能与百合的热激反应密切相关。

关键词: 百合; MBF1; 基因克隆; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)05-1120-08

Cloning and expression analysis of *LIMBF1c* in lily

CAO Xing¹, GUO Shang-jing¹, GAO Xiang-bin¹, LYU Fu-tang¹, SUI Juan-juan², MU Hong-mei¹,
WU Ze³, YI Ming-fang³, ZHANG Xiu-sheng¹

(1. College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. College of Biology and Food Engineering, Fuyang Normal College, Fuyang 236037, China; 3. Beijing Key Laboratory of Development and Quality Control of Ornamental Crops, College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To explore the molecular mechanism of lily in response to heat stress, the *MBF1c* homologous gene was isolated from lily cultivar White Heaven. The open reading frame of *LIMBF1c* gene was 438 bp, a protein of 145 amino acid residues was encoded, and the molecular weight of *LIMBF1c* protein was 15 900 with a theoretical isoelectric point of 10.22. Sequence alignment and phylogenetic relationship analysis results showed that *LIMBF1c* belonged to c subtype MBF1, containing a typical MBF1 domain and a HTH domain. Subcellular localization assay results indicated that *LIMBF1c* could mediate the transduction of heat stress signal from cytoplasm to nucleus. The qRT-PCR results showed that the relatively highest expression level of *LIMBF1c* was detected in leaf and *LIMBF1c* transcripts were induced by heat shock. In conclusion, *LIMBF1c* might be closely related to heat stress response in lily.

Key words: lily; MBF1; gene cloning; subcellular localization; expression analysis

收稿日期: 2018-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601788); 山东省自然科学基金项目(ZR2016CB36); 聊城大学博士科研启动基金项目(318051312)

作者简介: 曹 兴(1984-), 男, 山东滕州人, 博士, 讲师, 主要从事园艺作物抗逆生理研究。(E-mail) caoxinglina@163.com

通讯作者: 张秀省, (E-mail) zhangxiusheng@lcu.edu.cn

百合(*Lilium* spp.)为百合科百合属球根花卉, 具有重要的观赏、食用和药用价值^[1-2]。百合性喜冷凉、湿润气候, 耐热性较差, 然而中国大部分地区夏季炎热, 高温造成百合生长停滞、植株矮小、少花盲花、茎秆软、病虫害严重等现象, 严重影响切花的产量和质量, 并造成种球退化, 制约着中国百合商品化周年生

产^[3]。所以,提高百合耐热性是解决这一问题的关键。在百合野生种中,麝香百合(*Lilium longiflorum* Thunb)和台湾百合(*Lilium formosanum* Wallace)的耐热性较强,它们的杂交品种也具有较强的耐热性。因此,解析耐热百合品种的高温逆境响应机制,鉴定调控耐热性的关键基因,对于采用基因工程技术来提高百合的耐热性具有重要的理论和实践意义。

目前的研究结果^[4]表明,植物响应高温胁迫的调控途径主要有:热激转录因子-热激蛋白(HSF-HSP)途径、钙离子-钙调蛋白(Ca^{2+} -CaM)途径、活性氧(ROS)途径、激素调控途径、细胞未折叠蛋白响应(UPR)途径和核小体介导途径。细胞内的这些调控途径相互交叉组成了植物的热激信号转导网络。近年来,植物多蛋白桥梁因子(Multiprotein bridging factor 1c, MBF1c)被鉴定为调控植物耐热性的重要转录调节因子。MBF1c 又称转录辅激活因子(Transcriptional Co-activator),可以连接通用转录因子 TBP(TATA-box Binding Protein)和基因特异性转录因子,从而增强特异性转录因子的 DNA 结合活性,最终促进靶基因的表达。研究发现,MBF1c 涉及通过激素、HSF-HSP、ROS 和 Ca^{2+} 信号途径调控植物的耐热性^[5-7],是植物热激信号转导网络的关键节点。

本研究以耐热性较好的麝香百合杂种系品种白天堂(*L. longiflorum* cv. White Heaven)为试验材料,从中克隆了 *MBF1c* 基因,分析百合 MBF1c 蛋白特性及 *MBF1c* 基因在热胁迫下的表达模式,以期为进一步研究 *MBF1c* 基因在百合耐热性调节方面的功能及作用机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为麝香百合杂种系品种白天堂组培苗,培养条件为 22 ℃,光照时间为 16 h/d。亚细胞定位使用的材料为紫皮洋葱(*Allium cepa*)。

RNA 提取试剂盒、大肠杆菌感受态 DH5 α 购自北京天根生化科技有限公司,DNA 片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,5'-Full RACE kit、pMD18-T 载体、M-MLV 逆转录试剂盒、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4 连接酶、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司,荧光定量试剂盒 SYBR FAST qPCR Universal Kit 购自 KAPA 公司,氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)购自 Sigma 公司,其他常规

试剂均为进口或国产分析纯。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(试验所用引物见表1);DNA 测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 *MBF1c* 全长 cDNA 克隆 用 37 ℃ 热激处理百合组培苗 2 h,然后取 0.1 g 叶片用液氮研磨提取 RNA。RNA 的提取根据多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书进行。用 NanoDrop 2000 Spectrophotometer(Thermo, USA)检测吸光值(A_{260}/A_{230} 和 A_{260}/A_{280})判断 RNA 的质量,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。cDNA 的合成根据 TaKaRa 公司的 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H)说明书进行,反转录接头引物为 AP。

基因保守片段的克隆:根据 GenBank 数据库中报道的其他植物 *MBF1c* mRNA 序列,通过 DNAMAN 5 软件进行同源比对,设计保守区兼并引物。以反转录的 cDNA 为模板,利用巢式 PCR 扩增中间保守片段,第一轮引物为 DPF1(上游)和 DPR1(下游),反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,33 个循环;72 ℃ 10 min。取 1 μl 产物作第二轮反应的模板,第二轮引物为 DPF2(上游)和 DPR2(下游),反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,33 个循环;72 ℃ 10 min。

基因 3'端序列的克隆:通过 RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)的方法获得目的基因的 3'端序列。以 cDNA 为模板,根据已经克隆的目的基因保守片段设计 2 条上游特异引物,分别与下游的 3'接头引物进行 PCR 扩增。第一轮引物为 SPF1 和 AP1,反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,33 个循环;72 ℃ 10 min。第二轮引物为 SPF2 和 AP2,反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,33 个循环;72 ℃ 10 min。

基因 5'端序列的克隆:按照 TaKaRa 公司 5'-Full RACE kit 说明书进行,用 Random 9 mers 引物进行反转录。根据已经获得的目的基因片段设计 2 条下游特异引物 SPR1 和 SPR2,与试剂盒自带的 2 条 5'端接头引物进行巢式 PCR 扩增。第一轮 PCR 扩增引物为 5'RACE Outer primer 和特异引物 SPR1,反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,25 个循环;72 ℃ 10 min。取第一轮产物 1 μl 进行第二轮反应,引物为 5' RACE Inner primer,特异引物为 SPR2,反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,62 ℃ 30

s, 72 °C 40 s, 33 个循环; 72 °C 10 min。

开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列的校正: 将已经获得的目的基因 5' 片段、中间片段和 3' 片段用 DNAMAN 5 拼接, 并在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上预测其 ORF, 在起始密码子上游设计特异引物 SPF3 (上游), 在终止密码子下游设计特异引物 SPR3 (下游), 用保真性较高的 TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 扩增目的基因的 ORF 序列。反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 33 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收, 连接到 pMD18-T 载体并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, Amp 抗性培养基过夜培养后, 挑取单克隆进行菌落 PCR 检测, 将含有目的基因片段的阳性克隆送北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.2.2 LIMBF1c 的生物信息学分析 用 Primer Premier 5 软件将目的基因的 ORF 序列翻译成氨基酸序列; 用 EXPASY (<https://www.expasy.org/tools/>) 中的 ProtParam、SMART、SignalP、TMHMM、PSORT 等工具对氨基酸序列进行生物信息学分析; 用 NCBI 的 BLAST 功能和 DNAMAN 5 对 LIMBF1c 进行多重比对分析; 用 MEGA 5 软件构建系统进化树。

1.2.3 LIMBF1c 的亚细胞定位 利用 DNAMAN 5 分析 LIMBF1c 的 ORF 序列的酶切位点, 结合 pCAMBIA1300 载体, 选用 Sal I 和 Spe I 作为融合表达载体构建的酶切位点, 并设计上游特异引物 SPF4 和下游特异引物 SPR4 进行 PCR 扩增。双酶切 pCAMBIA1300 空载质粒和 PCR 扩增产物, 纯化酶切产物并用 T4 连接酶连接, 获得 pCAMBIA1300-LIMBF1c-GFP 重组表达载体, 双酶切和测序验证连接是否成功。用基因枪轰击法^[8]将构建好的 pCAMBIA1300-LIMBF1c-GFP 重组表达载体轰击到在 MS 培养基上预培养 24 h 的洋葱表皮细胞中, 分别置于 22 °C 和 37 °C 暗培养 24 h, 空载 pCAMBIA1300-GFP 作为对照。用激光共聚焦显微镜 (Nikon Eclipse TE2000-E) 观察和拍照, 并用 EZ-C1 软件分析和处理照片。

1.2.4 LIMBF1c 的表达分析 选择生长良好、长势一致的白天堂组培苗作为基因表达分析的材料。

LIMBF1c 在不同组织中的表达: 分别取常温 (22 °C) 培养的百合组培苗的根、鳞茎和叶片。LIMBF1c 在不同热激时间下的表达: 用 37 °C 热激百合的组培苗, 分别在处理 0.5 h、1.0 h、2.0 h、4.0 h 和 8.0 h

时取叶片, 以常温 (22 °C) 为对照。LIMBF1c 受 Ca²⁺ 处理的表达: 分别在 22 °C、37 °C 条件下, 用 20 ml 20 mmol/L CaCl₂、10 mmol/L EGTA 溶液浸没百合组培苗根系 2.0 h 后取叶片, 用去离子水处理作为对照。

所取组织用液氮速冻并保存于 -80 °C 的超低温冰箱中备用提取 RNA, RNA 的提取与反转录方法同方法 1.2.1。采用荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 的方法检测基因的表达, LIMBF1c 的扩增引物为 qF1 和 qR1, 内参基因 18S rRNA 的扩增引物为 18S qF 和 18S qR。试验参照 SYBR FAST qPCR Universal Kit 荧光定量试剂盒说明书进行, 仪器为 Applied Biosystems Step One system PCR 仪。反应程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 3 s, 55 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。每个样品重复 3 次。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法^[9] 分析基因的相对表达量, 用 Excel 2003 和 SPSS 18 软件分析数据。

表 1 逆转录和 PCR 扩增引物

Table 1 Primers applied in the reverse transcription and PCR amplification

引物	序列 (5'→3')
AP	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGT ₍₁₈₎
DPF1	CARGACTGGGARCCRGTTGGT
DPR1	CNAGVRCYSYKCTCCATCTTGGC
DPF2	GAAGCTNGANGAAGNRACDAGGCC
DPR2	TCCATCTTVGCVAGCACVGCCTG
SPF1	GAGACTGTCAATCCAGAAGGCCAGG
AP1	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
SPF2	CTGATTAACGACGGGTGCAGGTC
AP2	CGCTACGTAACGGCATGACAGTC
5'RACE outer primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
SPR1	TCATCCAGCTTCCGGCGATACAC
5'RACE inner primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
SPR2	CTCGCAGCGCCTGGTTACCC
SPF3	GTTGACTTCTCTGGTAATCATC
SPR3	ATTTCATCAACTCCTGCCTATTCC
SPF4	TATGTCGACATGCCGAGCCGATCAGCAG
SPR4	AAGACTAGTCTTAATCTTACCCTGAGC
qF1	GCTGATTAACGACGGGTGTC
qR1	CAACTCCTGCCTATTCCAAAG
18SqF	AGTTGGTGGAGCGATTGTCT
18SqR	CCTGTTATTGCCTCAAACCTTC

表中下划线表示酶切位点。

2 结果与分析

2.1 百合 *LIMBF1c* 的 cDNA 全长克隆

通过同源克隆的方法获得目的基因的中间保守片段序列,通过 RACE 的方法获得目的基因的 3'端

和 5'端序列,利用 DNAMAN 5 拼接得到全长为 620 bp 的序列,其中 ORF 区序列长为 438 bp,编码 145 个氨基酸(图 1)。BLAST 的结果显示,该基因与其他物种的 *MBF1c* 基因有较高的同源性,将其命名为 *LIMBF1c*。

```

1  ATGCCGAGCCGATCAGCAGGCCCGATCACACAGGACTGGGATCCTGTGGTGGTAAGTCGCCGG
1  M P S R S A G P I T Q D W D P V V V S R R
64  AAGCCGAAGGCGGCGGACTTGAAGGATCCTCGTGTGGTGAACCAGGCGCTGCGAGCCGGGGCG
22  K P K A A D L K D P R V V N Q A L R A G A
127 GTGGTGGAGACTGTGAAGAAGCATGATGCCGGGCATAACAAGAAGATCTCTGCAGCGCCTGCA
43  V V E T V K K H D A G H N K K I S A A P A
190 GTGTATGCGCGGAAGCTGGATGAGCAGACAGAGCCTGCAGCGCTTGATCGGGTTGCGGCGGAG
64  V Y A R K L D E Q T E P A A L D R V A A E
253 GTGAGACTGTCAATCCAGAAGGCCAGGTTGGCGAAAAAGATGGGGCAAGCGGAGCTGGCGAAG
85  V R L S I Q K A R L A K K M G Q A E L A K
316 CTGATTAACGAGCGGGTGCAGGTGGTACAGGAGTACGAGAACGGTAAGGCGGTGCCGAATCAG
106 L I N E R V Q V V Q E Y E N G K A V P N Q
379 GCGGTGCTTGCGAAGATGGAGCGGGTGCTGGGGGTCAAGCTCAGGGTAAGATTAAGTGA
127 A V L A K M E R V L G V K L R G K I K *
```

图 1 百合 *LIMBF1c* 基因开放阅读框及编码的氨基酸序列

Fig.1 The open reading frame of *LIMBF1c* and the predicted amino acid sequences

2.2 百合 *LIMBF1c* 蛋白的生物信息学分析

ProtParam 在线工具预测百合 *LIMBF1c* 蛋白包含 145 个氨基酸残基,分子式为 $C_{696}H_{1182}N_{216}O_{201}S_3$, 分子量为 15 900。亲水性平均系数 (*GRAVY*) 为 -0.47 (<0),属于亲水蛋白,不稳定系数为 36.12 (<40),属于稳定蛋白,半衰期在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中大于 10 h,在酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中大于 20 h。氨基酸组成成分分析结果表明, *LIMBF1c* 肽链负电荷残基(天冬氨酸 Asp + 谷氨酸 Glu) 为 16,正电荷残基(精氨酸 Arg + 赖氨酸 Lys) 为 29,理论等电点 (*PI*) 为 10.22,属于碱性蛋白。蛋白质信号肽预测程序 SignalP 预测分值为 0.11 (<0.50),表明 *LIMBF1c* 不含信号肽。蛋白跨膜区域预测软件 TMHMM 未发现 *LIMBF1c* 有明显的跨膜区域,蛋白质亚细胞定位工具 PSORT 预测 *LIMBF1c* 主要定位于细胞质、细胞核内。将 *LIMBF1c* 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、芜菁 (*Brassica rapa*)、水稻 (*Oryza sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 的 *MBF1c* 氨基酸序列进行同源比对,结果(图 2)表明, *LIMBF1c* 蛋白与其他物种的 *MBF1c* 蛋

白类似,在靠近 N 端 11~81 个氨基酸残基内含有 1 个典型的 *MBF1* 结构域,在靠近 C 端部分(88~143 aa)含有 1 个 α 螺旋-转角- α 螺旋 (Helix-Turn-Helix, HTH) 结构域。

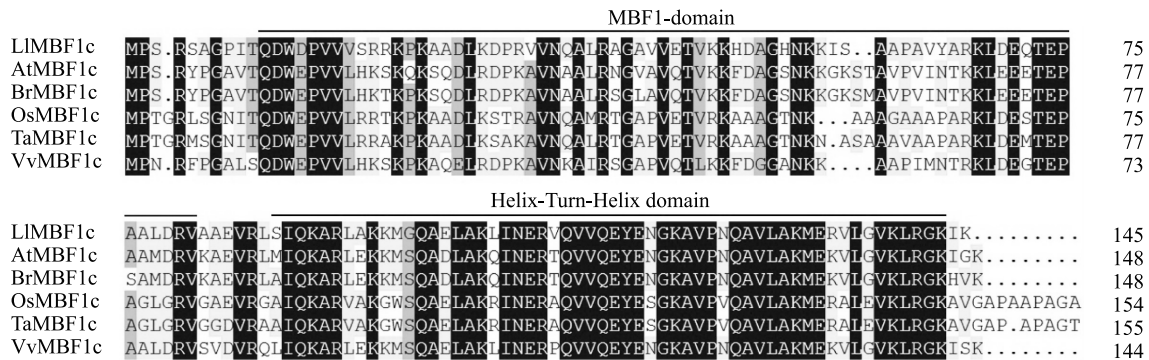
将百合 *LIMBF1c* 和其他植物的 *MBF1* 氨基酸序列,用 MEGA 5 构建系统进化树,结果(图 3)显示 *MBF1* 家族有 2 个分枝,第 I 类 *MBF1* (Group I) 包括 a 亚型 (Subtype a) 与 b 亚型 (Subtype b); c 亚型 (Subtype c) 与 a、b 亚型相似度较低,归属第 II 类 *MBF1* (Group II)。百合 *LIMBF1c* 归属于 c 亚型,与油棕 (*Elaeis guineensis*) 的亲缘关系最近, BLAST 的结果显示相似度达 79%。

2.3 百合 *LIMBF1c* 亚细胞定位

利用基因枪将构建好的重组表达载体 pCAM-BIA1300-*LIMBF1c*-GFP 轰击到经过 24 h 预培养的洋葱表皮细胞中,分别置于常温、热胁迫条件下暗培养 24 h 后放置于激光共聚焦显微镜下观察。结果(图 4)表明,常温下,空载对照 pCAMBIA1300-GFP 的绿色荧光分布在细胞膜、细胞质和细胞核中;热胁迫下,绿色荧光的分布无明显变化。常温下,

pCAMBIA1300-*LIMBF1c*-GFP 的绿色荧光分布在细胞质和细胞核中;热胁迫下, pCAMBIA1300-*LIMBF1c*-GFP 的绿色荧光则主要分布在细胞核中。

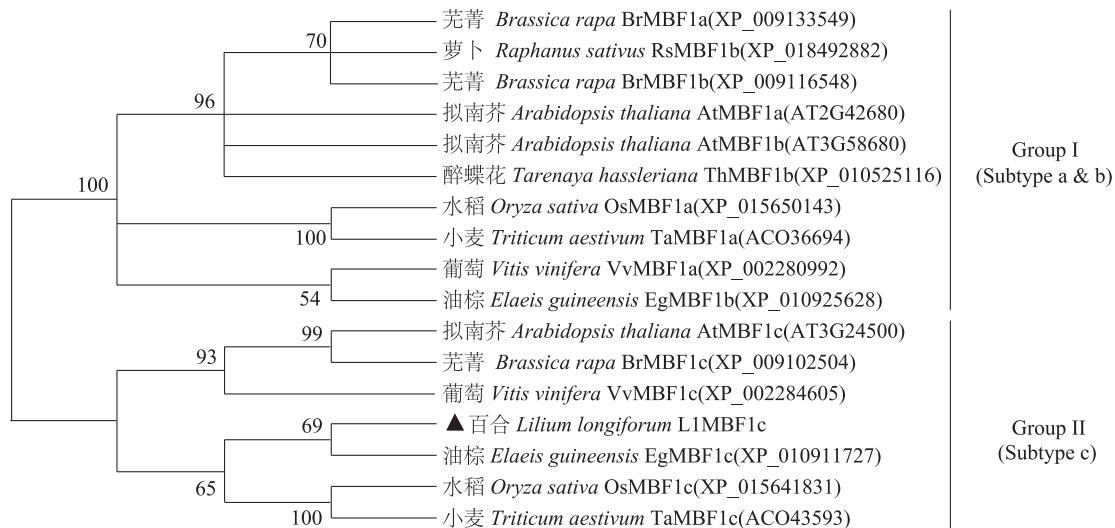
表明 *LIMBF1c* 可能介导了热激信号由细胞质向细胞核的转导,并在细胞核内进一步行使功能。



图中颜色表示同源性。

图2 百合 *MBF1c* 与其他植物 *MBF1c* 氨基酸序列同源比对

Fig.2 Alignment of the amino acid sequences of *LIMBF1c* and *MBF1c* from other plants



节点上的数值表示 bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比(%)。

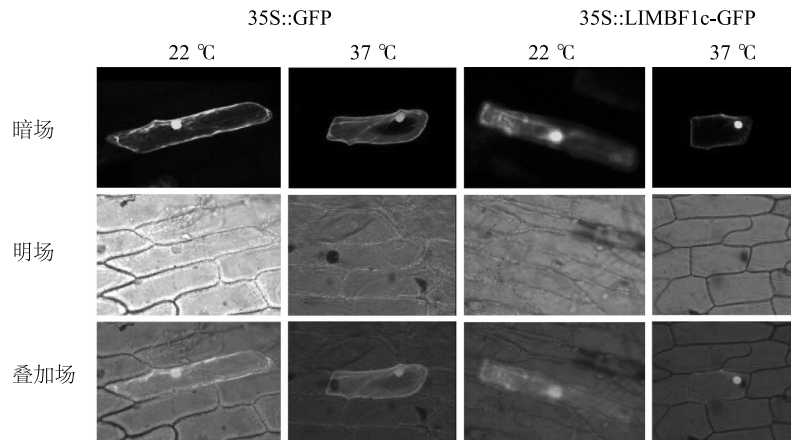
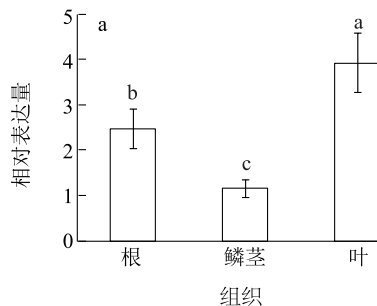
图3 百合 *MBF1c* 与其他植物 *MBF1* 家族系统进化树

Fig.3 Phylogenetic relationship of *LIMBF1c* with other plant *MBF1s*

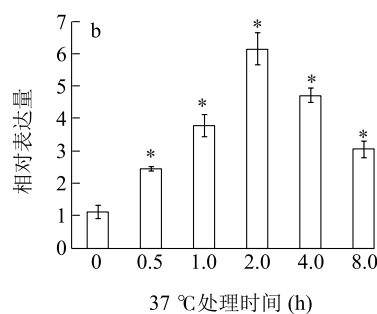
2.4 百合 *LIMBF1c* 的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 检测了 *LIMBF1c* 的时空表达。结果表明,常温条件下, *LIMBF1c* 在百合根、鳞茎和叶中均有表达,其中叶中的表达量最高,根中次之,鳞茎中最低(图 5)。热激处理后,在 0.5~8.0 h 内百合叶片中 *LIMBF1c* 的相对表达量呈现出先上升后下降的趋势,但始终高于对照,在热激处理

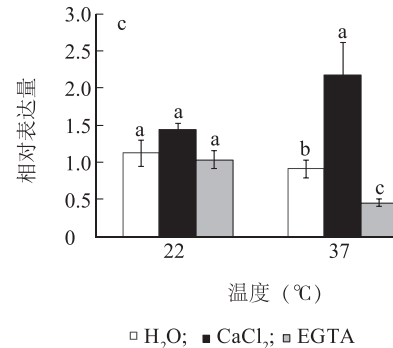
2 h 时达到峰值,为对照的 5.53 倍(图 6)。常温条件下,与对照相比, CaCl_2 或 EGTA 处理的 *LIMBF1c* 的相对表达量差异不显著($P>0.05$)。37 °C 热胁迫下, CaCl_2 处理显著促进了 *LIMBF1c* 的表达($P<0.05$),而 EGTA 处理则显著抑制了 *LIMBF1c* 的表达($P<0.05$)(图 7),表明 *LIMBF1c* 也可能通过 Ca^{2+} 信号途径参与百合的热激反应。

图4 *LIMBF1c* 在洋葱表皮中的亚细胞定位Fig.4 Subcellular localization of *LIMBF1c* in onion epidermal cells

不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图5 *LIMBF1c* 在不同组织中的表达Fig.5 Expression of *LIMBF1c* in different organizations

* 表示与对照相比差异显著。

图6 叶片 *LIMBF1c* 在 37 °C 不同热激时间下的表达Fig.6 Expression of leaf *LIMBF1c* exposed to 37 °C for different heat shock time

不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

图7 叶片 *LIMBF1c* 受 Ca²⁺ 处理的表达Fig.7 Expression of leaf *LIMBF1c* under the treatment of Ca²⁺

3 讨论

目前,有关百合的耐热研究主要集中在以下几个方面:(1)百合对高温胁迫的形态和生理响

应^[10-14]。(2)百合种质耐热性比较^[15-17]。(3)利用物理、化学方法或杂交育种途径提高百合的耐热性^[18-23]。(4)百合响应高温胁迫的分子机制。百合 *LlHSA1*、*LlHsfA2*、*LlHSP70*、*LimHSP16.45* 的表达受高温诱导,在拟南芥中过表达这些基因显著提高了植株的耐热性^[24-27]。百合钙调蛋白 *LlCaM3* 为响应 Ca²⁺ 和热胁迫的重要信号分子,Ca²⁺/*LlCaM3* 可能在 *HSA1* 的上游发挥作用^[28]。尚爱芹等^[29] 利用农杆菌介导的方法将拟南芥干旱应答元件结合蛋白 *AtDREB2A* (Dehydration responsive element binding protein 2A) 基因转化百合,高温胁迫下,转基因植株的 *POD*、*SOD* 等酶活性及脯氨酸含量高于野生型植株,耐热性明显强于野生型植株。以上的研究结果表明 ROS、SA、HSF-HSP 和 Ca²⁺ 信号途径均参与了百合

耐热性的调控。近年的研究表明,转录辅激活因子 MBF1 涉及通过激素、HSF-HSP、ROS 和 Ca^{2+} 信号途径调控植物的耐热性,是植物热激信号转导网络的关键节点,在植物耐热性的转录水平调控中发挥重要作用。根据氨基酸序列的不同,植物中的 MBF1 可分为 a、b、c 3 个亚型,a 亚型与 b 亚型相似度较高,归属第 I 类 MBF1;c 亚型与 a、b 亚型相似度较低,归属第 II 类 MBF1^[30]。与 I 类 MBF1 相比,II 类(c 亚型)MBF1 在植物耐热性的调控中起主要作用^[31-33]。因此,我们选择植物热激信号转导网络的可能整合因子 MBF1c 作为研究对象。本研究以耐热性较好的麝香百合杂种系品种白天堂为试验材料,从中克隆了 *MBF1c* 基因。同源比对及系统进化树分析的结果显示 LIMBF1c 归属 c 亚型 MBF1,具有典型的 MBF1 和 HTH 结构域。

MBF1 的结构和功能在真核生物中高度保守:C-末端形成 MBF1_{CTD} 结构域,为 TBP 的结合域,N-末端能够结合激活蛋白,通过桥接通用转录因子 TBP 和基因特异性转录因子,增强特异性转录因子的 DNA 结合活性,促进依赖于该转录因子的基因的表达。虽然 MBF1 是一种核受体辅激活因子,但在常温下,AtMBF1c 主要在细胞质中表达,热激则促进了它在细胞核中的表达^[32]。对 LIMBF1c 的生物信息学分析结果表明 LIMBF1c 没有明显的跨膜区域,预测其主要定位于细胞质、细胞核内。进一步的亚细胞定位显示热胁迫增强了 LIMBF1c 在细胞核内的相对表达,表明 LIMBF1c 可能介导了热激信号由细胞质向细胞核的转导,并在细胞核内进一步行使转录辅激活功能,这与对小麦 *TaMBF1c* 的研究结果类似^[7]。葡萄 *VvMBF1c*、大麦 *HvMBF1c*、芥蓝 *MBF1c*、拟南芥 *AtMBF1c*、小麦 *TaMBF1c* 受热激诱导表达^[33-36],小麦 *TaMBF1c* 启动子区域包含 HSE 响应元件^[7]。本研究中,37 °C 热胁迫显著促进了百合 *LIMBF1c* 的表达,*LIMBF1c* 基因启动子克隆及其响应元件分析工作正在进行中。在前期工作中,我们发现 Ca^{2+} 信号转导途径涉及调控百合的耐热性^[28],有研究表明 *MBF1c* 的表达也受 Ca^{2+} 信号系统的调控^[31,37],因此我们研究了 CaCl_2 、钙离子螯合剂 EGTA 处理对 *LIMBF1c* 表达的影响,发现 *LIMBF1c* 的表达受热胁迫与 Ca^{2+} 处理协同诱导,表明 *LIMBF1c* 也可能通过 Ca^{2+} 信号途径参与百合的高温胁迫反应。亚细胞定位与基因表达的结果表明

LIMBF1c 可能参与了百合的热激响应。

近年来的研究结果进一步揭示了 MBF1c 调控植物耐热性的机制。AtMBF1c 能够结合 CTAGA 元件,调控 *DREB2A* 和 *HSFB* 的表达来增强拟南芥的耐热性^[32,38-39],AtMBF1c 还可以与海藻糖磷酸合成酶 *AtTPS5* (Trehalose phosphate synthase 5) 或胁迫相关蛋白 AtSAP5 (Stress-associated protein 5) 互作,由此提高植株海藻糖的含量或 *HSP* 基因的表达量来增强拟南芥的耐热性^[32,6]。超表达小麦 *TaMBF1c* 水稻植株中 6 个 *HSP* 基因和 2 个 *TPS* 基因的表达量显著高于野生型,具有较好的耐热性^[7]。*LIMBF1c* 能否真正调控百合的耐热性,需要进一步分析基因的功能。

参考文献:

- [1] 蒋瑶,陈文波,蒋柱宇.亚洲百合不定芽的诱导及再生植株的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(12):35-38.
- [2] 闫海霞,蒋月喜,邓杰玲,等.3种东方百合离体培养[J]. 南方农业学报,2016,47(6):889-894.
- [3] 辛海波,连青龙,董爱香,等.铁炮百合热激转录因子基因 *HS-FA2b* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报,2014,41(10):2125-2131.
- [4] MITTLER R, FINKA A, GOLOUBINOFF P. How do plants feel the heat? [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37: 118-125.
- [5] HIGASHI Y, OHAMA N, ISHIKAWA T, et al. HsfA1d, a protein identified via FOX hunting using *Thellungiella salsuginea* cDNAs improves heat tolerance by regulating heat-stress-responsive gene expression [J]. Molecular Plant, 2013, 6(2): 411-422.
- [6] KIM G D, CHO Y H, YOO S D. Regulatory functions of evolutionarily conserved AN1/A20-like Zinc finger family proteins in *Arabidopsis* stress responses under high temperature [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 457(2): 213-220.
- [7] QIN D, WANG F, GENG X, et al. Overexpression of heat stress-responsive *TaMBF1c*, a wheat (*Triticum aestivum* L.) Multiprotein Bridging Factor, confers heat tolerance in both yeast and rice [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(1/2): 31-45.
- [8] 徐淑平,卫志明.基因枪的使用方法介绍[J]. 植物生理学通讯, 1998(1): 41-43.
- [9] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nature Protocols, 2008(3): 1101-1108.
- [10] 王凤兰,周厚高,黄子峰,等.新铁炮百合叶片抗热性形态指标初探[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(2): 102-105.
- [11] 周斯建,义鸣放,穆鼎.高温胁迫下铁炮百合幼苗形态及生理反应的初步研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 145-147.
- [12] YIN H, CHEN Q M, YI M F. Effects of short-term heat stress on

- oxidative damage and responses of antioxidant system in *Lilium longiflorum* [J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, 54(1): 45-53.
- [13] 杨炜茹,张启翔,孙 明,等. 高温胁迫对岷江百合幼苗耐热指数和理化特性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(1): 51-54.
- [14] 杜 凌,吴 楠,董万鹏,等. 高温胁迫对淡黄花百合幼苗生理指标的影响[J]. 种子, 2016, 35(11): 75-78.
- [15] 周子发,牛立新,张延龙,等. 秦巴山区野生百合组培苗耐热性的初步研究[J]. 北方园艺, 2009(11): 164-166.
- [16] 程千钉,刘桂芳,杨利平. 百合新种质苗期耐热性比较[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(5): 34-39.
- [17] 张 珊,王媛媛,张楚君,等. 百合新品种在北京地区的引种试验[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(19): 4967-4969.
- [18] 陈秋明,尹 慧,李晓艳,等. 高温胁迫下外源水杨酸对百合抗氧化系统的影响[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(2): 44-48.
- [19] 刘雪凝,杨利平,马 川,等. 温汤处理种球对亚洲百合幼苗耐热性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1314-1320.
- [20] 刘雪凝,杨利平. 热激锻炼对亚洲百合耐热性的诱导[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(5): 64-66.
- [21] 向地英,张 钢,杨利平. 热激诱导对高温胁迫下百合相对电导率及电阻抗参数的影响[J]. 西北农业学报, 2014, 23(9): 189-195.
- [22] 崔光芬,王祥宁,蒋亚莲,等. OT百合新品种‘金门’[J]. 园艺学报, 2014, 41(7): 1517-1518.
- [23] 冯丽媛,王文和,赵祥云,等. 景观应用百合新品种‘云景红’[J]. 园艺学报, 2014, 41(6): 1275-1276.
- [24] XIN H B, ZHANG H, CHEN L, et al. Cloning and characterization of *HsfA2* from Lily (*Lilium longiflorum*) [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(8): 875-885.
- [25] GONG B H, YI J, WU J, et al. *LIHSA1*, a novel heat stress transcription factor in lily (*Lilium longiflorum*), can interact with *LIHSA2* and enhance the thermotolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(9): 1519-1533.
- [26] 宫本贺. 百合热激转录因子 *LIHSA1* 及其下游热激蛋白 *LIHSP70* 响应热胁迫的机制解析[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [27] MU C J, ZHANG S J, YU G Z, et al. Overexpression of small heat shock protein *LimHSP16.45* in *Arabidopsis* enhances tolerance to abiotic stresses [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e82264.
- [28] CAO X, YI J, WU Z, et al. Involvement of Ca^{2+} and *CaM3* in regulation of thermotolerance in lily (*Lilium longiflorum*) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31: 1293-1304.
- [29] 尚爱芹,高永鹤,段龙飞,等. 逆境诱导转录因子 *AtDREB2A* 转化百合的研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(1): 149-156.
- [30] FAN G, ZHANG K, HUANG H, et al. Multiprotein-bridging factor 1 regulates vegetative growth, osmotic stress, and virulence in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Current Genetics*, 2017, 63(2): 293-309.
- [31] SUZUKI N, RIZHSKY L, LIANG H, et al. Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(3): 1313-1322.
- [32] SUZUKI N, BAJAD S, SHUMAN J, et al. The transcriptional co-activator *MBF1c* is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(14): 9269-9275.
- [33] RIETH M, TORREGROSA L, LUCHAIRE N, et al. Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 1-18.
- [34] 秦丹丹,许甫超,董 静,等. 大麦 *MBF1* 基因的电子克隆与生物信息学分析[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(21): 5276-5281.
- [35] 王浩伟,陈国菊,陈长明,等. 芥蓝耐热性鉴定及耐热转录因子 *MBF1c* 表达分析[J]. 中国蔬菜, 2017(2): 30-37.
- [36] TSUDA K, YAMAZAKI K I. Structure and expression analysis of three subtypes of *Arabidopsis MBF1* genes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 2004, 1680(1): 1-10.
- [37] ZANETTI M E, BLANCO F A, DALEO G R, et al. Phosphorylation of a member of the *MBF1* transcriptional co-activator family, *St-MBF1*, is stimulated in potato cell suspensions upon fungal elicitor challenge [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(383): 623-632.
- [38] SUZUKI N, SEJIMA H, Tam R, et al. Identification of the *MBF1* heat-response regulon of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(5): 844-851.
- [39] ARCE D P, GODOY A V, TSUDA K, et al. The analysis of an *Arabidopsis* triple knock-down mutant reveals functions for *MBF1* genes under oxidative stress conditions [J]. *Plant Physiology*, 2010, 167(3): 194-200.

(责任编辑:陈海霞)