

香石竹热激转录因子基因*DcHsfB1*的克隆及其对不同非生物胁迫的表达响应

冯依, 万雪丽, 刘庆华, 王奎玲*

青岛农业大学园林与林学院, 山东青岛266109

摘要: 热激转录因子(heat shock transcription factors, Hsfs)在植物遭受非生物胁迫时调控热激蛋白(heat shock protein, Hsp)和其他热激诱导的转录本的表达, 参与响应热胁迫进程。本文以香石竹‘想象’作为实验材料, 对基因*DcHsfB1*开放阅读框进行克隆。氨基酸序列的组成成分及理化性质分析结果表明, *DcHsfB1*含有一个804 bp的开放阅读框, 编码267个氨基酸, 分子量为30.78 kDa, 理论等电点为5.84。DcHsfB1蛋白的二级及三级结构预测表明, α -螺旋占36.36%, 延伸链占13.82%, β -折叠链占4.0%, 无规则卷曲占45.82%, 无规则卷曲构成了蛋白质的主要骨架。系统进化树分析结果显示*DcHsfB1*与*AtHsfB1*同源性最高。实时定量PCR分析*DcHsfB1*在各种非生物胁迫下的相对表达量。结果表明, 在42°C胁迫2 h、ABA处理3 h和干旱胁迫3 h的*DcHsfB1*相对表达量显著上调; 在甘露醇、NaCl和4°C胁迫下*DcHsfB1*的相对表达量也有不同程度的上升。

关键词: 香石竹; *DcHsfB1*; 克隆; 非生物胁迫

热激转录因子(heat shock transcription factors, Hsfs)在植物受到非生物胁迫时起着重要的作用。Hsfs是热胁迫的中央控制因子, 尽管它们的大小和序列有很大的差异, 但它们的基本结构和启动子识别在整个真核生物领域都是保守的(Baniwal等2004)。在N端附近, 由一个3螺旋束(H1、H2、H3)和4股反平行单片(β 1、 β 2、 β 3、 β 4)组成的高度结构化的DBD (DNA-binding domain)是Hsfs中最保守的部分(Nover等2001)。该区域的疏水区域确保了中心螺旋-旋转螺旋基序(H2-T-H3)与热应力启动子元件的精确定位和高度选择性的相互作用(Scharf等2012)。与其相邻的是寡聚化结构域(oligomerization domain, OD) (疏水氨基酸残基组成的双边七价构型HR-A/B域)。B类Hsfs的HR-A/B区域与所有非植物Hsfs相似, 而所有A类和C类Hsfs都有一个扩展的HR-A/B区域, 分别插入21个(A类)氨基酸和7个(C类)氨基酸(Nover等2001)。其次为核定位信号(nuclear localization signal, NLS)、核输出信号(nuclear export signal, NES)和C端的激活域(C-terminal trans-activation domain, CTAD)。Hsfs的C端激活域的大小和序列是最不保守的, 该区域主要负责Hsfs与基础转录复合体的结合(Baniwal等2004)。在未受到胁迫的细胞中, Hsfs保持不与DNA结合的单体形式。在受到热激或者其他类

型的胁迫时, Hsfs以三聚体的形式与热激元件(heat stress element, HSE)结合发生磷酸化来响应各种非生物胁迫。

不同的植物种类含有的Hsfs种类与功能也不尽相同。例如, 模式植物拟南芥编码21个Hsf基因, 包括15个A类成员、5个B类成员和1个C类成员; 大豆中的Hsf基因最多可达52个; 水稻和玉米分别含有25个和30个Hsfs (Scharf等2012)。百合热激转录因子HsfA2b在酵母中的过表达可以提高转基因拟南芥幼苗对高温和氧化胁迫的耐受性(Xin等2017)。百合HsfA3s在拟南芥中的过表达通过改变脯氨酸分解代谢来提高耐热性和盐敏感(Wu等2018)。除了研究百合之外, 近年来也有报道Hsfs在葡萄受到热胁迫时的调控功能。HsfA类热激转录因子在葡萄中不仅与基础耐热性有关, 也与获得耐热性有关。在敲除拟南芥中的*AtHsfA3*后, 基础耐热性和获得性热耐受性均降低。HsfA5是HsfA4的特异性抑制剂(Liu等2018)。HsfA6在提高拟南芥的耐热性方面发挥着重要作用。Lin等(2018)

收稿 2019-01-16 修定 2019-06-21

资助 国家自然科学基金(31700623)、山东省高等学校科技计划项目(J17KA144)和青岛农业大学高层次人才科研基金(663/1116016)。

* 通讯作者(wkl6310@163.com)。

人证明了*AtHSFA2*、*AtHSFA4a*和*AtHSFA7a*基因在拟南芥植物HSR中的作用是独立的。

香石竹是石竹科石竹属多年生草本植物,其花色丰富、花形多变,为世界四大切花之一,具有极大的商业价值。香石竹原产于地中海,高温环境会导致其生长发育不良,影响其切花产量和品质。目前国内外对香石竹的研究主要是对瓶插寿命等相关性状与遗传规律的分析(Boxriker等2018)、切花保鲜(谢婕等2018)和遗传转化体系的建立(孔维龙等2018)。此外,分子水平的研究主要是切花衰老(Boxriker等2017;孔维龙等2017)及花发育方面(Zhang等2018),但是对香石竹热激转录因子的研究较少。本文以香石竹‘想象’为材料,克隆了*DcHsfB1*基因并进行了生物信息学分析,为进一步明确*DcHsfB1*的特性提供基础;利用实时定量PCR检测该基因在不同非生物胁迫下的表达响应情况,为进一步了解香石竹耐热机制,培育耐热香石竹新品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.) ‘想象’无菌苗。培养条件如下:光照时间为14 h,光照强度为 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,温度为 24°C 。选取长势均一的香石竹无菌苗进行非生物胁迫处理。将香石竹无菌苗移入光照培养箱进行温度胁迫, 42°C 高温处理于0、1、2、4、8和12 h取样; 4°C 低温处理于0、1、3、6、12和24 h取样。将无菌苗置于干燥室温环境中进行3种不同处理,将无菌苗根部分别浸于 $250 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl溶液和 $400 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇溶液用于盐胁迫处理和渗透胁迫处理, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

ABA溶液喷施叶面用于ABA处理,于0、1、3、6、12和24 h取样后立即进行液氮冷冻,置于 -80°C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取和cDNA合成

香石竹总RNA提取采用植物总RNA提取试剂盒RNAprep Pure Plant Kit (DP432, TIANGEN)。提取的RNA用核蛋白检测仪检测其浓度和OD值,用电泳跑胶检测其完整性。

反转录cDNA合成采用PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(DRR047A, TaKaRa)。将反转录的cDNA稀释10倍后置入 -20°C 冰箱保存备用。用看家基因*DcGAPDH*进行PCR检测反转录结果。

1.2.2 *DcHsfB1*基因克隆

以香石竹基因组序列为参考序列,利用引物设计软件Primer 5.0设计目的基因*DcHsfB1*开放阅读框(open reading frame, ORF)扩增特异性引物*DcHsfB1*-F与*DcHsfB1*-R(表1),以香石竹cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系为: $2 \mu\text{L}$ $10\times$ PCR Buffer、 $0.1 \mu\text{L}$ Ex Taq 聚合酶($5 \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、 $1.6 \mu\text{L}$ dNTP ($2.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、正向和反向引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $1 \mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{L}$ cDNA, ddH₂O补足 $20 \mu\text{L}$ 。PCR反应程序为: 94°C 预变性5 min→(94°C 变性30 s→ 60°C 退火30 s→ 72°C 延伸1 min) 35个循环→ 72°C 延伸10 min→ 4°C 保存。

取 $3 \mu\text{L}$ PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,利用TaKaRa Mini BESTAgarose Gel DNA Extraction Kit试剂盒(TaKaRa, 大连)回收目的条带,与pMD18-T载体连接。将连接产物转化大肠杆菌DH5 α ,挑取单菌落PCR鉴定,将阳性克隆送公司测序。

表1 香石竹*DcHsfB1*基因克隆和表达分析引物

Table 1 Primers used for *DcHsfB1* cloning and expression analysis in carnation

引物名称	序列(5'→3')	目的
<i>DcHsfB1</i> -F	GCTCTAGAATGGGACTGAGGTCGGTAC	基因克隆
<i>DcHsfB1</i> -R	AACTGCAGCTGGGTCTTCATAAATTTGC	基因克隆
<i>DcHsfB1</i> -qF	CACTCCATCACAGCCACACAAAAG	表达分析
<i>DcHsfB1</i> -qR	CACGGAAAGCCATACCAGTCAAC	表达分析
<i>DcGAPDH</i> -qF	CAATGTGGGGTATTCGGGGC	
<i>DcGAPDH</i> -qR	CACACCTCCCTCTTTTTTTCCTACT	

1.2.3 DcHsfB1生物信息学分析

利用Prot Param (<http://web.expasy.org/prot-param/>)在线分析DcHsfB1氨基酸序列的组成成分及理化性质; 利用Prot Scale (<http://web.expasy.org/protscale/>)分析DcHsfB1氨基酸序列的疏水性/亲水性; 利用SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_sopma.html)和SWISS-MODEL (<https://swissmodel.exp-asy.org/>)工具分析DcHsfB1蛋白质的二、三级结构。利用NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载与香石竹DcHsfB1的同源性较高的氨基酸序列, 利用Gene Doc进行氨基酸序列比对。利用clustal X软件对香石竹DcHsfB1和拟南芥HSF家族的氨基酸序列 (<https://www.arabidopsis.org/>)进行比对, 利用MEGA 5.0软件, 采用NJ (neighbor-joining)法构建系统进化树。利用MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)在线分析DcHsfB1基序的保守性。

1.2.4 实时定量PCR

实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)采用SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time)试剂盒(DRR041A, TaKaRa)。所有反应均在Setp One Plus荧光定量PCR平台(美国ABI公司)进行。以香石竹*DcGAPDH*基因为内参基因, 与目的基因一起扩增, 引物序列见表1。*DcHsfB1*实时定量PCR引物。采用20 μL反应体系, 反应程序为95°C预变性60 s; 95°C变性10 s, 58°C退火20 s,

72°C延伸15 s, 共40个循环, 然后进行熔解曲线分析, 起始温度为72°C。采用2^{-ΔΔCT}法分析数据。采用Sigmaplot 10.0软件绘制图表。采用SPSS软件中的Duncan法($P<0.05$)分析其显著性差异。

2 实验结果

2.1 香石竹*DcHsfB1*基因的克隆

根据已公布的香石竹基因组序列, 设计*DcHsfB1*同源克隆引物, 经PCR扩增后得到*DcHsfB1*基因开放阅读框区(图1), 共804 bp, 编码267个氨基酸。NCBI BlastP结果显示*DcHsfB1*属于Hsfs家族成员。

2.2 DcHsfB1氨基酸序列及保守基序分析

利用Clustal X与Gene Doc软件将DcHsfB1与其他物种HsfB1类氨基酸进行多序列比对。结果显示, DcHsfB1与拟南芥AtHsfB1 (NP_195416.1)、水稻OsHsfB1a (XP_015611859.1)和番茄SlHsfB1a (XP_004235322.1)的同源性都比较高, 都含有典型的HsfB家族的结构域(图2)。其中DcHsfB1在7~100个氨基酸之间含有一个DBD域; 在140~180个

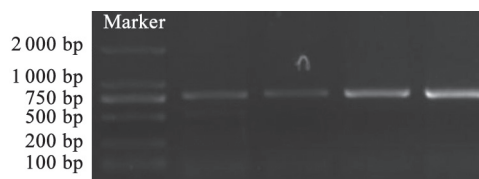


图1 *DcHsfB1*基因开放阅读框的克隆

Fig.1 Cloning of the open reading frame of *DcHsfB1* gene

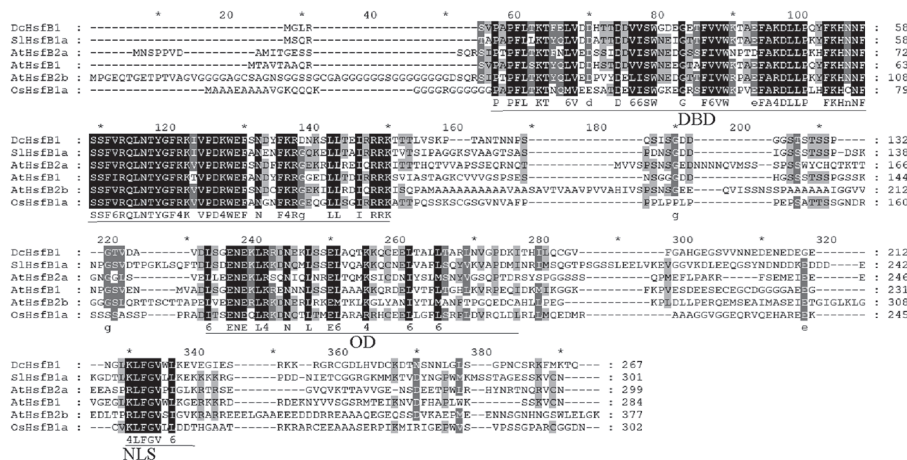


图2 DcHsfB1与其他植物Hsf氨基酸序列多重比对

Fig.2 Alignment analysis in sequences of DcHsfB1 and Hsfs of other plants

氨基酸之间含有一个OD域; 在216~226个氨基酸之间含有一个NLS域。

通过MEME在线软件分析蛋白的保守基序, 将DcHsfB1与拟南芥HSF家族进行比对。结果如

图3所示, 在DcHsfB1和拟南芥HSF家族的DBD域都含有motif 1、motif 2和motif 4三个保守基序。DcHsfB1和AtHsfB1在OD域都含有1个保守基序为motif 6。

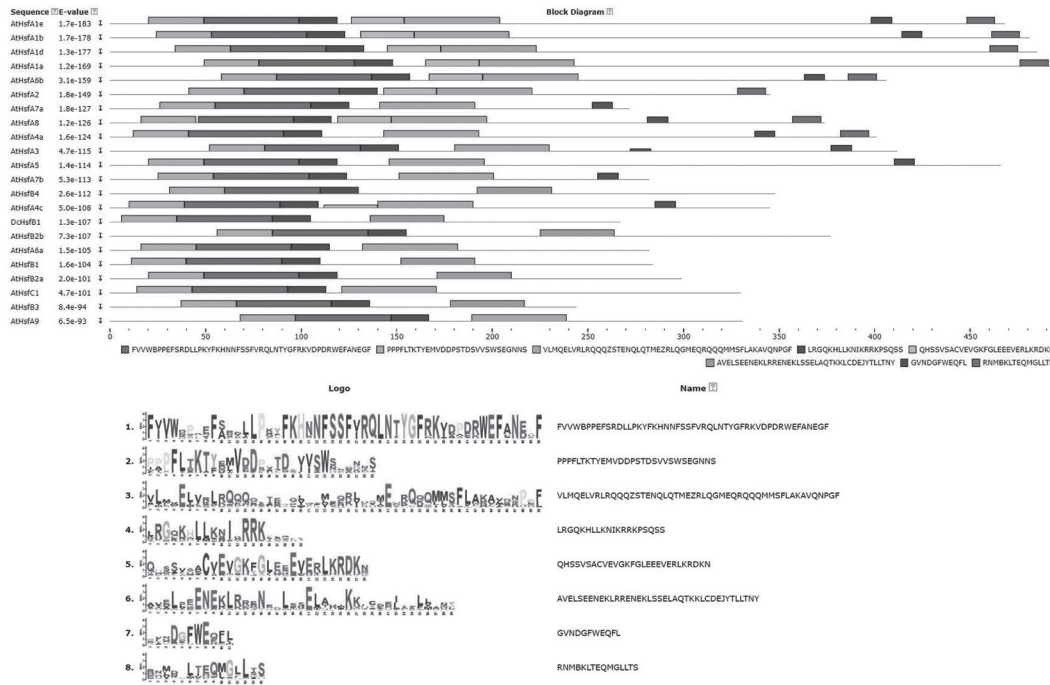


图3 DcHsfB1保守结构域分析
Fig.3 Conserved domains analysis of DcHsfB1

2.3 DcHsfB1进化树分析

通过MEGA 5.0对DcHsfB1与拟南芥Hsf家族进行同源性分析。结果如图4所示: DcHsfB1与AtHsfB类进化距离最近, 且属于同一分支。DcHsfB1与AtHsfB1同源性最高, 其次与AtHsfB2类热激转录因子的同源性也比较高。

2.4 DcHsfB1氨基酸序列的组成成分及理化性质的分析

对DcHsfB1编码的211个氨基酸序列用Prot Param在线工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行分析。等电点为5.84, 分子量是30.78 kDa, 其中氨基酸组成最多的亮氨酸(Leu)为9.5%, 最少的蛋氨酸(Met)为0.7%, 亲水性为-0.720。

2.5 DcHsfB1蛋白的二、三级结构分析

利用DcHsfB1的氨基酸序列和SOPMA在线预测其蛋白二级结构(图5), 结果表明: DcHsfB1的氨基酸中 α -螺旋占36.36%, 延伸链占13.82%, β -折叠

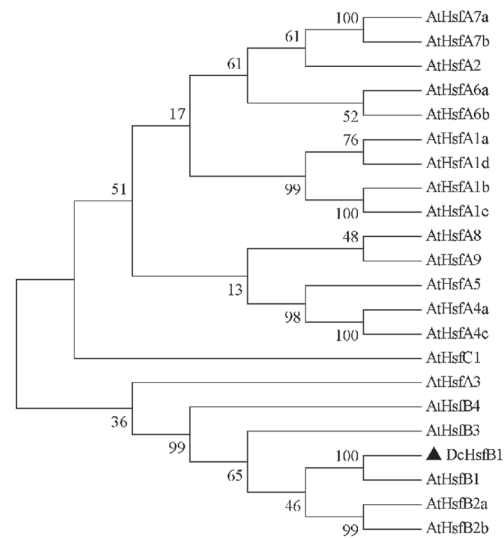
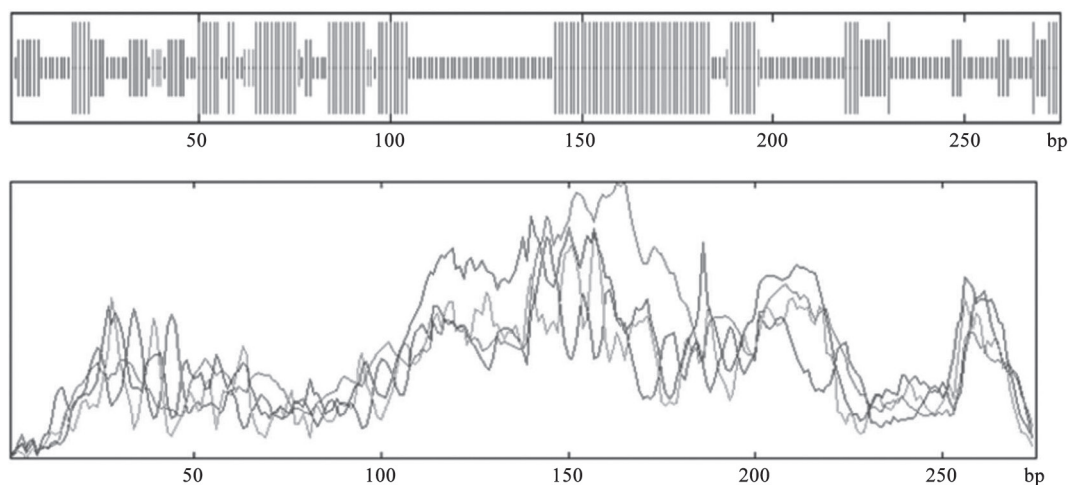


图4 DcHsfB1与拟南芥Hsf蛋白序列的系统进化树
Fig.4 Phylogenetic tree analysis of Hsf protein sequences from DcHsfB1 and *Arabidopsis thaliana*

图5 *DcHsfB1*蛋白二级结构预测Fig.5 Secondary structure prediction of *DcHsfB1* protein图6 *DcHsfB1*的蛋白三级结构预测Fig.6 Tertiary structure prediction of *DcHsfB1* protein

链占4.0%, 无规则卷曲占45.82%。对*DcHsfB1*的蛋白质三级结构预测, 结果如图6所示, 无规则卷曲构成了蛋白质的主要骨架, 这与二级蛋白结构分析结果相同。

2.6 *DcHsfB1*在不同非生物胁迫下的相对表达量

以*DcGAPDH*为内参基因, 以提取的总RNA反转录成第一链cDNA为模板进行qRT-PCR, 得到*DcHsfB1*在不同非生物胁迫下的相对表达量(图7)。

图7表明: 在高温42°C胁迫下*DcHsfB1*的相对表达量先升高后降低, 在高温胁迫2 h时相对表达量达到最高, 8 h时恢复到与CK (对照组)相同水平。*DcHsfB1*在低温4°C胁迫下的相对表达量在12 h达到最大, 约是CK的4倍, 随后降低。在干旱胁迫3 h时*DcHsfB1*的相对表达量上调至最高水平, 约是CK的8倍。在ABA处理3 h时*DcHsfB1*相对表达量达到

最大值, 是CK的近15倍。在受到NaCl胁迫3 h时, *DcHsfB1*的相对表达量相对于CK略有降低, 但是胁迫12 h时*DcHsfB1*的相对表达量达到最大, 是CK的3倍。甘露醇胁迫后基因的相对表达量的变化与其他处理有所不同, 在处理1 h后基因的相对表达量相对于CK组来说有所降低, 但是在胁迫过程中一直保持上调状态, 并且在12 h时*DcHsfB1*的相对表达量达到最高, 是CK的近1.5倍。

*DcHsfB1*在以上非生物胁迫中的相对表达量均有所上升, 其中在高温42°C、干旱胁迫和ABA处理下*DcHsfB1*的相对表达量上调幅度最大, 这说明了*DcHsfB1*可能在高温胁迫和干旱胁迫以及ABA处理中扮演着重要的角色。

由图7分析可知: *DcHsfB1*在42°C胁迫下属于前期诱导表达的基因; 在干旱胁迫和ABA处理下为中期诱导表达的基因; 在低温4°C胁迫, 甘露醇胁迫以及NaCl胁迫下为后期诱导表达的基因。以上分析说明了*DcHsfB1*作为调控因子在参与非生物胁迫下调控的复杂性与多样性。

3 讨论

植物热激转录因子的DBD和OD域在不同物种间相对保守, 而其他功能域则有一定的特异性(Scharf等2012)。氨基酸序列比对显示, 香石竹*DcHsfB1*具有高度保守的DBD域。B类Hsf有DNA

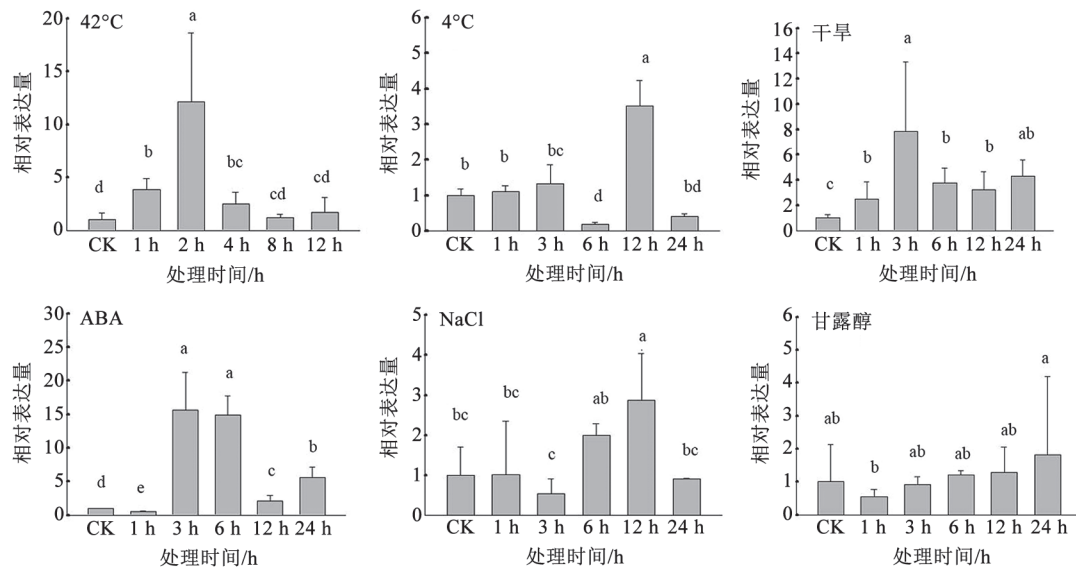


图7 *DcHsfB1*对高温、低温、干旱、ABA和甘露醇的表达响应

Fig.7 Expression response of *DcHsfB1* to high temperature, low temperature, drought, ABA and mannitol

不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

结合活性而无激活域,其高度保守的四肽-LFGV-却能形成核心阻遏域,可作为辅助激活子与A类Hsf共同发挥作用(Czarnecka-Verner等2000; Scharf等2012),香石竹*DcHsfB1*蛋白不含有转录激活结构域,含有四肽-LFGV-,与之相符。植物中Hsfs参与了植物遭受各种非生物胁迫后调控。热激转录因子家族的多样性造成了其功能的复杂性。*HsfA1a*和*HsfA2*是番茄耐热性主调节因子,*HsfB1*作为共同调节剂来增强*HsfA1a*或*HsfA2*的活性(Baniwal等2004)。DNA结合和抑制作用是番茄热应激转录因子HsfB1转化的前提条件(Hu等2018)。Zhu等(2012)发现HsfB1含有2个较短的ORF区uORF1和uORF2,分别编码15个和36个氨基酸序列。其中uORF2是保守的,且对HsfB1的翻译有一定的抑制作用。为探讨HsfB1抑制作用在HS反应中的影响,对拟南芥根组织进行定量PCR分析,表明在非高温(23°C)条件下,突变体和野生型植物根系中*HsfA1*、*HsfA7a*、*HsfB2b*、*HsfA2*、*HsfA7a*、*HsfB2b*和*HsfB1*的相对表达量均高于*HsfB1*转基因植物,并且提出*HsfB1*可能提高*HsfA1*和*HsfA2*在热胁迫下的活性(Ikeda等2011)。由此表明,*HsfB1*与植物耐热性有一定的相关性。此外,有研究证明22°C时,在转基因

拟南芥中*HsfB1*和*HsfB2b*的表达水平较低,但是在高温37°C胁迫2 h后其相对表达量增加了15倍以上,且都在1~2 h时达到最高水平(Kumara等2009)。*DcHsfB1*在42°C胁迫下相对表达量显著上调,与上述文献结论是一致的。对大豆中的Hsfs进行冷胁迫以及其他非生物胁迫处理,证实HsfB亚族成员在冷诱导中除了*HsfB1c*相对表达量较高外,其他基因上调程度均不明显,但是干旱胁迫下*HsfB2b*、*HsfB1c*和*HsfB2d*的相对表达量显著上调(Chung等2013)。而*DcHsfB1*在干旱胁迫后的相对表达量显著上调,在甘露醇、NaCl和4°C胁迫下相对表达量也有不同程度的上升。由此表明,不同物种的不同HsfB成员的表达模式并非完全一致,反应了Hsf家族成员功能的多样性和复杂性。

本研究为改良香石竹的耐热性奠定了分子基础,为深入研究热激转录因子在调控植物抵抗逆境胁迫中的生物学功能与机制提供理论参考。

参考文献(References)

- Baniwal SK, Bhartii K, Chan KY, et al (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci*, 29 (4): 471-487

- Boxriker M, Boehm R, Krezdorn N, et al (2017). Comparative transcriptome analysis of vase life and carnation type in *Dianthus caryophyllus* L. *Sci Hortic*, 217: 61–72
- Boxriker M, Möhring J, Piepho HP (2018). Genetic and phenotypic correlation for breeding relevant traits in *Dianthus caryophyllus* L. *Postharvest Biol Tec*, 43: 129–136
- Chung E, Kim KM, Lee JH (2013). Genome-wide analysis and molecular characterization of heat shock transcription factor family in *Glycine max*. *J Genet Genomics*, 40 (3): 127–135
- Czarnecka-Verner E, Yuan CX, Scharf KD, et al (2000). Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Mol Biol*, 43: 459–471
- Hu XJ, Chen DD, McIntyre L, et al (2017). Heat shock factor C2a serves as a proactive mechanism for heat protection in developing grains in wheat via an ABA-mediated regulatory pathway. *Plant Cell Environ*, 41 (1): 79–98
- Ikeda M, Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2011). *Arabidopsis* HsfB1 and HsfB2b act as repressors of the expression of heat-inducible *Hsfs* but positively regulate the acquired thermotolerance. *Plant Physiol*, 157 (3): 1243–1254
- Kong WL, Hu R, Bao MZ, et al (2017). Cloning and expression analysis of the aquaporin genes in carnation. *Acta Hortic Sin*, 44 (3): 515–527 (in Chinese with English abstract) [孔维龙, 胡瑞, 包满珠等(2017). 香石竹水孔蛋白基因的克隆及表达分析. *园艺学报*, 44 (3): 515–527]
- Kong WL, Wang C, Dan NZ, et al (2018). Agrobacterium-mediated genetic transformation system of carnation. *J China Agric Univ*, 23 (4): 34–44 (in Chinese with English abstract) [孔维龙, 王翠, 但乃震等(2018). 根癌农杆菌介导的香石竹遗传转化体系的建立. *中国农业大学学报*, 23 (4): 34–44]
- Kumar M, Buschb W, Birkec H, et al (2009). Heat shock factors HsfB1 and HsfB2b are involved in the regulation of *Pdfl.2* expression and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2 (1): 152–165
- Lin KF, Tsai MY, Lu CA, et al (2018). The roles of *Arabidopsis* *HSFA2*, *HSFA4a*, and *HSFA7a* in the heat shock response and cytosolic protein response. *Bot Stud*, 59 (1): 1–9
- Liu GT, Chai FM, Wang Y, et al (2018). Genome-wide identification and classification of HSF family in grape, and their transcriptional analysis under heat acclimation and heat stress. *Hortic Plant J*, 4 (4): 133–143
- Nover L, Bharti K, Mishra SK, et al (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperon*, 6 (3): 177–189
- Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I, et al (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 104–119
- Wu Z, Liang JH, Wang CP, et al (2018). Overexpression of lily *HsfA3s* in *Arabidopsis* confers increased thermotolerance and salt sensitivity via alterations in proline catabolism. *J Exp Bot*, 69 (8): 2005–2021
- Xie J, Liang XJ, Weng LF, et al (2018). Estimation on multicolor dye formulae and compound preservatives for carnation cut flowers. *Hunan Agric Sci*, (10): 92–94 (in Chinese with English abstract) [谢婕, 梁雄基, 翁柳芳等(2018). 香石竹切花多彩染色及复合保鲜剂研究. *湖南农业科学*, (10): 92–94]
- Xin HB, Zhang H, Zhong XH, et al (2017). Over-expression of *LlHsfA2b*, a lily heat shock transcription factor lacking trans-activation activity in yeast, can enhance tolerance to heat and oxidative stress in transgenic *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 130: 617–629
- Zhang XN, Wang QJ, Yang SZ, et al (2018). Identification and characterization of the mads-box genes and their contribution to flower organ in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Genes*, 9 (4): 193
- Zhu XJ, Thalor SK, Takahashi Y, et al (2012). An inhibitory effect of the sequence-conserved upstream open-reading frame on the translation of the main open-reading frame of *HsfB1* transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 35: 2014–2030

Cloning and expressional response analysis of *DcHsfB1* under different abiotic stresses in carnation (*Dianthus caryophyllus*)

FENG Yi, WAN Xue-Li, LIU Qing-Hua, WANG Kui-Ling*

College of Landscape Architecture and Forestry, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: Heat shock transcription factors (Hsfs) regulate the expression of heat shock proteins (Hsps) and other heat shock-induced transcripts when plants are subjected to abiotic stress, and participate in the response to heat stress. In this paper, carnation 'Fancy' was used as experimental material to clone the open reading frame of *DcHsfB1*. The composition and physicochemical properties analysis of the amino acid sequence showed that *DcHsfB1* contained a 804 bp open reading frame encoding 267 amino acids with a molecular weight of 30.78 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.84. The secondary structure and tertiary structure prediction of the protein showed that, α -helix accounted for 36.36%, extended chain accounted for 13.82%, β -folded chain accounted for 4.0%, and irregular curl accounted for 45.82%. Irregular curl constituted the main skeleton of the protein. Phylogenetic tree analysis showed that *DcHsfB1* had the highest homology with *AtHsfB1*. The relative expressions of *DcHsfB1* under various abiotic stresses were analyzed by quantitative real-time PCR. The results showed that the relative expression of the gene were significantly up-regulated under 42°C for 2 h, ABA treatment for 3 h and drought stress for 3 h. The relative expression of *DcHsfB1* under mannitol and NaCl and 4°C also increased in different degrees.

Key words: carnation (*Dianthus caryophyllus*); *DcHsfB1*; clone; biological information

Received 2019-01-16 Accepted 2019-06-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31700623), the Shandong Provincial Higher Education Science and Technology Plan Project (J17KA144), and Qingdao Agricultural University High-level Talent Research Fund (663/1116016).

*Corresponding author (wkl6310@163.com).