

耧斗菜 HSF 分类、表达分析及 AyHSF1 的亚细胞定位

张华丽¹, 王 涛¹, 崔荣峰¹, 董爱香¹, 辛海波^{1,*}, 义鸣放²

(¹北京市园林科学研究所, 绿化植物育种北京市重点实验室, 北京 100102; ²中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100193)

摘 要: 从蓝花耧斗菜 (*Aquilegia coerulea*) 基因组中鉴定出了 14 个热激转录因子 (Heat shock transcription factor, HSF), 对其进行了序列和进化树分析, 发现该物种中有 8 个 A 类、5 个 B 类和 1 个 C 类 HSF。荧光定量 PCR 表明: 14 个预测的 HSF 基因在华北耧斗菜 (*A. yabeana*) 中均有表达, 其中大部分成员表达响应热激处理。从华北耧斗菜 cDNA 中克隆了 *HSF1*, 构建了 GFP 表达载体, 通过洋葱表皮细胞瞬时表达, 发现 GFP-AyHSF1 融合蛋白存在转位现象。

关键词: 蓝花耧斗菜; 华北耧斗菜; 热激转录因子; 热激; 耐热性

中图分类号: S 682

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 08-1533-09

Classification and Gene Expression Analysis of HSFs from *Aquilegia coerulea* and Sub-cellular Localization of AyHSF1

ZHANG Hua-li¹, WANG Tao¹, CUI Rong-feng¹, DONG Ai-xiang¹, XIN Hai-bo^{1,*}, and YI Ming-fang²

(¹Beijing Institute of Landscape Architecture, Beijing Key Laboratory of Greening Plants Breeding, Beijing 100102, China; ²Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Fourteen HSFs (Heat shock transcription factors) were identified from *Aquilegia coerulea* genome sequence. Alignment and phylogenetic analyses displayed there were 8 HSFAs, 5 HSFBs and 1 HSFC in *A. coerulea*. Real-time PCR revealed that transcripts of these HSFs were detected and most of them were induced significantly by heat shock in *A. yabeana*. Furthermore, *HSF1* was cloned from *A. yabeana* cDNA. The protein fused with GFP at its N-terminus was investigated in onion epidermal cell and observed with a translocation phenomenon.

Key words: *Aquilegia coerulea*; *A. yabeana*; heat shock transcription factor (HSF); heat shock; thermotolerance

耧斗菜属 (*Aquilegia*) 花卉为毛茛科 (Ranunculaceae) 宿根植物, 世界范围内约有 70 种, 其叶片优美, 花形独特, 可用于花坛、花境和切花, 在园林绿化与切花生产方面具有较高的应用价值; 同时, 多数耧斗菜属植物具有一定的药用价值 (孙明晓 等, 2011)。目前主要对耧斗菜进行了花色

收稿日期: 2015-03-19; 修回日期: 2015-07-31

基金项目: 农业部“948”引进项目 (2011-G17); 北京市公园管理中心项目 (ZX2014026)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zghzpx@163.com)

花型遗传、系统进化 (Sharma et al., 2014), 栽培、生殖生物学 (郑德承 等, 2009)、分子标记和组织培养 (朱蕊蕊 等, 2010) 等的研究。中国耬斗菜属资源丰富, 广泛分布在华北、东北、西南等地 (朱蕊蕊 等, 2009)。耬斗菜花期在 5—7 月, 而 7—8 月高温对其生长和开花不利, 如果可以改良其耐热性, 可提高其在园林绿化应用中的竞争力。

热激转录因子 (Heat shock transcription factor, HSF) 在植物热信号转导中起着关键调控作用 (Kotak et al., 2007; von Koskull-Döring et al., 2007; Liu & Charng, 2012)。HSF 在转录水平调控热激蛋白 (Heat shock protein, HSP) 的表达, HSP 作为一类分子伴侣, 在提高细胞抗逆性方面起着重要作用 (Vierling, 1991; Sun et al., 2002)。植物拥有多个 HSF, 它们在不同组织和生理环境下发挥着不同的调控作用 (Nover et al., 2001)。植物 HSF 的研究始于番茄 (Scharf et al., 1990)。对番茄及单子叶模式作物水稻和双子叶植物拟南芥 HSF 的研究表明, HSF 家族基因分为 A、B、C 三类 (Nover et al., 1996)。番茄 HSFA1 作为主要的调控者, 它可以激活其它 HSFs 的表达 (Mishra et al., 2002), 而番茄 HSFA2 是一个严格受热激诱导的、耐热细胞中的一个统治性的 HSF (Scharf et al., 1998)。在拟南芥中, HSFA3 参与了 DREB (Drought-responsive element binding) 转录因子调控的水分胁迫信号传导网络 (Sakuma et al., 2006)。与植物 A 类 HSF 相比, 大量的 B 类和 C 类成员本身没有转录激活功能。番茄 HSFB1 是一类共激活子, 与 A 类 HSF 协同作用 (Bharti et al., 2004), 而拟南芥 B1 可能是 A 类成员的抑制子 (Czarnecka-Verner et al., 2000, 2004)。

植物中 HSF 家族成员众多, 精细的功能分析主要在模式植物番茄、水稻和拟南芥 (Scharf et al., 1990; Panchuk et al., 2002; Baniwal et al., 2007; Zhang et al., 2009) 上。在观赏植物中, 对 HSF 的研究仅见于百合等少数种类 (Xin et al., 2010; Gong et al., 2014), 且在基因组水平对整个 HSF 家族成员进行分类和基因表达分析未见报道。本研究中采用蓝花耬斗菜全基因组测序结果, 从全基因组水平鉴定 HSF, 并对其进行分类。同时, 对各成员热激响应情况进行荧光定量 PCR 检测, 并克隆关键调控成员。本研究中为耬斗菜耐热相关分子育种提供了理论支持和基因储备。

1 材料与方法

1.1 材料及其序列下载与分析

试验于 2013 年 10 月至 2014 年 12 月在北京市园林科学研究院进行。材料为华北耬斗菜 (*Aquilegia yabeana*) 组培苗。将种子用 2% 的次氯酸钠灭菌 15 min, 用灭菌水冲洗 3 次。播种于 MS 培养基, 25℃, 16 h 光照, 8 h 黑暗。取 45 d 的苗用于热激处理以及总 RNA 的提取。

从植物转录因子数据库下载了 20 条蓝花耬斗菜 (*A. coerulea*) 的 HSF 序列, 剔除了重复序列, 共有 14 条 HSF。拟南芥 HSF 序列从 TAIR 网站下载, 以 FASTA 格式保存。采用 Genedoc 和 MEGA5 对蛋白进行多序列比对和聚类分析。

1.2 RNA 的分离和 cDNA 的合成

将整株植株研磨成粉末, 迅速称取 0.1 g, 加入 1 mL Trizol (Invitrogen), 具体操作按照说明书进行。用 RNase-free DEPC 水溶解 RNA, 用 Nanodrop ND-1000 进行总 RNA 浓度和质量测定, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

每个样品取 1 µg 总 RNA 用于 cDNA 的合成, 具体操作按照 Invitrogen 公司的 superscript II 试剂盒说明书进行。每个样品设 3 个独立的生物学重复。

1.3 荧光定量 PCR 检测热激条件下 *AyHSF* 的表达情况

取常温下 (25 °C)、37 °C 处理 0.5 h 和 3 h 的华北稷斗菜植株进行总 RNA 提取, 用随机引物进行反转录。荧光定量 PCR 采用 ABI 7500 real-time PCR 系统完成。25 μL 反应体系组分如下: cDNA, 1 μL; 10× PCR 缓冲液, 2.5 μL; 10 mmol · L⁻¹ dNTPs, 0.5 μL; 20 pmol · μL⁻¹ 引物, 0.25 μL; *Taq* 酶, 0.5 μL; Sybr Green, 1 μL; 双蒸水补至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min, 1 个循环; 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 5 min, 1 个循环。内参基因用 *18S rDNA*。扩增引物序列见表 1。数据分析来源于 3 次生物学重复, 处理间进行 *t* 检验分析。

表 1 稷斗菜 *HSF* 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Realtime PCR Primer sequences of *HSFs* in *Aquilegia yabeana*

基因编号 Gene No.	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>HSF1</i>	CTTCTGGGCCTCCGTACTTG	AGCTGATGGACGCATTGCT
<i>HSF2</i>	TGAGGCTGACTTGGGTGATG	CTCCATTCTCAGCTGCAATCAT
<i>HSF3</i>	AGTTGAAGGCATCGCCAAAC	CAAAGCCAGCAGCGACATC
<i>HSF4</i>	CCTCACTCAAAGATGTGCATTCT	GGCTTTCCACATTACACATCGAT
<i>HSF5</i>	AATGACGCGATCTCTTCATCTTC	GCAGCTGCATGCACTTGATT
<i>HSF6</i>	GAGGCGTGATAAACAAGTCCTAATG	CCGCGTGTCTGCTGTTG
<i>HSF7</i>	TGTGGTCATGCAGGAGTTGGT	CAGCTTCCCATCTGCACCTT
<i>HSF8</i>	CGGGACCGAAATACACTGATG	CGTTCCTGAGAACCTTGCTGTT
<i>HSF9</i>	TGCGAGCCAAGCGTCTTC	CACCACCCACTGGTTCACTACTAG
<i>HSF10</i>	TGATCAGCTGCGTGAAATCC	ACAACAACCTGAGGCGTCAAC
<i>HSF11</i>	TGGAACAGCCTTTGTCGTTTG	TGAAAAGGGATGGAAGAAGATCTC
<i>HSF12</i>	TGATGATCCAAGTACTGACCATATTG	AAATTCAGGAGGACGCCAAAC
<i>HSF13</i>	GGATCCACAGAAAGGTGTTCTT	TGTGTTAGGGTCATCTACAAGCTGAT
<i>HSF14</i>	GGCCGGACAGCCTTTTATG	GGAGTGAAAGAACCCCATACAGT
<i>18S rDNA</i>	CATGATAACTCGACGGATCG	TGCTGCCTTCCTTGGATGTG

1.4 *AyHSF1* 基因克隆及其编码蛋白的亚细胞定位

以 37 °C 处理 3 h 的华北稷斗菜的 cDNA 为模板进行了 *AyHSF1* 的 PCR 扩增。引物序列为: FOR: tctagagATGGATGGAAACTTAGG; REV: cccgggTCATGCCGCTTTGTTATT。PCR 反应采用 25 μL 体系, 引物浓度同上, 模板 1 μL, 退火温度 55 °C, 延伸时间为 3 min。PCR 产物回收, 用 *Xba* I / *Sma* I 双酶切, 连入 pUC18 改造的 GFP 载体。将重组质粒转入大肠杆菌, 选取单克隆送上海生工测序。洋葱表皮细胞瞬时表达按照曹丽等 (2010) 的方法。将转化后的洋葱表皮于 25 °C 培养 24 h, 用于亚细胞定位观察, 热激处理于观察前 37 °C 培养 0.5 h。

2 结果与分析

2.1 *AcHSF* 序列比对与分类

采用拟南芥的 21 个 HSF 序列与 14 个蓝花稷斗菜 HSF 进行了多序列比对, 并将其对比结果输入 MEGA5 进行了进化树构建。如图 1 所示, 所有的 HSF 被明显地划分成 A、B 和 C 类, 蓝花稷斗菜中包含了这 3 类 HSF, 并且每个 *AcHSF* 均可以准确地与拟南芥对应成员划为 1 个分支。与拟南芥不同的是, 在 A 类中, 蓝花稷斗菜只有 1 个 A1 (*Aquca_005_00532*), 没有 A6; B 类中没有 B2, 但分别有 2 个 B1 (*Aquca_084_00048*、*Aquca_015_00059*) 和 B4 (*Aquca_015_00048*、*Aquca_004_00776*)

(表 2)。同时, 对 14 个 AcHSF 的蛋白质性质进行了分析 (表 2), 它们的氨基酸数为 173 ~ 510, 等电点为 4.5 ~ 9.6, 相对分子量最大的是 A1 类的 AcHSF1 (56.269 kD)。

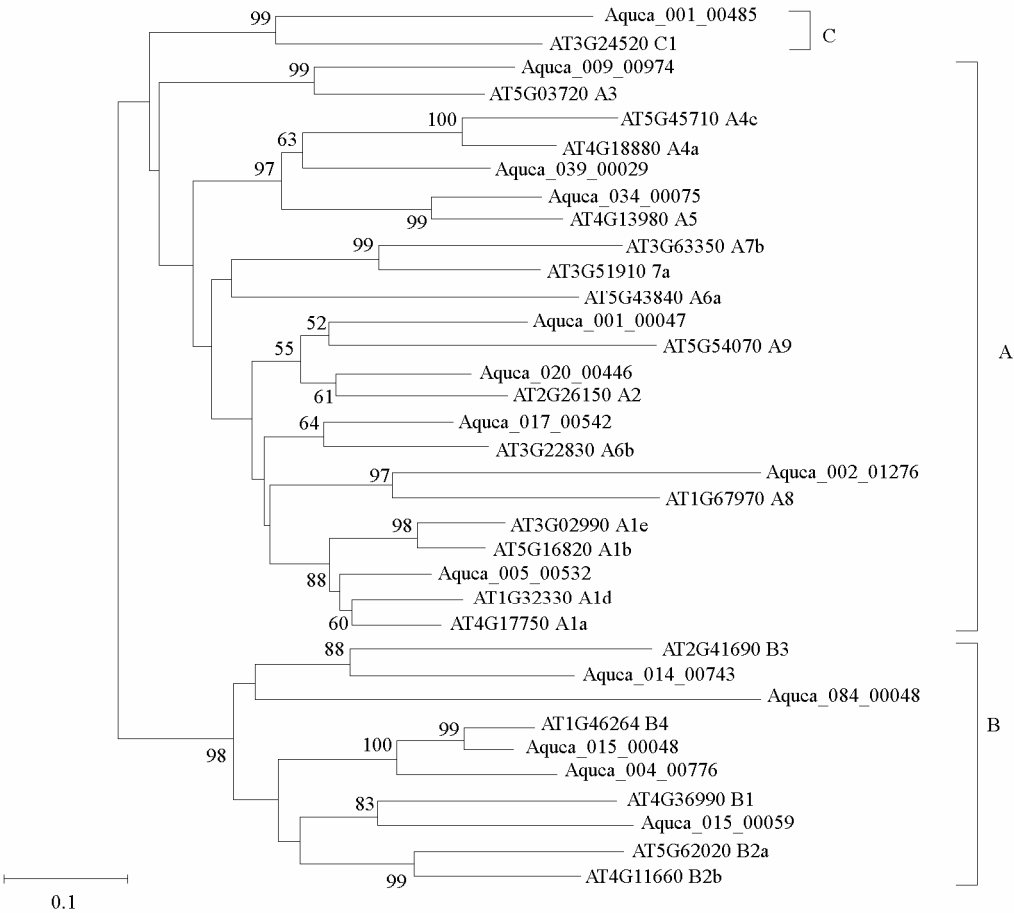


图 1 耬斗菜 (Aqua) 和拟南芥 (AT) HSF 进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree for HSFs from *Aquilegia coerulea* (Aqua) and *Arabidopsis thaliana* (AT)

表 2 耬斗菜 HSF 特性及分类

Table 2 Characterization and classification of HSFs in *Aquilegia coerulea*

基因编号 No.	编码蛋白编号 TF ID	氨基酸数/aa Length	相对分子量/kD MW	等电点 pI	分类 Group
AcHSF1	Aqua_005_00532	510	56.269	4.568	A1
AcHSF2	Aqua_020_00446	383	43.672	4.870	A2
AcHSF3	Aqua_009_00974	500	55.696	5.081	A3
AcHSF4	Aqua_039_00029	449	51.033	5.267	A4
AcHSF5	Aqua_034_00075	481	53.797	5.472	A5
AcHSF6	Aqua_017_00542	385	43.636	4.576	A7
AcHSF7	Aqua_002_01276	423	47.743	5.009	A8
AcHSF8	Aqua_001_00047	363	41.023	4.843	A9
AcHSF9	Aqua_084_00048	173	20.439	8.480	B1
AcHSF10	Aqua_015_00059	290	32.440	6.266	B1
AcHSF11	Aqua_014_00743	214	25.032	9.454	B3
AcHSF12	Aqua_015_00048	346	39.317	7.924	B4
AcHSF13	Aqua_004_00776	271	31.512	7.451	B4
AcHSF14	Aqua_001_00485	276	32.145	9.196	C1

2.2 AcHSF 主要功能域和基序分析

对 14 个 AcHSF 蛋白序列分析表明: 它们具有保守的 DNA 结合域 (DNA binding domain, DBD) 存在形成 α 螺旋和 β 折叠的保守氨基酸序列 (图 2, I)。在由 2 个疏水 7 肽重复序列 A 和 B (HR-A/B) 组成的寡聚域 (oligomerization domain, OD), 8 个 A 类 AcHSF 在 A 和 B 部分之间有 21 个氨基酸的插入; 而 C 类 AcHSF 在此处有 7 个氨基酸的插入 (图 2, II)。

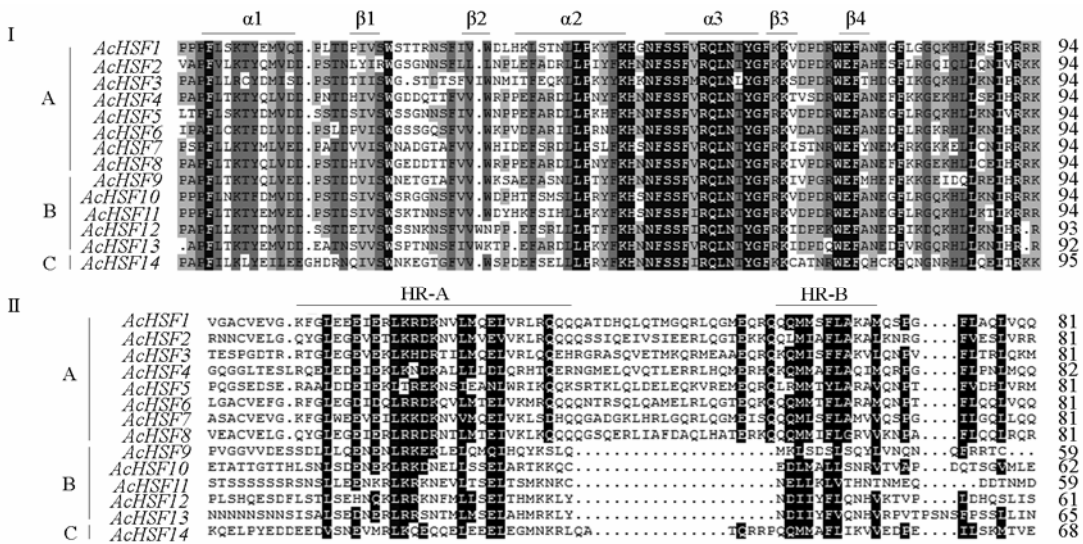


图 2 AcHSF 的 DNA 结合域多序列比对 (I) 和寡聚域氨基酸序列比对 (II)
 α : α 螺旋; β : β 折叠。

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequence of DNA-binding domains (I) and DBD (II) from *Aquilegia coerulea* HSF
 α : α -helix; β : β -fold.

除这两个最重要的功能域外, 14 个 AcHSF 均包含富含赖氨酸 (K) 和精氨酸 (R) 的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS), 7 个成员包含富含亮氨酸 (L) 的核输出信号 (nuclear export signal, NES), 8 个 A 类成员均含转录激活域 (activator domain, AD) (表 3)。

表 3 矮斗菜 HSF 功能基序
Table 3 Functional motifs of HSFs in *Aquilegia coerulea*

蛋白名称 Protein name	核定位信号 NLS	转录激活域 AD	核输出信号 NES
AcHSF1	RRITGVNKKRR	DINDDFWEQI	ITEQMGLL
AcHSF2	LFDGGAACKQR	IWEELLNDEM	LVEQMGYL
AcHSF3	ISSPREKRKFVK	GFDTCSQDIW	
AcHSF4	QSENHNKKRR	GANDDFWGQF	LTEQMGL
AcHSF5	YFSPINKRR	PANDGFWEQY	SDMEQLTL
AcHSF6	ELEEAITKKRRR	EEVFEELE	VFNRLGDL
AcHSF7	WRISSETSKRR	FYEDGMLENL	LTEELGLC
AcHSF8	LHSGSIGRKRR	LDCQDQTV	LVAQFPLL
AcHSF9	RKEK		
AcHSF10	GGPSSKKMKMA		
AcHSF11	KRLKRLKNEVL		
AcHSF12	HPKRLHPD		
AcHSF13	KKRLHHER		
AcHSF14	FGEKKRRL		

2.3 *AyHSF* 的表达分析

与对照 (0 h) 相比, 14 个 *HSFs* 在热激 0.5 h 时只有 *HSF4* 和 *HSF9* 表达量有明显变化 (t 检验, $P < 0.05$); 在热激处理 3 h 时, *HSF2*、*HSF3*、*HSF6*、*HSF7* 和 *HSF11* 表达量显著升高 ($P < 0.05$), 其中 *HSF2*、*HSF3* 表达量与对照相比均极显著上升 ($P < 0.01$), *HSF2* 表达量是对照的 119 倍。

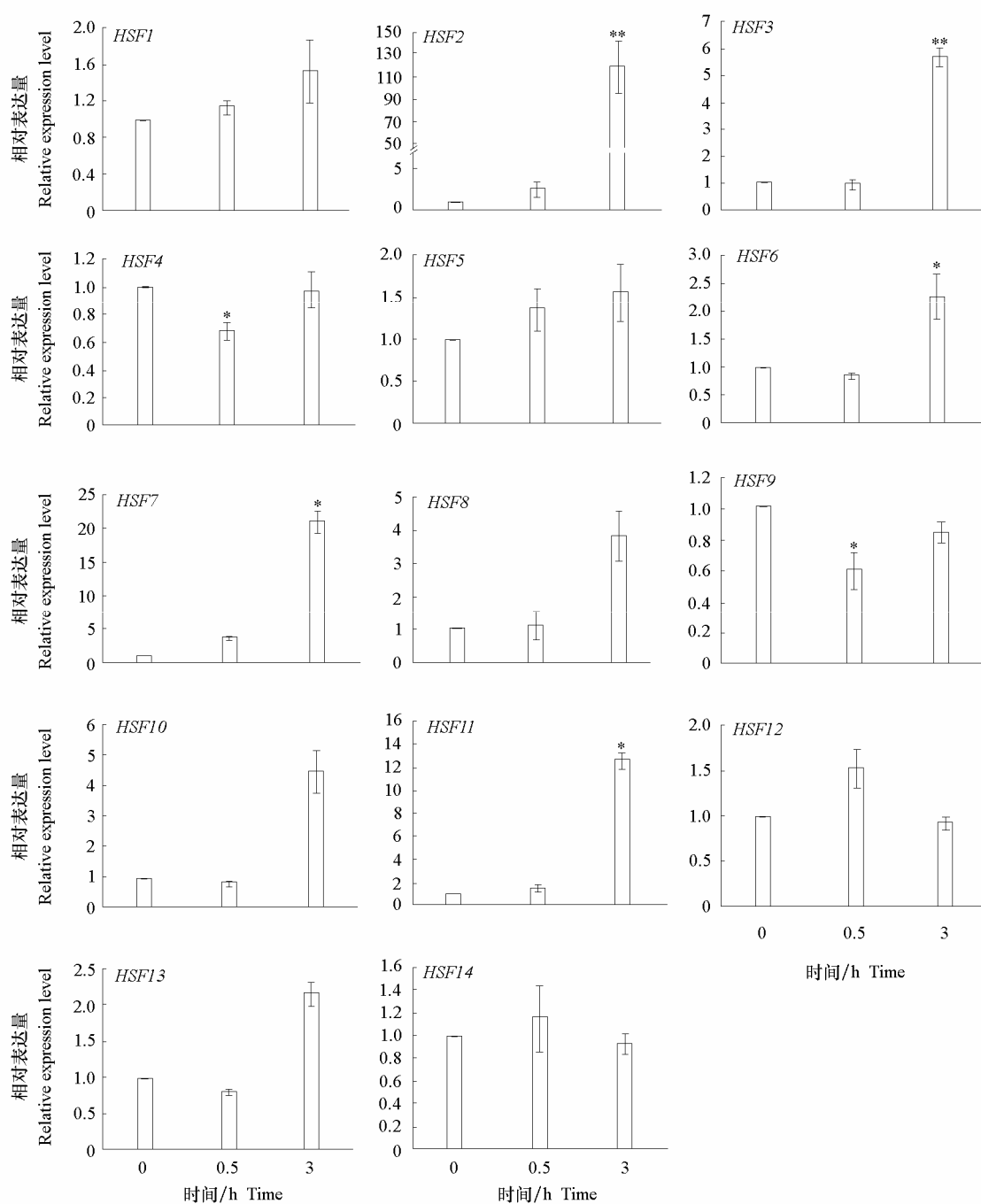


图 3 37 °C 热处理条件下 *AyHSF* 的表达情况

Fig. 3 Expression of *AyHSFs* under heat shock at 37 °C

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 AyHSF1 的亚细胞定位

如图 4 所示, 在 25 °C 条件下, 与空载体对照相比, GFP-AyHSF1 融合蛋白在细胞质、核、膜均有定位; 在 37 °C 处理 0.5 h 后, GFP-AyHSF1 融合蛋白主要定位在细胞核内。

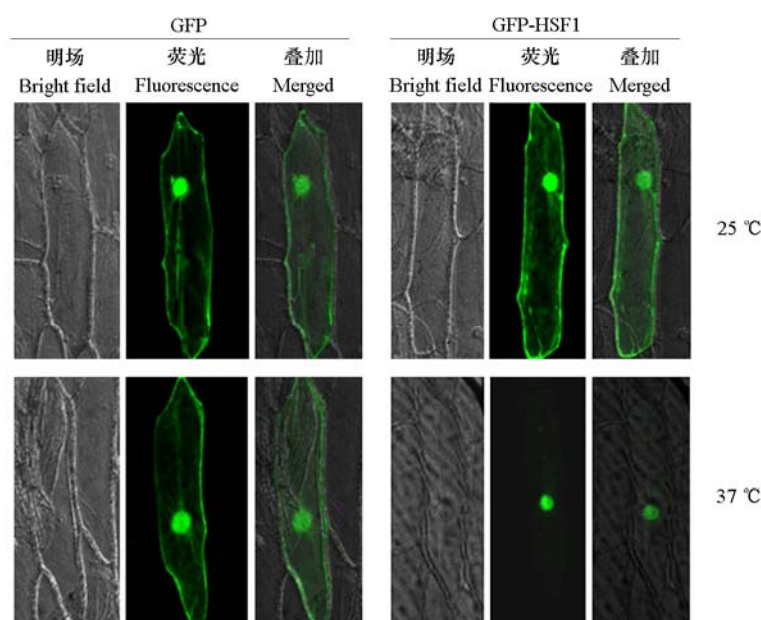


图 4 AyHSF1 在 25 °C 和 37 °C 条件下的亚细胞定位
 Fig. 4 Sub-cellular localization of AyHSF1 at 25 °C and 37 °C

3 讨论

基于模式植物拟南芥和水稻基因组测序结果, 研究者们获取了这两个物种 HSF 的准确信息, 分析表明: 拟南芥有 21 个 HSF, 水稻有 33 个 HSF (Miller & Mittler, 2006; Guo et al., 2008)。矮斗菜染色体组较小, 花形花色极其丰富, 自花结实率高, 系统发生学地位特殊, 是理想的花色遗传和系统进化学研究材料 (Hodges et al., 2002)。随着矮斗菜基因组测序的完成, 使得有可能从基因组水平对控制矮斗菜某个重要园艺性状的某一类功能基因展开全面研究。

本研究中利用了双子叶模式植物拟南芥的 HSF 作为参考序列, 通过多序列比对和进化树分析, 将 14 个蓝花矮斗菜 HSF 进行了准确分类。对其 DBD 多序列分析表明, 14 个 AcHSF 均存在形成 DNA 结合域的保守蛋白序列。HSF 分类的另一个主要标准为 OD 区的 HR-A/B 之间, 有无一定数量的氨基酸插入 (Nover et al., 1996)。对 OD 区的多序列比对结果发现, 5 个 B 类 HSF 在此处无氨基酸插入, 而 A 和 C 类分别有 21 个和 7 个氨基酸的插入, 这一结果与拟南芥和水稻 (Miller & Mittler, 2006; Guo et al., 2008) 的研究结果相同。此外, 与 A 类 HSF 相比, B 和 C 类通常没有转录激活域 (Nover et al., 1996), 研究在对 AcHSF 序列分析中, 得到了相同的结论。

本研究中采用实时荧光定量 PCR, 检测了 14 个 AyHSF 的表达模式, 旨在初步分析 AyHSF 家族成员在热信号传导中发挥的作用。在热激处理前期 (0.5 h), B1 类编码基因 *HSF9* 表达量显著下降。拟南芥 HSF B1 是 A 类成员的抑制子 (Czarnecka-Verner et al., 2000, 2004), 推测华北矮斗菜中 *HSF9* 可能是 A 类 HSF 的抑制子, *HSF9* 在热激前期表达量下降, 使 A 类 HSF 活性提高。拟南

芥中, HSFA5 与 HSFA4 亲缘关系最近, 前者是后者的抑制子 (Baniwal et al., 2007)。AyHSF4 (A4 类) 在热处理前期表达量显著下降, 推测它可能是某个 A 类成员的抑制子。拟南芥中 A2 和 A3 类 HSFs, 尤其是 A2 类表达量受热诱导变化最为剧烈 (Miller & Mittler, 2006; Von Koskull-Döring et al., 2007)。37 °C 处理 3 h, AyHSF2 (A2 类) 和 AyHSF3 (A3 类) 表达量均有极显著上升, 与拟南芥的研究结果类似。

在番茄中, HSFA1 是诱导耐热性的主要调节者, 可以激活其他 HSF 的表达 (Mishra et al., 2002)。在拟南芥中, HSFA1 是热激反应的主调控因子 (Liu et al., 2011; Liu & Charnng, 2012); 4 个 HSFA1 中, HSFA1d 和 HSFA1e 直接调控 HSFA2 表达 (Nishizawa-Yokoi et al., 2011)。本研究中热激处理 0.5 h 和 3 h, AyHSF1 (A1 类) 表达量无显著性变化, 而热激处理 0.5 h, AyHSF1 发生了转位现象, 主要定位在细胞核。这与番茄 HSFA1 研究结果 (Sarge et al., 1993) 相同。据此分析, AyHSF1 可能是热激反应的主要调控因子, 它在热激前期通过蛋白核转位, 激活下游 HSF (如 HSF2) 表达。

References

- Baniwal S K, Chan K Y, Scharf K-D, Nover L. 2007. Role of heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (6): 3605 - 3613.
- Bharti K, Koskull-Döring P V, Bharti S, Kumar P, Tintschl-Korbitzer A, Treuter E, Nover L. 2004. Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1. *Plant Cell*, 16 (6): 1521 - 1535.
- Cao Li, Sun Zhen-yuan, Yi Ming-fang, Han Lei, Xin Hai-bo. 2010. Cloning, expression and subcellular localization of *P5CS* gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (9): 1477 - 1484. (in Chinese)
- 曹 丽, 孙振元, 义鸣放, 韩 蕾, 辛海波. 2010. 多年生黑麦草 *P5CS* 基因的 cDNA 克隆、表达及亚细胞定位. *园艺学报*, 37 (9): 1477 - 1484.
- Czarnecka-Verner E, Yuan C X, Scharf K D, English G, Gurley W B. 2000. Plants contain a novel multimember class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Molecular Biology*, 43 (4): 459 - 471.
- Czarnecka-Verner E, Pan S Q, Salem T, Gurley W B. 2004. Plant class B Hsfs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Molecular Biology*, 56 (1): 57 - 75.
- Gong B H, Yi J, Wu J, Sui J J, Khan M A, Wu Z, Zhong X H, Seng S S, He J N, Yi M F. 2014. LIHSFA1, a novel heat stress transcription factor in lily (*Lilium longiflorum*), can interact with LIHSFA2 and enhance the thermotolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 33 (9): 1519 - 1533.
- Guo J K, Wu J, Ji Q, Wang C, Luo L, Yuan Y, Wang Y H, Wang J. 2008. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Genetics & Genomics*, 35 (2): 105 - 118.
- Hodges S A, Whittall J B, Fulton M. 2002. Genetics of floral traits influencing reproductive isolation between *Aquilegia formosa* and *Aquilegia pubescens*. *The American Naturalist*, 159 (S): 51 - 60.
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, Döring P, Vierling E, Scharf K D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (3): 310 - 316.
- Liu H C, Charnng Y Y. 2012. Acquired thermotolerance independent of heat shock factor A1 (HsfA1), the master regulator of the heat stress response. *Plant Signal Behavior*, 7 (5): 547 - 550.
- Liu H C, Liao H T, Charnng Y Y. 2011. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environment*, 34 (5): 738 - 751.
- Miller G, Mittler R. 2006. Could Heat Shock Transcription Factors function as hydrogen peroxide sensors in plant. *Annals of Botany*, 98 (2): 279 - 288.

- Mishra S K, Tripp J, Winkellaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf K D. 2002. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Development*, 16 (12): 1555 – 1567.
- Nishizawa-Yokoi A, Nosaka R, Hayashi H, Tainaka H, Maruta T, Tamoi M, Ikeda M, Ohme-Takagi M, Yoshimura K, Yabuta Y, Shigeoka S. 2011. HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for the Hsf signaling network in response to environmental stress. *Plant Cell Physiology*, 52 (5): 933 – 945.
- Nover L, Bharti K, Doring P, Mishra S K, Ganguli A, Scharf K D. 2001. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, 6 (3): 177 – 189.
- Nover L, Scharf K D, Gagliardi D, Vergne P, Czarnecka-Verner E, Gurley W B. 1996. The Hsf world: Classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones*, 1 (4): 215 – 223.
- Panchuk I I, Volkov R A, Schoffl F. 2002. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129 (2): 838 – 853.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-shock-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (49): 18822 – 18827.
- Sarge K D, Murphy S P, Morimoto R I. 1993. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involved oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Molecular Cell Biology*, 13 (3): 1392 – 1407.
- Scharf K D, Rose S, Zott W, Schöffl F, Nover L. 1990. Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. *EMBO Journal*, 9 (13): 4495 – 4501.
- Scharf K D, Heider H, Höhfeld I, Lack R, Schmidt E, Nover L. 1998. The tomato Hsf tomato Hsf system: *HsfA2* needs interaction with *HsfA1* for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Molecular Cell Biology*, 18 (4): 2240 – 2251.
- Sharma B, Yant L, Hodges S A, Kramer E M. 2014. Understanding the development and evolution of novel floral form in *Aquilegia*. *Current Opinion Plant Biology*, 17: 22 – 27.
- Sun Ming-xiao, Zhao Ting, Gao Ang, Jia Xu, Gong Jiang, Lu Feng, Zhao Peng-hui, Yuan Dong-ya, Ni Shi-feng. 2011. Overview of pharmacological research on *Aquilegia* L. *Journal of Liaoning University of TCM*, 13 (4): 83 – 84. (in Chinese)
- 孙明晓, 赵 婷, 高 昂, 贾 旭, 巩 江, 路 锋, 赵鹏辉, 袁东亚, 倪士峰. 2011. 矮斗菜属药学研究进展. *辽宁中医药大学学报*, 13 (4): 83 – 84.
- Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimical Biophysics Acta*, 1577 (1): 1 – 9.
- Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 579 – 620.
- Von Koskull-Döring P, Scharf K D, Nover L. 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Science*, 12 (10): 452 – 457.
- Xin H B, Zhang H, Chen L, Li X X, Lian Q L, Yuan X, Hu X Y, Cao L, He X L, Yi M F. 2010. Cloning and characterization of HsfA2 from lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Reports*, 29 (8): 875 – 885.
- Zhang L R, Li Y S, Xing D, Gao C. 2009. Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (7): 2073 – 2091.
- Zheng De-cheng, Wang Fei, Liu Xiao-dong. 2009. The biological characteristics of flowering and fruiting of *Aquilegia oxysepala*. *Hubei Agricultural Sciences*, 48 (2): 292 – 293. (in Chinese)
- 郑德承, 王 非, 刘晓东. 2009. 尖萼矮斗菜开花结实的生物学特性. *湖北农业科学*, 48 (2): 292 – 293.
- Zhu Rui-rui, Gao Yi-ke, Zhang Qi-xiang. 2010. Optimization of AFLP of *Aquilegia*. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*, 25 (S): 38 – 40. (in Chinese)
- 朱蕊蕊, 高亦珂, 张启翔. 2010. 矮斗菜属 AFLP 体系的建立和优化. *华北农学报*, 25 (S): 38 – 40.
- Zhu Rui-rui, Yang Shan-shan, Ming Xiao, Gao Yi-ke. 2009. Research on regeneration of callus and adventitious bud of *Aquilegia vulgaris*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 21 (7): 81 – 82. (in Chinese)
- 朱蕊蕊, 杨姗姗, 明 晓, 高亦珂. 2009. 矮斗菜愈伤组织和不定芽诱导的初步研究. *江西农业学报*, 21 (7): 81 – 82.