

张 杰, 单宝来, 田永生, 等. 葡萄 *HSP17* 基因的合成与功能分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 503-509.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.004

葡萄 *HSP17* 基因的合成与功能分析

张 杰¹, 单宝来¹, 田永生², 彭日荷², 姚泉洪², 汪良驹¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 上海市农业科学院生物技术研究所, 上海 201106)

摘要: 为了探究葡萄 *HSP17* 基因(*VvHSP17*)的功能, 以过量表达 *VvHSP17* 的转基因拟南芥幼苗为材料, 研究了高温胁迫对植株形态、叶绿素含量、丙二醛含量、脯氨酸含量、超氧化物歧化酶(*SOD*)活性的影响, 同时还观察了苯酚胁迫对植株形态和种子萌发率的影响, 并且比较了不同基因型植株对苯酚吸收降解能力的差异。结果表明, 与野生型相比, 转 *VvHSP17* 基因拟南芥抗高温和苯酚胁迫的能力明显增强, 逆境胁迫导致的叶绿素含量下降较少, 丙二醛含量增幅较小, 脯氨酸含量大幅升高, *SOD* 酶活性较高, 种子萌发率较高, 处理液中苯酚残留量少。说明转 *VvHSP17* 基因拟南芥对物理性高温胁迫和化学性苯酚胁迫都有较高的耐受性。

关键词: 葡萄; 小分子热激蛋白; 转基因; 高温胁迫; 苯酚胁迫

中图分类号: S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0503-07

Synthesis and functional analysis of *HSP17* gene in grape

ZHANG Jie¹, SHAN Bao-lai¹, TIAN Yong-sheng², PENG Ri-he², YAO Quan-hong², WANG Liang-ju¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Biotechnology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: The synthetic *VvHSP17* gene was overexpressed in *Arabidopsis thaliana* to study the morphology of transgenic plants and the changes of chlorophyll content, MDA content, proline content and *SOD* enzyme activity in response to high temperature. In addition, the differences in phenol uptake, seed germination, and plant growth were compared under phenol stress in transgenic and wild *Arabidopsis*. Compared with wild type, the tolerances of transgenic *Arabidopsis* to heat stress and phenol stress were significantly improved. The chlorophyll content in the transgenic plants was less decreased, while the MDA content was less increased. The proline content accumulated more, super oxide dismutase (*SOD*) activity was higher, seed germination was higher, and the phenol residual in culture liquid was lower. The results confirmed that the *VvHSP17* gene increased the heat and phenol tolerance of *A. thaliana*.

Key words: grape; small heat shock protein; transgene; high temperature stress; phenol stress

收稿日期: 2016-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401820); 江苏省自然科学基金项目(BK20140702); 江苏省苏北科技发展计划项目(BN2012035)

作者简介: 张 杰(1989-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 从事果树生物技术研究。(E-mail) zhangjieshanxyu@163.com

通讯作者: 汪良驹, (E-mail) wlj@njau.edu.cn

热激蛋白(Heat shock proteins, HSP)是一类温度响应蛋白, 在植物遭受高温胁迫时表达会得到增强^[1-3]。根据它的分子量大小, 可以分成 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小分子热激蛋白 sHSP 等^[4-5]。在耐高温植物中, 小分子热激蛋白存在最为丰富。热激蛋白作为分子伴侣, 有利于蛋白质的正确折叠、运输以及维持蛋白质构象和功能的

稳定^[6]。

sHSP 分子量在 1.2×10^4 至 4.5×10^4 之间,都具有保守的 C 段 α -crystalline 结构域,在所有类型的热激蛋白中保守性最低。与其他热激蛋白不同,小分子热激蛋白不能独自使非变性蛋白质重新再折叠,但是它能够与其他热激蛋白以及未折叠蛋白组成复合物^[7-10]。

小分子热激蛋白在植物抗逆防御中发挥重要作用。超表达 *AtHSP17.6A* 基因增强了拟南芥对干旱和盐胁迫的抗性^[11]。过量表达莲 *NnHSP17.5* 基因提高了拟南芥种子的活力^[12]。紫花苜蓿线粒体 *MsHSP* 基因在烟草中过量表达可提高转基因植株对砷胁迫的抗性^[13]。月季 *Rchsp17.8* 基因转化的烟草,在高温下表现出明显耐受性^[14]。本研究根据 NCBI 数据库公布的葡萄热休克蛋白 (GenBank No: CAN65631.1) 氨基酸序列,进行密码子偏爱性改造,用 PTDS (PCR-based two-step DNA synthesis) 法合成 *VvHSP17* 基因,通过拟南芥异源过表达,对该基因在高温和苯酚胁迫 2 种非生物逆境中的功能进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 于人工气候室中培养, 22 ℃, 16 h, 5 000 lx。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、农杆菌菌株 GV3101 由上海市农业科学院生物技术研究所有保存, pMD18-T、VectorpBluescript II SK 等购自 TaKaRa 公司。

1.2 *VvHSP17* 基因的合成

根据 NCBI 数据库公布的葡萄热休克蛋白 (GenBank No: CAN65631.1) 氨基酸序列,进行密码子偏爱性改造,通过 PTDS 方法合成 *VvHSP17* 基因,然后克隆并测序。

1.3 表达载体的构建

在目的基因的两端插入 *Bam* H I 和 *Sac* I 酶切位点,与表达载体连接后,经酶切鉴定、测序得到植物二元表达载体,基因的表达通过 CAMV 35S 启动子+ TMV Omega leader sequence 驱动 (图 1)。

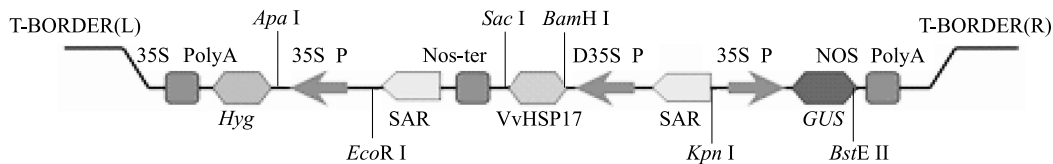


图 1 *VvHSP17* 基因的植物表达载体构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of plant expression vector harboring *VvHSP17* gene

1.4 *VvHSP17* 基因的拟南芥转化及转基因植株的鉴定

将构建好的含有 *VvHSP17* 基因的质粒转化农杆菌 GV3101,然后通过农杆菌蘸花法浸染拟南芥,潮霉素筛选和 GUS 染色筛选后得到的阳性纯合植株进一步进行 PCR 鉴定。所用上游引物: 5'-GGCT-GATGTTCTGGTCT- 3'; 下游引物: 5'-TCTTTGCT-GCTTCCTTTG- 3'。Southern 分析依照 Sambrook 等方法^[15]进行。

1.5 高温胁迫处理后转基因拟南芥形态变化以及生理指标的测定

1.5.1 形态变化观察 将野生型和转基因拟南芥同时放入培养箱, 42 ℃ 处理 16 h。然后放回到 22 ℃ 人工气候室内, 恢复 14 d, 观察表型变化。

1.5.2 生理指标测定 将野生型和转基因拟南芥放入培养箱, 42 ℃ 处理 2 h, 用于生理指标测定。叶绿素含量的测定采用分光光度法^[16]。丙二醛 (MDA) 含量的测定采用硫代巴比妥酸法^[17]。脯氨酸 (Proline) 含量的测定采用酸性茚三酮法^[17]。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性用 NBT 光还原法测定^[18]。

1.6 转 *VvHSP17* 基因拟南芥对苯酚胁迫的抗性分析

1.6.1 对拟南芥种子萌发率的影响 拟南芥种子消毒洗涤后, 平铺在苯酚浓度分别为 0 mg/L、30 mg/L、50 mg/L 和 70 mg/L 的 MS 固体培养基上培养, 每隔 12 h 记录种子萌发数。

1.6.2 对拟南芥幼苗生长的影响 将消毒、洗涤过

的拟南芥种子平铺在浓度为 0 mg/L、30 mg/L、50 mg/L 和 70 mg/L 苯酚的 MS 平板上,将 MS 平板垂直摆放在光照培养室中,培养 14 d 左右,观测野生型和转基因拟南芥根长的变化。

1.6.3 转 *VvHSP17* 基因拟南芥对苯酚的降解 野生型和转基因拟南芥种子经春化 2 d 后,同时铺在 MS 平板上,在正常条件下生长 14 d。将幼苗移至营养液中培养 7 d,之后用含 50 mg/L 苯酚的水溶液进行水培处理。3 d 后测定水培处理液中苯酚的残留量,以判定植株对苯酚的吸收降解能力。苯酚测定方法采用紫外分光光度法^[19]。

1.7 数据处理与分析

试验测定均重复 3 次以上,所得数据用 SPSS13.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *VvHSP17* 基因的合成

对葡萄热休克蛋白 (GenBank No: CAN65631.1) 的氨基酸序列进行拟南芥偏爱的密码子改造,采用 PTDS 方法合成基因。*VvHSP17* 基因与野生型基因序列对比见图 2。

野生型	ATGTCGCTAATTCCTGCGATCGAATGTTTTGATCCATTCTCTCTGAGGTATGGGAT	60
合成型	ATGATCTCTATTCCTGCGAGAAATTAATGTTTTGATCCATTCTCTCTGAGGTATGGGAT	60
Consensus	atg ct attcct g ga aatgtttttgatccatt tct ga gt tggga	
野生型	CCATTGAGGTTGGCCATTCAAGAGCAACTTCCTCTCTCTGATCAATCCGTTCC	120
合成型	CCATTGAGGTTGGCCATTAAAGTAAATTAGAACTCTCTCTGATCAATCCGTTCC	120
Consensus	cc ttgtga ggttggccatt aa ag aa tt g tct tgatca at cc	
野生型	GGTTTCCCGCAGAAACCTGCTCTCTCTCTGATCAATCCGTTCC	180
合成型	GGTTTCCCGCAGAAACCTGCTCTCTCTCTGATCAATCCGTTCC	180
Consensus	ggttt cc gc gaaac tttgt ca gc ag gt ga tgggaaggaaac cca	
野生型	AATCTCAGCTCTTCAAGGCTGATGTCCTGGGCTGAAGAAGGAGGACTCAAGGTGGA	240
合成型	AATACTCACTTTAAGGCTGATGTCCTGGCTGAAGAAGGAGGACTCAAGGTGGA	240
Consensus	aat tca gt tt aaggtctgatgt cctgg ct aagaaggaggga ct aaggt ga	
野生型	GTTGAAGAGGGGCGGTTCTTCAGATCAGCGACAGAGAAACGGAAGTGGAGGAAG	300
合成型	GTTGAAGAGGGGCGGTTCTTCAGATCAGCGACAGAGAAACGGAAGTGGAGGAAG	300
Consensus	gttgaa ga gg g gttcttcagat ag ggacagagaaa g gaact ga ga aag	
野生型	ACGAGCACTTGGCAGCGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	360
合成型	ACGAGCACTTGGCAGCGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	360
Consensus	ac ga acttggca g gt gag g ag ag gg ag tt t ag ag tt g ct	
野生型	CCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	420
合成型	CCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	420
Consensus	cc ga ga gc aaggt gatca gt aa gc gc atgga gatggtgt t actgt	
野生型	ACTGTCCAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	480
合成型	ACTGTCCAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	480
Consensus	actgt ccaaaaggga gc gc aagaagcc gatgt aag attcaaat tgg t a	

图 2 按照拟南芥偏爱的密码子改造的 *VvHSP17* 基因碱基序列与原序列的同源性对比

Fig.2 Homology of the original sequence and the modified *VvHSP17* gene sequence according to *Arabidopsis thaliana* preferred codons

2.2 转 *VvHSP17* 基因拟南芥阳性纯合植株的 PCR 鉴定与 Southern 杂交分析

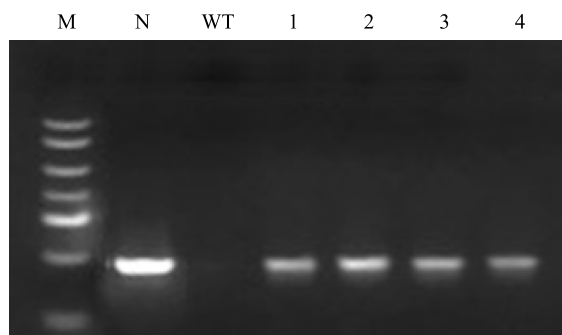
对潮霉素筛选和 GUS 染色筛选后得到的阳性纯合植株进一步进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定结果见图 3。

转基因拟南芥基因组 DNA 分别经 *Dra* I 和 *Eco* I 酶切之后,以³²P 标记的 *VvHSP17* 基因 (*Bam*HI 和 *Sac* I 的酶切片段)为探针进行 Southern 杂交。结果 (图 4) 显示,在 3 个不同株系的转基因拟南芥中,都有 1 条非常明显的杂交条带,而野生型植株中没有杂交条带出现。这说明 *VvHSP17* 基因在转基因拟南芥基因组中以单拷贝形式存在。

2.3 转 *VvHSP17* 基因拟南芥对高温胁迫的抗性

由图 5 可知,经高温胁迫后,转基因拟南芥植株除了基部少量叶片出现枯黄萎蔫外,其他叶片生长健壮,而野生型株系叶片枯黄萎蔫的数目和程度都明显高于转基因株系,说明转 *VvHSP17* 基因植株耐高温胁迫能力明显增强。

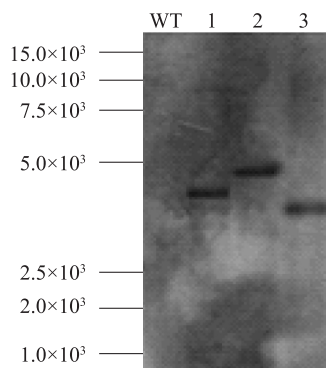
叶绿素是植物光合系统中的重要成分。高温胁迫前野生型植株和转基因拟南芥叶片中叶绿素含量大致相同,高温处理后野生型和转基因拟南芥的叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量都有不同程度下降 (图 6)。但是,两者下降幅度存在显著差异,野生型拟南芥的叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量下降幅度明



M: Marker; N: 阳性质粒; WT: 野生型拟南芥; 1~4: 转基因株系。

图 3 转 *VvHSP17* 基因拟南芥阳性植株的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of positive plants of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana* by PCR



WT 为野生型拟南芥; 1~3 分别代表转基因株系 66-2 (*Dra* I 酶切)、66-4 (*Dra* I 酶切)、66-18 (*Eco* I 酶切)。

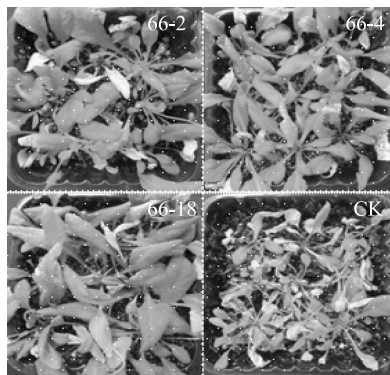
图 4 转 *VvHSP17* 基因拟南芥的 Southern 杂交

Fig.4 Southern blot of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana*

显大于转基因拟南芥的下降幅度,说明 *VvHSP17* 能显著提高拟南芥叶片对高温胁迫的抵抗能力。

植物在受到伤害时,会发生质膜过氧化。而 MDA 是质膜氧化的最终分解产物,因此 MDA 含量可反映植物遭受质膜过氧化伤害的程度。由图 7 可知,高温胁迫前,转基因和野生型拟南芥植株体内 MDA 含量基本相同。高温处理后,植株的 MDA 含量均增加,其中野生型拟南芥 MDA 含量增加了近 1 倍,而转基因拟南芥 MDA 含量增幅较小。说明在高温胁迫下,转基因拟南芥受到的质膜过氧化作用较弱,所受伤害程度较轻,具有较强的耐热性。

脯氨酸是植物体内非常重要的渗透调节物质,脯氨酸含量能够在一定程度上反映植物的抗逆性。



66-2、66-4、66-18: 转基因株系; CK: 野生型拟南芥。

图 5 超表达 *VvHSP17* 基因对拟南芥转基因植株高温耐受能力的影响

Fig.5 Effect of overexpression of *VvHSP17* gene on heat tolerance of transgenic *A. thaliana*

高温胁迫前,转基因和野生型拟南芥植株体内脯氨酸含量相差不大。高温胁迫后,转基因拟南芥比野生型拟南芥积累了更多的脯氨酸(图 8)。说明转入 *VvHSP17* 基因可以诱导高温胁迫下拟南芥叶片合成更多脯氨酸。

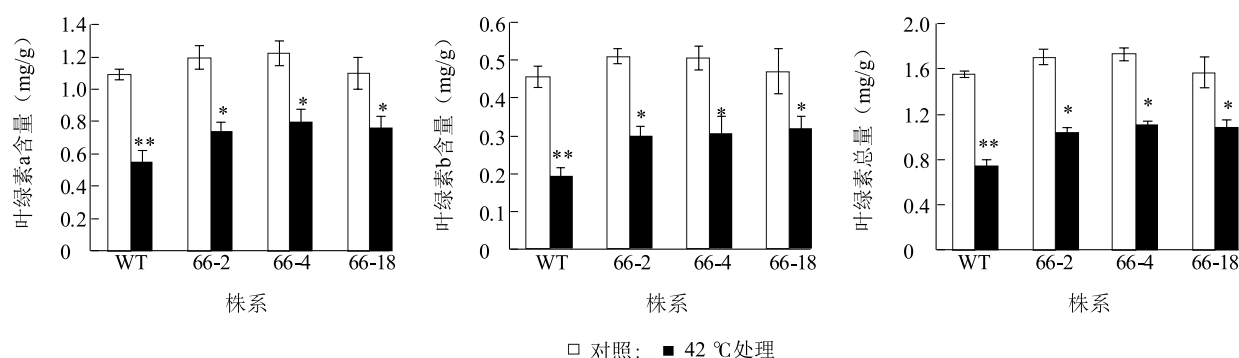
植物遭受非生物胁迫时细胞内会产生抗氧化酶以清除活性氧,减少自身受到的伤害。由图 9 可知,高温胁迫下,转基因拟南芥和野生型拟南芥 *SOD* 活性都明显增加,但转基因拟南芥的 *SOD* 活性增加更加显著。说明转 *VvHSP17* 基因拟南芥在高温胁迫下抗氧化酶的活性较高,有利于清除高温胁迫产生的活性氧,提高自身抗高温胁迫的能力。

2.4 转 *VvHSP17* 基因拟南芥对苯酚胁迫的抗性

图 10 显示,在苯酚胁迫 (≥ 50 mg/L) 下,野生型拟南芥种子的萌发率明显低于转基因拟南芥。在含有 70 mg/L 苯酚的 MS 培养基上,野生型种子几乎不再萌发,而转基因拟南芥种子依然有 30% 左右的萌发率,说明 *VvHSP17* 基因的过表达提高了拟南芥种子对苯酚的耐受性。

在含 50 mg/L 苯酚的 MS 培养基上,转基因和野生型拟南芥的生长状况存在明显差异(图 11)。转基因幼苗生长发育基本良好,而野生型植株大多子叶发黄苍白,并且根长明显短于转基因拟南芥植株,这说明 *VvHSP17* 基因提高了拟南芥对苯酚的抗性。

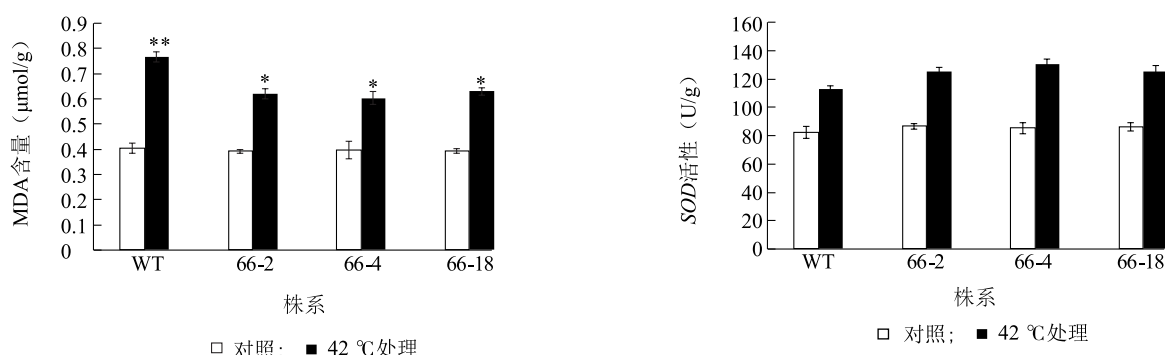
将转基因拟南芥在含 50 mg/L 苯酚的水溶液进



66-2、66-4、66-18:转基因株系;WT:野生型拟南芥。*、** 分别表示与对照相比差异达到显著和极显著水平。

图6 高温胁迫对转基因和野生型拟南芥叶片叶绿素含量的影响

Fig.6 Effects of high temperature stress on the leaf chlorophyll content of wild type and transgenic plants of *A. thaliana*



66-2、66-4、66-18:转基因株系;WT:野生型拟南芥。*、** 分别表示与对照相比差异达到显著和极显著水平。

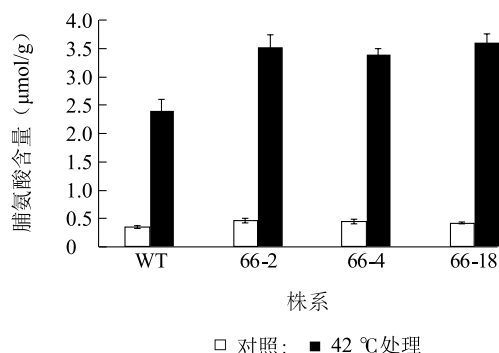
图7 高温胁迫对转 *VvHSP17* 基因拟南芥叶片丙二醛含量的影响

Fig.7 Effects of high temperature stress on the leaf MDA content of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana*

66-2、66-4、66-18:转基因株系;WT:野生型拟南芥。

图9 高温胁迫对转 *VvHSP17* 基因拟南芥叶片 SOD 活性的影响

Fig.9 Effects of high temperature stress on leaf SOD activity of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana*



66-2、66-4、66-18:转基因株系;WT:野生型拟南芥。*、** 分别表示与对照相比差异达到显著和极显著水平。

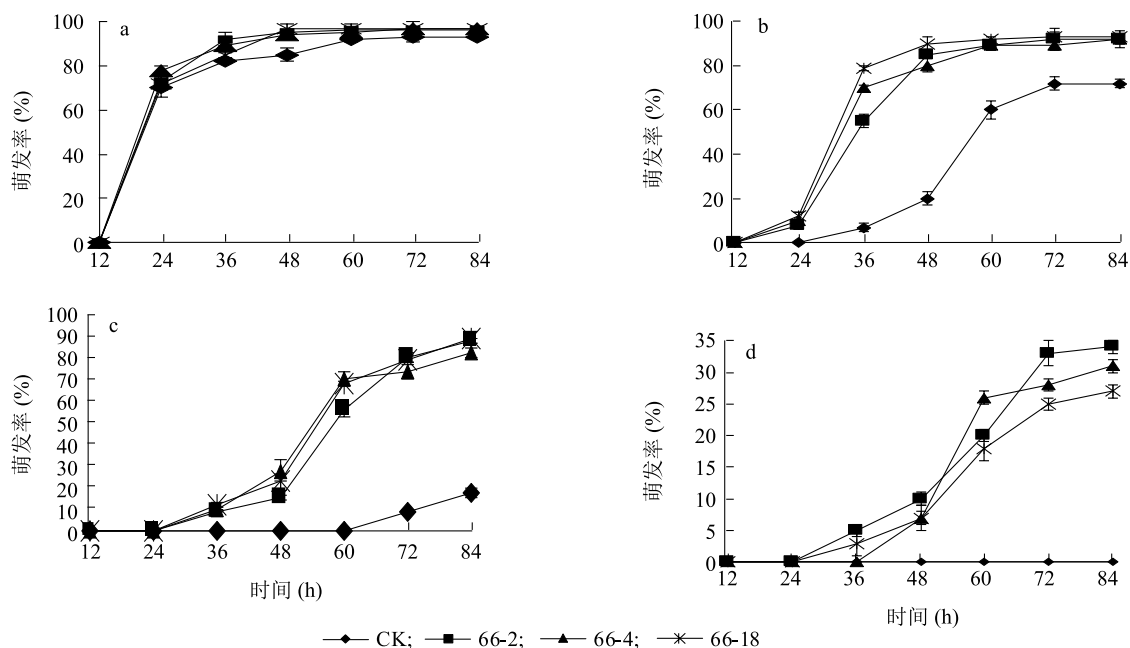
图8 高温胁迫对野生型和转基因拟南芥叶片脯氨酸含量的影响

Fig.8 Effects of high temperature on the proline content of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana*

行水培处理,3 d 后测定水培处理液中苯酚的残留量。结果(图12)显示转基因株系 66-2、66-4 和 66-18 水培处理液中苯酚残留量比空白对照分别减少了 17%、19%和 16%,而野生型减少了 7%。说明转基因拟南芥修复苯酚污染土壤的能力明显提高。

3 讨论

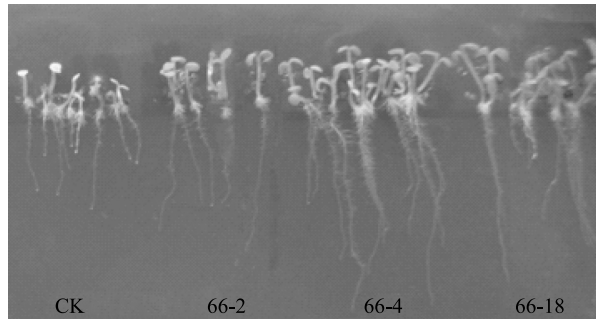
热激蛋白(HSP)是一类高温响应蛋白,在植物逆境防御系统中发挥重要作用。HSP 能被许多逆境诱导,能够减轻逆境胁迫引起的伤害并对其进行修复。众多研究者认为,热激蛋白与植物的耐热性有关。例如,报春 *PFS_{hsp21.4}* 基因转化拟南芥后,热激蛋白 HSP21.4 可有效地减小转基因拟南芥在高温下细胞膜的受损程度,减轻光合系统Ⅱ的损伤,以及维持蛋白质热稳定性^[20]。玉米小分子热激蛋



a: 对照; b: 30 mg/L 苯酚; c: 50 mg/L 苯酚; d: 70 mg/L 苯酚。

图 10 不同浓度苯酚胁迫处理对转 *VvHSP17* 基因拟南芥种子萌发率的影响

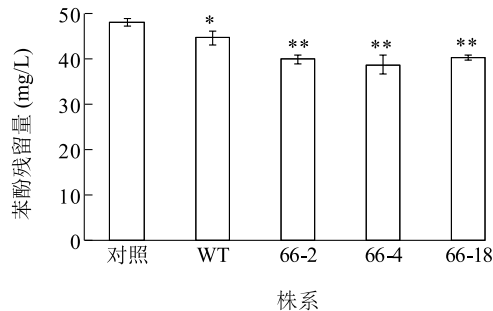
Fig.10 Seed germination of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana* treated with different concentrations of phenol



66-2、66-4、66-18: 转基因株系; CK: 野生型拟南芥。

图 11 转 *VvHSP17* 基因拟南芥幼苗对 50 mg/L 苯酚的抗性

Fig.11 Tolerance of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana* to 50 mg/L phenol



66-2、66-4、66-18: 转基因株系; WT: 野生型拟南芥。*、** 分别表示与对照相比差异达到 0.05 和 0.01 显著水平。

图 12 转 *VvHSP17* 基因拟南芥水培液中苯酚残留量

Fig.12 Changes of phenol residual in culture solution of *VvHSP17* transgenic *A. thaliana*

白 *ZmHSP17.7* 基因表达受高温快速诱导^[21]。月季 *Rchsp17.8* 基因转化的烟草,在高温下表现出明显的耐受性^[14]。本研究结果也证实 *VvHSP17* 基因提高了拟南芥的耐热性,高温胁迫后转 *VvHSP17* 基因拟南芥叶片中脯氨酸含量增幅明显高于野生型对照。有报道称, HSP26 参与了脯氨酸的合成途径,提高了转基因拟南芥株系中游离脯氨酸的含量,增强了植株耐热性^[22]。我们推测过量表达 *VvHSP17* 转基因植株在高温条件下大量积累脯氨酸,有利于增强

植株对高温的抗性。

酚类化合物会造成环境污染,它主要来自于炼油、造纸、合成氨等化工行业。降解酚类化合物的常用方法有物理方法、化学方法,以及微生物修复、植物修复等。植物修复是依靠太阳能作为动力,利用植物吸收、降解和根际圈降解方式去除环境中的有机污染物。植物修复具有处理费用低、对环境干扰小、资源可持续利用等优势,具有广阔的应用前景。本研究中,我们发现异源表达 *VvHSP17* 基因提高了

拟南芥对苯酚的抗性。这为苯酚污染土壤的植物修复提供了一条新的技术路线。转 *VvHSP17* 基因拟南芥对苯酚的抗性可能与 HSP 具有交叉保护功能有关,即不同胁迫蛋白之间必定存在某种功能上的重叠,一种胁迫的产生必定能增强植株对其他胁迫的忍受能力^[23]。Abernethy 等报道,小麦种子萌发早期高温胁迫诱导产生的 HSP 及种子成熟后期积累的 HSP,对提高逆境胁迫下种子萌发率起着重要作用^[24]。本研究获得的转 *VvHSP17* 基因拟南芥对苯酚的吸收降解能力高于野生型拟南芥,这预示 *VvHSP17* 基因在植物修复中具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] 李静婷,刘子记,赵旭耀,等.小麦小分子热激蛋白 *TasHSP16.9* 基因在逆境应答中的表达分析[J].江苏农业科学,2016,44(7):39-41.
- [2] CARRASCO R, ALMOGUERA C, JORDANO J. A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress[J].Biol Chem,1997, 272: 27470-27475.
- [3] 李 翠,侯 蕾,任 丽,等.花生热激蛋白 AhHSP70 与热激因子 AhHSF 基因的克隆及表达分析[J].山东农业科学,2015, 47(4):1-7.
- [4] SANMIYA K, SUZUKI K, EGAWA Y, et al. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants[J]. FEBS Lett, 2004, 557: 265-268.
- [5] QIU X B, SHAO Y M, MIAO S, et al. The diversity of the DnaI/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63: 2560-2570.
- [6] BUCHNER J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones[J]. FASEB,1996, 10: 10-19.
- [7] SUN W, VAN MONTAGU M, VERBRUGGEN N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1577:1-9.
- [8] WANG W, VINOCUR B, SHOSEYOV O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response[J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 244-252.
- [9] CASPERS G J, LEUNISSEN J A M, DE JONG W W. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved 'α-crystallin domain' [J]. Mol Evol, 1995, 40: 238-248.
- [10] BONDINO H G, VALLE E M, TEN HAVE A. Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/α-crystallin family in higher plants[J]. Planta, 2012, 235: 1299-1313.
- [11] SUN W, BEMARD C, VAN DE COTTE B, et al. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression [J]. Plant, 2001, 27: 407-415.
- [12] ZHOU Y, CHEN H, CHU P, et al. NnHSP17.5, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor and seedling thermo tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J].Plant Cell Rep, 2012, 31: 379-389.
- [13] LEE K W, CHA J Y, KIM K H. Over-expression of alfalfa mitochondrial HSP23 in prokaryotic model systems confers enhanced tolerance to salinity and arsenic stress [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(1): 167-174.
- [14] 李 敏,蒋昌华,胡永红,等.月季 *Rchsp17.8* 基因转化烟草的非生物胁迫耐性研究[J].园艺学报,2009,36(8):1191-1196.
- [15] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] 李合生.植物生理生化试验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:134-136.
- [17] 郝建军,刘延吉.植物生理学实验技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1994:9-11,144-145.
- [18] STEWERT R C, BEWLEY J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol, 1980, 65: 245-248.
- [19] 吴雪梅,钟士莲,李丽清.紫外分光光度法测定苯酚注射液中苯酚含量[J].中国医院药学杂志,1995,15(10):452-453.
- [20] 张 路,胡伟娟,张启翔,等.报春 *PFsHSP21.4* 基因转化拟南芥的获得及耐热鉴定[J].分子植物育种,2001,9(5):635-641.
- [21] 孙爱清,葛淑娟,董 伟,等.玉米小分子热激蛋白 *ZmHSP17.7* 基因的克隆与功能分析[J].作物学报,2015,41(3):414-421.
- [22] XUE Y, PENG R H, XIONG A S. Over-expression of heat shock protein gene HSP26 in *Arabidopsis thaliana* enhances heat tolerance[J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(1): 105-111.
- [23] LURIE S, KLEIN J D, FALLIK E. Cross protection of one stress by another[C]//Cherry J. Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance of plants. Berlin: NATO ASI Series, Springer Verlag, 1994:201-202.
- [24] ABEMETHY R H, THIEL D S, PETERSEN N S, et al. Thermo tolerance is developmentally dependent in germinating wheat seed [J]. Plant Physiology, 1989, 89: 569-576.

(责任编辑:张震林)