

核桃 *JrsHSP17.3* 基因克隆及温度胁迫响应模式分析

杨桂燕, 贾彩霞, 孙宇栋, 李 鸣, 翟梅枝*

(西北农林科技大学 林学院 核桃研究中心, 陕西杨陵 712100)

摘要:通过分析核桃(*Juglans regia*)转录组, 鉴定获得核桃热激蛋白家族 *sHSP17.3* 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *JrsHSP17.3*。*JrsHSP17.3* 基因开放读码框 474 bp, 编码产物含 157 个氨基酸, 分子量为 17.64 kD, 理论等电点为 5.35。为了研究该基因表达的组织特异性及温度响应模式, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法, 对高温和低温胁迫下 *JrsHSP17.3* 基因在根、茎、叶中的转录水平进行分析。结果显示, *JrsHSP17.3* 基因在不同组织中均有表达; 经高温(36 °C~52 °C)和低温(16 °C~6 °C)处理后, *JrsHSP17.3* 基因均可被显著诱导, 其中 12 °C 胁迫 1 h 表达最高, 为对照(非处理情况)的 142.02 倍。研究表明核桃 *JrsHSP17.3* 基因能够响应冷热温度胁迫, 为进一步研究 *JrsHSP17.3* 基因的抗寒耐高温特性奠定基础。

关键词:核桃; 热激蛋白; *JrsHSP17.3*; 组织表达; 温度胁迫

中图分类号: Q786

文献标志码: A

JrsHSP17.3 Cloning from *Juglans regia* and Its Expression Profiles in Response to Temperature Stresses

YANG Guiyan, JIA Caixia, SUN Yudong, LI Ming, ZHAI Meizhi*

(Laboratory of Walnut Research Center, Walnut Experimental Station, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The full length cDNA of a *sHSP17.3* was identified by analysis of the transcriptome of *Juglans regia*, which was named as *JrsHSP17.3*. The ORF of *JrsHSP17.3* is 474 bp in length and encodes a 17.64 kDa protein with 157 amino acid residues and the theoretical pI of 5.35. To understand the tissue specific and temperature responsive expression profiles, we analyzed the transcription levels of *JrsHSP17.3* in roots, stems and leaves exposed to heat and cold stresses at different time points by quantitative real time PCR (qRT-PCR). The results showed that *JrsHSP17.3* was expressed more or less in stems, roots and leaves, and was obviously induced after high (36 °C–52 °C) and low (16 °C–6 °C) temperature treatments, among which the highest expression level was 142.02-fold of control under 12 °C for 1 h, suggesting *JrsHSP17.3* could response to heat and cold temperature stresses. These results will provide a basis for further understanding the function of *JrsHSP17.3* in cold and heat tolerance.

Key words: *Juglans regia*; heat shock protein; *JrsHSP17.3*; tissue expression; cold and hot stress

热激蛋白(HSP)是一类受温度刺激诱导表达的蛋白质。自1962年在黑腹果蝇体内发现HSP蛋白以来^[1], 在其他各类生物群包括植物也相继发现了

HSP的存在^[2]。例如, 红藻(*Cyanidioschyzon merolae*)的2个HSP蛋白能同时迅速响应热胁迫, 且与对照比较其表达大于1 000倍^[3]。摇蚊(*Chi-*

收稿日期: 2015-05-05; 修改稿收到日期: 2015-06-02

基金项目: 西北农林科技大学博士科研启动基金(2014BSJJ038); 陕西省科技统筹项目(2012KTZB02-01-01)。

作者简介: 杨桂燕(1986-), 女, 博士, 讲师, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: yangguiyan@nwsuaf.edu.cn

* 通信作者: 翟梅枝, 教授, 主要从事林木遗传改良研究。E-mail: plum-zhai@163.com

ronomus riparius) *HSP27* 基因在 35 °C 能被明显诱导,但在低温胁迫下其表达不明显,4 °C 时该基因的转录水平明显下降,但进入正常生长温度时,其转录水平能迅速恢复并显著过表达,表明该基因对环境刺激因素具有敏锐性^[4]。在 2 °C 胁迫下,胡萝卜 (*Daucus carota*) *DcHSP17.7* 在营养组织中被诱导,且该基因作为分子伴侣阻止低温胁迫导致的蛋白降解,进而有利于植株的抗寒^[5]。

根据分子量大小可以将植物 HSP 分为小 HSPs (sHSPs)、HSP60、HSP70、HSP90 和 HSP100 等 5 类^[6]。其中 sHSPs 是分子量分布在 15 kD~42 kD 的一类 HSP 蛋白^[7],包含具有进化分歧的 N-端、后接一个保守的约由 90 个氨基酸残基组成的 α -crystallin 结构域 (ACD) 以及一个较短的 C-端^[8-9]。sHSPs 的主要功能涉及植株的生长、防御、非生物胁迫响应等多个方面^[10]。例如,从麻风树 (*Jatropha curcas*) 发育种子中克隆获得的 *JcHSP-1* 和 *JcHSP-2* 基因,在植物细胞保护和种子成熟发育中起重要作用^[11];过表达拟南芥 *HSP23* 基因能增强植株的耐盐能力^[12];柽柳 *sHSP* 基因能响应 NaCl、高温、低温等不同胁迫诱导^[13],且 *ThHSP18.3* 能改善转基因酵母的多重抗逆能力^[14]。

核桃 (*Juglans regia*) 属多年生落叶果木,是中国经济林中分布广泛的树种之一,资源丰富。由于全球气候变化,核桃的生长发育、结实坐果等多方面也受到不同程度的影响。特别是中国西北部,频繁的倒春寒现象严重制约了核桃的产量和经济效益。因此研究核桃的温度胁迫响应功能及机理将为预防或调节核桃遭受倒春寒、冷冻害等胁迫提供一定的理论依据。本研究从核桃中克隆获得 *JrsHSP17.3* 基因,分析了核桃 *JrsHSP17.3* 基因在不同温度胁迫下的组织表达模式,以及它对高温和低温胁迫的响应特征,为研究核桃抗寒耐高温相关基因的功能及抗逆机理打下基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料处理

核桃品种‘香玲’种子采自西北农林科技大学核桃研究中心核桃采穗圃。将种子播种于泥炭土:珍珠岩=2:1 (V/V) 的混合土壤中,培养条件为温度 (22±2) °C,光照 14 h/黑暗 10 h,相对湿度 70%~75%。于温室大棚中培育 2 个月,使用光照培养箱进行温度处理。温度处理分别设 36、40、44、48、52 °C 等高温,16、12、10、8 和 6 °C 等低温,处理时间分

别为 1 和 2 h。正常生长条件下的植株未进行处理 (0 h) 设为对照。每个处理设置 3 次重复。

1.2 方法

1.2.1 *JrsHSP17.3* 基因克隆与序列分析 以“heat shock protein”为关键词在‘香玲’核桃叶片转录组中查找相关基因,结果共获得 10 余条 *sHSP* 基因。经 Blast 比对,根据注释结果发现 1 条为 *sHSP17.3* 基因,命名为 *JrsHSP17.3*。用 ORF finder 确定 *JrsHSP17.3* 基因开放读码框 (ORF),再根据 ORF 两端序列设计引物 *JrsHSP17.3*-YZ-F (5'-ATGGATCTCAGAATCATGGGT-3') 和 *JrsHSP17.3*-YZ-R (5'-TTATGCAATCTTAACCTCAATT-3'),进行 PCR 扩增。扩增产物胶回收纯化后,与 pMD-18-T 载体 16 °C 下连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,并在氨苄青霉素存在下筛选培养。挑取阳性克隆扩大培养进行菌液 PCR 确认,对能够产生目的片段的克隆进行测序。利用 ExPasy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对确认的 *JrsHSP17.3* 基因进行分析;利用 BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行序列同源搜索;利用 Clustal 3.0 和 MEGA 软件对不同物种的 *sHSP17* 蛋白进行进化分析。

1.2.2 *JrsHSP17.3* 基因组织表达分析 使用 CTAB 法^[15] 提取各样品总 RNA,经 DNA 酶消化后用 PrimeScript™ RT reagent Kit (CW BIO, 北京,中国) 进行反转录。将获得的 cDNA 稀释 10 倍后作为实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 模板。qRT-PCR 使用 SYBR Green Real time PCR Master mix (CW-BIO) 进行,qRT-PCR 引物为 *JrsHSP17.3*-F (5'-ATGGATCTCAGAATCATG-3') 和 *JrsHSP17.3*-R (5'-CTACCTGGACCTTGATGTC-3')。选取核桃 18S rRNA (HE574850) 基因^[16] 作为内参基因,内参基因引物为 18S-rRNA-F (5'-GGTCAATCTTCTCGTTCCTT-3') 和 18S-rRNA-R (5'-TCGCATTTTCGCTACGTTCTT-3')。反应程序为:94 °C 预变性 30 s;94 °C 变性 12 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,45 个循环;81 °C 读板 1 s,每个样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对定量结果进行分析^[17]。

2 结果与分析

2.1 *JrsHSP17.3* 基因全长 cDNA 的获得及序列分析

通过分析核桃转录组发现其中存在 10 余条

sHSP 蛋白, 经 Blast 分析发现其中 1 条为 *sHSP17.3* (命名为 *JrsHSP17.3*), 根据序列设计起始和末端引物 (*JrsHSP17.3*-YZ-F/R) 进行 PCR 验证, 确认其 ORF 长 474 bp, 编码的蛋白含 157 个氨基酸, 分子量为 17.64 kD, 理论等电点为 5.35 (图 1)。Blast 分析发现该基因具有 α -crystallin (ACD) 保守域, 表明该蛋白为 sHSP 蛋白。

利用 Blastp 搜索同源蛋白进行比对分析, 发现来自不同植物的 sHSP17 蛋白相似性较高, 大于 70%, *JrsHSP17.3* 与葡萄 *VvsHSP17.3* 和毛果杨 *PtsHSP17.7* 同源关系较近 (图 2)。

2.2 高温胁迫下 *JrsHSP17.3* 的表达

提取不同高温处理下核桃根、茎、叶总 RNA, 反转录为 cDNA 后进行 qRT-PCR 分析。结果显示, 高温胁迫下 *JrsHSP17.3* 基因在根、茎、叶中均有不同程度表达, 且主要表现为上调表达 (图 3)。在 44°C 环境胁迫 1h, *JrsHSP17.3* 在根中的表达量

最大, 为对照的 107.63 倍; 在 36°C 时的表达被抑制, 为对照的 11.03%, 52°C 时为对照的 4.50 倍。*JrsHSP17.3* 基因在茎中的变化趋势与根中相似, 36°C 时被抑制表达, 表达量仅为对照的 34.87%, 44°C 时最高, 为对照的 54.95 倍; 叶中的表达趋势与根茎中的表达差异较大, 36°C 为上调表达, 而 40°C 时被抑制, 为对照的 30.99%, 48°C 时被诱导最明显, 为对照的 77.71 倍 (图 3, A)。

2 h 胁迫下, 根的变化略区别于茎和叶, 根中

```

10 atg gat ctc aga atc atg ggt gtg gat tct cca ctg ttc tcc acc
   M D L R I M G V D S P L F S T
55 ctg cag cag atg atg gac ctg gcc gal gac aca gaa aag teg tcc
   L Q Q M M D L A D D T E K S S
100 ttc aac gct cct aca cgc acc tac ctg cgc gac gcc aag gcc atg
   F N A P T R T Y L R D A K A M
145 gct acc act ccc gcc gat gtc aag gag tat cca act tcc tac gtc
   A T T P A D V K E Y P T S Y V
190 ttc atc atc gac atg ccc ggg ctc aag tct ggg gac atc aag gtc
   F I I D M P G L K S G D I K V
235 cag gta gag gat gac aat gtg ctg gtt atg agc ggc gag agg aaa
   Q V E D D N V L V I S G E R K
280 cga gat gag gag aaa gag ggg cca aag tac gtt agg atg gag agg
   R D E E K E G P K Y V R M E R
325 agg atc ggg aaa ttt atg agg aag ttt gtg ctg cct gag aat gcc
   R I G K F M R K F V L P E N A
370 aac aca gat gct atc tcc gcg gtt tgc cag gac gcc gtg ctg act
   N T D A I S A V C Q D G V L T
415 gtg act gtg gaa aag ctt ccg cct cca gaa ccc aag aag ccc aag
   V T V E K L P P P E P K K P K
460 aca att gag gtt aag att gca taa 483
   T I E V K I A *
    
```

图 1 核桃 *JrsHSP17.3* 基因 ORF 全长及推导的氨基酸
Fig. 1 The full length of *JrsHSP17.3* ORF and deduced amino acid sequence

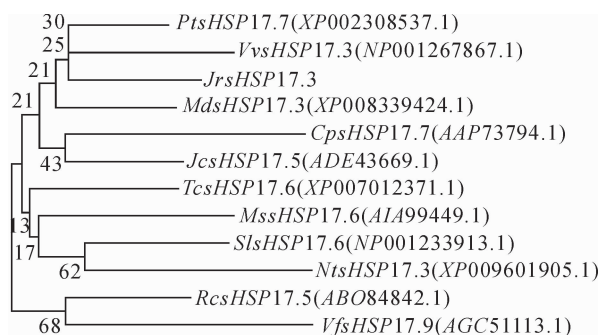


图 2 核桃 *JrsHSP17.3* 蛋白的进化树分析
进化树中蛋白名称后括号内为蛋白 GenBank 登录号;
分支上数值表示 1 000 次重复抽样符合聚类的百分数。

PtsHSP17.7. 毛果杨; *VvsHSP17.3*. 葡萄; *CpsHSP17.7*. 番木瓜;
MdsHSP17.3. 苹果; *JcsHSP17.5*. 麻风树; *RcsHSP17.5*. 蔷薇杂交
品种; *TcsHSP17.6*. 可可; *VfsHSP17.9*. 蚕豆; *MssHSP17.6*. 苜蓿;
SlsHSP17.6. 番茄; *NtsHSP17.3*. 烟草
Fig. 2 The phylogenetic tree analysis of *JrsHSP17.3* protein
The symbol behind the protein in the brackets were
GeneBank numbers. The numbers on the branches mean
the percentages of times the species are grouped together
in the bootstrap analysis for 1 000 replicates.
PtsHSP17.7. *Populus trichocarpa*; *VvsHSP17.3*. *Vitis vinifera*;
CpsHSP17.7. *Carica papaya*; *MdsHSP17.3*. *Malus domestica*;
JcsHSP17.5. *Jatropha curcas*; *RcsHSP17.5*. *Rosa hybrid cultivar*;
TcsHSP17.6. *Theobroma cacao*; *VfsHSP17.9*. *Vicia faba*;
MssHSP17.6. *Medicago sativa*; *SlsHSP17.6*. *Solanum lycopersicum*;
NtsHSP17.3. *Nicotiana tomentosiformis*

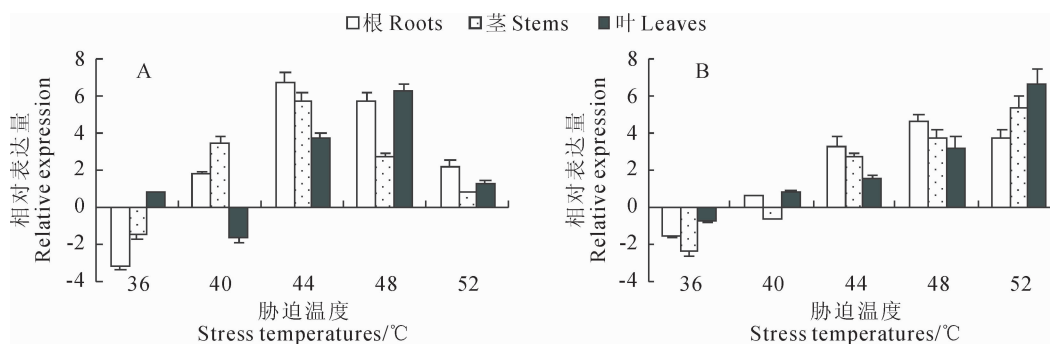


图 3 高温胁迫 1 h(A) 和 2 h(B) 核桃 *JrsHSP17.3* 基因的表达
Fig. 3 Expression of *JrsHSP17.3* exposed to high temperatures for 1 h(A) and 2 h(B)

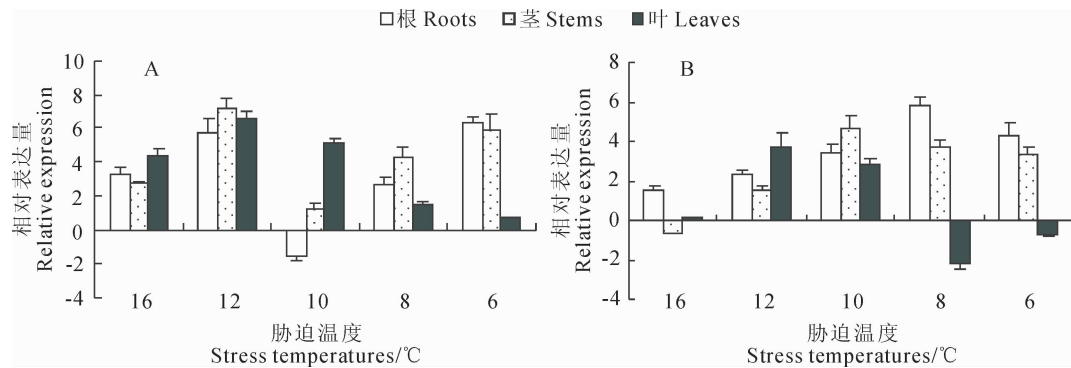


图4 低温胁迫1 h(A)和2 h(B)核桃 *JrsHSP17.3* 基因的表达

Fig. 4 Expression of *JrHSP17.3* exposed to low temperatures for 1 h(A) and 2 h(B)

JrsHSP17.3 的转录水平在 48 °C 时达最大值,为对照的 25.46 倍;52 °C 略低,为对照的 13.45 倍。茎和叶中的表达均在 52 °C 最大,分别为对照的 41.07 和 104.69 倍(图 3,B)。

2.3 低温胁迫下 *JrsHSP17.3* 的表达

低温胁迫后, *JrsHSP17.3* 基因在不同组织和不同时间表现出差异,但主要表现为上调表达。胁迫 1 h,根在 10 °C 被抑制,为对照的 33.68%,其他低温处理下被上调为对照的 6.28~79.89 倍;茎中均为诱导表达,12 °C 最高,为对照的 142.02 倍,6 °C 也被诱导较高水平,为对照 63.12 倍,10 °C 最低,为对照的 2.39 倍;叶中也均为上调表达,在 12 °C 最高,为对照的 93.70 倍,6 °C 最低,仅为对照的 1.67 倍(图 4,A)。胁迫 2 h,根中的表达均为上调表达,相对于对照的表达,被上调了 2.97~55.33 倍;茎中的表达量相对小,如在 10 °C 胁迫下最高,表达为对照的 25.46 倍,在 16 °C 被抑制;叶中的表达比根和茎都不明显,在 8 °C、6 °C 为抑制表达,12 °C 最高,也只有对照的 13.45 倍(图 4,B)。

3 讨论

通过分析‘香玲’核桃转录组和 PCR 验证获得

JrsHSP17.3 基因,它含有 sHSP 蛋白 ACD 保守域,属于 sHSPs 成员;BlastP 分析发现 *JrsHSP17.3* 属于 sHSP17.3 类蛋白,在进化关系上与毛果杨 *PtsHSP17.7* 蛋白、葡萄 *VvsHSP17.3* 蛋白、苹果 *MdsHSP17.3* 蛋白、木瓜 *CpsHSP17.7* 蛋白较近,而与蚕豆 *VfsHSP17.9* 蛋白、蔷薇杂交品种 *RcsHSP17.5* 蛋白、烟草 *NtsHSP17.3* 蛋白、番茄 *SlsHSP17.6* 蛋白较远,表明 *JrsHSP17.3* 蛋白在功能特性上可能与毛果杨、葡萄、苹果、木瓜等的 sHSP17 蛋白相似。

有研究表明 sHSPs 蛋白是植株响应温度变化、

进行温度胁迫保护调节的重要分子伴侣,也是调控其他非生物胁迫响应的重要因子^[12,18]。对拟南芥、水稻等模式植物中有关 HSP 基因的研究较多^[19],木本植物中的研究相对较少。Yang 等^[13]研究柽柳 (*Tamarix hispida*) 9 个 sHSP 基因的表达模式发现,这些 sHSP 基因在温度胁迫下主要表现为上调表达,推测其为柽柳响应温度胁迫调控的重要因子。核桃是中国重要的经济树种,具有重要的经济价值,分布广泛,深受广大人们喜爱,保证核桃的经济效益尤为重要。目前,随着全球气候变化,核桃的生产受到一定的限制,核桃的抗逆机制特别是抗寒耐高温调控机理相关研究亟待进行。

本研究对核桃 *JrsHSP17.3* 基因在不同温度胁迫不同时间时不同组织中的表达水平进行分析,结果发现,相同温度相同时间处理下,根、茎、叶中的表达差异较大。如 36 °C 胁迫 1 h 根中的表达分别为茎和叶的 31.64% 和 6.56%;8 °C 胁迫 1 h,茎中的表达分别为根和叶的 3.20 倍和 7.26 倍。相同组织不同温度处理相同时间下的表达也具有差异,如,根在 36 °C~52 °C 处理 2 h 时其表达值为对照的 0.35~25.46 倍,6 °C~16 °C 胁迫 2 h 时为对照的 2.97~55.33 倍。同一组织在同一温度胁迫不同时间下的表达也有较大差异,如 44 °C 胁迫 1 h 根中的表达是 2 h 时的 11.18 倍,4 °C 胁迫 1 h 叶中的表达是 2 h 的 18.90 倍。表明 *JrsHSP17.3* 基因响应温度胁迫具有组织表达特异性和时序表达特异性,体现了 sHSP 的表达与胁迫温度和时间的关系,与 C. Howarth 等^[20]的结论一致。不同植物 HSP 蛋白的表达具有差异,如柽柳在 4 °C 胁迫 2 h 时 9 个 sHSP 基因的表达差异较大^[13],*JrsHSP17.3* 基因在胁迫 1 h 后表现为明显的上调表达,而有些植物的 sHSP 基因则在胁迫 15 min 后即可被显著诱

导^[21]。表明来自不同植物的同一家族基因的表达,受相同温度诱导的响应时间具有差异性,由此可推知,相同基因在不同植物中,对相同胁迫的调控方式及调节能力可能有一定的差异性。本研究较系统地

分析了核桃 *JrsHSP17.3* 基因在不同温度不同时间胁迫下的表达水平,表明 *JrsHSP17.3* 基因与温度胁迫调控具有一定的关系,为继续研究 *sHSP* 逆境应答功能、核桃抗逆机理打下了基础。

参考文献:

- [1] EHRNSPERGER M, GRABER S, GAESTEL M, *et al.* Binding of non-native protein to HSP25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation[J]. *Embo Journal*, 1997, **16**(2): 221–229.
- [2] VIERLING E. The roles of heat shock proteins in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1991, **42**(1): 579–620.
- [3] KOBAYASHI Y, HARADA N, NISHIMURA Y, *et al.* Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, **6**(10): 2731–2740.
- [4] MART NEZ-PAZ P, MORALES M, MART N R, *et al.* Characterization of the small heat shock protein *HSP27* gene in *Chironomus riparius* (Diptera) and its expression profile in response to temperature changes and xenobiotic exposures[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2014, **19**(4): 529–540.
- [5] SONG N H, AHN Y J. DcHsp17.7, a small heat shock protein from carrot, is upregulated under cold stress and enhances cold tolerance by functioning as a molecular chaperone[J]. *Hortscience*, 2010, **45**(3): 469–474.
- [6] HU X L, LI Y H, LI C H, *et al.* Characterization of small heat shock proteins associated with maize tolerance to combined drought and heat stress[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, **29**(4): 455–464.
- [7] LEE G J, ROSEMAN A M, SAIBIL H R, *et al.* A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state[J]. *The Embo Journal*, 1997, **16**(3): 659–671.
- [8] DE J, CASPERS G J, LEUNISSEN A M, *et al.* Genealogy of the α -crystallin-small heat-shock protein superfamily[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1998, **22**(3–4): 151–162.
- [9] DE J, LEUNISSEN J, VOORTER C, *et al.* Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, **10**(1): 103–126.
- [10] SUN W, VAN M, VERBRUGGEN N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1577**(1): 1–9.
- [11] OMAR S A, FU Q T, CHEN M S, *et al.* Identification and expression analysis of two small heat shock protein cDNAs from developing seeds of biodiesel feedstock plant *Jatropha curcas*[J]. *Plant Science*, 2011, **181**(6): 632–637.
- [12] LEE K W, CHA J Y, KIM K H, *et al.* Overexpression of alfalfa mitochondrial HSP23 in prokaryotic and eukaryotic model systems confers enhanced tolerance to salinity and arsenic stress[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, **34**(1): 167–174.
- [13] YANG G, WANG Y, ZHANG K, *et al.* Expression analysis of nine small heat shock protein genes from *Tamarix hispida* in response to different abiotic stresses and abscisic acid treatment[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, **41**: 1279–1289.
- [14] GAO C, JIANG B, WANG Y, *et al.* Overexpression of a heat shock protein (ThHSP18.3) from *Tamarix hispida* confers stress tolerance to yeast[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(4): 4889–4897.
- [15] YUCHENG W, CHUANPING Y, JING J. The main points and principles of isolating total RNA from ligneous plant tissues[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2002, **30**(2): 1–4.
- [16] XU F, DENG G, CHENG S Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia*[J]. *Molecules*(Basel, Switzerland), 2012, **17**(7): 7810–7823.
- [17] YANG G, WANG Y, XIA D, *et al.* Overexpression of a *GST* gene (*ThGSTZ1*) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance by enhancing the ability to scavenge reactive oxygen species[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, **117**(1): 99–112.
- [18] SCHMIDT R, SCHIPPERS J H M, WELKER A, *et al.* Transcription factor *OsHsfC1b* regulates salt tolerance and development in *Oryza sativa* ssp. *japonica*[J]. *Aob Plants*, 2012: pls011.
- [19] CHO E, HONG C. Over-expression of tobacco *NtHSP70-1* contributes to drought-stress tolerance in plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, **25**(4): 349–358.
- [20] HOWARTH C. Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1991, **14**(8): 831–841.
- [21] ZOU J, LIU A, CHEN X, *et al.* Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, **166**(8): 851–861.