

番茄 *LeHsp110/ClpB* 基因的分子克隆及其对植物耐热性的影响

Molecular Cloning of Tomato *LeHsp110/ClpB* Gene and its Effect on the Thermotolerance in Plant

杨金莹, 孙颖, 孙爱清, 伊淑莹, 刘箭*

YANG Jin-Ying, SUN Ying, SUN Ai-Qing, YI Shu-Ying and LIU Jian*

山东师范大学生命科学学院, 济南 250014

College of Life Science of Shandong Normal University, Jinan 250014, China

摘 要 HSP100/ClpB 是 Clp 蛋白家族的一员, 具有分子伴侣功能, 与细胞“获得耐热性(acquired thermotolerance)”相关。从番茄 cDNA 文库中筛选到长度达 3144 bp 的 cDNA, 依据最长的开放读码框推导出的多肽含 980 个氨基酸残基, 分子进化分析结果表明该蛋白属于 HSP100/ClpB 家族, 因其计算分子量为 110 kD, 所以命名为 LeHSP110/ClpB。实验证明, *LeHsp110/ClpB* 在番茄叶片中没有组成型表达, 为热诱导型基因, 其编码蛋白定位于叶绿体基质。利用农杆菌介导法, 将 CaMV 35S 驱动的反义 *LeHsp110/ClpB* cDNA 片段导入番茄, 高温下转反义基因的番茄株系中 *LeHsp110/ClpB* mRNA 水平明显低于对照, 转基因株系的 PS II 对高温胁迫更加敏感, 说明 HSP110/ClpB 在植物耐热性方面起重要作用。

关键词 热激蛋白, ClpB, 耐热性, 叶绿体

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0052-06

Abstract The heat shock protein ClpB is a member of the Clp family and functions as molecular chaperones. ClpB is related to the acquired thermotolerance in organisms. A cDNA of 3144 bp was screened out of a tomato cDNA library. The polypeptide deduced from the longest ORF contains 980 amino acid residues, and was classified into HSP100/ClpB family based on the result of molecular phylogenesis analysis. Thus it was named as LeHSP110/ClpB according to its calculated molecular weight. *LeHSP110/ClpB* was characteristic of heat-inducibility but no constitutive expression, and was demonstrated to locate in chloroplastic stroma. An antisense cDNA fragment of *LeHsp110/ClpB* under the control of CaMV 35S promoter was introduced into tomato by *Agrobacterium tumefactions*-mediated method. At high temperature, the mRNA levels of *LeHsp110/ClpB* in antisense transgenic plants were lower than those in control plants. The PS II of transgenic plants is more sensitive to high temperature than that of control plants according to data of Fv/Fm. These results clearly showed that HSP110/ClpB plays an important role in thermotolerance of high plants.

Key words HSP100, ClpB, thermotolerance, chloroplast, PS II

Clp(Caseinolytic protease)蛋白广泛存在于原核及真核生物中, 是一个庞大的蛋白质家族(包括 ClpA ~ D, M, N, X 和 Y 等), 在细胞内承担多种功

能^[1]。多数 Clp 蛋白是 ATP 依赖型蛋白酶, 而 ClpB 不具备蛋白酶结构域, 不能水解蛋白质, 但具有 ATP 酶活性和分子伴侣活性, 能瓦解蛋白质聚集体, 并协

Received: August 8, 2005; Accepted: September 21, 2005.

This work was supported by Grants from the National Natural Science Foundation of China(No.30270132).

* Corresponding author. Tel 86-531-86180797; E-mail: jlsd@beelink.com

国家自然科学基金资助课题(No.30270132)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

同其它的分子伴侣修复变性蛋白质^[2]。ClpB 可被高温诱导,是热激蛋白质的一种,按照热激蛋白质的分类标准(按分子量大小),ClpB 属于 HSP100 热激蛋白质家族,因此也命名为 HSP100/ClpB。

ClpB 与细胞耐热性有关。突变大肠杆菌 (*Escherichia coli*) *ClpB* 造成突变株的“基础耐热性”(突然受到致死性高温的处理,细胞表现出的耐热性)显著下降,但“获得耐热性”(经历非致死性高温处理后,细胞提高了对致死性高温的抗性)并没有降低^[3]。而突变酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 胞质的 *Hsp104/ClpB*,不但降低了细胞“基础耐热性”^[4],而且突变株丧失了“获得耐热性”^[5]。Eriksson^[6]等发现 HSP100/ClpB 可以保护蓝藻 (*Synechococcus* sp.) PS II 免受高温伤害,并认为这种保护作用源于 HSP100/ClpB 的分子伴侣活性。

植物胞质 HSP101/ClpB 是植物抗高温胁迫的必需蛋白质^[7]。大豆 (*Glycine max*)^[8] 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[9] *Hsp101/ClpB* 均可以恢复酵母 *Hsp104/ClpB* 突变体的“获得耐热性”,这表明高等植物 HSP101/ClpB 与酵母 HSP104/ClpB 在功能上互补。Hong 和 Vierling^[10]发现拟南芥 hot1-1 突变株(细胞质型 *Hsp101/ClpB* 基因的错义突变)对高温十分敏感,热锻炼后突变株的耐热性没有明显增加,即突变株丧失了“获得耐热性”;Queitsch^[11]利用反义 RNA 方法抑制拟南芥 *Hsp101/ClpB* 的表达,也获得了同样的结果,证明植物胞质 HSP101/ClpB 在植物耐热,特别是“获得耐热性”方面起重要作用。

Sharon^[12]从利马豆中克隆到一个可能定位叶绿体的 *Hsp100/ClpB* 基因,并推测该基因的表达与植物的热适应过程相关,但没有对其功能进行详细研究。本文报道了番茄 *LeHsp110/ClpB* cDNA 的分子克隆,证明 *LeHSP110/ClpB* 蛋白定位于叶绿体基质中,在番茄叶片中没有组成型表达,是典型的热诱导型基因。利用农杆菌介导法,将 CaMV 35S 启动子驱动的反向 *LeHsp110/ClpB* cDNA 片段导入番茄, Northern 分析表明,高温下转基因株系中 *LeHsp110/ClpB* mRNA 水平明显低于对照,热适应后转基因番茄 PS II 的获得耐热性也明显低于对照,说明叶绿体 HSP110/ClpB 在植物获得耐热性方面起重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄:中蔬四号,购自中国农科院,所用质粒和菌种均为本实验室保存。PCR 扩增引物见表 1。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Construct	Primer Sequence
A	5'-CAAGGAATCCTTGCATCGCCAG-3'
	5'-TCCCTCGAGGATCTTGATCAATAAC-3'
B	5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3'
	5'-TCTGGATCCGCAACAATTGCTTG-3'
C	5'-TAGTAGTAGCTCTGTATCT-3'
	5'-TAAGAGCTCTCACTATAGGGC-3'
D	5'-TGGATCCGCAACAATTGCTTG-3'
	5'-TAAGAGCTCTCACTATAGGGC-3'

1.2 方法

1.2.1 番茄 *Hsp110/ClpB* 基因的分子克隆:对番茄 cDNA 文库^[13]的 1000 个 EST 数据进行分析,发现 1 个类似 *Hsp110/ClpB* 的 cDNA 片段(2310 bp),以此 cDNA 的 5'端 800 bp DNA 片段为探针,筛选 cDNA 文库,获得全长的番茄 *Hsp110/ClpB* cDNA,并命名为 *LeHsp110/ClpB*(GenBank 注册号 AB219939)。

1.2.2 Southern 和 Northern 分析:以番茄成熟叶片为实验材料提取基因组 DNA^[14],然后分别用 *EcoR* I, *EcoR* V 和 *Hind* III 完全酶切。选取 *LeHsp110/ClpB* 基因 5'端 795 bp 的 DNA 片段(该片段包括 5' UTR 区,叶绿体信号肽编码区和部分 *Hsp100/ClpB* 基因在进化上的高变异区),用 α -³²P-dCTP 标记探针,在高度严谨的条件下,65 ℃ 杂交过夜(杂交液组成为:0.5 mol/L 磷酸缓冲液,7% SDS,10 mmol/L EDTA,100 μg/mL 鲑精 DNA),然后在高度严谨的条件下,依次用 65 ℃ 的 4 × SSC/0.1% SDS、2 × SSC/0.1% SDS 和 1 × SSC/0.1% SDS 洗膜,每次 10 ~ 15 min,利用 X 光片曝光。

用异硫氰酸胍法提取番茄成熟叶片的总 RNA^[15],参照上述 Southern 杂交的制备探针方法和杂交条件,进行 Northern 杂交。

1.2.3 抗体的制备:以 *LeHsp110/ClpB* cDNA 为模板,利用 PCR 扩增 *LeHsp110/ClpB* 的 C 端特异区(编码 HSP110/ClpB 的 Ile⁹⁷至 Pro²³⁷区间的肽链),PCR 所用引物为(A)。PCR 扩增片段经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,与 pGEX-6P-2 载体连接,转化 BL21(DE₃)菌株,用 0.1 mmol/L IPTG 诱导融合蛋白表达,产生的融合蛋白经谷胱甘肽 S-转移酶(GST)Agarose 亲和柱纯化后用作抗原,免疫新西兰兔。

1.2.4 *LeHSP110/ClpB* 的 Western 分析:用缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,1 mmol/L PMSF)研磨植物叶片,研磨液经离心后,上清液中的蛋白质为可溶性全蛋白质。提取的蛋白质用 Bradford 法定量,然

后与等体积的 SDS-PAGE 样品缓冲液混合,将等量的蛋白质样品用 8% SDS-PAGE 分离后,进行 Western 分析。

取 5 叶期的番茄幼苗,暗培养 24 h,采集嫩叶,提取叶绿体蛋白质和叶绿体基质蛋白^[16],将等量的蛋白质样品用 8% SDS-PAGE 分离后进行 Western blot 分析。

1.2.5 反义表达载体的构建及番茄的转化:先以 *LeHsp110/ClpB* cDNA 为模板,PCR 扩增 *LeHsp110/ClpB* 的 1~330 bp DNA 片段(PCR 扩增引物(B)),扩增片段包括 *LeHsp110/ClpB* cDNA 的 5' UTR 区和叶绿体信号肽编码区,是 *LeHsp110/ClpB* 的特异区),扩增的片段经 *Bam*H I 酶切后,正向连入 pBlueScript[®](SK)载体,所构建的载体命名为 pBS-1。再扩增 *LeHsp110/ClpB* cDNA 的 3021~3144 bp 区(PCR 引物为(C)),该区域对应 *LeHsp110/ClpB* mRNA 的 3' UTR 区,含 PolyA 加尾信号),扩增产物经 *Sac*I 和 *Xba*I 双酶切后,连入 pBS-1 载体,产生 pBS-2 载体。利用 *Sac*I 和 *Kpn*I 双酶切 pBS-2 载体,切出的插入子连入植物表达载体 pROK2,构建成反义 *LeHsp110/ClpB* 植物表达载体,形成 CaMV 35S + 反向 *LeHsp110/ClpB* cDNA 片段 + *LeHsp110/ClpB* 的 3' UTR 序列的反义 RNA 表达载体。利用冻融法将构建的反义 *LeHsp110/ClpB* 植物表达载体导入农杆菌 LBA4404,供番茄转化之用。

利用农杆菌介导的叶圆盘法转化番茄^[17](中蔬四号,由中国农科院提供),获得的转基因幼苗移至田间育种,收获的 T1 代转基因番茄种子,在含 50 μ g/mL 卡钠霉素的 MS 培养基上萌发,选取能够生长侧根的幼苗,继续育种,直到获得纯合转基因番茄。

1.2.6 转基因植株的分子鉴定:提取转基因番茄叶片基因组 DNA,利用外源片段特异引物(D)进行 PCR 扩增。扩增产物稀释 100 倍后,进行 Southern 杂交分析。

将转基因植株经 38 $^{\circ}$ C 热激处理 2 h 后,提取叶片总 RNA,参照方法 1.2 进行 Northern 杂交分析。

1.2.7 转基因番茄叶片光系统 II 耐热性分析:选用纯合的转基因番茄植株和未转基因的对照番茄植株,播种在营养钵中,在光照培养箱中培养至 5 叶期,经各种高温处理后,移至 28 $^{\circ}$ C 恢复 12 h,暗适应 30 min 后,用 FMS2 脉冲调制式荧光仪(Hansatech)测定 PS II 荧光参数,按照以下公式计算 PS II 最大光化学效率: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (F_0 为暗适应下初始荧光; F_m 为暗适应下最大荧光)。

2 结果及分析

2.1 番茄 *LeHsp110/ClpB* 基因的分子克隆、表达特性及其蛋白质在叶绿体中的定位分析

LeHsp110/ClpB cDNA 片段全长 3144 bp,最长开放读码框包含 2944 bp,据此推导的多肽含 980 个氨基酸残基,计算的分子质量为 110 kD。TargetP 软件预测,*LeHSP110/ClpB* 蛋白前体含有一个由 76 个氨基酸组成的叶绿体穿膜导肽,预测可靠率为 97.2%,预测可信度为最高级。Western-blotting 分析表明,在叶绿体和叶绿体基质中均存在 *LeHSP110/ClpB*。为更精确地测定细胞中 *LeHSP110/ClpB* 的分子质量,我们利用 8% SDS-PAGE 对 *LeHSP110/ClpB* 进行电泳分离,实测 *LeHSP110/ClpB* 的分子质量 97 kD(图 1),小于计算的蛋白前体分子质量 110 kD,符合理论计算的成熟 *LeHSP110/ClpB* 蛋白分子质量(不包含由 76 个氨基酸组成的信号肽)。以上结果均表明,*LeHSP110/ClpB* 为叶绿体蛋白质。

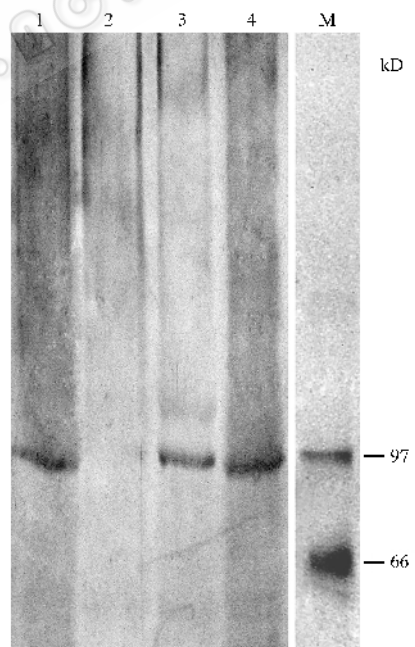


图 1 *LeHSP110/ClpB* 蛋白的 Western 分析

Fig. 1 Western blotting analysis of *LeHSP110/ClpB*

The plant proteins and protein markers (lane M) were separated by 8% SDS-PAGE, and then subjected to Western-blotting (Lane 1-4). The plant proteins were extracted from leaf treated at 38 $^{\circ}$ C for 2 h (lane 1), from purified chloroplast in normal tomato leaves grown at 28 $^{\circ}$ C (lane 2), from purified chloroplast in the tomato leaves treated at 38 $^{\circ}$ C for 2 h (lane 3) and from chloroplastic stroma from tomato leaves treated at 38 $^{\circ}$ C for 2 h (lane 4), respectively.

番茄基因组含有 3 个 *LeHsp110/ClpB* 基因拷贝(图 2),*LeHsp110/ClpB* 没有组成型表达,是典型的热诱导基因。*LeHsp110/ClpB* 转录和翻译的临界温度均

为 34 °C, *LeHSP110/ClpB* 表达高峰的温度是 38 °C, 温度高于 40 °C 时, *LeHSP110/ClpB* 表达略有下降 (图 3), *LeHSP110/ClpB* 呈现热激蛋白的表达特征。

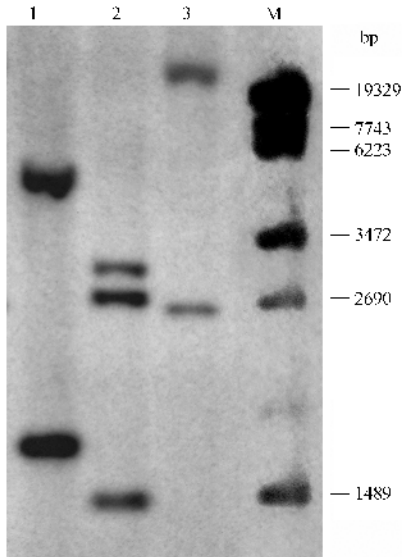


图 2 *LeHsp110/ClpB* 的 Southern 杂交

Fig. 2 Southern hybridization analysis of *LeHSP110/ClpB*. The genomic DNA (10 μ g) was digested with *EcoR* I (lane 1), *Hind* III (lane 2) and *EcoR* V (lane 3). M is DNA marker.

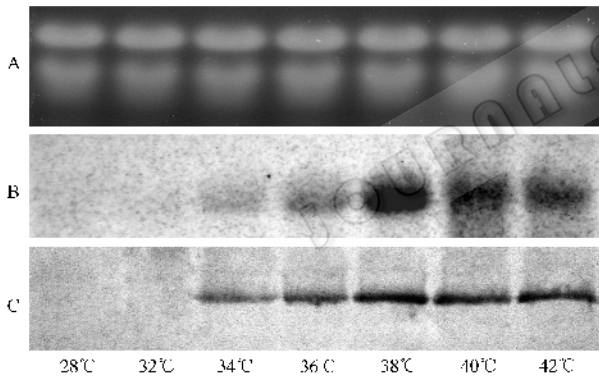


图 3 不同的温度处理番茄 2 h 后, 番茄叶片中 *LeHsp110/ClpB* 的 mRNA 和蛋白质水平

Fig. 3 The levels of mRNA and protein of *LeHSP110/ClpB* in tomato leaves after 2 h treatment at different temperatures indicated in the figure

A : rRNA ; B : Northern hybridization ; C : Western analysis of *LeHSP110/ClpB* in purified chloroplast.

2.2 转反义 *ClpB* 基因植株的获得及分子鉴定

利用农杆菌介导法转化番茄, 共获得 17 个独立转化株系, 其中有 14 个转化系收获种子, 7 个转化系获得纯合的 T3 代。PCR 和 PCR-Southern 鉴定结果表明, 纯合转化系均可扩增出预期的约 520 bp DNA 片段, 说明反义 DNA 片段已经整合在转基因株系的基因组 DNA 上 (图 4)。

5 叶期的番茄植株经 38 °C 高温处理 2 h 后提取总 RNA, 进行 Northern 杂交, 发现转基因植株

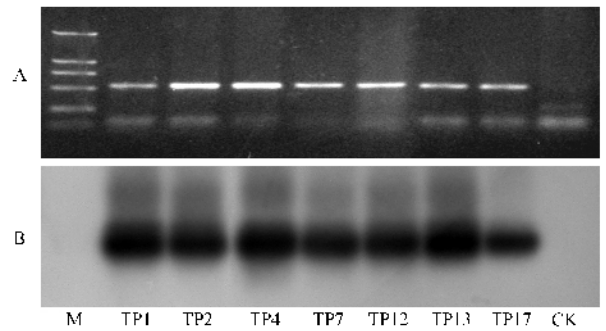


图 4 转反义 *LeHsp110/ClpB* 植株的 PCR (A) 和 PCR-Southern (B) 鉴定

Fig. 4 Identification of *LeHSP110/ClpB* antisense transgenic plants by PCR (A) and PCR-Southern blotting analysis (B)

CK : non-transgenic plant ; TP : transgenic plants , M : DL2000 DNA marke(TaKaRa).

(Transgenic Plants , TP) 的内源 *LeHsp110/ClpB* 的 mRNA 的含量明显低于对照, 其中 TP1、TP2 和 TP7 转化系的内源 *LeHsp110/ClpB* mRNA 下降十分明显 (图 5), TP4 和 TP17 的内源 *LeHsp110/ClpB* mRNA 水平也明显低于对照, 说明利用反义 RNA 技术抑制内源 *LeHsp110/ClpB* 的表达获得预期的结果, 内源 *LeHsp110/ClpB* mRNA 水平下降最明显的 TP1、TP2 和 TP7 转化系也将用于以下的 PS II 耐热性分析实验。而整合 pROK 2 空载体的转基因植株的 *LeHsp110/ClpB* mRNA 水平与 CK 相同, 说明转基因番茄 *LeHsp110/ClpB* mRNA 水平的下降源于反义 RNA 的出现。

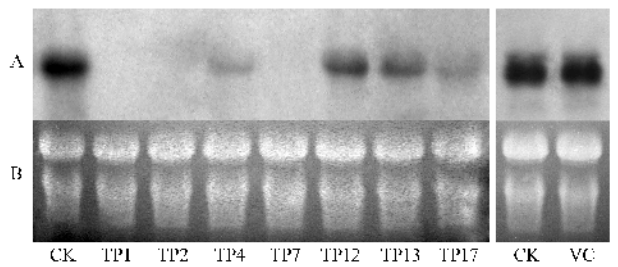


图 5 38 °C 热激 2 h 后, 对照和转基因番茄植株中 *LeHsp110/ClpB* 的 mRNA 水平

Fig. 5 The mRNA levels of *LeHsp110/ClpB* in non-transgenic and differential lines of transgenic tomato after high temperature treatment at 38 °C for 2 h

A : Northern blotting ; B : rRNA ; CK : non-transgenic plant ; TP : transgenic plants ; VC : vector control.

2.3 热胁迫对番茄幼苗叶片 PS II 的影响

叶绿素可变荧光与最大荧光的比值 (F_v/F_m) 反映了 PS II 的最大光能转化效率, F_0 是 PS II 反应中心处于完全开放时的最小荧光产额, 高温造成 PS II 损伤, 导致 F_v/F_m 值下降, F_0 升高^[18]。番茄幼苗经

38℃热适应 2h 后 移至更高温度的环境中处理 2h , 测定叶绿素荧光。结果发现 随胁迫温度逐步升高 , 番茄幼苗叶片的 F_v/F_m 逐步下降 , 其中 3 个转基因番茄株系的 F_v/F_m 下降程度大于对照番茄植株 , 当胁迫高温达到 46℃ 时 , 三个转基因番茄株系的 F_v/F_m 分别降低了 18.5%、22.5% 和 22.5% , 而对照的 F_v/F_m 仅下降 11.8% (图 6) 。以 F_0 为参数 , 其结果是 , 高温胁迫下转基因番茄的 F_0 升高更快 , 当经历 46℃ 胁迫后 , 转基因番茄的 F_0 值分别升高 47.9%、49.3% 和 55% , 而对照的 F_0 仅上升 26.8% (图 7) 。以上 F_v/F_m 和 F_0 数据变化表明 , 转基因番茄植株的能量转换机构 PS II 比对照番茄植株的 PS II 更易受到高温伤害。

将上述处理的幼苗再移至 28℃ 条件下恢复 12h 测定 F_v/F_m 和 F_0 值。结果发现 , 对照番茄的 F_v/F_m 值可恢复至热处理前的 95% , 而 3 个转基因番茄株系的 F_v/F_m 值仅分别恢复到热处理前的 87.9%、85.5% 和 90% (图 6) ; 恢复 12h 后对照番茄的 F_0 值比热处理前高 10.9% , 而 3 个转基因番茄株系的 F_0 值比热处理前高 47.9%、49.3%、55% (图 7) , 说明高温造成 PS II 损伤 , 转基因番茄比对照番茄的 PS II 更难被修复。

3 讨论

高等植物 HSP100/ClpB 是一个蛋白家族 , 其中关于细胞质型 HSP101/ClpB 研究报道较多 , 已经从拟南芥、大豆、玉米、小麦和烟草等植物^[12]中克隆到细胞质型 Hsp101/ClpB 基因。Agarwal^[19]利用分子系统进化方法分析了拟南芥 HSP100/ClpB 家族 , 发现拟南芥 Hsp100/ClpB 家族共有 8 个基因 , 其中 3 个定位于细胞质 5 个可能定位于质体 , 但至今没有关于拟南芥质体型 Hsp100/ClpB 的研究报道。Sharon^[12]从利马豆中克隆到一个可能是叶绿体型的 Hsp100/ClpB 基因 , 并推测该基因的表达与植物的热适应过程相关 , 但没有对其功能进行详细研究。我们从番茄 cDNA 文库中克隆到编码全长 LeHSP110/ClpB 蛋白的基因 , 利用生物信息学和实验方法证明该蛋白定位于叶绿体。

植物生长发育过程中经常遇到高温胁迫 , 叶绿体极易被高温损伤 , 其中叶绿体的光系统 II (PS II) 对高温胁迫十分敏感^[20]。植物在进行光合作用时 , 捕光色素吸收的光能传递到光化学反应中心后 , 一部分光能用来进行光化学反应 , 一部分吸收的光能

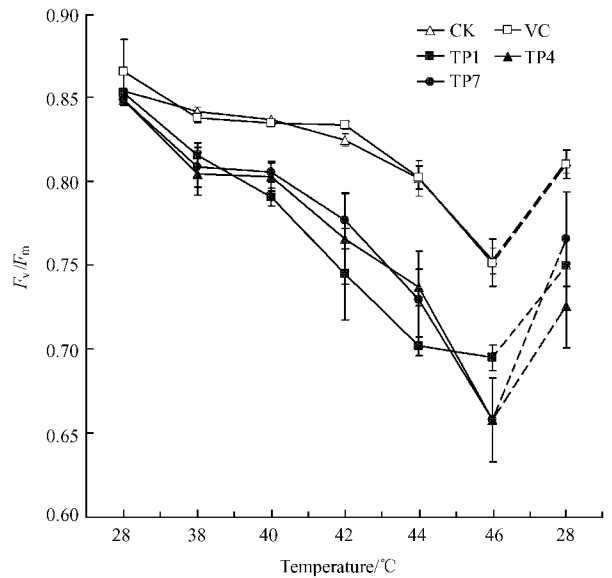


图 6 高温处理对番茄叶片 F_v/F_m 的影响

Fig. 6 Effect of high temperature on F_v/F_m of tomato leaves. The real lines indicated that the control plants and antisense transgenic plants were treated at 38 °C for 2 h, and shifted into growth chamber for 2 h with the different temperatures indicated on X axis and then F_v/F_m was measured. The dashed lines presented that the plants treated at 46 °C for 2 h were shifted into the growth chamber at 28 °C for 12 h of recovery and then F_v/F_m was measured. The light density in growth was 2000 Lux throughout the experiments.

CK : Non-transgenic plant ; TP : Transgenic plants ; VC : Vector control.

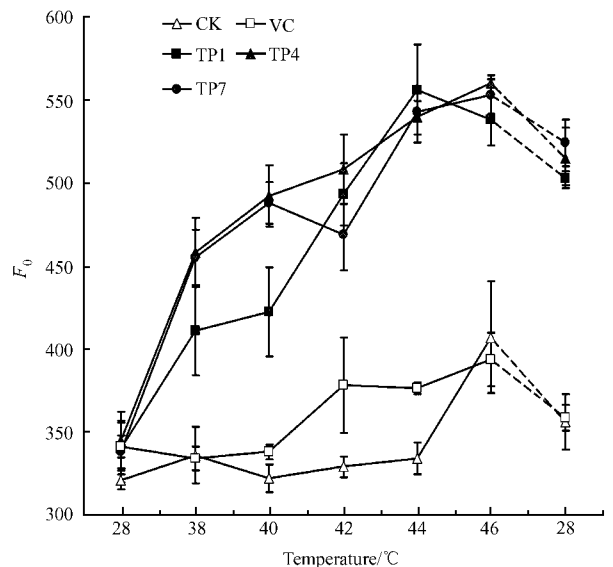


图 7 高温处理对番茄叶片初始荧光 F_0 的影响

Fig. 7 Effect of high temperature on F_0

The experiment conditions were identical to those described in Fig 6.

CK : Non-transgenic plant ; TP : Transgenic plants ; VC : Vector control

以热的形式耗散掉 称为非辐射能量耗散 , 还有一部分能量则以叶绿素荧光的形式耗散掉 , 即辐射能量耗散^[21]。正常情况下 , 大部分吸收的光能 (约 80%~90%) 用来进行光化学反应 , 仅有少部分以热或荧

光的形式耗散掉(分别为 5% ~ 15% 和 0.5% ~ 2%)^[22]。但当植物受到胁迫时,光化学反应下降,而热耗散和叶绿素荧光形式的耗散增加。因此叶绿素荧光的变化可以反映植物受胁迫后 PS II 的损失情况。叶绿素荧光参数 F_v/F_m 值(PS II 原初光能转化效率)和 F_0 值(PS II 反应中心处于完全开放时的最小荧光产额)常被用作植物被高温损伤或抗高温的生理指标^[23]。胁迫导致 PS II 受损,表现为 F_v/F_m 值下降, F_0 上升。

高温下叶绿素荧光的 F_v/F_m 和 F_0 值的变化(图 6,7)说明,不但转基因番茄的“获得耐热性”明显低于对照番茄,而且被高温损伤的 PS II 也更难被修复。鉴于 ClpB 在原核生物^[3]及酵母^[5]、蓝藻^[6]中的分子伴侣功能及 HSP100/ClpB 结构上的高度保守性,我们认为 *LeHsp100/ClpB* 也具备分子伴侣活性,导致转反义 *LeHsp100/ClpB* 番茄株系变得更加敏感的原因可能是,在(38℃)热锻炼过程中,对照番茄的内源 *LeHsp100/ClpB* 被诱导表达,*LeHsp100/ClpB* 可能是利用其分子伴侣活性,瓦解高温造成的蛋白聚集体,从而保护 PS II 免受高温伤害;而转基因番茄的内源 *LeHsp100/ClpB* 的表达受到了抑制(图 5),缺少 HSP110/ClpB 的保护,PS II 更易受高温胁迫的伤害,这说明 HSP110/ClpB 在植物体叶绿体耐热中起重要作用。

REFERENCES(参考文献)

[1] Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Development*, 1997, **11**: 815 - 823

[2] Celerin M, Gilpin AA, Schisler NJ *et al.* ClpB in a Cyanobacterium: Predicted Structure, Phylogenetic Relationships, and Regulation by Light and Temperature. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(19): 5173 - 5182

[3] Squires CL, Pedersen S, Ross BM *et al.* ClpB is the Escherichia coli heat shock protein F84.1. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(14): 4254 - 4262

[4] Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA *et al.* Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO Journal*, 1992, **11**(6): 2357 - 2364

[5] Parsell D A, Kowal AS, Singer MA *et al.* Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, 1994, **372**: 475 - 478

[6] Eriksson MJ, Clarke AK. The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(16): 4839 - 4846

[7] Hong SW, Vierling E. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *The Plant Journal*, 2001, **27**(1): 25 - 35

[8] Lee YRJ, Nagao RT, Key JL. A soybean 101-kD heat shock protein complements a yeast HSP104 deletion mutant in acquiring thermotolerance. *Plant Cell*, 1994, **6**(12): 1889 - 1897

[9] Schirmer EC, Lindquist S, Vierling E. An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell*, 1994, **6**(12): 1899 - 1909

[10] Hong SW, Vierling E. Mutants of Arabidopsis thaliana defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(8): 4392 - 4397

[11] Queitsch C, Hong SW, Vierling E *et al.* Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2000, **12**(4): 479 - 492

[12] Sharon JK, Cynthia MB, Janine GH *et al.* Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean. *Plant Physiology*, 2000, **123**: 1121 - 1132

[13] Liu (刘箭), Shono M. Molecular cloning the gene of small heat shock protein in the mitochondria and endoplasmic reticulum of tomato. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2001, **43**(2): 138 - 145

[14] Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983, **1**: 19 - 21

[15] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, **162**: 156 - 159

[16] Torsethaugen G, Pitcher LH, Zilinskas BA *et al.* Overproduction of Ascorbate Peroxidase in the Tobacco Chloroplast Does Not Provide Protection against Ozone. *Plant Physiology*, 1997, **114**(2): 529 - 537

[17] Holsters M, de Waele D, Depicker A. Transfection and transformation of Agrobacterium tumefaciens. *Mol Gen Genet*, 1978, **163**(2): 181 - 187

[18] Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, **51**(345): 659 - 668

[19] Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Sahi C *et al.* Arabidopsis thaliana Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperones*, 2001, **6**(3): 219 - 224

[20] Yordanov I, Dilova S, Petkova R *et al.* Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. *Photobiochemistry and Photobiophysics*, 1986, **12**: 147 - 155

[21] Roháček K, Barták M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica*, 1999, **37**: 339 - 363

[22] Lichtenthaler H K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 1996, **148**: 4 - 14

[23] Feng JC(冯建灿), Hu XL(胡秀丽), Mao XJ(毛训甲). Application of chlorophyll II fluorescence dynamics to plant physiology in adverse circumstance. *Economic Forest Researches*(经济林研究) 2002, **20**(4): 41 - 43