

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.03.031

美容杜鹃 *RcHsfB3* 基因的克隆及表达分析

陈霞连, 杨华侨, 黎佳欣, 陈可, 曲绮雯, 白洁

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 通过 RT-PCR 和 RACE 方法从美容杜鹃(*Rhododendron calophytum*) 中克隆到一个热激转录因子(Heat shock factors, Hsfs), 命名为 *RcHsfB3* (GenBank 登录号 KU145694). *RcHsfB3* 基因全长 1130bp, 完整的开放读码框(ORF)长 771bp, 预测可编码 257 个氨基酸, 分子量为 28.8KD, 等电点为 5.38. 系统进化树分析发现, 该基因与其它几种植物的 *HsfB3* 基因属于同一分支, 氨基酸同源序列比对结果表明 *RcHsfB3* 与葡萄的 *VvHsfB3* 的同源性最高, 达 67.29%. 原生质体亚细胞定位表明, *RcHsfB3* 编码蛋白定位在细胞核上. 荧光定量 PCR 分析显示, 美容杜鹃分别受到热激、低温和盐胁迫处理后, *RcHsfB3* 的相对表达量总体呈现先上升, 后下降, 且“上升-下降”交替的表达趋势. 初步研究表明 *RcHsfB3* 基因受高温、低温和高盐胁迫的诱导表达.

关键词: 美容杜鹃; *RcHsfB3*; 基因克隆; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0405-06

Cloning and expression analysis of *RcHsfB3* from *Rhododendron calophytum*

CHEN Xia-Lian, YANG Hua-Qiao, LI Jia-Xin, CHEN Ke, QU Qi-Wen, BAI Jie

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: A Heat shock factor (*Hsf*) from *Rhododendron calophytum* was cloned using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques and it was named *RcHsfB3* (accession no. KU145694). The full length was 1130bp, including an open reading frame of 774bp and encoding a protein of 257 amino acids. Its molecular weight and theoretical isoelectric point were 28.8 kDa and 5.38 respectively. Phylogenetic analysis showed that this gene was classified as the same branch with *HsfB3* of other plants, indicating that it belongs to the *HsfB3* gene family. Multiple sequence alignment analysis indicated that the homology reaches 67.29% with *VvHsfB3*, which is highest. The result of subcellular localization in protoplasts exhibited that *RcHsfB3* is located in the cell nucleus. The expression of *RcHsfB3* were examined using real-time polymerase chain reaction. Under heat, cold and salt stress respectively, *RcHsfB3* expression level showed an alternate trend of ‘rising and falling’, remarkably up-regulated. Preliminary studies indicate that *RcHsfB3* will be induced by high temperature, low temperature and high salt stress.

Keywords: *Rhododendron calophytum*; *RcHsfB3*; Gene clone; Subcellular localization; Expression analysis

收稿日期: 2016-01-18

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(2012JY0090); 四川省科技基础条件平台项目—四川大学植物标本数字化平台建设及共享(2014JCP004)

作者简介: 陈霞连(1990-), 女, 江西抚州人, 硕士研究生, 主要研究领域为资源植物学. E-mail: xialianchen_scu@163.com

通讯作者: 白洁. E-mail: baijie@scu.edu.cn

1 引言

近年随着全球气温持续升高,植物的生长也日益受到影响,因此对植物耐热性的研究引起人们的广泛重视.真核生物通过热激反应来提高耐热性和其它胁迫耐受性,而热激转录因子(Heat shock factors, Hsfs)在热激反应中起着主要的调节作用^[1-2].经热激而活化的 Hsfs 可识别存在于热激蛋白(Heat shock proteins, Hsps)基因上游启动子区域的热激元件(Heat Shock Element, HSE)而诱导 *Hsps* 基因的转录. Hsps 可以作为分子伴侣协助其它相关蛋白重新折叠、积累、分配和降解,对受损蛋白的修复和细胞的存活起着重要的作用^[3-4].根据 Hsfs 寡聚域(HR-A/B)结构的不同可将其分为 A、B、C 三类^[5].研究表明, *HsfA1* 在番茄中为组成型表达,在热激反应过程中起主导作用,可诱导 *HsfA2* 和 *HsfB1* 的表达,促进热激蛋白的大量积累^[6-7].拟南芥和番茄的 *HsfA2* 是主要的热激转录因子,热激后 *HsfA2* 大量表达,进而诱导 *Hsp70*、*Hsp101* 和 *Hsp17.4-CII* 的表达^[8].

美容杜鹃隶属于杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃属(*Rhododendron* L.),常绿灌木或小乔木,中国特有种^[9].叶常绿,花大色艳,花姿优雅独特且花期长,是世界著名的观赏花卉,同时美容杜鹃中含有多种黄酮类和挥发油类活性成分^[10-11],具有很高的经济和药用价值.美容杜鹃分布在海拔 1300~4000m 的山区,喜冷凉环境,对高温耐受性差,限制了美容杜鹃的开发和利用.

目前,对美容杜鹃的形态、栽培、组培、化学成分等方面的研究已有相关报道^[10,13],分子方面仅见遗传多样性分析^[14],有关热激蛋白和热激转录因子的研究未见报道.本研究克隆了 *RcHsfB3* 基因,进行了生物信息学相关分析,构建 pBI221-*RcHsfB3* 载体转入拟南芥原生质体后,分析了 *RcHsfB3* 蛋白的亚细胞定位,并利用荧光定量技术探究了美容杜鹃在分别受到热激、低温和高盐等胁迫条件下 *RcHsfB3* 的表达情况.为丰富植物热激转录因子 B 类基因的信息和功能及探究美容杜鹃的抗逆机制奠定基础.

2 材料与方法

2.1 材料试剂

美容杜鹃采自峨眉山雷洞坪,根据罗琳文献^[12]进行组培获得组培苗.

植物总 RNA 提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司,反转录试剂盒、TaqDNA 聚合酶、DNA 纯化回收试剂盒、pEASY-T 载体购自北京全式金生物有限公司,荧光定量试剂盒 iTaq^[TM] Universal SYBR[®] Green Supermix 购自 Bio-Rad 公司,大肠杆菌 DH5 α 菌株、pBI221 载体由本实验室提供,其它化学试剂均为国产或进口分析纯,引物合成、测序由北京擎科生物科技有限公司完成,实验所用引物见表 1.

表 1 反转录与 PCR 引物

Tab.1 Reverse transcription and PCR primers

引物名称	序列(5'→3')
PF1	ACBTWCGANRYGGTGGARGA
PR1	TGDCGWAYGAARCTGGAGAA
PF2	CTCCTCCCTACGCTCTTCAA
PR2	ACCCGAGGACGATGAAGTTGATG
PF3	GCTCTTCAAGCACAGCAACT
PR3	GAAGTTGCTGTGCTTGAAGAGCGTAG
PF4	GCTCTAGAATGATGATGGATTCTGGAG
PR4	TTATTGGCATGACTGAGATAG
PF5	GGACGAGAACAAACGACTGAAG
PR5	GTTGTTTGGAGTGAGGCTGGA
AP	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-GCATGACAGTG(T)18
AP1-1	GTCAACGATACGCTACGTAACG
AP1-2	TACGTAACGGCATGACAGTG
Hsf-RT	CGTTTGTCTCTCGTCCAG
Actin F	GCAACGGATATCTCGGCTCTCGC
Actin R	GGATGGCCTCGGGCGCAACT

2.2 方法

2.2.1 植物处理方法 选取大小、长势一致的美容杜鹃组培苗进行胁迫处理,液氮冷冻后置于-80℃备用.

热激处理:将组培苗置于 40℃ 培养箱中,分别于处理后的 0、0.5、1、2、3、4 和 5h 取供试样品;将组培苗分别置于不同温度的培养箱,处理温度点为 20、25、30、35、40 和 45℃,2h 后取样.取 40℃ 热激 2h 后的组培苗用于基因克隆.

低温处理:将组培苗 4℃ 低温诱导,分别于处理后的 0、1、2、3、4、5 和 6h 取样.

盐胁迫处理:将组培苗转接至含 250mM NaCl 的继代培养基中进行盐胁迫处理,分别处理 0、2、4、6、8d 后取样.

2.2.2 RNA 提取及 cDNA 合成 按照试剂盒操作说明书提取美容杜鹃总 RNA,利用反转录试剂盒

对美容杜鹃总 RNA 进行反转录获得第一链 cDNA.

2.2.3 RcHsfB3 基因的克隆 根据 GenBank 中 *Hsfs* 基因保守区域设计简并引物 PF1 和 PR1, 本研究中所用的引物见表 1, 以美容杜鹃 cDNA 为模板进行 PCR. 根据保守序列设计正向特异引物 PF2 和 PF3 进行巢式 PCR, 第一轮 PCR 引物为 PF2 和 AP1-1, 第二轮 PCR 引物为 PF3 和 AP1-2, 所用模板 cDNA 由接头引物 AP 反转录. 根据已克隆的序列设计反向特异引物 PR2 和 PR3 进行巢式 PCR, 第一轮 PCR 引物为 PR2 和 AP, 第二轮 PCR 引物为 PR3 和 AP1-1, 所用模板 cDNA 先由特异引物 Hsf-RT 反转录, 再纯化, 最后进行同聚物加尾, 即脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)在单链 cDNA 的 5' 端加上一段 polyA 结构. 拼接好目的基因 5' 片段、中间片段和 3' 片段后, 在起始和终止密码子处设计引物 PF4 和 PR4 (带有 XbaI、BamHI 酶切位点), 并扩增 cDNA 全长. PCR 产物纯化回收后连接到克隆载体 pEASY-T, 并转化至大肠杆菌 DH5 α , 选取阳性克隆菌液进行测序.

2.2.4 生物信息学分析 利用 ORF Finder 预测 ORF 和氨基酸序列, ExPASy (<http://au.expasy.org>) 的 Compute pI/Mw 计算蛋白质的等电点、分子量, MEGA4.0 软件构建系统进化树, SubLoc1.0 (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/Sub-Loc/>) 在线程序预测其蛋白的亚细胞定位, DNAMAN 软件进行氨基酸序列对比.

2.2.5 RcHsfB3 的亚细胞定位 对 2.2.3 中 ORF 全长扩增后转化的大肠杆菌进行质粒提取, 对该质粒和瞬时转化载体 pBI221 分别进行双酶切, 回收目的片段后用 T4 连接酶连接, 获得重组载体 pBI221-RcHsfB3. 为了鉴定插入片段的特异性, 将重组载体转化大肠杆菌, 菌落 PCR 后选取阳性克隆的菌液进行测序验证. 将重组载体转化拟南芥原生质体, 共培养 12h 后在荧光显微镜下观察细胞的荧光信号, 并以不含目的基因的 pBI221 原载体质粒作为阳性对照.

2.2.6 RcHsfB3 基因的表达分析 按 2.2.1 中的方法对美容杜鹃组培苗分别进行热激、低温和盐胁迫处理, 采集组培苗并用液氮速冻, -80 $^{\circ}$ C 保存备用.

提取不同处理后的美容杜鹃总 RNA 并反转录成第一链 cDNA, 按照 iTaq^[TM] Universal SYBR[®] Green Supermix 说明书在 Bio-Rad iCycler MyiQ Real-Time PCR Systems 平台上对该基因进行定量表达分析. 荧光定量的一对特异引物为 PF5 和 PR5, 产

物长度 188bp, 内参基因为 ActinF 和 ActinR. 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3min; 95 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 39 个循环. 用 Excel 软件对所得数据进行分析.

3 结果与分析

3.1 RcHsfB3 基因的克隆

根据已知植物的 Hsf 序列, 设计兼并引物, 得到目的基因的中间保守片段 (153bp), 利用 RACE 方法分别获得该基因的 3' 序列 (807bp) 和 5' 序列 (346bp), 利用 MEGA4.0 进行序列拼接, 得到美容杜鹃 cDNA 全长 1130bp, 其中编码区序列 (CDS) 长为 774bp, 编码 257 个氨基酸 (图 1).

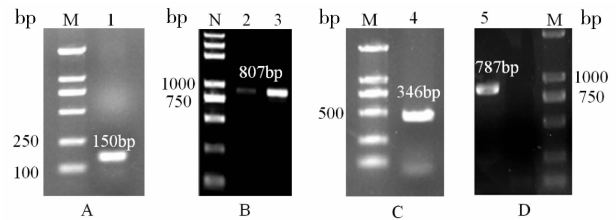


图 1 RcHsfB3 基因的 PCR 扩增

A: 保守片段的扩增; B: 3'RACE 的扩增; C: 5'RACE 扩增; D: ORF 全长的扩增; M: DNA marker DL2000(bp) N: DNA marker DL5000(bp)

Fig. 1 PCR products of RcHsfB3 gene

3.2 RcHsfB3 基因的进化树分析与氨基酸序列对比

利用 DNAMAN 将核酸序列翻译成氨基酸序列, 并用 MEGA4.0 进行比对和聚类分析. 聚类分析 (图 2) 表明, 克隆到的美容杜鹃 Hsf 与葡萄、桑属、苜蓿、大豆的 HsfB3 属于同一分支, DNAMAN

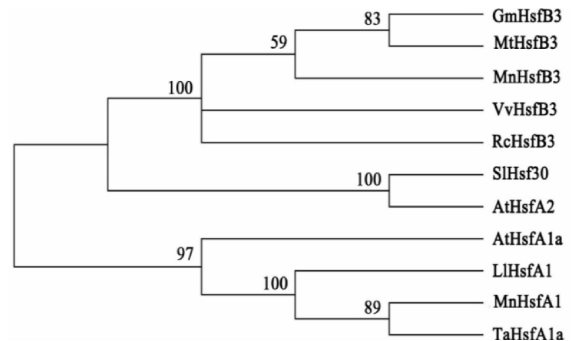


图 2 RcHsfB3 与其他已知 Hsfs 的进化树分析

GmHsfB3 (XP_003521171.1); 大豆; MtHsfB3 (XP_003625136.1); 苜蓿; MnHsfB3 (XP_010105217.1); MnHsfA1 (XP_010091127.1); 桑属; VvHsfB3 (XP_002284216.1); 葡萄; RcHsfB3 (KU145694); 美容杜鹃; SIHsf30 (P41152.1); 番茄; AtHsfA2 (NP_180184.1); AtHsfA1a (NP_193510.1); 拟南芥; LHsfA1 (AH142570.1); 百合; TaHsfA1a (AH244762.1); 小麦

Fig. 2 Clustering of RcHsfB3 deduced amino acid sequence and several other plants Hsfs proteins

软件分析表明它们之间同源性分别为 67.29%、61.42%、61.92%、64.06%。因此,判断所克隆得到的基因为 HsfB3 家族的新成员,将其命名为 *RcHsfB3*。

ExpASy 显示 *RcHsfB3* 分子量为 28.81KD,等

电点为 5.38。与葡萄、桑属、苜蓿、大豆和拟南芥的 *HsfB3* 基因进行氨基酸序列比对(图 3),结果表明, *RcHsfB3* 具有典型的热激转录因子结构域, DNA 结合域(DBD)比较保守。利用 SubLoc1.0 预测蛋白亚细胞定位,结果显示 *RcHsfB3* 定位于细胞核。



图 3 *RcHsfB3* 与其他已知 *HsfB3* 氨基酸序列同源性比对
AtHsfB3(NC_003071.7);拟南芥 DBD: DNA 结合域

Fig. 3 Alignment of the predicted amino acid sequences of *RcHsfB3* and *HsfB3* of other plants

3.3 *RcHsfB3* 的亚细胞定位

将构建好的融合蛋白表达载体 35S-*RcHsfB3*-GFP 和对照载体 35S-GFP 分别转到拟南芥原生质体中,共培养 12h 后,在荧光显微镜下观察融合蛋白

的表达(图 4)。观察紫外激发光下 GFP 蛋白的位置,发现对照组的绿色荧光分布于整个细胞,转入 35S-*RcHsfB3*-GFP 载体的细胞只能在细胞核看到绿色荧光,说明 *RcHsfB3* 蛋白定位于细胞核。

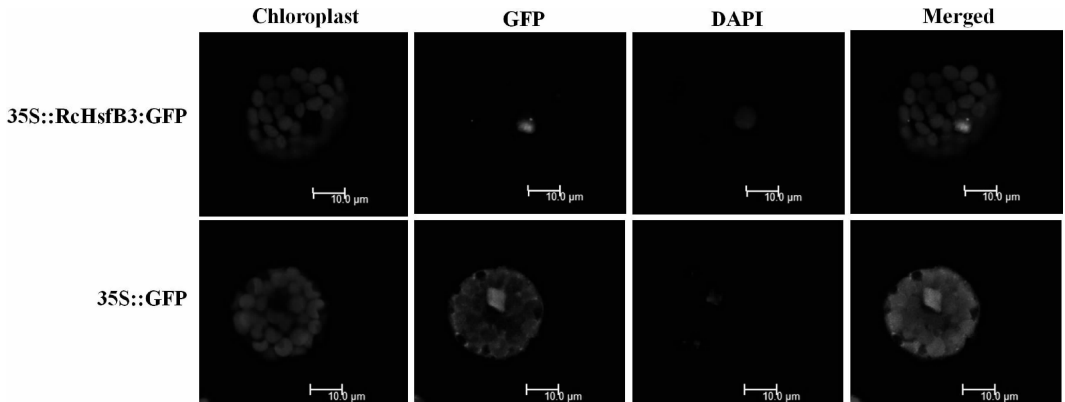


图 4 *RcHsfB3* 在拟南芥原生质体中的亚细胞定位

Chloroplast:在激发光下叶绿体自发荧光; GFP:在紫外激发光下绿色荧光蛋白位置; DAPI:细胞核染色荧光; Merge:叠加后的荧光

Fig. 4 Subcellular localization of *RcHsfB3* in *Arabidopsis* protoplast

3.4 *RcHsfB3* 基因的表达分析

采用荧光定量 RT-PCR 法,探究了高温、低温、高盐等胁迫条件下 *RcHsfB3* 基因的表达情况。结果显示,在胁迫条件下,美容杜鹃叶片 *RcHsfB3* 的相对表达量总体上均呈现出“上升-下

降”交替的趋势(图 5)。

RcHsfB3 在不同热激时长的表达情况表明,热激处理 0.5 h 时,表达量达到最高,1h 时下降,热激 2 h 时又上升,达到第二个高峰,随后又下降,但即使在 5h 达到最低值时其表达量也高于对照

(图 5A). 采用不同热激温度处理美容杜鹃 2h, 结果显示在 30℃ 热激条件下 *RcHsfB3* 的相对表达量最低, 而 35℃ 处理后表达量最高(图 5B). 冷胁迫表达情况表明, 1h 时 *RcHsfB3* 表达量升高, 随后下降, 4h 时达到高峰, 均高于对照(图 5C). 不同

盐胁迫处理时间的表达情况表明, 盐胁迫 2d 时 *RcHsfB3* 的相对表达量略微上升, 4d 时表达量急剧升高并达到高峰, 6d 时表达量下降较多, 8d 时较 6d 略微升高(图 5D). 荧光定量结果说明 *RcHsfB3* 基因受高温、低温和高盐胁迫的诱导表达.

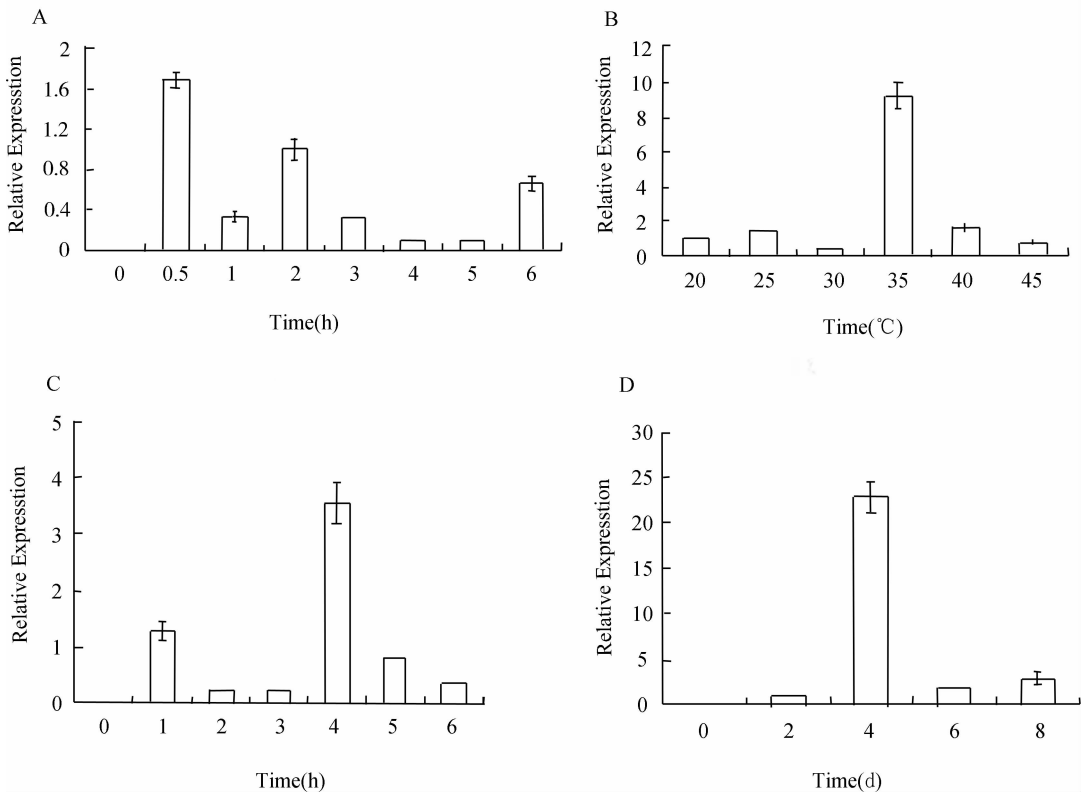


图 5 不同条件胁迫下美容杜鹃 *RcHsfB3* 的相对定量分析

A: 40℃ 条件下热激不同时间; B: 不同温度热激 2h; C: 4℃ 低温胁迫不同时间; D: 高盐胁迫不同时间
Fig. 5 Relative expression of *RcHsfB3* gene under different conditions

4 讨 论

热激转录因子 *Hsfs* 可调控多个功能相似的下游基因的表达, 是一种经济而灵活的调节机制, 目前对模式植物拟南芥和番茄的研究表明热激转录因子对高温、干旱、盐等多种逆境胁迫起调节作用^[7]. 因此在提高植物对环境胁迫抗性的分子育种中, 相对于调控个别功能基因的表达, 采用导入或改良热激转录因子的方法理论上对提高抗逆性更为有效. 因此, 本研究通过克隆美容杜鹃 *Hsf* 基因, 检测其表达情况, 为丰富植物热激转录因子 B 类基因的功能及研究如何利用基因修饰手段来提高美容杜鹃的抗逆性奠定基础.

聚类分析发现, *RcHsfB3* 与葡萄、桑属、苜蓿的 *HsfB3* 属于同一分支, 氨基酸序列比对结果发现它们与拟南芥 *AtHsfB3* 同源性较高, 蛋白序列

DBD 有着高度的保守性, 可以初步确定, 本研究在美容杜鹃中克隆到的基因属于 *HsfB3* 类成员. 亚细胞定位预测结果显示 *RcHsfB3* 定位于细胞核, 无核输出信号, 推测可能原因是基因转录主要发生在细胞核.

根据 DNA 结合域的研究以及对它们聚合区域的比较, 可将植物热激转录因子 *Hsfs* 基因分为 A、B、C 三类^[5], A 类 *Hsfs* 主要负责热激基因表达的调控. 以前的研究认为, B 类和 C 类 *Hsfs* 由于缺少 AHA 基元而不具备激活功能^[15], 因此人们对 B 类 *Hsfs* 的研究较少, 但越来越多的证据表明植物 B 类和 C 类 *Hsfs* 在植物响应逆境胁迫的过程中也发挥着重要作用. 研究发现, 在拟南芥中 *HsfB2b*、*B3* 和 *C1* 如果与活性较弱的 A 类 *Hsfs* 结合起来, 可起着协同激活的作用^[16]. 在番茄、烟草、大豆的研究中发现, *HsfB1* 作为一种转录共激

活子,通过与 HsfA1 结合共同激活转录^[17].也有研究表明,B类 Hsfs 可以与基本转录因子 TBP 和 TFIIB 结合形成非功能性转录复合体,从而抑制热激蛋白 Hsps 基因的表达^[18].在本研究中,美容杜鹃胁迫处理后 *RcHsfB3* 基因的相对表达量有一定的幅度变化,均高于对照,表明 *RcHsfB3* 基因受热激、冷胁迫、盐胁迫的诱导上调表达,起到一定的正调节作用,为 B 类 *Hsfs* 家族作为辅助转录激活因子的存在提供了进一步的证据.但该基因的表达量表现出“上升-下降”交替的变化趋势,分析可能的原因是,在逆境胁迫初始,*RcHsfB3* 的表达上调并激活下游与热激相关蛋白的表达,随着胁迫时间延长,这些蛋白的表达达到一定丰度后可能对 *RcHsfB3* 具有反馈抑制作用,但随着胁迫程度的进一步加深,这些被激活表达的蛋白又不断消耗,它们对 *RcHsfB3* 的反馈抑制作用随之减小,所以 *RcHsfB3* 的表达量又得以回升.植物热激转录因子 Hsfs 在本质上是具有转录调节活性的蛋白质,其在热应激反应中的主要功能,是在热休克基因的表达过程中与相应启动子结合,启动基因的转录,促进热休克蛋白的表达,最终对受损蛋白的修复和细胞的存活起着重要的作用.

参考文献:

- [1] Li H C, Li G L, Liu Z H, *et al.* Cloning, localization and expression analysis of ZmHsf-like gene in *zea mays*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014,13(6): 1230.
- [2] Giorno F, Guerriero G, Baric S, *et al.* Heat shock transcriptional factors in *Malus domestica*: identification, classification and expression analysis [J]. *BMC Genomics*,2012,13: 639.
- [3] Al-Whaibi M H. Plant heat-shock proteins: A mini review[J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2011, 23 (2): 139.
- [4] Duan Y H, Guo J, Ding K, *et al.* Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses [J]. *Mol Biol Rep*,2011, 38: 301.
- [5] Nover L, Bharti K, Doring P, *et al.* Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(3): 177.
- [6] Mishra S K, Tripp J, Winkelhaus S, *et al.* In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato[J]. *Genes Dev*, 2002,16 (12): 1555.
- [7] Chan-Schaminet K Y, Baniwal S K, Bublak D, *et al.* Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression[J]. *The journal of Biological Chemistry*, 2009, 284: 20848.
- [8] Schramm F, *et al.* The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60, 759.
- [9] 胡琳贞,方明渊.中国植物志[M].北京:科学出版社,1994,57.
- [10] 付先龙,白洁,陈放,等.美容杜鹃叶挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用分析[J].*时珍国医国药*, 2008 (4): 931.
- [11] 田萍,白洁,陈放,等.美容杜鹃花挥发油化学成分 GC-MS 分析[J].*应用与环境生物学报*, 2010, 16 (5): 734.
- [12] 罗琳,白洁,陈霞连,等.美容杜鹃叶片再生及愈伤组织耐热生理研究[J].*西北植物学报*, 2014, 34 (7): 1377.
- [13] 肖寒,白洁.常绿杜鹃亚属属锦杜鹃亚组 26 种植物叶片微形态特征及其分类学意义[J].*四川大学学报:自然科学版*, 2013, 50(2).
- [14] 钟容,丁显平,李创,等.金佛山特有杜鹃花遗传多样性分析[J].*四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52(2): 388.
- [15] Czarnecka-Verner E, Pan S, Salem T, *et al.* Plant class B Hsfs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56, 57.
- [16] Kotak S, Port M, Ganguli A, *et al.* Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization [J]. *Plant J*, 2004, 39(1): 989.
- [17] Bharti K, Koskull-Döring P V, Bharti, *et al.* 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 [J]. *Plant Cell*, 2004,16, 1521.
- [18] Czarnecka-Verner E, Yuan C X, Scharf K D, *et al.* Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(4): 459.