DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04114

马铃薯热激转录因子 *HsfA3* 基因的克隆及其耐热性功能分析

唐锐敏^{1,2} 贾小云¹ 朱文娇² 印敬明² 杨清^{2,*}

¹ 山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801; ² 南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095

摘要: 马铃薯在田间生长时常会受到各种不利环境的影响。夏季高温常导致马铃薯块茎产量和质量的下降。因此, 阐明马铃薯对热胁迫的响应机制, 发掘耐热相关基因, 对马铃薯耐热性的提高意义重大。热激转录因子(heat shock transcription factor A3, HsfA3)在植物机体内的活动影响到大量功能基因的表达, 在植物响应热胁迫的过程中发挥重要的作用。为了研究马铃薯中 HsfA3 的结构和功能, 本研究通过 RT-PCR 从马铃薯品种 Désirée 中克隆到长度为 1506 bp 的 *StHsfA3* 基因, 编码 501 个氨基酸。StHsfA3 的相对分子量为 55.23 kD, 理论等电点为 4.9, 属于亲水性蛋白。构建 *StHsfA3*-pBA002 过表达载体, 并转化马铃薯植株, 共鉴定得到 5 个独立的 *StHsfA3* 过表达转基因马铃薯株系。通过对转基因植株和非转基因植株叶片中的相对含水量(relative water content, RWC)以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的测定发现, 在高温胁迫下, 转基因植株叶片中的 RWC 显著高于非转基因植株, MDA 含量显著低于非转基因植株, 说明 *StHsfA3* 在耐热过程中起到正调控作用。对 *StHsfA3*、*StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 在不同马铃薯植株中的表达分析显示, *StHsfA3* 过量表达诱导了 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 的表达, 预示着 StHsfA3 可能协同 StHsp26-CP 和 StHsp70 来增强过表达转基因株系的耐热性。

关键词: 马铃薯; 热胁迫; *HsfA3*; 基因克隆; 遗传转化; 功能分析

Cloning of potato heat shock transcription factor *StHsfA3* gene and its functional analysis in heat tolerance

TANG Rui-Min^{1,2}, JIA Xiao-Yun¹, ZHU Wen-Jiao², YIN Jing-Ming², and YANG Qing^{2,*}

¹ College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; ² College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: During potato cultivation in the field, various adverse environmental stresses would affect its growth status. Heat stress in summer always results in the decline of tuber yield and quality. Therefore, it is of great significance to reveal the response mechanism of potato to heat stress and explore heat resistant genes for potato breeding. The activity of HsfA3 (heat shock transcription factor A3) affects the expression of numerous functional genes and plays an important role in response to heat stress. In order to investigate the structure and function of potato HsfA3, the *StHsfA3* gene was isolated from potato cultivar Désirée by RT-PCR. The full-length cDNA of *StHsfA3* was 1506 bp encoding 501 amino acids. StHsfA3 was predicted to be a hydrophilic protein with an estimated molecular weight of 55.23 kD and a theoretical isoelectric point of 4.9. The vector of *StHsfA3*-pBA002 was constructed and transformed into potato plants. Totally five independent transgenic potato plants overexpressing *HsfA3* were obtained. The detection of relative water content (RWC) and malondialdehyde (MDA) content showed that the RWC was significantly increased while MDA content was significantly decreased in the transgenic plants compared with the non-transgenic plants under heat stress, suggesting that StHsfA3 played a positive regulatory role in enhancing the heat resistance of potato. Furthermore, the expression levels of *StHsfA3*, *StHsp26-CP*, and *StHsp70* were determined by qRT-PCR in different potato plants. The

本研究由国家青年科学基金项目(31900450), 山西农业大学科技创新基金项目(2018YJ28)和山西省优秀博士来晋工作奖励资金科研项目(SXYBKY2018034)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (31900450), the Science and Technology Innovation Fund of Shanxi Agricultural University (2018YJ28), and the Award Fund for Outstanding Doctors Working in Shanxi (SXYBKY2018034).

* 通信作者(Corresponding author): 杨清, E-mail: qyang19@njau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: ruimin_tang829@hotmail.com

Received (收稿日期): 2020-05-25; Accepted (接受日期): 2020-08-19; Published online (网络出版日期): 2020-09-08.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200907.1415.004.html>

results exhibited that the expression levels of *StHsp26-CP* and *StHsp70* in the transgenic lines overexpressing *StHsfA3* were significantly higher than that in non-transgenic plants, indicating that *StHsfA3* might act in synergy with *StHsp26-CP* and *StHsp70* to increase the heat tolerance of the transgenic plants.

Keywords: potato; heat stress; *HsfA3*; gene cloning; genetic transformation; functional characterization

植物在生长发育过程中经常会受到各种不利环境如极端温度、盐渍化、干旱、重金属等胁迫^[1]。其中,热胁迫是对植物生长繁殖影响最严重且最不易控制的因素之一^[2]。而且,温室效应的积累加剧了高温的影响力,从而造成农作物减产,大大威胁了我国乃至全世界的粮食安全^[1]。马铃薯营养丰富,种植广泛,是一种重要的粮蔬兼用型作物。然而马铃薯性喜凉冷,不耐高温。在夏季马铃薯栽培过程中,高温会严重影响其生长发育过程,导致块茎产量和质量下降^[3]。因此,阐明马铃薯对热胁迫的响应机制,发掘耐热相关基因,对马铃薯耐热性改良具有重要意义。

热激转录因子(heat shock transcription factor, Hsf)作为热胁迫信号转导途径中的重要元件,激活热胁迫响应基因的转录表达,在植物热响应调控过程中发挥关键的作用^[4]。与其他转录因子类似,Hsf家族成员的N端有1个保守的螺旋-转角-螺旋结构,为Hsf的DNA结合域(DNA binding domain, DBD)^[5]。与DBD区域相毗邻的是寡聚域(oligomerization domain, OD),由2个疏水的七肽重复序列(hydrophobic heptad repeats, HR-A和HR-B)和1段插入序列组成^[5-6]。根据HR-A/B之间插入氨基酸残基的数目不同,可将Hsf分成A、B和C三大类。

与动物和酵母相比,植物中的Hsf家族成员十分丰富^[7]。例如在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[8]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[9]、水稻(*Oryza sativa*)^[10]和杨树(*Populus trichocarpa*)^[11]中,分别鉴定得到21、24、25和30个Hsf家族成员。这些Hsf成员在植物对各种复杂的非生物胁迫响应过程中发挥重要作用^[12]。例如,在拟南芥中,*HsfA1e*、*HsfA4a*、*HsfB2a*和*HsfC1*表达会受到低温胁迫、盐胁迫以及渗透压胁迫的诱导^[7,13-14]。在我们前期的研究中,鉴定出27个马铃薯Hsf家族成员,分属A、B和C三大类。这些马铃薯Hsf家族基因对热胁迫、干旱胁迫和冷胁迫均有不同程度的响应^[15]。

*HsfA3*是热激转录因子A家族的一个成员。在正常条件下,*HsfA3*表达属于组成型表达,存在于细胞质中;而当植物受到热胁迫时,其表达为诱导型

表达,作用在细胞核中^[16]。研究表明,*HsfA3*在植物耐热调控方面起着重要的作用。例如,在拟南芥中,*HsfA3*在DREB2A(dehydration-responsive element binding protein 2A)的调控作用下表达,并对热胁迫做出响应,从而级联调控其下游一系列热诱导基因表达,使植株获得更高的耐热性^[17]。在番茄中,*HsfA3*能够与MAP激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)直接相互作用来调控植物对热胁迫的响应^[18]。在马铃薯中,我们也发现*StHsfA3*在热胁迫诱导下能够高效表达,表明*StHsfA3*可能在马铃薯响应热胁迫的过程中起着重要的作用^[15]。除了调控植物对热胁迫响应之外,*HsfA3*还参与了其他非生物胁迫应答。在水稻中发现,*OsHsfA3*不但参与了植物的耐热调控,同时也通过调节依赖脱落酸和活性氧水平的多胺生物合成来提高植株的耐旱性^[19]。在拟南芥中过表达百合*HsfA3*可以通过改变脯氨酸分解代谢来提高拟南芥植株的耐热性和盐敏感性^[20]。

目前,对*HsfA3*的研究主要集中在拟南芥、番茄等模式植物中,在马铃薯中尚未见到有关*HsfA3*克隆和表达的报道。在前期研究中,我们通过构建共表达网络预测,*StHsp26-CP*(PGSC0003DMG400003219)和*StHsp70*(PGSC0003DMG400027611)可能是*StHsfA3*的共表达基因,它们之间可能存在某种调控关系^[15]。为了研究*StHsfA3*在提高植物耐热性方面的作用以及*StHsfA3*与相关*StHsps*之间潜在的表达调控关系,本研究从马铃薯品种Désirée中克隆了*StHsfA3*的cDNA序列,通过在马铃薯中过表达该基因并对其耐热性功能进行研究,以期揭示*StHsfA3*的调控机制提供基础,同时也为马铃薯耐熟育种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株及载体

马铃薯品种Désirée,由南京农业大学杨清教授实验室提供,保存于MS培养基中,置于温度为(22±1)、光周期为光照(16 h)/黑暗(8 h)的温室中培养。将1月龄的组培苗转移至试管中炼苗,1周后移至基质中生长。菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α和农杆菌

(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101。克隆载体 pMD19-T (TaKaRa, 中国大连)和表达载体 pBA002 由南京农业大学农学院喻德跃教授课题组提供。

1.2 马铃薯 *HsfA3* 的克隆及序列分析

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取马铃薯品种 Désirée 的叶片约 0.1 g, 利用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 中国大连)提取样品总 RNA, 用不含 RNase 的 DNase I (TaKaRa, 中国大连)消除基因组 DNA 的干扰。对所得 RNA 的完整性和浓度进行检测后, 取 0.5 μg RNA, 利用反转录试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany)合成 cDNA 第 1 链。将 1 μL 合成的

cDNA 用 9 μL nuclease-free 水稀释作为模板。

1.2.2 马铃薯 *HsfA3* 的分子克隆 根据 NCBI 网站中查到的马铃薯 *HsfA3* 预测序列(XM_015306031.1)设计带有 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切位点的引物(P1, 表 1)。以上述合成的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增程序为 94 5 min; 94 50 s, 58 50 s, 72 90 s, 33 个循环; 72 10 min。PCR 产物经电泳测定后通过凝胶回收试剂盒(Axygen Scientific Inc., Union city, USA)将目的片段回收, 然后将其连接至 pMD19-T 克隆载体中, 转化大肠杆菌 DH5α, 经 PCR 检测后, 对阳性克隆进行测序检验, 将测序正确的菌液加甘油冻存。

表 1 本研究所使用的引物
Table 1 Primer sequences used in this study

引物编号 Primer ID.	名称 Name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Function
P1-F	CloneHsfA3-F	GCGCT <u>TCGAG</u> ATGAACCCATTGATAAAAATCAAG	<i>StHsfA3</i> 的克隆, 酶切位点用下划线标出
P1-R	CloneHsfA3-R	GTC <u>ACGCGT</u> CTAAAACTATCATTCTTTGGCTG	Gene cloning of <i>StHsfA3</i> ; the restriction sites are underlined
P2-F	HsfA3002-F	GGGTAATATCCGGAACCTCCT	转基因验证
P2-R	HsfA3002-R	GCTTCTCCATTCTACCCAAAG	Transgenic verification
P3-F	DLHsfA3-F	CGGAAGTTCTTCTGGATCATCTG	荧光定量分析
P3-R	DLHsfA3-R	CCATCTGCTTCTGTCTTTGTCT	qRT-PCR analysis
P4-F	DLsHsp3219-F	CGTCCAATGTCAGTGTGGTGG	荧光定量分析
P4-R	DLsHsp3219-R	CAGTGCCTTGGTTGTTTCCTCC	qRT-PCR analysis
P5-F	DLHsp70-F	GTGGCAGTAATGGAAGGTGGGA	荧光定量分析
P5-R	DLHsp70-R	TTCTCCGGATTACACCGATT	qRT-PCR analysis
P6-F	EF1α-F	CTGTTAAGGATCTGAAGCGTGGT	荧光定量分析, <i>EF1α</i> 为内参基因
P6-R	EF1α-R	AATGTGGGAAGTGTGGCAGTCG	qRT-PCR analysis; <i>EF1α</i> is used as the reference gene

1.2.3 马铃薯 *HsfA3* 的序列分析及系统发育分析 由 ExPASy 的 PrptParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测 *StHsfA3* 基因编码的肽链氨基酸残基数目、相对分子量、理论等电点; 由 NPSA-PRABI (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) 和 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>)在线分析获得 *StHsfA3* 蛋白的二级结构和三级结构。使用 NCBI conserved domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>)和 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/servers/SignalP/>)分别预测 *StHsfA3* 的保守结构域和信号肽。由 ExPASy 的 ProtScale 工具(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 预测 *StHsfA3* 蛋白的疏水性; 用 TMHMM Server v. 2.0 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)在线分析得到

StHsfA3 蛋白跨膜结构。由 ClustalX 2.0 和 MEGA 4.0 软件构建系统进化树, 采用邻接法 (Neighbor-Joining Method)作图, 重复计算次数设为 1000。

1.3 马铃薯 *HsfA3* 过表达载体的构建及重组质粒的转化

从上述保存的大肠杆菌菌液中提取质粒, 用 *Xho* I 和 *Mlu* I 对其进行双酶切, 回收目的片段; 同时用相同的酶将 pBA002 载体也进行双酶切并将载体大片段回收。然后将目的基因片段与酶切后的 pBA002 载体通过 T4 连接酶(Thermo Fisher Scientific, USA)连接, 并将连接产物转化到农杆菌 GV3101 中。通过菌液 PCR 验证、酶切验证以及测序验证后, 将测序正确的含有 *StHsfA3*-pBA002 重组质粒的农杆菌菌液加甘油保存到 -80 冰箱, 用于后续遗传转化试验。

利用本实验室已经建立的马铃薯遗传转化体系^[21], 将 *StHsfA3*-pBA002 重组子转入马铃薯品种 Désirée 外植体中。经预培养、共培养、愈伤诱导、芽分化和生根筛选后, 获得转基因马铃薯株系。

1.4 转基因植株的分子检测

利用 SDS 法提取得到的抗性马铃薯植株以及非转基因对照植株的总 DNA。为了检测 *StHsfA3*-pBA002 重组质粒是否转入马铃薯植株内, 本研究设计了包含 1 段 pBA002 表达载体和 1 段 *StHsfA3* 基因片段的引物(P2, 表 1)。以非转基因对照植株的总 DNA 作为阴性对照, *StHsfA3*-pBA002 重组质粒作为阳性对照, 用该引物进行 PCR 验证, 程序如下: 94 预变性 4 min; 94 变性 50 s, 58 退火 45 s, 72 延伸 50 s, 33 个循环; 最后 72 延伸 10 min。得到的 PCR 产物再经电泳检测。

1.5 相对含水量(RWC)测定

将 1 月龄的非转基因植株(wild type, WT)以及转基因阳性株系(transgenic lines, L)的组培苗移栽到基质中, 置于温度为(22±1)℃, 光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗的光照培养箱中生长 2 周, 再将它们分别分成 2 组, 一组放在 35℃光照培养箱中; 另一组留在原来的培养箱中生长。处理 8 h 后取其叶片测定相对含水量。相对含水量的测定具体步骤如下: 称取鲜重(fresh weight, FW)约为 0.5 g 的新鲜马铃薯叶片, 将其浸入水中, 一段时间后取出, 滤纸吸干表面水分, 称重; 然后再把叶片浸入水中, 过段时间再取出, 吸干叶片表面水分后再称重; 重复操作几次, 直到重量稳定, 此时叶片的重量为饱和鲜重(saturated fresh weight, SFW)。之后把吸水饱和的叶片放入纸袋, 置于温度为 105℃的烘箱内杀青 10 min, 再将烘箱温度调到 75℃继续烘干叶片, 直至其重量不再变化。这时将叶片取出, 冷却至室温, 记录其干重(dry weight, DW)。每个样本设置 3 个生物学重复和 3 次试验重复。相对含水量计算公式如下:

$$RWC = \frac{FW - DW}{SFW - DW} \times 100\%$$

1.6 丙二醛(MDA)含量测定

用与 1.5 同样的方法处理马铃薯植株, 不同温度处理 8 h 后取马铃薯叶片测定 MDA 的含量。采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法测定 MDA 含量^[22], 其含量用“μmol g⁻¹ FW”来表示。取马铃薯植物新鲜叶片 1 g, 剪碎后加入 2 mL 5% TCA 溶液, 于研

钵中研磨成匀浆, 再加 8 mL TCA, 将残液移至 10 mL 离心管中。4℃, 4000 ×g 离心 10 min; 取上清 2 mL (对照中加入 2 mL 蒸馏水)至试管中, 加入 2 mL 0.6% TBA 溶液, 混匀后于沸水浴中煮沸 10 min, 取出冷却至室温, 3000×g 离心 15 min, 取上清量取其体积 V_s; 以对照管内溶液为空白, 测定 530 nm、600 nm 和 450 nm 处的吸光值。每个样本进行 3 个生物学重复和 3 次试验重复。MDA 含量用下列公式计算:

$$C = 6.45(A_{530} - A_{600}) - 0.56A_{450}$$

$$MDA \text{ 含量} = \frac{C \times V_s}{FW \times 1000}$$

1.7 *StHsfA3*、*StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 的表达量检测

用与 1.5 同样的方法处理马铃薯植株, 处理 2 h 后分别取不同处理不同植株的叶片提取 RNA, 采用荧光定量 PCR 方法检测非转基因植物和转基因不同株系中的 *StHsfA3*、*StHsp70* 和 *StHsp26-CP* 的表达量。这 3 个基因的引物见表 1 (P3, P4, P5), 以 *EF1a* 为内参基因, 引物为 P6。按照 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Mannheim, Germany) 的使用说明, 在 ABI-7500 实时定量 PCR 仪上 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 检测候选基因的表达量。PCR 反应体系为 20 μL, 包含 10 μL SYBR-Green、6.8 μL ddH₂O、2 μL 稀释后的模板以及各 0.6 μL 10 μmol L⁻¹ 的正反向引物。PCR 反应程序如下: 50℃ 2 min; 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 35 s, 共 40 个循环。根据 2^{-ΔΔCt} 法, 对每个基因的相对表达量进行标准化计算。每个样本进行 3 次生物学重复和 2 次试验重复。利用邓肯多重测试法对结果进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 *StHsfA3* 基因的分子克隆及序列分析

根据 NCBI 网站中预测得到的马铃薯 *HsfA3* 碱基序列设计加酶切位点的引物 P1, 从马铃薯品种 Désirée 中克隆得到 *StHsfA3* 基因的 cDNA 全长序列。经软件分析, *StHsfA3* 从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAG 的长度为 1506 bp (图 1-A), 共编码 501 个氨基酸 (图 1-B)。利用 ExPasy 网站的 PrptParam 工具预测 *StHsfA3* 蛋白的相对分子量为 55.23 kD, 理论等电点为 4.9。本研究发现, 在 *StHsfA3* 氨基酸序列的 C 端含有 4 个中心是色氨酸残基的短肽基序 (图 1-B):

图 1 *StHsfA3* 的扩增产物条带(A)及其氨基酸序列(B)
Fig. 1 Amplified product stripe of *StHsfA3* (A) and its amino acid sequence (B)
A 图中: M: DNA 2000 分子标记; I: *StHsfA3* 的扩增片段。B 图中: 红线部分为 4 个中心是色氨酸(W)的短肽基序。
M: DNA 2000 marker; I: amplified fragment of *StHsfA3* in Fig. A; the motifs marked with red line are the four short peptide sequences containing tryptophan (W) in Fig. B.

DEELWSMGFE、GAELWDSFSS、LSDLWDIDPL 和 GVDKWPADGS, 该结构使得 HsfA3 具有高效的转录激活功能。

对 StHsfA3 蛋白的二级结构预测显示, α 螺旋、延伸链和无规则卷曲的氨基酸残基数分别为 117、13 和 368 个, 占整个氨基酸数目的 23.35%、2.59% 和 73.45% (图 2-A)。无规则卷曲构成了该蛋白的活性

中心, 所占比例最高, 说明这部分结构不稳定。通过 NCBI CD search 功能对该蛋白进行分析, 预测出其含有热激转录因子 Hsf 典型的 DBD 结构域(图 2-C)。其三级结构预测表明, 该 DBD 结构域含有 3 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠片(图 2-B), 构成了该蛋白最保守的结构域。利用 Signal P-5.0 预测 StHsfA3 信号肽发现, 该蛋白无信号肽(图 2-D), 为非分泌蛋白。

图 2 马铃薯 *StHsfA3* 的结构分析
Fig. 2 Structural analysis of *StHsfA3* in potato
A: 二级结构预测; B: 三级结构预测; C: 保守结构域预测; D: 信号肽预测。
A: secondary structure prediction; B: tertiary structure prediction; C: conservative domain prediction; D: signal peptide prediction.

利用 ExPASy 的 ProtScale 工具预测 StHsfA3 蛋白的疏水性发现, 构成 StHsfA3 蛋白的氨基酸中, 亲水性氨基酸的数量远远大于疏水性氨基酸(图 3-A), 表明该蛋白属于亲水性蛋白。跨膜结构域预测分析表明, StHsfA3 蛋白没有跨膜区, 不属于膜蛋白, 这与 StHsfA3 在细胞中的位置以及发挥的功能相适应。

图 3 StHsfA3 疏水性分析(A)和跨膜域分析(B)

Fig. 3 Hydrophobicity analysis (A) and transmembrane domain analysis (B) of StHsfA3

A: 图中曲线得分在 0 以上说明这部分氨基酸为疏水性, 分值越高疏水性越强; 得分在 0 以下说明氨基酸为亲水性氨基酸, 分值越低亲水性越强。B: 没有跨膜结构域。

A: the curves above zero show that these amino acids are hydrophobic, and the higher score, the stronger the hydrophobicity; the curves below zero show that these amino acids are hydrophilic, and the lower score, the stronger the hydrophilicity. B: there is no transmembrane domain.

2.2 StHsfA3 的系统进化分析

从 NCBI 数据库中搜索到 15 个来自于其他植物物种的 HsfA3 氨基酸序列, 将马铃薯 HsfA3 蛋白序列与其他物种中的同源序列进行比对, 用邻接法构建系统发育树(图 4)。该系统发育树主要有两大分支, 双子叶植物 HsfA3 聚为一支, 单子叶植物 HsfA3 聚为一支。马铃薯 HsfA3 的氨基酸序列与番茄(*Solanum lycopersicum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)这些茄科植物的亲缘关系比较近, 尤其与番茄的 HsfA3 亲缘关系最近。

2.3 StHsfA3 过表达载体的构建及转基因马铃薯植株的获得

将克隆获得的 *StHsfA3* 基因目的片段通过 *Xho* I

图 4 16 个物种 HsfA3 的系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of HsfA3s from 16 plant species

利用 ClustalX 2.1 和 MEGA 4.0 软件构建来自 16 个物种的 HsfA3 氨基酸序列的系统发育树, 重复计算次数设为 1000。各物种名称缩写及 NCBI 数据库中的序列号如下: MdHsfA3: 苹果 (XP_008391748.1); ZjHsfA3: 枣 (XP_015898712.1); CsHsfA3: 柑橘 (XP_006481891.1); AtHsfA3: 拟南芥 (NP_195992.2); VrHsfA3: 豇豆 (XP_014511066.1); GmHsfA3: 大豆 (XP_003541445.1); PeHsfA3: 杨树 (XP_011016541.1); NtHsfA3: 烟草 (XP_016473897.1); CaHsfA3: 辣椒 (XP_016542894.1); SIHsfA3: 番茄 (NP_001234854.1); OsHsfA3: 水稻 (XP_015623061.1); ZmHsfA3: 玉米 (NP_001147968.1); SiHsfA3: 狗尾草 (XP_004952622.1); BdHsfA3: 二穗短柄草 (XP_003575055.1); HvHsfA3: 大麦 (AEB26588.1)。

The Neighbor-joining phylogenetic tree of HsfA3 amino acid sequences from 16 plant species was constructed by ClustalX 2.1 and MEGA 4.0, which was bootstrapped over 1000 cycles. Abbreviations for each species and database accession numbers are as follows: MdHsfA3: *Malus domestica* (XP_008391748.1); ZjHsfA3: *Ziziphus jujube* (XP_015898712.1); CsHsfA3: *Citrus sinensis* (XP_006481891.1); AtHsfA3: *Arabidopsis thaliana* (NP_195992.2); VrHsfA3: *Vigna radiata* var. *radiata* (XP_014511066.1); GmHsfA3: *Glycine max* (XP_003541445.1); PeHsfA3: *Populus euphratica* (XP_011016541.1); NtHsfA3: *Nicotiana tabacum* (XP_016473897.1); CaHsfA3: *Capsicum annuum* (XP_016542894.1); SIHsfA3: *Solanum lycopersicum* (NP_001234854.1); OsHsfA3: *Oryza sativa* Japonica Group (XP_015623061.1); ZmHsfA3: *Zea mays* (NP_001147968.1); SiHsfA3: *Setaria italica* (XP_004952622.1); BdHsfA3: *Brachypodium distachyon* (XP_003575055.1); HvHsfA3: *Hordeum vulgare* (AEB26588.1)。

和 *Mlu* I 双酶切后插入到 pBA002 表达载体 35S 启动子, 构建成 35S::StHsfA3 过表达载体(图 5-A), 并转化农杆菌 GV3101。利用利福平(rifampicin, Rif)和壮观霉素(spectinomycin, Spec)筛选出含有过表达载体的农杆菌阳性菌落, 并用 PCR 验证。提取农杆菌质粒, 经限制性内切酶 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切后, 除了载体片段, 还得到 1 条长度为 1506 bp 的目的片段(图 5-B), 说明过表达载体已成功构建。

将含有过表达载体的农杆菌菌液侵染马铃薯组培苗茎段, 经预培养、共培养、诱导愈伤、芽分化

以及草丁膦生根筛选(图 5-C), 初步得到 12 株抗性植株。提取其叶片 DNA, 利用引物 P33 进行 PCR 验证, 最终鉴定得到 5 个 *StHsfA3* 的过表达马铃薯转基因

因株系(图 5-D)。荧光定量结果显示, *StHsfA3* 在过表达马铃薯转基因株系中的表达量显著高于非转基因植株(图 5-E)。

图 5 *StHsfA3* 过表达载体的结构示意图(A)、过表达载体的酶切验证(B)、转基因马铃薯植株的再生(C)、*StHsfA3* 过表达转基因植株的 PCR 检测(D)、不同植株中 *StHsfA3* 表达量的 qRT-PCR 检测(E)

Fig. 5 Vector construction of *35S::StHsfA3* (A), enzyme digestion identification of *35S::StHsfA3* vector (B), regeneration of transgenic potato (C), PCR identification of *StHsfA3* overexpression transgenic plant lines (D), and qRT-PCR determination of *StHsfA3* in WT and *StHsfA3* overexpression transgenic plant lines (E)

A: 带有酶切位点的 *35S::StHsfA3* 载体示意图。B: M: 1 kb plus DNA marker; P: 含有 pBA002-*StHsfA3* 载体的农杆菌质粒; 1, 2: 含有 pBA002-*StHsfA3* 载体的农杆菌质粒酶切结果。C: a. 预培养; b. 芽分化; c. 生根筛选; d. 盆栽苗。D: M: DNA 2000 marker; WT: 非转基因植株, 作为阴性对照; +: pBA002-*StHsfA3* 农杆菌质粒, 作为阳性对照; L1-L5: 转基因株系。E: 不同植株中 *StHsfA3* 的表达量测定。 **表示在 0.01 水平差异显著。

Schematic diagram of *35S::StHsfA3* vector with site of restriction enzymes in Fig. A. M: 1 kb plus DNA marker; P: pBA002-*StHsfA3* plasmid; 1, 2: enzyme digestion identification of pBA002-*StHsfA3* plasmid in Fig. B. a: preincubation in darkness; b: bud formation; c: selection of transgenic lines; d: plants in pot in Fig. C. M: DNA 2000 marker; WT: non-transgenic potato plant, used as a negative control; +: pBA002-*StHsfA3* plasmid, used as a positive control; L1-L5: Transgenic lines in Fig. D. The expression levels of *StHsfA3* were determined in different plants in Fig. E. **: significantly different at the 0.01 probability level.

2.4 转基因马铃薯植株的相对含水量(RWC)和丙二醛(MDA)含量分析

相对含水量和丙二醛含量是反应植物在逆境状态下生长状况的重要生理指标, 通常可用于鉴定植物抗逆境胁迫的能力。通过检测非转基因植株(WT)和转基因植株(L)在适温(22 °C)和高温(35 °C)条件下叶片中的相对含水量发现, 在适温条件下, 马铃薯叶片中的相对含水量均保持在 80%以上

(图 6-A)。当热处理 8 h 之后, 不论是转基因植株还是非转基因植株, 其叶片的相对含水量都因叶片受到热胁迫而呈现不同程度的下降, 而且热处理后转基因马铃薯叶片中的相对含水量仍然显著高于非转基因植株, 表明 *StHsfA3* 过表达转基因植株比非转基因植株在热胁迫下的保水能力更强, 因此耐热性更高。

对转基因马铃薯植株和非转基因植株在 35 °C 高

温胁迫下和 22 ℃ 适温条件下叶片中 MDA 含量的检测(图 6-B)发现, 热处理 8 h 后, 植株叶片中的 MDA 含量均升高, 说明它们都受到了热胁迫引起的膜脂过氧化, 但转基因各株系叶片中的 MDA 含量显著

低于非转基因植株, 说明 *StHsfA3* 过表达植株受到热胁迫导致的膜脂过氧化程度低于普通非转基因马铃薯, 因此, *StHsfA3* 过表达转基因植株比非转基因植株耐热性强。

图 6 不同温度处理下非转基因植株与 *StHsfA3* 过表达转基因植株叶片中的相对含水量(A)和丙二醛含量(B)

Fig. 6 RWC (A) and MDA (B) content in the leaves of non-transgenic plants and *StHsfA3* overexpression transgenic plants under different temperature treatments

WT: 非转基因植株; L: *StHsfA3* 过表达转基因株系(L1、L3、L5 三个株系); RWC: 相对含水量; MDA content: 丙二醛含量; 正常生长温度: 22 ℃; 高温胁迫: 35 ℃; 处理时间: 8 h; 图中的值是 3 个独立试验的结果, 每个试验 3 个重复, 以平均值±标准误表示。根据 Duncan's 多重测试, 柱形图上不同小写字母表示 $P < 0.05$ 的显著性差异水平。

WT: non-transgenic plants; L: *StHsfA3* overexpression transgenic plant lines; RWC: relative water content; MDA: malondialdehyde; temperature treatments: 22 ℃ (optimal temperature) and 35 ℃ (heat stress) for eight hours. Values are means ± SE of three independent experiments with three replicates in each experiment. Bars with different lowercase letters are significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range tests.

2.5 *StHsfA3*、*StHsp26-CP* 以及 *StHsp70* 的表达量分析

利用 qRT-PCR 的方法, 本研究检测了适温(22 ℃)和高温(35 ℃)条件下非转基因植株和 3 个转基因株系叶片中 *StHsfA3* 的表达水平(图 7-A)。在适温条件下, 转基因株系中 *StHsfA3* 的表达量均显著高于非转基因植株, L1、L3、L5 中 *StHsfA3* 的表达量分别是非转基因植株中的 3.95、7.05 和 3.36 倍。在高温处理 2 h 后, 各植株中 *StHsfA3* 的表达量均受高温诱导而上升, 且 3 个转基因株系中该基因的表达量都显著高于非转基因植株。

在正常生长条件下, *StHsfA3* 过表达转基因植株中 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 的表达量均显著高于非转基因植株中, 说明 *StHsfA3* 过表达诱导了 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 在转基因植株中的表达, 但 *Hsp26-CP* 和 *StHsp70* 是否是 *StHsfA3* 的靶基因, 是否被 *StHsfA3* 直接调控, 还需要进一步研究。当 35 ℃ 处理 2 h 后, 所有植株中 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 的表达量都在高温诱导下显著上升, 且各转基因株系中这 2 个基因的表达量显著高于非转基因植株(图 7-B, C)。

3 讨论

马铃薯地上部分生长的最适温度为 20~25 ℃, 块茎形成的最适温度为 15~20 ℃^[23-24]。高温抑制马铃薯块茎的形成和发育, 从而严重影响营养物质的积累。因此马铃薯耐热基因的开发和耐热机制的研究对提高马铃薯的抗热性具有重要意义。

热激转录因子(Hsf)广泛存在于各植物中, 在热胁迫应答方面具有十分重要的作用。随着马铃薯全基因组测序工作的完成, 课题组前期已鉴定出 27 个马铃薯 *Hsf* 基因家族成员。其中, *StHsfA3* 介导了一系列高温胁迫响应基因的转录调控, 包括 *Hsps* 以及一些其他的功能基因, 在植物的热响应调控过程中发挥重要作用^[15]。

本研究从马铃薯品种 Désirée 中克隆得到 *StHsfA3* 基因。序列分析显示, *StHsfA3* 的 cDNA 长度为 1506 bp, 编码 501 个氨基酸(图 1)。大多数 A 族 Hsf 具有 1 个包含氨基酸激活序列(AHA)的 C 端激活域(C-terminal activation domain, CTAD)^[25]。StHsfA3 虽然属于 HsfA 家族成员, 但在其 CTAD 区域不含 AHA 基序, 而是含有 4 个中心是色氨酸残基的短肽

图 7 不同温度处理下非转基因植株(WT)和转基因植株(L)叶片中 *StHsfA3* (A)、*StHsp26-CP* (B)和 *StHsp70* (C)的表达水平

Fig. 7 Expression levels of *StHsfA3* (A), *StHsp26-CP* (B), and *StHsp70* (C) in the leaves of non-transgenic plants (WT) and transgenic plant lines (L) under different temperature treatments

WT: 非转基因植株; L: *StHsfA3* 过表达转基因株系(L1、L3、L5 三个株系); 正常生长温度: 22 ; 高温胁迫: 35 ; 处理时间: 2 h; 图中的值是 2 次试验重复的结果, 每个试验 3 个生物学重复, 以平均值±标准误表示。根据邓肯多重测试, 柱形图上不同小写字母表示 $P < 0.05$ 的显著性差异水平。

WT: non-transgenic plants; L: *StHsfA3* overexpression transgenic plant lines; temperature treatments: 22 (optimal temperature) and 35 (heat stress) for two hours. Values are means ± SE of two experimental replicates with three biological replicates in each experiment. Bars with different lowercase letters are significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range tests.

基序(图 1-B)。该结构在番茄 HsfA3 中也有发现, 它与 AHA 功能相似, 使得 HsfA3 具有高效的转录激活功能^[16]。经研究证实, 不含 AHA 基序的 HsfA 可与其他 HsfA 成员结合形成异聚体, 从而激活其转录活性^[10,26]。StHsfA3 蛋白的二级结构预测显示, 无规则卷曲所占比例最高(图 2-A), 它们构成了该蛋白的活性中心, 激活了 Hsf 三聚体的形成, 促进了该三聚体与 Hsp 基因启动子区的有效结合^[5-6]。其 DBD 结构域的三级结构模型含有 3 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠

片(图 2-B)。 α 螺旋和 β 折叠片一般作为蛋白质的支架, 因此这部分构成该蛋白最保守的结构域。生物信息学软件预测到 StHsfA3 是无跨膜结构域和信号肽的亲水性蛋白, 表明它既不是分泌蛋白也不是膜蛋白, 这与其在细胞中的位置以及发挥的功能相适应。马铃薯 HsfA3 的氨基酸序列与番茄、辣椒和烟草这些茄科植物的亲缘关系比较近, 尤其与番茄的 HsfA3 亲缘关系最近, 表明马铃薯 HsfA3 可能与番茄 HsfA3 具有相似的功能和作用机制。

为了研究 *HsfA3* 基因的功能, 本研究通过农杆菌介导法将该基因转入马铃薯植株, 最终获得了 5 个独立的 *HsfA3* 过表达转基因株系。在我们验证的 3 个转基因株系中, *StHsfA3* 的表达量均显著高于非转基因植株, 表明 *StHsfA3* 基因在强启动子 CaMV 35S 带动下高效表达^[27]。然而在这 3 个转基因株系中(L1、L3 和 L5), *StHsfA3* 的表达量存在差异, 在 L3 中表达量最高, 在 L5 中表达量最低, 这可能是与目的基因插入的位点和在马铃薯中的拷贝数不同有关^[27]。相对含水量(RWC)反映了植物的保水能力, RWC 越小, 说明水分亏缺越严重, 对逆境的耐受性越弱^[28]。在高温胁迫下, 活性氧的积累导致植物生物膜脂发生过氧化产生丙二醛(MDA), 因此 MDA 含量越高, 说明植物生物膜受伤害程度越深, 对逆境的耐受性越弱^[29]。因此, 这 2 个指标侧面反映植物耐热性的强弱。本研究通过检测各植株在高温处理后叶片中的 RWC 和 MDA 含量的变化发现, 高温处理后转基因植株中的 RWC 显著高于非转基因植株, MDA 含量显著低于非转基因植株。这说明 *StHsfA3* 过表达转基因植株比非转基因植株在热胁迫下的保水能力更强, 受到热胁迫导致的膜脂过氧化程度更低, 预示马铃薯植株内 *StHsfA3* 过表达提高了马铃薯植株的耐热性。

在前期研究中, 通过构建 *StHsfs* 共表达网络发现, *StHsp26-CP*、*StHsp70* 与 *StHsfA3* 处于同一个共表达模块中, 表明 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 可能是 *StHsfA3* 的共表达基因^[15]。本研究发现, 在正常条件下生长时, *StHsfA3* 过表达马铃薯转基因株系中 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 的表达量均显著高于非转基因植株, 说明 *StHsfA3* 在马铃薯植株中的过表达诱导了 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 表达。当受到热胁迫后, 转基因植株中 *StHsfA3* 受高温诱导而大量表达, 与此同时, *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 也呈现出与 *StHsfA3* 表达量变化一致的趋势。这说明 *StHsfA3* 对

StHsp26-CP 和 *StHsp70* 表达起到一定的正调控作用, 与我们前期的研究结果相一致。StHsp26-CP 属于叶绿体 sHsp 家族。研究发现, 拟南芥中的叶绿体 sHsp (AtHsp21) 能够与一种质体核蛋白 pTAC5 (plastid transcriptionally active 5) 结合, 来维持质体编码 RNA 聚合酶(plastid-encoded RNA polymerase, PEP) 的功能, 从而保护叶绿体^[30]。马铃薯 StHsp26-CP 是否具有与 AtHsp21 相似的作用, 还需要进一步的试验验证。Hsp70 是一类结构最保守、分布最广泛的热激蛋白。它能够帮助蛋白质正确折叠, 或者将蛋白聚合物降解, 最后将其转运到细胞外, 从而减轻热胁迫对细胞和组织的破坏^[31]。

类似地, 在拟南芥中也发现一些 *Hsp* 基因表达与 *HsfA3* 的丰度有密切的关系。Sakuma 等^[32]通过在拟南芥中过表达 *AtHsfA3* 的上游基因 *AtDREB2A* 发现, *AtHsfA3* 和 3 个 *Hsp* 基因(*Hsp18.1-CI*、*Hsp26-MII* 和 *Hsp70*)的表达量均显著上升。随后, Yoshida 等^[17]进一步证明, 热胁迫下拟南芥 *HsfA3* 能够直接被 DREB2A 调控而上调表达, 从而产生一系列 *Hsps* 等热诱导基因的级联表达, 如 *Hsp70b*、*Hsp19.9-P* 和 *Hsp22.0*。然而, *Hsf* 介导的转录调控是一个非常复杂的过程, 往往是不同的 *Hsf* 分子共同作用的结果。如 Li 等^[33]研究表明, 拟南芥中 *HsfA2* 和 *HsfA3* 在相同的耐热调控途径中发挥作用, 且它们在蛋白水平上能够互作, 从而诱导下游耐热基因大量表达。因此, 在马铃薯中 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 是否是作为 StHsfA3 的靶基因而受到 StHsfA3 直接调控, 还需进一步试验验证。

4 结论

本研究从马铃薯品种 Désirée 中克隆得到 *StHsfA3* 基因, 该基因 cDNA 全长为 1506 bp, 编码 501 个氨基酸。该蛋白的相对分子量为 55.23 kD, 理论等电点为 4.9, 无跨膜结构和信号肽, 属于亲水性蛋白。StHsfA3 与茄科植物番茄 *HsfA3* 的亲缘关系最近。通过农杆菌介导的遗传转化法共得到 5 个 *StHsfA3* 过表达转基因马铃薯株系。*StHsfA3* 过表达增强了植株的相对含水量, 降低了植株的 MDA 含量, 表明 *StHsfA3* 基因在马铃薯响应热胁迫过程中起正调控作用。*StHsfA3* 过量表达诱导了 *StHsp26-CP* 和 *StHsp70* 表达, 推测 StHsfA3 可能协同 StHsp26-CP 和 StHsp70 增强过表达转基因株系的耐热性。

References

- [1] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 2016, 167: 313–324.
- [2] Herman D J, Knowles L O, Knowles N R. Heat stress affects carbohydrate metabolism during cold-induced sweetening of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Planta*, 2017, 245: 563–582.
- [3] Lafta A, Lorenzen J. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiol*, 1995, 109: 637–643.
- [4] Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf K D. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 310–316.
- [5] Scharf K D, Berberich T, Ebersberger I, Nover L. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819: 104–119.
- [6] Lyck R, Harmening U, Höfeld I, Treuter E, Scharf K D, Nover L. Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta*, 1997, 202: 117–125.
- [7] Miller G, Mittler R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot*, 2006, 98: 279–288.
- [8] Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra S K, Ganguli A, Scharf K D. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6: 177–189.
- [9] Baniwal S K, Bharti K, Chan K Y, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra S K, Nover L, Port M, Scharf K D, Tripp J, Weber C, Zielinski D, von Koskull-Döring P. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci*, 2004, 29: 471–487.
- [10] Guo J, Wu J, Ji Q, Wang C, Luo L, Yuan Y, Wang Y, Wang J. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *J Genet Genomics*, 2008, 35: 105–118.
- [11] Wang F, Dong Q, Jiang H, Zhu S, Chen B, Xiang Y. Genome-wide analysis of the heat shock transcription factors in *Populus trichocarpa* and *Medicago truncatula*. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 1877–1886.
- [12] Bharti K, Koskull-Döring P V, Bharti S, Kumar P, Tintschl-Körbitzer A, Treuter E, Nover L. 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*, 2004, 16: 1521–1535.
- [13] Swindell W R, Huebner M, Weber A P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 2007, 8: 125.
- [14] Zhang J, Liu B, Li J, Zhang L, Wang Y, Zheng H, Lu M, Chen J. *Hsf* and *Hsp* gene families in *Populus*: genome-wide identification, organization and correlated expression during development and in stress responses. *BMC Genomics*, 2015, 16: 181.
- [15] Tang R M, Zhu W J, Song X Y, Lin X Z, Cai J H, Wang M, Yang Q. Genome-wide identification and function analyses of heat shock transcription factors in potato. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 490.

- [16] Bharti K, Schmidt E, Lyck R, Heerklotz D, Bublak D, Scharf K D. Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *Plant J*, 2000, 22: 355–365.
- [17] Yoshida T, Sakuma Y, Todaka D, Maruyama K, Qin F, Mizoi J, Kidokoro S, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368: 515–521.
- [18] Link V, Sinha A K, Vashista P, Hofmann M G, Proels R K, Ehness R, Roitsch T. A heat-activated MAP kinase in tomato: a possible regulator of the heat stress response. *FEBS Lett*, 2002, 531: 179–183.
- [19] Zhu M D, Zhang M, Gao D J, Zhou K, Tang S J, Zhou B, Lyu Y M. Rice *OsHSA3* gene improves drought tolerance by modulating polyamine biosynthesis depending on abscisic acid and ROS levels. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: E1857.
- [20] Wu Z, Liang J, Wang C, Zhao X, Zhong X, Cao X, Li G, He J, Yi M. Overexpression of lily HsfA3s in *Arabidopsis* confers increased thermotolerance and salt sensitivity via alterations in proline catabolism. *J Exp Bot*, 2018, 69: 2005–2021.
- [21] Li W, Wang B, Wang M, Chen M, Yin J M, Kaleri G M, Zhang R J, Zuo T N, You X, Yang Q. Cloning and characterization of a potato *StANI1* gene involved in anthocyanin biosynthesis regulation. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56: 364–372.
- [22] Jin Q, Zhu K, Cui W, Xie Y, Han B, Shen W. Hydrogen gas acts as a novel bioactive molecule in enhancing plant tolerance to paraquat-induced oxidative stress via the modulation of heme-oxygenase-1 signalling system. *Plant Cell Environ*, 2013, 36: 956–969.
- [23] Rykaczewska K. The impact of high temperature during growing season on potato cultivars with different response to environmental stresses. *Am J Plant Sci*, 2013, 4: 2386–2393.
- [24] Tang R M, Niu S Y, Zhang G D, Chen G S, Haroon M, Yang Q, Rajora O P, Li X Q. Physiological and growth responses of potato cultivars to heat stress. *Botany*, 2018, 96: 897–912.
- [25] Ikeda M, Ohme-Takagi M. A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 970–975.
- [26] Li P S, Yu T F, He G H, Chen M, Zhou Y B, Chai S C, Xu Z S, Ma Y Z. Genome-wide analysis of the *Hsf* family in soybean and functional identification of *GmHsf-34* involvement in drought and heat stresses. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1009.
- [27] Emani C, Garcia J M, Lopata-Finch E, Pozo M J, Uribe P, Kim D J, Sunilkumar G, Cook D R, Kenerley C M, Rathore K S. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1: 321–336.
- [28] 贾小霞, 齐恩芳, 刘石, 文国宏, 马胜, 李建武, 黄伟. *AtDREB1A* 基因过量表达对马铃薯生长及抗非生物胁迫基因表达的影响. 作物学报, 2019, 45: 1166–1175.
- Jia X X, Qi E F, Liu S, Wen G H, Ma S, Li J W, Huang W. Effects of over-expression of *AtDREB1A* gene on potato growth and abiotic stress resistance gene expression. *Acta Agron Sin*, 2006, 2019, 45: 1166–1175 (in Chinese with English abstract).
- [29] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*, 2004, 57: 453–455.
- [30] Zhong L L, Zhou W, Wang H J, Ding S H, Lu Q T, Wen X G, Peng L W, Zhang L X, Lu C M. Chloroplast small heat shock protein HSP21 interacts with plastid nucleoid protein pTAC5 and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis* under heat stress. *Plant Cell*, 2013, 25: 2925–2943.
- [31] Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 2006, 125: 443–451.
- [32] Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18822–18827.
- [33] Li X D, Wang X L, Cai Y M, Wu J H, Mo B T, Yu E R. *Arabidopsis* heat stress transcription factors A2 (*HSA2*) and A3 (*HSA3*) function in the same heat regulation pathway. *Acta Physiol Plant*, 2017, 39: 67–75.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	ATGAACCCATTTTGATAAAAAATCAAGAATCTGTACTAATAACAAAAACCCCTTTTCGACTGAAATGGACTCTGAATTTGCTGCGTTTTCA								
1	M N P F D K N Q E S D T N T K T P F S T E M D S E F A A F S								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
91	CCAATTTCACTCCCTTTTGTGCTGACCCATCTTCTCCTTTTATCAATTTTGGATCTTTTGCCACTCCTTTTGAGCCAACATCCAGTTGGAGAA								
31	P I S L P F A D P S S P F I N F G S F A T P L S Q H P V G E								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
181	GGAGGAGAAATTGAACAGCTAGCTGAGGAAGGATTGGGTGTGCCACACCCCTATGGAGTGTGTTACATGGGATACAAATTCGCCCATTTTGTG								
61	G G E I E Q L A E E G L G V P H P M E C L H G I Q I P P F I L								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
271	TCAAAGACTTTTGATTGGTTGAGGACCCCTTTATTGGATTCGATTATTCTTCTGGGGTAGAAATGGAGAAAGCTTTGTAGTTTGGGATCCCA								
91	S K A T F D L V E D P L L D S I I S W G R N G E S F V V W D P								
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
361	GTGGAGTTTTCAGATTGGTTCTTCTCCTAGGAATTTCAAGCACAGCAATTTCTCCAGCTTTGTTTCGACAGCTTAATACATATGGATTTCGC								
121	V E F S R L V L P R N F K H S N F S S F V R Q L N T Y G F R								
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
451	AAAATCGATGCTGACAGGTGGGAGTTTGCGAATGAAGGGTTCTTGAGAGGGAAGAGGCATTTGTTGAAGAACATACAGAGGCGAAAGCCA								
151	K I D A D R W E F A N E G F L R G K R H L L K N I Q R R K P								
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
541	CATCAGGCTGGAAGTTCTTCTGGATCATCTGCTGGAGCAGGGAAGGTACTATGGATGAGATAGAGAACTCAGGAATGAGAAGAGTTTG								
181	H Q A G S S S G S S A G A G K G T M D E I E K L R N E K S L								
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
631	ATGATGCAGGAAGTTGTTGAGTTGCAGCAGCAGCAGCGTGGGACGGTTCAACAAATGGAATCTGTTAATGAAAAGCTTCAGGCTGCAGAA								
211	M M Q E V V E L Q Q Q Q R G T V Q Q M E S V N E K L Q A A E								
	730	740	750	760	770	780	790	800	810
721	CAAAGACAGAAGCAGATGGTTTCATTCTTGGCCAAGGTGCTTCAGAATCCCACATCTTGGCTCGTGTTCGGCAGATGAAGGAGCAAGGA								
241	Q R Q K Q M V S F L A K V L Q N P T F L A R V R Q M K E Q G								
	820	830	840	850	860	870	880	890	900
811	GAAATTAATTTGCCAAGAACATGAGGAATTTGTTAAACATCAGCCACATGGTCCGGATGGAGTGGGGTCTGCTTTTCATGGAAGGGCAG								
271	E I T C P R T M R K F V K H Q P H G P D G V G S S F M E G Q								
	910	920	930	940	950	960	970	980	990
901	ATAGTCAAGGTCAAGTCTGAATTTCAAGACCTTGACAGCATGCTTTGAGAGCCAGATTTCAATCCAGTTGTGGATCAACAACTCCAGAA								
301	I V K V K S E F Q D L A A C F E S P D F N P V V D Q Q L P E								
	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
991	ACTGGTTTAGGAGCGGAAGCCATGCCTTTTGAAGGTGGTACTGTGTCATCTGAGGGACTGACAGTGGCACATGAACCTTTTAAATTGTTCA								
331	T G L G A E A M P F E G G T V A S E G L T V A H E L F N C S								
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
1081	GATCGGGAAGAGGAGGAGCTTCATTCTTTAAACCCCGAAGGCTCTCATTTCAAAGGGAAGATGTAGCTAGTCCCTCAATTAGAAGTTATG								
361	D R E R G G A S F F N P E G S H F K G K N V A S P Q L E V M								
	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
1171	CCCGAGTACTTTGCTCTTTTCCAGAGGAGATGGGAAAGGAGAAAAACATTTCAAGATTTCCTCACCAGCTATTGGAAGCTTGGTGAA								
391	P E Y F A S F P E E M G K E K N I S G F S S P A I G S L V K								
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350
1261	GACGAGGAACCTTTGGAGTATGGGTTTGAAGCCAGTGTGCGCATGCCAAGTGTGCGCTGAGTTATGGGATAGTTTATAGCAGCTATGTC								
421	D E E L W S M G F E A S A G M P S A G A E L W D S F S S Y V								
	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
1351	CCAGACTTCGGTGTAGCTCTGGTCTGTGTCAGATTTGTGGGATATAGATCCCTTGCAAGCAGCTGGAAGTTCTGGGGTTGATAAGTGGCCA								
451	P D F G V S S G L S D L W D I D P L Q A A G S S G V D K W P								
	1450	1460	1470	1480	1490	1500			
1441	GCTGATGGGTCTCCTTTTGGTCACTCTGAAGGCCATGCCGACCAGCAAGAATGATAGTTTTTAG								
481	A D G S P F G Q S E S H A D Q P K N D S F *								

附图 1 马铃薯 *HsfA3* 基因的 cDNA 序列和对应的氨基酸序列Fig. S1 cDNA sequence of potato *HsfA3* and corresponding amino acid sequence