

甜荞 *FeHSP83* 基因的克隆及其在逆境胁迫下的表达分析

徐锐,熊泽浩,朱旭东,周宾寒,侯泽豪,许嘉盛,罗旖柔,方正武

(长江大学农学院,主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心,湖北荆州 434025)

摘要:为了探究甜荞 *FeHSP83* 基因在干旱和盐胁迫下的表达模式,本研究采用‘西农 9976’为试验材料,通过 15% PEG 6000 溶液和 0.1% NaCl 溶液对荞麦幼苗进行胁迫处理。通过 RT-PCR 的方法,鉴定获得 *FeHSP83*,该基因开放阅读框 2 100 bp,编码 704 个氨基酸,预测其相对分子质量为 80.97 kDa,理论等电点为 4.96,具有较强亲水性。同源性分析结果显示,该基因与藜麦、甜菜亲缘关系较近,同源性达到 97.06%。采用 qRT-PCR 的方法,对干旱和盐胁迫下 *FeHSP83* 基因在叶和根中的表达水平进行分析。结果显示,在干旱胁迫条件下,*FeHSP83* 在甜荞根部的表达量持续上升,到 48 h 达到最大值,增加范围为 1.03~10.20;叶的表达量呈先升后降的趋势;而在盐胁迫条件下,*FeHSP83* 在植株叶部的响应较为明显,增加范围为 1.07~6.24,在 12 h 时表达量达到最高;根部的表达量在 3 h 时迅速升高,随后缓慢下降。结果表明,*FeHSP83* 基因在干旱和盐胁迫条件下能够快速响应胁迫,且在根和叶不同器官中的表达存在差异。预测 *FeHSP83* 基因在甜荞抗旱中起到一定作用。

关键词:甜荞;*FeHSP83* 基因;克隆;逆境;表达模式

中图分类号:S517;S332.1 **文献标志码:**A

Cloning and expression analysis of buckwheat *FeHSP83* gene under drought and salt stress

XU Rui, XIONG Zehao, ZHU Xudong, ZHOU Binhan, HOU Zehao,
XU Jiasheng, LUO Yirou, FANG Zhengwu

(College of Agriculture, Yangtze University, Hubei Center for Collaborative
Innovation of Grain Industry, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: This study used ‘Xinong 9976’ as the experimental material to explore the expression pattern of the *FeHSP83* gene of sweet buckwheat under drought and salt stress. The buckwheat seedlings were subjected to stress treatment with 15% PEG 6000 solution and 0.1% NaCl solution. Through the RT-PCR method, *FeHSP83* was identified. The gene had an open reading frame of 2 100 bp and encoded 704 amino acids. Its relative molecular mass was predicted to be 80.97 kDa, and the theoretical isoelectric point was 4.96. It had strong hydrophilicity. The result of homology analysis showed that the gene was closely related to quinoa and sugar beet, and the homology reached 97.06%. The qRT-PCR method was used to analyze the expression level of *FeHSP83* gene in leaves and roots under drought and salt stress. The results showed that under drought stress, the expression of *FeHSP83* in the roots of buckwheat continued to increase, reaching the maximum at 48 h, with an increase in the range of 1.03~10.20; the expression of leaves showed a trend of increasing first and then decreasing; while under salt stress conditions *FeHSP83* had a more obvious response in the leaves of plants, and the increase range was 1.07~6.24, and the expression reached the highest at 12 h; the expression of roots increased rapidly at 3 h, and then slowly decreased. The results showed that *FeHSP83* gene quickly responded to stress under drought and salt stress, and the expression of *FeHSP83* gene in different organs of roots and leaves was different. Therefore, *FeHSP83* gene played a certain role in drought resistance of sweet buckwheat.

Keywords: sweet buckwheat; *FeHSP83* gene; clone; adversity; expression mode

随着全球环境的变化,干旱、高温、盐碱等非生物胁迫已经成为影响植物正常生长的关键因素。荞麦是蓼科(*Polygonaceae*)荞麦属(*Fagopyrum Mill*)药食两用的草本植物,主要分为苦荞(*Fagopyrum tataricum Gaertn*)、甜荞(*Fagopyrum esculentum Moench*)两个栽培种。其中甜荞作为一种重要的粮食作物和经济作物,在我国北方干旱地区得到了大量种植。因此,开展荞麦抗逆研究对于培育植物抗逆新品种具有重要意义。

热激蛋白(Heat shock proteins, HSPs)也被称为热休克蛋白,是植物遭遇高温等非生物胁迫时诱导生物体合成的一类保护性蛋白。大多数真核细胞生物体内都有种类丰富的 HSPs 存在^[1],一般根据蛋白质大小以及同源关系,将其分为五大类,分别是 HSP60、HSP70、HSP90、HSP110 和小分子量 sHSP 家族^[2],其中 HSP90 家族蛋白主要存在于真核细胞中,约占细胞蛋白总数的 1%~2%^[3];在结构上包含有两个保守结构域,N-端为 ATP 酶结合域、C-端含有二聚体结合区,中间段为氨基酸,是一个主要受 ATP 调控的二聚体伴侣蛋白^[4]。已有研究表明 HSP90 在控制细胞周期、细胞生存、激素等多个细胞过程中扮演重要角色^[5],且与其他蛋白间存在互作关系,如 Hsp40、p23\FKBP52 等^[6]。近年来,HSP90 家族研究逐渐成为热点^[7]。另外,HSP90 作为一种功能专一的蛋白折叠工具,在生物体的存活和逆境胁迫应答方面有着重要意义^[8]。同时 HSP90 作为分子伴侣,参与辅助了其他蛋白的合成与加工,在生物体机能维护方面起到了极其重要的作用^[9]。

目前 HSP90 家族在辣椒(*Capsicum annuum L.*)^[10]、南瓜(*Cucurbita moschata*)^[11]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[12]等植物中得到了广泛的研究,但其在甜荞逆境胁迫条件下的分析却鲜有报道。本试验以‘西农 9976’为材料开展研究,通过同源克隆的方法得到荞麦 *FeHSP83* 基因序列,在此基础上对该序列进行生物信息学分析,通过进化树亲缘关系对比,发现其隶属于 HSP90 家族成员,与此同时运用 qRT-PCR 的方法探究该基因在干旱、盐胁迫条件下的表达情况,分析该基因在荞麦中的表达模式,为荞麦培育抗旱抗盐品种提供优异的基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料、生长条件及胁迫处理

试验用甜荞品种为‘西农 9976’,挑选饱满无病害的种子,经消毒冲洗后,置于铺有双层滤纸的培

养皿中,25℃ 恒温催芽,待种子长出根时,将长势相同的荞麦种子移栽至水培盒中,进行常规水肥管理。待幼苗长出 2~3 片真叶后,使用 15% PEG 6000 溶液和 0.1% NaCl 溶液对荞麦幼苗进行胁迫处理,在分别处理 3、6、12、24、48 h 后对幼苗和根部进行取样,将胁迫前的材料作为对照,每个处理设置 3 个生理学重复,样品通过液氮速冻后放置 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.2 供试仪器与试剂

PCR 扩增采用 Bio-rad T-100 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司);凝胶成像仪购自上海培清科技有限公司。RNA 提取试剂盒(RN38)购自北京艾德莱生物科技有限公司;反转录试剂盒(TaKaRa)及金牌 MIX 购自北京擎科生物科技有限公司;荧光定量试剂盒、感受态细胞引物合成和 DNA 测序也均由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.3 *FeHSP83* 基因克隆

荞麦嫩叶基因组 DNA,总 RNA 提取法参考 CTAB 法^[13-14],得到 RNA 后利用反转录试剂盒逆转录 RNA 得到 cDNA,具体试验步骤参照试剂盒说明书进行。以 cDNA 为模板,使用引物 *FeHSP83-F/FeHSP83-R*(表 1)对基因进行扩增。PCR 反应体系如下:cDNA 2 μL,上下游引物各 1.5 μL,金牌 MIX 45 μL。PCR 反应条件为:98℃ 预变性 2 min,98℃ 变性 10 s,56℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环,72℃ 延伸 5 min,4℃ 保温。PCR 产物使用 1.0% 琼脂凝胶电泳进行检测,产物保存于 -20℃ 备用。参照凝胶试剂盒回收目的条带,采用 007VS 载体连接回收产物,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,通过 AMP 抗生素进行筛选,挑选阳性克隆进行测序。

1.4 *FeHSP83* 基因的生物信息学分析

通过 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库网站 ORF Finder 分析目标基因编码区;利用在线

表 1 引物名称与序列

Table 1 Primer name and sequence

引物 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	用途 Purpose of primers
FeHSP83-F	ATGGCAGACGTTTCAGATGGC	基因克隆
FeHSP83-R	TTAATCAACCTCTCCATCTTGCT	Gene cloning
QFeHSP83-RTF	ACAGCGGACACGAGATGACT	表达分析
QFeHSP83-RTR	TGGCTGACACGAGCTTCTTT	
QFeACTIN-F	ACCTTGCTGGACGTGACCTTAC	Expression analysis
QFeACTIN-R	CCATCAGGAAGCTCATACTTC	

软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析目标基因基本理化特性;利用 MEGA7.0 软件,以邻接法 (Neighbor-joining, NJ; bootstrap = 1000) 构建进化树;通过 WOLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 在线软件进行蛋白亚细胞定位预测;使用 SWISS - MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对蛋白质三级结构进行预测。

1.5 *FeHSP83* 基因的 qRT-PCR 分析

以反转录的 cDNA 第一链为模板,将其稀释 10 倍后用于荧光定量分析。设计 *FeHSP83* 基因对应的荧光定量引物,根据 TB Green (TaKaRa, 大连) 荧光定量试剂盒操作说明书在 CFX96 real-time PCR 仪器 (美国 BioRad 公司) 上进行 qRT-PCR。qRT-PCR 反应体系为 20 μ L、100 ng cDNA 模板、引物各 0.6 μ L 和 10 μ L PCR-mix (2 \times)。qRT-PCR 反应体系为:95 $^{\circ}$ C, 30s, (95 $^{\circ}$ C, 10s; 55 $^{\circ}$ C, 30s) \times 40 个循环。试验以 β -Actin 为内参基因,试验数据通过 CK 对样品做标准化处理,并使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.6 数据处理

通过 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析,利用 Excel 2019 和 SPSS 19.0 软件对数据进行整理和统计分析,最后使用 Excel 2019 软件绘制基因表达量的柱状图。

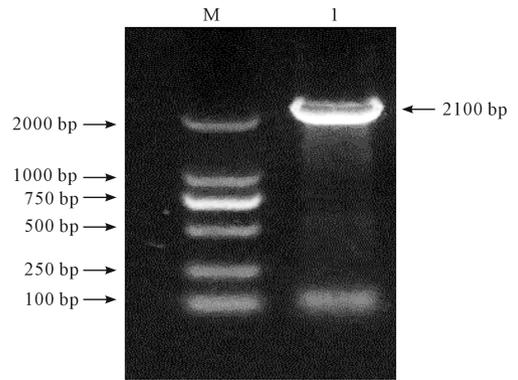
2 结果与分析

2.1 *FeHSP83* 基因的克隆

以甜荞 cDNA 为模板,使用表 1 中的引物进行扩增,连接 007VS 载体后转化大肠杆菌,利用 AMP 抗生素筛选阳性克隆,成功获得了目的条带,通过观察 PCR 产物凝胶电泳图 (图 1) 可知,PCR 扩增得到的长度大约为 2 100 bp,与预期的片段大小基本一致。通过 BLAST 对比发现,甜荞 *HSP83* 基因与藜麦 *HSP83* 基因同源性达到 80% 以上,证实在西农 9976 中获得了 *HSP83* 基因,将其命名为 *FeHSP83*。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 *FeHSP83* 蛋白质理化性质与序列分析 通过 ProtParam 软件对 *FeHSP83* 蛋白理化特性分析表明,该基因蛋白相对分子量约为 80.97 kDa,理论等电点为 4.96,总共包括 11408 个原子,分子式为 C3592H5721N9330I1137S25。在组成 *FeHSP83* 编码蛋白的 704 个氨基酸中,谷氨酸 (Glu) 含量最高,达到了 12.5%,负电荷残基 143 个,正电荷残基 109 个,脂溶指数为 82.56,蛋白的不稳定参数为 41.03,具有较强亲水性。



注:M:DNA 标准物 2000;1:引物 *FeHSP83*-F/*FeHSP83*-R 的扩增产物。

Note:M:DNA maker 2000;1: Amplified products of primers *FeHSP83*-F/*FeHSP83*-R.

图 1 *FeHSP83* 基因扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR product for *FeHSP83*

2.2.2 *FeHSP83* 蛋白的同源比对和进化分析 利用 NCBI 数据库,将 *FeHSP83* 基因编码的氨基酸序列与甜菜 (*BvHSP83*)、藜麦 (*CqHSP83*)、花生 (*AhHSP83*) 的 *HSP83* 氨基酸序列进行对比 (图 2),结果显示,其蛋白氨基酸长度极为相似,同源性达 97.06%,说明 *FeHSP83* 蛋白在这几个作物中存在较高的相似性。

通过进化树的构建,发现甜荞 *FeHSP83* 蛋白与甜菜、藜麦 *HSP83* 蛋白的亲缘关系较近,与番茄、辣椒等作物的 *HSP83* 蛋白亲缘关系较远 (图 3)。进一步对比发现,同一分支上的甜菜、藜麦与甜荞都为藜科植物,这种进化关系符合形态学分类规律,由此我们可推测 *FeHSP83* 基因具有较高的保守性。

2.2.3 *FeHSP83* 蛋白亚细胞定位 WOLF PSORT 预测表明,该蛋白主要存在于细胞质,推测其编码蛋白可能在细胞核外发挥作用。使用 SWISS - MODEL 网站对 *FeHSP83* 蛋白的三级结构进行预测,其结构如图 4 所示。

2.3 *FeHSP83* 基因的表达分析

实时荧光定量 PCR 结果显示 (图 5),经干旱和盐胁迫处理后,*FeHSP83* 基因能较快响应胁迫,且在根、叶不同部位的表达量存在较大差异。在干旱胁迫条件下,*FeHSP83* 在植株根部的表达量持续上升,至 48 h 达到最大,响应较为强烈;叶的表达量呈先升后降的状态,在 48 h 时表达量最高,12 h 时表达量较低。在盐胁迫条件下,*FeHSP83* 在植株叶部的响应较为强烈,在 12 h 时表达量达到最高,之后开始下降;根部的表达量在 3 h 时迅速升高,随后缓慢下降。

FeHSP83	MADVQMAEAEETFAFCAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSDALDKIRFESLTDKSKLDAQPELFIIRLVPDKANKT	80
AhHSP83	MADVQMAEAEETFAFCAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSDALDKIRFESLTDKSKLDAQPELFIIRLVPDKANKT	80
CqHSP83	MADVQMAEAEETFAFCAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSDALDKIRFESLTDKSKLDAQPELFIIRLVPDKANKT	80
BvHSP83	MADVQMAEAEETFAFCAEINQLLSLIINTFYSNKEIFLRELISNSDALDKIRFESLTDKSKLDAQPELFIIRLVPDKANKT	80
Consensus	madv m aetfafqaeinqlslsiintfysnkeiflrelisn sdaldkirfesltdkskldaqpelfirlvpdkankt	
FeHSP83	LSIIDSIGIMGTKADLVNVLNGLTIARSGTKEFMEALQAGADVSMIGQFVGFGVFSAYLVAEKVIVTTKHNDEQYTWESQAGG	160
AhHSP83	LSIIDSIGIMGTKADLVNVLNGLTIARSGTKEFMEALQAGADVSMIGQFVGFGVFSAYLVAEKVIVTTKHNDEQYTWESQAGG	160
CqHSP83	LSIIDSIGIMGTKADLVNVLNGLTIARSGTKEFMEALQAGADVSMIGQFVGFGVFSAYLVAEKVIVTTKHNDEQYTWESQAGG	160
BvHSP83	LSIIDSIGIMGTKADLVNVLNGLTIARSGTKEFMEALQAGADVSMIGQFVGFGVFSAYLVAEKVIVTTKHNDEQYTWESQAGG	160
Consensus	lsiidsigimgtkadlvnvlngltiarsgtkefmealqagadvsmigqfvgfgvfyfsaylvaekvivttkhndeqy wesqagg	
FeHSP83	SFTVTRDITSGEQLRGRTKITLFLKEDQLEYLEERRIKDLVKKHSEFISYPIYLWTEKTTTEKESISDDEDDEPKKKEEGEVI	239
AhHSP83	SFTVTRDITSGEQLRGRTKITLFLKEDQLEYLEERRIKDLVKKHSEFISYPIYLWTEKTTTEKESISDDEDDEPKKKEEGEVI	239
CqHSP83	SFTVTRDITSGEQLRGRTKITLFLKEDQLEYLEERRIKDLVKKHSEFISYPIYLWTEKTTTEKESISDDEDDEPKKKEEGEVI	240
BvHSP83	SFTVTRDITSGEQLRGRTKITLFLKEDQLEYLEERRIKDLVKKHSEFISYPIYLWTEKTTTEKESISDDEDDEPKKKEEGEVI	239
Consensus	sftvtrd itsgelqrgrtkitlflkedqleyleerrikdlvkkhsefisyypiylwtektttekesisdeded depkkeeegevi	
FeHSP83	EEVDEEKREKAKKKKKIKEVSHWQLINKQKPIWLRKPEEITKEEYASFYKSLTNDWEDHLAVKHFVSEGCQLEFKAILFV	319
AhHSP83	EEVDEEKREKAKKKKKIKEVSHWQLINKQKPIWLRKPEEITKEEYASFYKSLTNDWEDHLAVKHFVSEGCQLEFKAILFV	319
CqHSP83	EEVDEEKREKAKKKKKIKEVSHWQLINKQKPIWLRKPEEITKEEYASFYKSLTNDWEDHLAVKHFVSEGCQLEFKAILFV	320
BvHSP83	EEVDEEKREKAKKKKKIKEVSHWQLINKQKPIWLRKPEEITKEEYASFYKSLTNDWEDHLAVKHFVSEGCQLEFKAILFV	319
Consensus	e vdeek r k k k k k i k e v s h e w q l i n k q k p i w l r k p e e i t k e e y a s f y k s l t n d w e d h l a v k h f s v e g c q l e f k a i l f v	
FeHSP83	PKRAPFDLFDTRKKFNINIKLYRRVFMIDNCEEITPEYLSFVKGVSDDLPLNISREVLQONKILKVIKRNIVKCCIEI	399
AhHSP83	PKRAPFDLFDTRKKFNINIKLYRRVFMIDNCEEITPEYLSFVKGVSDDLPLNISREVLQONKILKVIKRNIVKCCIEI	399
CqHSP83	PKRAPFDLFDTRKKFNINIKLYRRVFMIDNCEEITPEYLSFVKGVSDDLPLNISREVLQONKILKVIKRNIVKCCIEI	400
BvHSP83	PKRAPFDLFDTRKKFNINIKLYRRVFMIDNCEEITPEYLSFVKGVSDDLPLNISREVLQONKILKVIKRNIVKCCIEI	399
Consensus	pkrapfdlfdtrkkfniniklyrrvfmidnceeitpeylsfvkgvdsddlplnisrevlqonkilkvirknivkcciei	
FeHSP83	FNEIAENKDYDNKFFYAFSKNLIKGIHEDSQNRKADLLRYHSTKSGDEMTSLKDYVTRMKEGQKDIYYITGESKKA	479
AhHSP83	FNEIAENKDYDNKFFYAFSKNLIKGIHEDSQNRKADLLRYHSTKSGDEMTSLKDYVTRMKEGQKDIYYITGESKKA	479
CqHSP83	FNEIAENKDYDNKFFYAFSKNLIKGIHEDSQNRKADLLRYHSTKSGDEMTSLKDYVTRMKEGQKDIYYITGESKKA	480
BvHSP83	FNEIAENKDYDNKFFYAFSKNLIKGIHEDSQNRKADLLRYHSTKSGDEMTSLKDYVTRMKEGQKDIYYITGESKKA	479
Consensus	fneiaenk dydnkffyafsknlikgihedsqnrkladllryhstks g d e m t s l k d y v t r m k e g q k d i y y i t g e s k k a v e	
FeHSP83	NSPFLERLKKKGYEVLVMDAIDEYAVGQLKEYBGKKLVATKEGLKLDDDEEEKKKKEEKKKSFEDLCKVIKDIILGDK	559
AhHSP83	NSPFLERLKKKGYEVLVMDAIDEYAVGQLKEYBGKKLVATKEGLKLDDDEEEKKKKEEKKKSFEDLCKVIKDIILGDK	559
CqHSP83	NSPFLERLKKKGYEVLVMDAIDEYAVGQLKEYBGKKLVATKEGLKLDDDEEEKKKKEEKKKSFEDLCKVIKDIILGDK	560
BvHSP83	NSPFLERLKKKGYEVLVMDAIDEYAVGQLKEYBGKKLVATKEGLKLDDDEEEKKKKEEKKKSFEDLCKVIKDIILGDK	559
Consensus	nspfle lk gyevl vm d a i d e y a v g q l k e y b g k k l v a t k e g l k l d d e e e e k k k e e k k k s f e d l c k v i k d i l g d k	
FeHSP83	VEKVVVSDRIVDSPCCCLVTGEYGYANMERIMKAQALRDSMAGYMSKKTMEINPDNGIMEELRKRKRAEADKNDKSVKDI	639
AhHSP83	VEKVVVSDRIVDSPCCCLVTGEYGYANMERIMKAQALRDSMAGYMSKKTMEINPDNGIMEELRKRKRAEADKNDKSVKDI	639
CqHSP83	VEKVVVSDRIVDSPCCCLVTGEYGYANMERIMKAQALRDSMAGYMSKKTMEINPDNGIMEELRKRKRAEADKNDKSVKDI	640
BvHSP83	VEKVVVSDRIVDSPCCCLVTGEYGYANMERIMKAQALRDSMAGYMSKKTMEINPDNGIMEELRKRKRAEADKNDKSVKDI	639
Consensus	vekvvvsdrivdspccclvtgeygyanmerimkaqalrds magymsskktmeinpdngimeelrkrkraeadkndksvkdil	
FeHSP83	VLLLFETALLTSGFSLDPNTFAARIHRMLKLGLSIEDEDAEEDADMPAEEBEGCEESKMEEV	703
AhHSP83	VLLLFETALLTSGFSLDPNTFAARIHRMLKLGLSIEDEDTGGDADIPPEEDGAEESKMEEV	703
CqHSP83	VLLLFETALLTSGFSLDPNTFAARIHRMLKLGLSIEEET...EDADMPALEDAEESKMEEV	702
BvHSP83	VLLLFETALLTSGFSLDPNTFAARIHRMLKLGLSIEEDDAG...EDADMPALEEDV...EESKMEEV	702
Consensus	v ll l f e t a l l t s g f s l d p n t f a a r i h r m l k l g l s i e e d e d a e e d a d m p a e e e s k m e e v	

图 2 FeHSP83 与其他物种同源蛋白的多序列比对分析结果

Fig.2 Multi-alignment of FeHSP83 amino acid sequence with other HSP83s

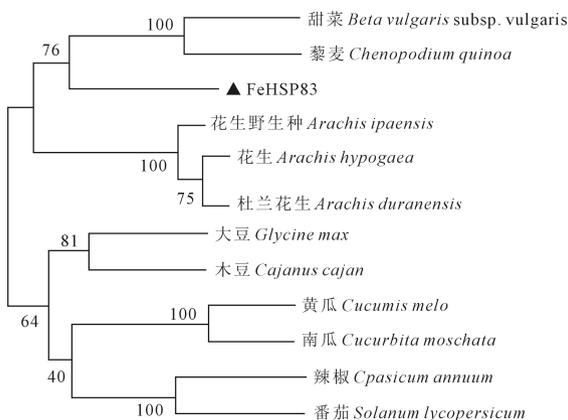


图 3 FeHSP83 与其他物种 HSP83 蛋白的系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of FeHSP83 with other HSP83-like proteins

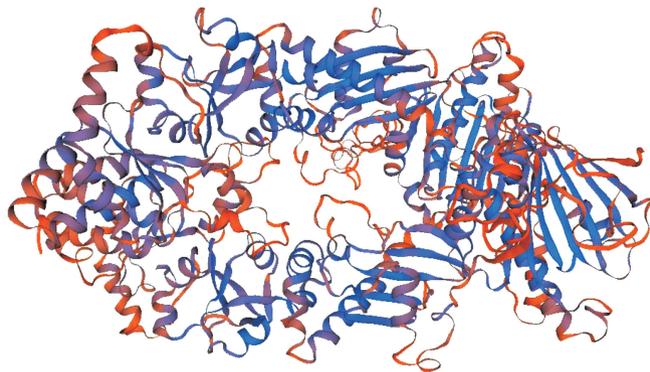


图 4 FeHSP83 蛋白的三级结构预测分析结果

Fig.4 Prediction of three-dimensional structure of FeHSP83 protein

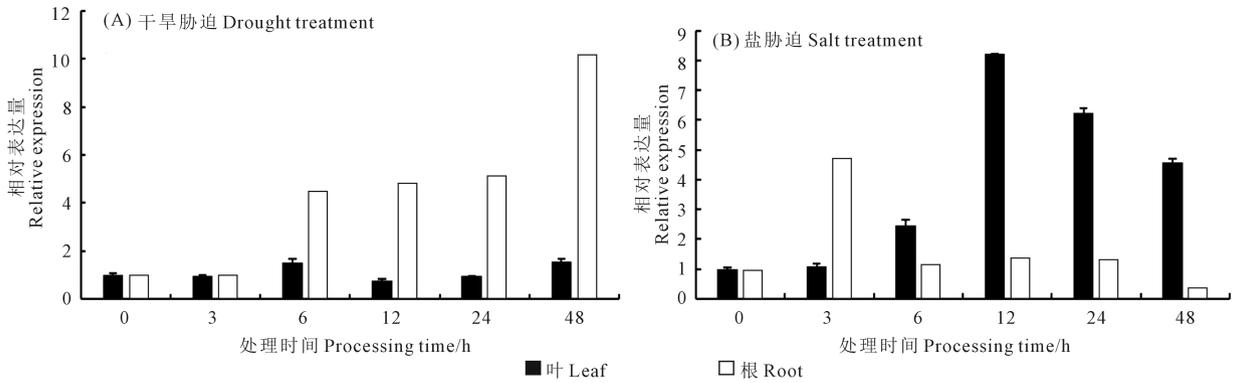


图 5 *FeHSP83* 在甜荞不同组织中的表达分析

Fig.5 Relative expression analysis of *FeHSP83* in different tissues of sweet buckwheat

3 讨论

热激蛋白(HSPs)是一类在生物体受到外界胁迫时由转录因子诱导合成产生的高度保守的蛋白质家族。目前,HSP被报道主要有三类生物学功能:(1)分子伴侣,能够帮助其他的蛋白质折叠、转运,而自身不参与相关代谢;(2)获得耐热性;(3)调控细胞骨架动力学^[15]。HSP90作为HSP家族中的一员,分子量大约为90KD,通常以同型二聚体结构存在于真核细胞中,王彬等^[11]研究发现,*CmHSP90*基因参与了中国南瓜对逆境的应答,表达量与其定位以及执行的功能有一定关系。叶绿体HSP90主要参与光热激的信号转导,而线粒体HSP90的功能较为特殊,主要作用为免受氧化胁迫带来的伤害。此外,有研究显示,热激转录因子(HSFs)在逆境信号传导过程中起着重要的作用,大量HSP家族基因表达受其调控。

甜荞是我国重要的经济作物,有很高的营养价值和药用价值,其生育期短、适应性强、耐贫瘠等优点,在干旱地区作物布局中具有极其重要的地位。本研究根据已知序列进行*FeHSP83*基因的引物设计,从甜荞品种西农9976中成功克隆了*FeHSP83*基因的编码序列,在对该基因进行生物信息学分析后发现*FeHSP83*基因具有HSP90家族所有的Pfam区域,在进化关系上与藜麦*FeHSP83*蛋白、甜菜*FeHSP83*蛋白较为接近,与番茄*FeHSP83*蛋白相距较远,推测*FeHSP83*蛋白隶属于HSP90家族,在功能上可能与藜麦较为相似,具有较高的同源保守性。

本研究基于转录组测序结果分析,发现了逆境胁迫条件下特异性表达基因*FeHSP83*,实时荧光定量PCR结果显示在干旱和盐胁迫条件下,*FeHSP83*

基因在甜荞幼苗子叶和根部的表达量显著上升,且在根和叶不同部位间的反应存在较大差异。在干旱胁迫处理下,甜荞幼苗子叶和根部反应迅速,子叶部分表达量相对较大,而在盐胁迫条件下,甜荞幼苗子叶和根部反应较为迟缓,根部的表达量远高于子叶部分。因此,我们可以推测,*FeHSP83*基因参与了甜荞对逆境胁迫的应答,在甜荞抗旱研究中起到一定作用。在后续的研究中,我们可以通过农杆菌介导转化法,构建超量表达载体转入荞麦,进一步探究*FeHSP83*基因在逆境胁迫下的调控机制,为荞麦的抗逆分子育种奠定基础。

参考文献:

- [1] JOHNSON J L, BROWN C. Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms[J]. Cell Stress & Chaperones, 2009, 14(1): 83-94.
- [2] AL-WHAIBI M H. Plant heat-shock proteins: a mini review [J]. Journal of King Saud University-Science, 2011, 23(2): 139-150.
- [3] MORONI E, AGARD D A, COLOMBO G. The structural asymmetry of mitochondrial Hsp90 (Trap1) determines fine tuning of functional dynamics[J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2018, 14(2): 1033-1044.
- [4] TERASAWA K, MINAMI M, MINAMI Y. Constantly updated knowledge of Hsp90[J]. Journal of Biochemistry, 2005, 137(4): 443-447.
- [5] 汤佳乐,徐海,苑平等.植物Hsp90s与耐热性关系的研究进展[J].生物技术通报,2020,36(10):173-179.
TANG J L, XU H, YUAN P, et al. Advance in relationship between heat shock protein 90s and thermo-tolerance in plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(10): 173-179.
- [6] MORÁN LUENGO T, KITTYK R, MAYER M P, et al. Hsp90 breaks the deadlock of the Hsp70 chaperone system[J]. Molecular Cell, 2018, 70(3): 545-552.
- [7] ADÃO R, ZANPHORLIN L M, LIMA T B, et al. Revealing the interaction mode of the highly flexible *Sorghum bicolor* Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop): a conserved carboxylate clamp confers high

- affinity binding to Hsp90 [J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 191: 191-201.
- [8] 陈庆山,郭森鑫,辛大伟,等.大豆热激蛋白 Hsp90 家族基因鉴定及分析[J].*东北农业大学学报*,2021,52(2):1-9.
CHEN Q S, GUO M X, XIN D W, et al. Identification and analysis of heat shock protein Hsp90 family genes in soybean [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2021, 52(2): 1-9.
- [9] CHEN X H, LIN S K, LIU Q L, et al. Expression and interaction of small heat shock proteins (sHsps) in rice in response to heat stress [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1844(4): 818-828.
- [10] 王静,谭放军,梁成亮,等.辣椒热激蛋白 HSP90 家族基因鉴定及分析[J].*园艺学报*,2020,47(4):665-674.
WANG J, TAN F J, LIANG C L, et al. Genome-wide identification and analysis of HSP90 gene family in pepper[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(4): 665-674.
- [11] 王彬,陈敏氢,林琿,等.中国南瓜 CmHSP90 基因的克隆及其在逆境胁迫下的表达分析[J].*中国细胞生物学学报*,2019,41(12): 2332-2341.
WANG B, CHEN M D, LIN H, et al. Cloning of CmHSP90 gene in *Cucurbita moschata* and its expression analysis under several adversity stresses[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2019, 41(12): 2332-2341.
- [12] 刘云飞,万红军,杨悦悦,等.番茄热激蛋白 90 的全基因组鉴定及分析[J].*遗传*,2014,36(10):1043-1052.
LIU Y F, WAN H J, YANG Y J, et al. Genome-wide identification and analysis of heat shock protein 90 in tomato[J]. *Hereditas*, 2014, 36(10): 1043-1052.
- [13] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(1): 8-15.
- [14] MEISEL L, FONSECA B, GONZÁLEZ S, et al. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses [J]. *Biological Research*, 2005, 38(1): 83-88.
- [15] 杜晓华,黄伶俐,刘会超.植物热激蛋白 70(HSP70)研究进展[J].*河南科技学院学报(自然科学版)*,2014,42(3):17-21.
DU X H, HUANG L L, LIU H C. Advance of heat shock protein 70 (HSP70) in plant [J]. *Journal of Henan Institute of Science and Technology(Natural Sciences Edition)*, 2014, 42(3): 17-21.

(上接第 87 页)

- [31] 闫永庆,刘兴亮,王崑,等.白刺对不同浓度混合盐碱胁迫的生理响应[J].*植物生态学报*,2010,34(10):1213-1219.
YAN Y Q, LIU X L, WANG K, et al. Effect of complex saline-alkali stress on physiological parameters of *Nitraria tangutorum* [J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2010, 34(10): 1213-1219.
- [32] 王金平,王舒甜,岳健敏,等.香樟幼苗对 NaCl 胁迫的生理响应[J].*中国水土保持科学*,2016,14(5):82-89.
WANG J P, WANG S T, YUE J M, et al. Physiological response of *Cinnamomum camphora* seedlings to NaCl stress [J]. *Science of Soil and Water Conservation*, 2016, 14(5): 82-89.
- [33] 王佳,聂兆君,扶海超,等.外源 Zn²⁺对冬小麦幼苗根系生长及部分氮代谢关键酶的影响[J].*河南农业大学学报*,2018,52(3): 307-312.
WANG J, NIE Z J, FU H C, et al. Effects of exogenous Zn²⁺ on root growth and some key enzymes in nitrogen metabolism in winter wheat seedlings [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2018, 52(3): 307-312.
- [34] SANDAR KYAING M,顾立江,程红梅.植物中硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的作用[J].*生物技术进展*,2011,1(3):159-164.
SANDAR KYAING M, GU L J, CHENG H M. The role of nitrate reductase and nitrite reductase in plant [J]. *Current Biotechnology*, 2011, 1(3): 159-164.
- [35] 李玉梅,郭修武,代汉萍,等.盐碱胁迫对牛叠趾幼苗渗透调节物质及叶绿素含量的影响[J].*经济林研究*,2015,33(1):9-16.
LI Y M, GUO X W, DAI H P, et al. Effects of salt-saline stress on contents of osmotic adjustment substances and chlorophyll in *Rubus crataegifolius* seedlings [J]. *Nonwood Forest Research*, 2015, 33(1): 9-16.
- [36] 朱金方,陆兆华,夏江宝,等.盐旱交叉胁迫对怪柳幼苗渗透调节物质含量的影响[J].*西北植物学报*,2013,33(2):357-363.
ZHU J F, LU Z H, XIA J B, et al. Changes of osmotic adjusting substances in leaves of *Tamarix chinensis* seedlings under salt and drought stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33(2): 357-363.
- [37] 肖强,郑海雷,陈瑶,等.盐度对互花米草生长及脯氨酸、可溶性糖和蛋白质含量的影响[J].*生态学杂志*,2005,24(4):373-376.
XIAO Q, ZHENG H L, CHEN Y, et al. Effects of salinity on the growth and proline, soluble sugar and protein contents of *Spartina alterniflora* [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(4): 373-376.
- [38] 方志红,董宽虎.NaCl 胁迫对碱蒿可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响[J].*中国农学通报*,2010,26(16):147-149.
FANG Z H, DONG K H. Effects of NaCl stress on soluble protein contents and soluble carbohydrate contents of *Artemisia cnethifolia* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(16): 147-149.