

花楸树小热激蛋白 23.8 基因 (*SpHSP23.8*) 克隆与表达分析

张 泽¹, 裴 鑫¹, 鲁仪增², 常金财³, 郑 健^{1,①}

(1. 北京农学院园林学院, 北京 102206; 2. 山东省林木种质资源中心, 山东 济南 250102;
3. 呼伦贝尔市林业科学研究所, 内蒙古 呼伦贝尔 021008)

摘要: 以花楸树 [*Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.] 为研究对象, 对其小热激蛋白 23.8 基因 (*SpHSP23.8*) 的克隆、组织特异性表达以及响应非生物胁迫的表达进行研究。结果表明: *SpHSP23.8* 基因开放阅读框 (ORF) 包含 648 个碱基, 编码 215 个氨基酸, 其编码氨基酸序列的理论相对分子质量约 23 800, 该基因包含 1 个内含子。氨基酸序列比对结果显示: *SpHSP23.8* 蛋白与枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] EjsHSP6 蛋白 (登录号 AKP06201.1) 的同源性最高。根据 *SpHSP23.8* 蛋白与模式植物小热激蛋白氨基酸序列的聚类分析结果, 推测 *SpHSP23.8* 蛋白定位于线粒体中。组织特异性表达结果显示: *SpHSP23.8* 基因在茎中的相对表达量最高, 其次为果实和根, 而花中的相对表达量最低。高温、NaCl 及干旱胁迫下, 花楸树叶片中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量显著升高。随着高温胁迫时间的延长, *SpHSP23.8* 基因的相对表达量呈先升高后降低的变化趋势, 且在胁迫 2.00 h 达到峰值; 在 NaCl 和干旱胁迫下, *SpHSP23.8* 基因的相对表达量均呈升高的变化趋势。高温、NaCl 和干旱胁迫下, *SpHSP23.8* 基因在转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中的表达趋势与其在相应胁迫条件下花楸树中的表达趋势一致。上述研究结果表明: *SpHSP23.8* 基因参与了花楸树对高温、NaCl 和干旱胁迫的响应, 在花楸树引种驯化的适应性方面起着一定的作用。

关键词: 花楸树; 小热激蛋白 (sHSPs); 基因克隆; 基因表达; 非生物胁迫

中图分类号: Q943.2; S792.25 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)05-0009-12

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.05.02

Cloning and expression analysis on small heat shock protein 23.8 gene (*SpHSP23.8*) in *Sorbus pohuashanensis* ZHANG Ze¹, PEI Xin¹, LU Yizeng², CHANG Jincai³, ZHENG Jian^{1,①} (1. School of Landscape Architecture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Shandong Provincial Center of Forest Tree Germplasm Resources, Jinan 250102, China; 3. Hulun Buir Institute of Forestry Science, Hulun Buir 021008, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(5): 9-20

Abstract: Taking *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. as research object, cloning, tissue-specific expression, and expression in response to abiotic stress of its small heat shock protein 23.8 gene (*SpHSP23.8*) were studied. The results show that the open reading frame (ORF) of *SpHSP23.8* gene contains 648 bases, which encodes 215 amino acids with a theoretical relative molecular mass about 23 800, and the gene contains one intron. The amino acid sequence alignment result shows that *SpHSP23.8* protein has the highest homology with EjsHSP6 protein (accession No. AKP06201.1) in *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. Based on the cluster analysis result of amino acid sequence of *SpHSP23.8* protein and small heat shock proteins in model plants, it is speculated that *SpHSP23.8* protein is located in mitochondria. The tissue-specific expression result shows that the relative expression

收稿日期: 2020-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770369); 国家林木种质资源共享服务平台 (2003DKA21003); 北京市农村工作委员会新型生产经营主体科技能力提升工程项目 (20170202); 城乡生态环境北京实验室建设项目 (PXM2015_014207_000014)

作者简介: 张 泽 (1995—), 男, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事林木种质资源育种方面的研究。

①通信作者 E-mail: buazhengjian708@126.com

of *SpHSP23.8* gene is the highest in stem, followed by fruit and root, and the lowest in flower. Under high temperature, NaCl, and drought stresses, the relative expression of *SpHSP23.8* gene in leaf of *S. pohuashanensis* increases significantly. With the elongation of high temperature stress time, the relative expression of *SpHSP23.8* gene shows a tendency to first increase and then decrease, and reaches the peak value under stress for 2.00 h; under NaCl and drought stresses, that of *SpHSP23.8* gene all shows a tendency to increase. Under high temperature, NaCl, and drought stresses, the expression tendency of *SpHSP23.8* gene in *SpHSP23.8*-transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. is consistent with that in *S. pohuashanensis* under corresponding stresses. It is suggested that *SpHSP23.8* gene is involved in the response of *S. pohuashanensis* to high temperature, NaCl, and drought stresses and plays a certain effect in the adaptability of introduction and domestication of *S. pohuashanensis*.

Key words: *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.; small heat shock proteins (sHSPs); gene cloning; gene expression; abiotic stress

小热激蛋白(sHSPs)是理论相对分子质量介于16 000~40 000之间的一类热激蛋白,是植物中最丰富且分布广泛的一类热激蛋白,且相较于其他真核生物,数目更多,差异也较大^[1]。小热激蛋白不仅参与许多细胞内过程及某些蛋白质家族成员突变导致细胞功能紊乱的调节^[2-3],还能在胁迫下作为中间体,通过阻止蛋白质的不可逆变性保护蛋白质。同时,小热激蛋白不仅起着“保持酶”伴侣的作用,还积极调控蛋白质富集过程,提高细胞在不同应激条件下(如高温或氧化应激)恢复蛋白质稳态的能力。除了调节细胞应激反应和响应细胞条件的变化,许多小热激蛋白基因还能在正常生长的细胞中表达^[4-5],通过调节正常蛋白质间的相互作用影响多种细胞功能,包括细胞信号传导、分化和凋亡。研究表明:小热激蛋白不仅参与植物对高温或热激的响应,而且能响应其他生物及非生物胁迫,如病原菌、捕食者、干旱、低温、盐害、紫外线、重金属离子、渗透胁迫、厌氧胁迫甚至是重力的变化等,也能诱导小热激蛋白基因表达^[6]。高温胁迫下,*Festuca arundinacea* Schreb.中*FaHSP18.2*基因的表达量明显上调,进而提高其对高温的耐受性^[7];干旱胁迫处理后,*Eucalyptus cladocalyx* F. Muell.中*EchSP17.6*基因表达量极显著升高^[8];马铃薯(*Solanum tuberosum* Linn.)中大多数小热激蛋白基因在高温胁迫、盐胁迫和渗透胁迫下明显上调表达^[9];水稻(*Oryza sativa* Linn.)中*OsHSP 26.7*、*OsHSP23.2*、*OsHSP17.9A*、*OsHSP17.4*和*OsHSP16.9A*基因在热胁迫下上调表达^[10];橡胶树[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.]在低温胁迫条件下大多数小热激蛋白基因明显上调表达^[11]。然而,小叶杨(*Populus simonii* Carr.)中*PsHSP17.4*基因在高温胁迫下转录下调,推测其可能在小叶杨高温

胁迫过程中不作为分子伴侣,而是发挥了其他功能^[12]。此外,小热激蛋白还能参与植物特定的生长发育过程^[13]。

花楸树[*Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.]为落叶小乔木,广泛分布于中国北方地区,原生境海拔约800~2 500 m,是一种优良的观叶、观花、观果树种,在中国东北地区作为行道树适应性良好^[14]。除观赏价值外,花楸树还是中国传统的药用植物^[15-16]。已有关于花楸树的研究主要集中在地理分布与天然更新^[17]、群体遗传多样性^[18]、种源地理变异^[19]、种子发育与休眠^[20-21]、繁殖技术^[22-23]以及引种驯化^[24]等方面,而在花楸树响应高温胁迫的机制方面,仅有花楸树2年生幼苗响应高温胁迫的生理生化机制^[25-26]以及花楸树热激蛋白70基因克隆和功能^[27]方面的初步报道。花楸树自然生境海拔较高,土壤大多为山地棕壤,pH 5.4至pH 6.2,呈弱酸性,腐殖质含量高,养分丰富,土壤肥力高。在实际引种驯化及种质资源保存过程中,难以保证引种地(或保存地)与原生地环境完全一致,因此,花楸树引种到低海拔地区将面临包括高温在内的多种非生物胁迫限制,探究其对逆境胁迫的响应有助于研究其驯化适应机制。本研究克隆了花楸树小热激蛋白基因,探讨其在非生物胁迫条件下的表达模式,并通过转化拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]对其功能进行进一步剖析,明确其在高温等非生物胁迫下的响应表达模式,以期在花楸树引种驯化奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验于2017年3月至2019年5月在北京农学

院园林学院实验基地进行。供试花楸树1年生实生苗(营养钵栽)用于干旱和NaCl胁迫实验,2年生实生苗(盆栽)用于高温胁迫实验,4年生实生苗用于基因组DNA提取和组织特异性表达分析。野生型拟南芥(*Col*背景)为本实验室保存。

实验用TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、2×EasyTaq PCR SuperMix、Trans2K Plus DNA Marker、pTOPO-TA Simple克隆载体及EasyPure Quick Gel Extraction Kit购自北京全式金生物技术有限公司,EASYspin Plus Complex Plant RNA Kit、50×TAE Buffer、2×Sybr Green qPCR Mix和抗生素等化学试剂购自北京艾德莱生物技术有限公司。Pleela超表达载体由中国科学院植物研究所刘永秀课题组惠赠。引物合成及测序皆由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA、总RNA提取及cDNA第1链合成 参照刘聪聪等^[27]的方法进行花楸树叶片基因组DNA的提取,参照EASYspin Plus Complex Plant RNA Kit说明书进行总RNA的提取,参照TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix说明书进行反转录,合成cDNA第1链。

1.2.2 基因克隆和序列分析 对花楸树转录组数据^[28]进行分析后,经NCBI的BLAST网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中BLASTn在线软件比对,获得1条与小热激蛋白基因相似的序列,依据所得序列设计引物*SpHSP23.8*-CF和*SpHSP23.8*-CR(表1),分别以花楸树cDNA和gDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系总体积为20.0 μL,包括模板1.0 μL、10 μmol·L⁻¹正向和反向引物各0.4 μL、2×EasyTaq PCR SuperMix 10.0 μL和ddH₂O 8.2 μL。扩增程序为:94℃预变性3 min;94℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸2 min,30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经质量体积分数1.0%琼脂糖凝胶电泳并回收目的条带、连接到pTOPO-TA Simple克隆载体进行测序,采用DNAMAN 7.0软件对测序结果进行开放阅读框(open reading frame, ORF)分析,获得该基因的cDNA序列,然后对该基因的gDNA和cDNA进行序列比对和结构分析。

1.2.3 蛋白质生物信息学分析 使用DNAMAN 7.0软件预测花楸树*SpHSP23.8*基因编码的氨基酸序列,利用NCBI的BLAST网站中BLASTp在线软件进行

同源性比对;利用ExPasy网站(<http://www.expasy.org/>)的相关软件预测蛋白质的理论等电点和理论相对分子质量;通过ProtParam工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)对蛋白质的一级结构进行分析;利用Sopma工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白质的二级结构;利用ClustalX 2.1软件对花楸树*SpHSP23.8*蛋白以及拟南芥、水稻和毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook.)等模式植物不同亚族小热激蛋白的氨基酸序列进行聚类分析(邻接法, neighbor joining method),并采用自检举法(bootstrap method)对构建的进化树进行评估(重复1 000次)。

表1 用于花楸树*SpHSP23.8*基因克隆和表达的引物序列
Table 1 Primer sequences used for cloning and expression of *SpHSP23.8* gene in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>SpHSP23.8</i> -CF	ATGGCTTCGTCAATGTCAATCC
<i>SpHSP23.8</i> -CR	CTACTCAACCTTAACCTCAAACACA
<i>SpHSP23.8</i> -QF	GAGCAGAACACGCTGCTAGT
<i>SpHSP23.8</i> -QR	CGTCACCTTCGGAATCACCA
<i>Sβ-actin</i> QF	TGGATGGCTGGAAGAGGA
<i>Sβ-actin</i> QR	GAGCGGAAATTGTGAGG
<i>SpHSP23.8</i> -TF	CACCATGGCTTCGTCAATGTCAATCC
<i>SpHSP23.8</i> -TR	CTACTCAACCTTAACCTCAAACACA
<i>Aβ-actin</i> QF	CTCCTTTGTGCTGTTGACTAC
<i>Aβ-actin</i> QR	GCACAAATGTTACCGTACAGATC

1.2.4 基因表达分析

1.2.4.1 组织特异性表达分析 参照刘聪聪等^[27]的研究方法,选取3株花楸树4年生实生苗,分别于2018年3月10日取芽,3月20日取幼叶和茎(1年生枝条的顶部第1和第2节间部分),4月20日(盛花期)取花,5月20日(花期后20 d)取果实、成熟叶和根,液氮速冻后于-80℃保存、备用。每株作为1个生物学重复,重复3次。

1.2.4.2 响应高温胁迫表达分析 以花楸树2年生实生苗为实验材料,置于昼温25℃、夜温23℃、光照时间16 h·d⁻¹、光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹的人工气候箱中预处理3 d后,进行温度42℃、全光照、光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹热激胁迫处理,期间正常浇灌清水避免干旱,分别于处理0.00、0.25、1.00、2.00、6.00、12.00和24.00 h从植株顶端往下数取第3

枚叶片,液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。以高温胁迫 0.00 h 为对照。每个处理3株,重复3次。

1.2.4.3 响应 NaCl 胁迫表达分析 以花椒树1年生实生苗为实验材料,在昼温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、夜温 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照强度 $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的培养室中进行培养,分别浇灌 200 和 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液 100 mL ,分别于处理 2 和 7 d 从植株顶端往下数取第3枚叶片,液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。以浇灌等体积蒸馏水为对照。每个处理10株,重复3次。

1.2.4.4 响应干旱胁迫表达分析 以花椒树1年生实生苗为实验材料,在昼温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、夜温 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照强度 $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的培养室中,分别于干旱胁迫(不浇灌清水)处理 5 和 10 d 从植株顶端往下数取第3枚叶片,液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。以正常浇灌清水为对照。每个处理10株,重复3次。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析使用的引物为 *SpHSP23.8*-QF 和 *SpHSP23.8*-QR (表 1), 均以花椒树 β -actin 基因为内参基因, 引物为 *Sp* β -actinQF 和 *Sp* β -actinQR (表 1), PCR 反应体系参照 $2\times$ Sybr Green qPCR Mix 说明书。PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s ; $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s , 40 个循环。

1.2.5 转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥响应非生物胁迫的表达分析

采用 Gateway 方法^[29], 构建 *SpHSP23.8*-Pella (35S 驱动) 超表达载体, 并将其转化农杆菌 GV3101+MPK90, 利用农杆菌介导转化野生型拟南芥。在含有 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 草铵膦 (PPT) 的固体 MS 培养基上筛选转基因植株, 经 3 代筛选获得 2 个超表达纯合转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系 OE1 和 OE2, 用于后续试验。载体构建使用的引物为 *SpHSP23.8*-TF 和 *SpHSP23.8*-TR (表 1)。

1.2.5.1 转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥响应高温胁迫表达分析 以 4 周龄 OE1 和 OE2 为实验材料, 将其置于温度 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、全光照、光照强度 $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的人工气候箱中, 分别于处理 0.00 、 0.25 、 1.00 、 2.00 、 6.00 、 12.00 和 24.00 h 取莲座叶片 (处理期间正常浇灌清水), 经液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。以高温胁迫 0.00 h 为对照。每个基因型每个处理收集 3 株, 重复 3 次。

1.2.5.2 转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥响应 NaCl 胁迫表

达分析 以 4 周龄 OE1 和 OE2 为实验材料, 在昼温 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、夜温 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照强度 $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的培养室中, 分别浇灌 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液 100 mL , 每 3 d 浇灌 1 次, 分别于处理 0 、 3 、 6 和 9 d 取莲座叶片, 液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。以处理 0 d 为对照。每个基因型每个处理收集 3 株, 重复 3 次。

1.2.5.3 转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥响应干旱胁迫表达分析 以 4 周龄 OE1 和 OE2 为实验材料, 在光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、昼温 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、夜温 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的培养室中, 分别于干旱胁迫 (不浇灌清水) 0 、 3 、 6 和 9 d 取莲座叶片, 液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。以干旱胁迫 0 d 为对照。每个基因型每个处理收集 3 株, 重复 3 次。

qRT-PCR 分析使用的引物为 *SpHSP23.8*-QF 和 *SpHSP23.8*-QR (表 1), 以拟南芥 β -actin 基因为内参基因, 引物为 *At* β -actinQF 和 *At* β -actinQR (表 1), 参照 $2\times$ Sybr Green qPCR Mix 说明书进行 qRT-PCR 分析, PCR 反应程序同 1.2.4.4, 每个样品 3 个技术重复。

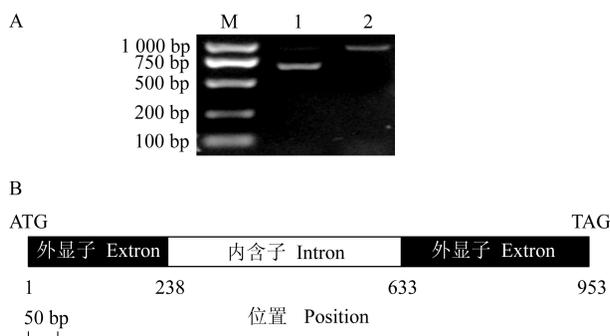
1.3 数据处理

定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[30] 进行计算。采用 SPSS 15.0 软件进行单因素方差分析, 采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较^[31]。

2 结果和分析

2.1 花椒树小热激蛋白基因 cDNA 和 gDNA 序列分析

根据花椒树转录组数据, 以花椒树 cDNA 为模板进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳和测序, 获得 1 条长度为 648 bp 的片段 (图 1), 经与其他植物比对, 发现该片段为花椒树小热激蛋白 20 家族基因。将 PCR 产物纯化并成功连入 pTOPO-TA Simple 克隆载体, 测序结果经 NCBI 比对后, 确定克隆得到的序列为小热激蛋白 20 基因的 ORF 序列, 该序列共包含 648 个碱基, 编码 215 个氨基酸, 编码氨基酸序列理论相对分子质量约 $23\text{ }800$, 该基因命名为 *SpHSP23.8* (图 2)。以花椒树 gDNA 为模板的 PCR 产物碱基序列与 *SpHSP23.8* 基因 ORF 碱基序列比较, 发现该基因 gDNA 序列共包含 953 个碱基, 在 238 至 633 位点插入 1 个长度为 305 bp 的内含子 (图 1-B)。



M: Marker; 1,2: 分别为 *SpHSP23.8* 基因的 cDNA 和 gDNA 的 PCR 扩增条带 PCR amplified bands of cDNA and gDNA of *SpHSP23.8* gene, respectively; ATG: 起始密码子 Initiation codon; TAG: 终止密码子 Termination codon.

图 1 花椒树 *SpHSP23.8* 基因的 PCR 扩增图谱 (A) 和结构示意图 (B)

Fig. 1 PCR amplification pattern (A) and its structure schematic diagram (B) of *SpHSP23.8* gene in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.

```

1 ATGGCTTCGTC AATGTC AATCCTTCTCAAAAAGGGCCG CAGCACCAGCACCAACCATCCTCTCCAAGCTCTCCAACCCCATCCGTTCTGCT
1 M A S S M S I L L K R A A A P A P T I L S K L S N P I R S A

91 TCTGTATCTCCCTCGTTTCTCGGTCATTCAACACCAACAGCCAAGTCACCAGTACGACCAGGATGAAAGCTCAGTCCCGTCGGTCCG
31 S V S P L V S R S F N T N S Q V T S Y D Q D E S S V P V G R

181 AGCACGCCGACAGGTCCTCCCTCCGCGCCGTGACCTCGGTTCTCCCTTCTTATCAGATGTTTTCGATCCGTTTTCTCCGACGAGGAGC
61 S T A D R S P S R R R D L G S P F L S D V F D P F S P T R S

271 TTGACCCAGGTTCTGAACATGGTGGACCAGTTCATGGACAACCCATCTCTGGCTGGGCGCGGGGAGGATCGAGAAGGGGATGGACGCTG
91 L T Q V L N M V D Q F M D N P S L A G P R G G S R R G W D V

361 AAGGAAAACGAGGAGGCTCTGTTTCTGCGAATGGACATGCCGGGACTGGACAAGGAGGACGTGAAGATCTCGGTGGAGCAGAACACGCTG
121 K E N E E A L F L R M D M P G L D K E D V K I S V E Q N T L

451 GTAGTGAAAGGGGAGGGGAAGGACTTGGAGGATGAAGACGGCGGAACGAGGAGGTTCTCGAGCAGACTGGAAGTGCCTCCGAATCTGTAC
151 V K G E G K D L E D E D G G T R R F S S R L E L P P N L Y

541 AAGATCGATTGATTAGGGCTGAGATGAAGAATGGAGTTCTGAAGCTGGTATTCCGAAGGTGACGGAGGAAGAGAAAGGATGTGTTT
181 K I D S I R A E M K N G V L K L V I P K V T E E E R K D V F

631 GAGGTTAAGGTTGAGTAG
211 E V K V E *
    
```

箭头示内含子插入位点 The arrow shows the insertion site of intron; 方框示小热激蛋白特有保守序列 The boxes show the specific and conserved sequences of small heat shock protein; *: 终止密码子 Termination codon.

图 2 花椒树 *SpHSP23.8* 基因 ORF 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The ORF sequence of *SpHSP23.8* gene in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. and its encoding amino acid sequence

```

MASSMILLKRAAAPITILSKLSNPIRSASVSPVLSVRSFNNTNSQVTSYDQDESSVPVGRSTADRSPSRR
hhhhhhhhhhccccchhhhhccccccccchhhhhcccccccccccccccccccccccccccccccc
RDLGSPFLSDVDFPSPTRSLTQVLNMVDQFMDNPSLAGPRGSSRRGWDVKEEALFLRMDMPGLDKED
ccccchhhccccccccchhhhhhhhhhhhhhhccccccccccccccccccccchheeeecttcttc
VKISVEQNTLVKGEKLEDEGGTRRFSSRLLEPPLNYKIDSIKRAEMKNGVLIKLVIPKVTVEERKDFV
eeeeeecttteeetccccccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhthheeeccccccccchh
EVKVE
eeeee
    
```

h: α 螺旋 α -helix; t: β 转角 β -turn; e: 延伸链 Extended strand; c: 无规卷曲 Random coil.

图 3 花椒树 *SpHSP23.8* 蛋白的二级结构预测
Fig. 3 Secondary structure prediction on *SpHSP23.8* protein in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.

2.2 花椒树 *SpHSP23.8* 蛋白的基本特性

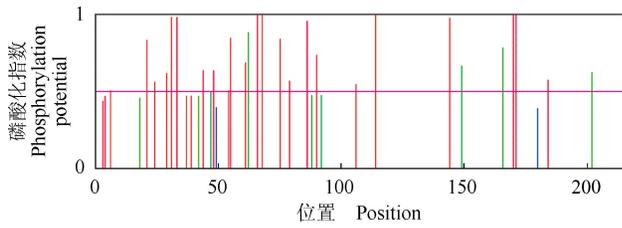
蛋白质一级结构分析结果显示: 花椒树 *SpHSP23.8* 基因编码 215 个氨基酸, 组成结构为 $C_{1034}H_{1685}N_{297}O_{334}S_7$, 不稳定系数 66.61, 属于不稳定蛋白。该蛋白包含带负电荷的氨基酸残基(天冬氨酸和谷氨酸)33 个, 带正电荷的氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸)31 个(图 2), 理论等电点为 pI 5.47, 属于酸性蛋白质。

蛋白质二级结构的预测结果(图 3)显示: 花椒树 *SpHSP23.8* 蛋白中 α 螺旋包含 50 个氨基酸残基, 占总氨基酸残基数目的 23.26%; β 转角包含 9 个氨基酸残基, 占总氨基酸残基数目的 4.19%; 延伸链包含 28 个氨基酸残基, 占总氨基酸残基数目的 13.02%; 无规卷曲包含 128 个氨基酸残基, 占总氨基酸残基数目的 59.53%。

蛋白质磷酸化位点预测结果(图 4)显示: *SpHSP23.8* 蛋白包含 28 个磷酸化位点, 其中, 丝氨酸磷酸化位点 23 个, 苏氨酸磷酸化位点 5 个。

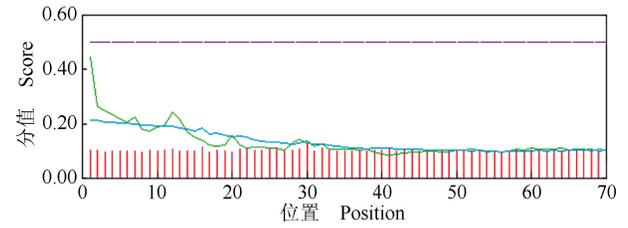
SignalP 预测结果(图 5)显示: Y 分值的最大值为 0.214, C 分值的最大值为 0.126, S 分值的最大值为 0.444, D 值(S 分值的平均值和 Y 分值的最大值的平均值)为 0.224(小于 0.500), 说明 *SpHSP23.8* 蛋白不具有信号肽。

将 *SpHSP23.8* 蛋白的氨基酸序列在 NCBI 网站



—: 丝氨酸 Serine; —: 酪氨酸 Tyrosine; —: 苏氨酸 Threonine; —: 阈值 Threshold.

图 4 花椒树 SpHSP23.8 蛋白的磷酸化位点预测
Fig. 4 Prediction on phosphorylation site of SpHSP23.8 protein in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.



—: C 分值 C-score; —: S 分值 S-score; —: Y 分值 Y-score; —: 阈值 Threshold.

图 5 花椒树 SpHSP23.8 蛋白的信号肽预测
Fig. 5 Prediction on signal peptide of SpHSP23.8 protein in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.

上进行 BLAST 比对,发现 SpHSP23.8 蛋白中 ACD 序列分别位于 119~200 位点,其羧基端存在小热激蛋白中保守的氨基酸残基序列 P-x(14)-x-V/L/I-V/L/I 和 P-x(14)-G-V-L(图 2)。与同源性较高的植物的比对结果(图 6)显示:SpHSP23.8 蛋白与枇杷

[*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] EjsHSP6 蛋白(登录号 AKP06201.1)的同源性最高,为 94.88%;与白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd.) PbsHSP 蛋白(登录号 XP_009348586.1)、梅(*Prunus mume* Sieb.) PmHSP22 蛋白(登录号 XP_008238549.1)、桃

SpHSP23.8	MASSMSILLKRAAFAPTILSKLSNPTRSASVSLVSRSFNTNSQVTSYDQDESSVFPVGRSTADRSPSRRRD...LGSPFLSD...VFDP	84
EjsHSP6	MAITSMISILLKFAAFAPTILSKLSNPTRSASVSLVSRSFNTNSQVTSYDQDESSVFPVGRGTADRSPSRRRD...LGSPFLSD...VFDP	84
PbsHSP	MAASMSILLKRAAFAPTILSKLSNPTRSASVSLVSRSFNTNSQVTSYDQDESSVFPVGRGTADMSPSRRRD...LGSPFLSD...VFDP	84
PmHSP22	MASVSIILLRFASA...PTLFSKLSLSPTRRSASVSLVSRSFNSNAQVTSYDQDRSVFPVDRSTTDRSPSRRRD...FGPTFFSD...VFDP	82
PpHSP22	MASVSIILLRFASA...PTLFSKLSLSPTRRSASVSLVSRSFNSNAQVTSYDQDRRVFPVDRSTTDRSPFRRRD...LGPTFFSD...VFDP	82
PaHSP22	MASVSIILLRFASA...PTLFSKLSLSPTRRSASVSLVSRSFNSNAQVTSYDQDDLRFVFPVDRRTTDRSPSRRRD...LGPTFFSD...VFDP	82
RcHSP22	MASISIALRRASS...PSLFSKLFNPTRSVSVAFSVSRSFNTNAQRTSYDQDDRSVSVDRRTTTS...SPSRRRDPIIDVFDFPFYDESRSLARS	87
EgsHSP	MASLLARRRATAAASSGVLRSRTNPFVFAASVAFHAFRSFNTSSQMRVDEDDSLVDVERRSDR.AVSRRE...PGLFS...DVFD	81
FvHSP22	MASISIALRRASS...PSLFSKLFNPTRSVSVAFSVSRSFNTNAQRSSYDQDDRSVSVDRSTSG...SEYRRRDPIIDVFDFPFYDESRSLARS	88
AcsHSP	MASLLARRRATAAS...LLKRLAHPTRRSASAVFSVSRSFNTTVEVTRSDGERSVDVDRRPDR.SIARRRGS...GPSEFS...DVFD	79
CmsHSP	MASIALRRLAAS...AAKTFSEMRSAVLSVSRSFNTNAQIASYDDEDRSVDLRSRRSG.SLSRFRDR...FPGEA...DVCH	77
SpHSP23.8	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAGPR...GGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLDKELVKISVEQNTLVVVGEGKDLSEDEEG...GT	166
EjsHSP6	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAGPR...GGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLDKELVKISVEQNTLVVVGEGKDLSEDEEG...GA	166
PbsHSP	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAGPR...GGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLDKELVKISVEQNTLVVVGEGKDLSEDEEG...GA	166
PmHSP22	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAGPR...GGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLDKELVKISVEQNTLVVVGEGKDLSEDEEG...GG	160
PpHSP22	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAGPR...GGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLDKELVKISVEQNTLVVVGEGKDLSEDEEG...GG	160
PaHSP22	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAGPR...GGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLDKELVKISVEQNTLVVVGEGKDLSEDEEG...GG	160
RcHSP22	INQVFRSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAASRGV.GAAGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLEKGLVVKISVEQNTLTVRGEKDFEDEEG...GG	174
EgsHSP	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAASRGV.GAAGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLSRELVKISVEQNTLTVRGEKDFEDEEG...ESG	169
FvHSP22	INQVFRSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAAYRGL.GAGGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLNKEIVKISVEQNTLTVRGEKDFEDEEG...GG	175
AcsHSP	FSPT.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAASRGV.GAAGSRGWDVKEEELFLRMDMPGLDKELVKISVEQNTLTVRGEKDFEDEEG...FG	166
CmsHSP	FSLN.RSLTQVLNMMVQCFMDNPFSLAASRGV.GAAGSR.RGWDVKEEELFLRMDMPGLSKELVKISVEQNTLTVRGEAAKESYE...DR	162
SpHSP23.8	RFSSRLLELPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	215
EjsHSP6	RFSSRLLELPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	215
PbsHSP	RFSSRLLELPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	215
PmHSP22	RFSSRLDLEPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	209
PpHSP22	RFSSRLDLEPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	209
PaHSP22	RFSSRLDLEPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	209
RcHSP22	RFSSRLDLEPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	223
EgsHSP	RFSSRLDLEPNLYKIDGIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	218
FvHSP22	RFSSRLDLEPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	224
AcsHSP	RFSSRLDLEPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	215
CmsHSP	RFSSRLDLEPNLYKIDSIFAELKNGVLLKLVIPKVEEERKIDVFEVKVE	211

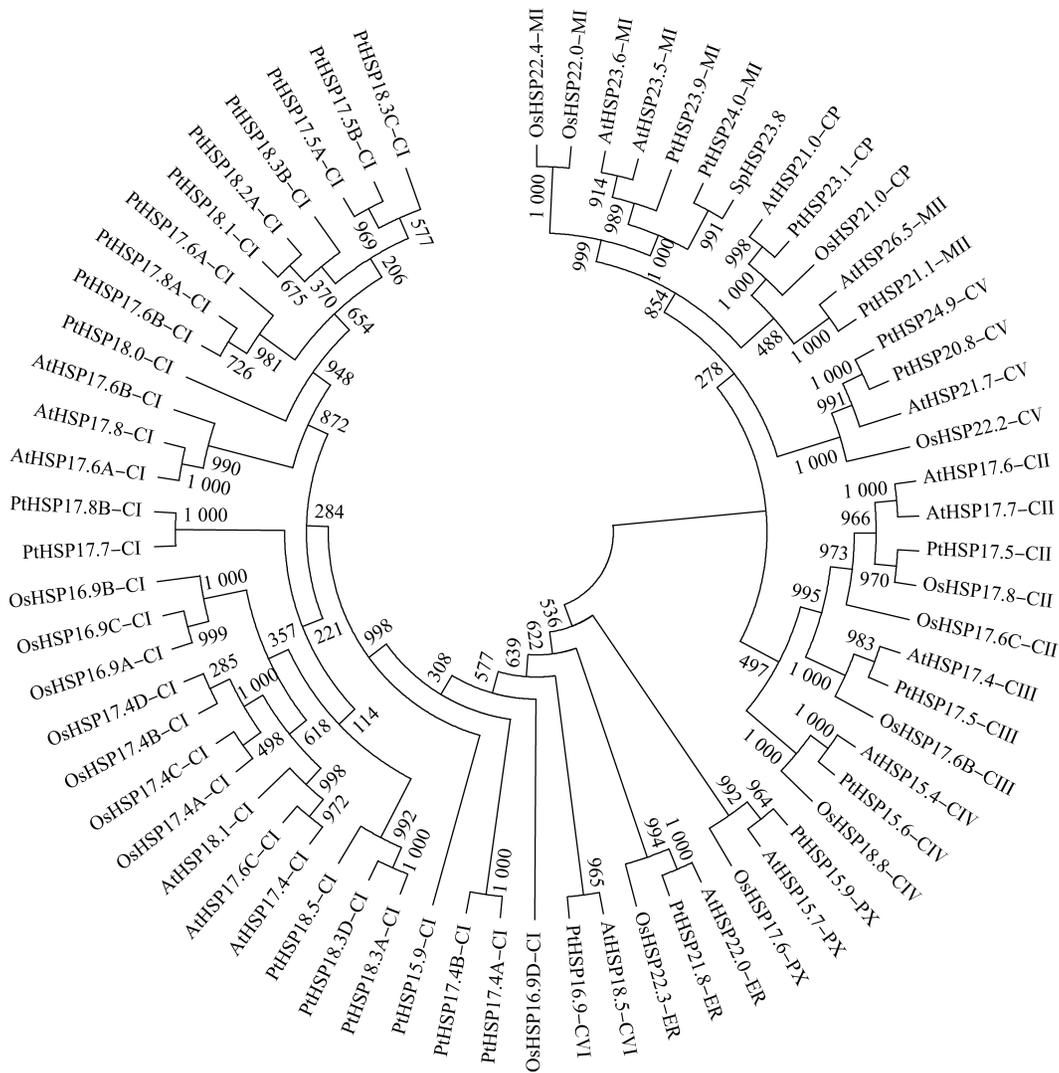
Sp: 花椒树 *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.; Ej: 枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.; Pb: 白梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd.; Pm: 梅 *Prunus mume* Sieb.; Pp: 桃 *Prunus persica* (Linn.) Batsch; Pa: 欧洲甜樱桃 *Prunus avium* (Linn.) Linn.; Rc: 月季花 *Rosa chinensis* Jacq.; Eg: 大桉 *Eucalyptus grandis* W. Mill ex Maiden; Fv: 野草莓 *Fragaria vesca* Linn.; Ac: 中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch.; Cm: 南瓜 *Cucurbita moschata* Duch.

图 6 基于氨基酸序列花椒树 SpHSP23.8 蛋白与其他植物 HSP20 蛋白的同源性比对
Fig. 6 Homologous alignment on SpHSP23.8 protein in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. with HSP20 protein in other plants based on amino acid sequence

[*Prunus persica* (Linn.) Batsch] PpHSP22 蛋白 (登录号 XP_007209602.1) 和欧洲甜樱桃 [*Prunus avium* (Linn.) Linn.] PaHSP22 蛋白 (登录号 XP_021831941.1) 的同源性也较高, 分别为 93.95%、83.26%、82.33% 和 81.86%; 与月季花 (*Rosa chinensis* Jacq.) RcHSP22 蛋白 (登录号 XP_024172893.1)、大桉 (*Eucalyptus grandis* W. Mill ex Maiden) EgsHSP 蛋白 (登录号 XP_010053471.1)、野草莓 (*Fragaria vesca* Linn.) FvHSP22 蛋白 (登录号 XP_004299444.1)、中华

猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) AcsHSP 蛋白 (登录号 PSS11530.1) 和南瓜 (*Cucurbita moschata* Duch.) CmsHSP 蛋白 (登录号 XP_022937223.1) 的同源性较低, 分别为 64.94%、64.53%、63.20%、61.09% 和 61.01%。

对花楸树 SpHSP23.8 蛋白与拟南芥、水稻和毛果杨 3 种模式植物不同亚族小热激蛋白的氨基酸序列进行聚类分析, 结果 (图 7) 显示: 花楸树 SpHSP23.8 蛋白与毛果杨 PtHSP24.0 蛋白在进化上关系最近, 且与



Pt: 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Os: 水稻 *Oryza sativa* Linn.; Sp: 花楸树 *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. C I, C II, C III, C IV, C V, C VI: 分别为细胞质亚族 I、II、III、IV、V 和 VI Cytosol subgroup I, II, III, IV, V, and VI, respectively; ER: 内质网亚族 Endoplasmic reticulum subgroup; PX: 过氧化物酶体亚族 Peroxisome subgroup; CP: 叶绿体亚族 Chloroplast subgroup; M I, M II: 分别为线粒体亚族 I 和 II Mitochondria subgroup I and II, respectively. 分支上数据表示重复次数 Datums in the branches indicate repeats.

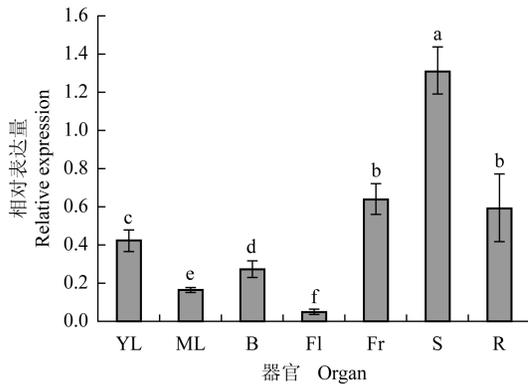
图 7 基于氨基酸序列花楸树 SpHSP23.8 蛋白与模式植物 sHSPs 的进化树
 Fig. 7 Phylogenetic tree of SpHSP23.8 protein in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. with sHSPs in model plants based on amino acid sequence

毛果杨、拟南芥和水稻线粒体亚族的小热激蛋白聚为一支,推测 SpHSP23.8 蛋白定位于花楸树的线粒体中。

2.3 花楸树 *SpHSP23.8* 基因的表达分析

花楸树不同器官中 *SpHSP23.8* 基因的表达情况见图 8;高温胁迫、NaCl 胁迫和干旱胁迫下,花楸树叶片中 *SpHSP23.8* 基因的表达情况分别见图 9、图 10 和图 11。

由图 8 可以看出:花楸树茎中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量最高,显著($P < 0.05$)高于其他器官;果实和根中的相对表达量也较高;花中的相对表达量最低。



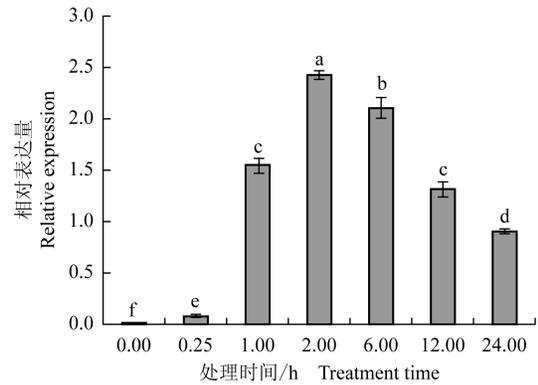
YL: 幼叶 Young leaf; ML: 成熟叶 Mature leaf; B: 芽 Bud; Fl: 花 Flower; Fr: 果实 Fruit; S: 茎 Stem; R: 根 Root. 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

图 8 花楸树不同器官中 *SpHSP23.8* 基因的表达分析
Fig. 8 Expression analysis on *SpHSP23.8* gene in different organs of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.

由图 9 可以看出:随着高温胁迫时间的延长,花楸树叶片中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量呈先升高后降低的变化趋势。高温胁迫 0.25 h, *SpHSP23.8* 基因的相对表达量即显著升高,随后急剧升高;高温胁迫 2.00 h,其相对表达量达到峰值,随后其相对表达量显著降低。

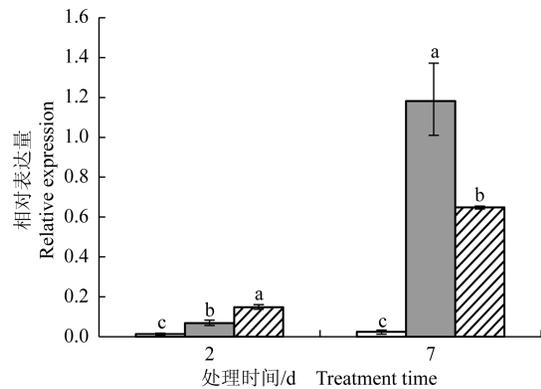
由图 10 可以看出:200 和 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下,花楸树叶片中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量均显著高于对照(蒸馏水)。NaCl 胁迫 2 d, *SpHSP23.8* 基因的相对表达量随着 NaCl 浓度的提高显著升高;NaCl 胁迫 7 d,其相对表达量随着 NaCl 浓度的提高先显著升高后显著降低。

由图 11 可以看出:干旱胁迫 5 d,花楸树叶片中



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

图 9 高温胁迫下花楸树叶片中 *SpHSP23.8* 基因的表达分析
Fig. 9 Expression analysis on *SpHSP23.8* gene in leaf of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. under high temperature stress



□: 对照 The control; ■: 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; ▨: 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl.

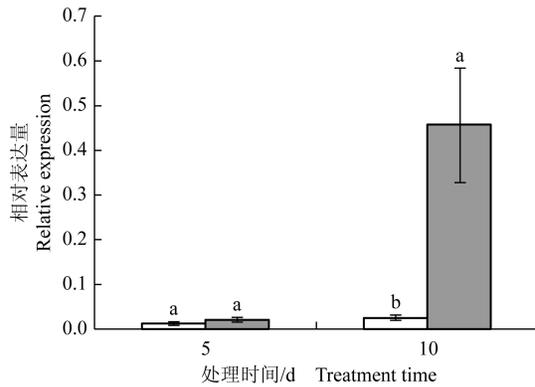
同一处理时间不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$) Different lowercases in the same treatment time indicate the significant ($P < 0.05$) difference among different treatments.

图 10 NaCl 胁迫下花楸树叶片中 *SpHSP23.8* 基因的表达分析
Fig. 10 Expression analysis on *SpHSP23.8* gene in leaf of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. under NaCl stress

SpHSP23.8 基因的相对表达量与对照(正常浇灌清水)无显著差异;干旱胁迫 10 d, *SpHSP23.8* 基因的相对表达量显著高于对照。

2.4 转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥对非生物胁迫响应的表达分析

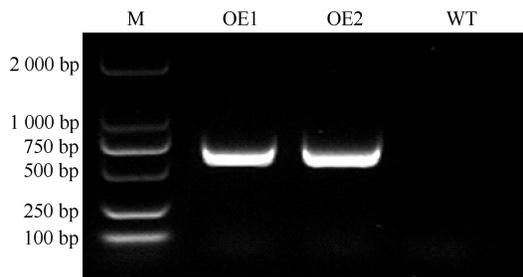
为进一步探究 *SpHSP23.8* 基因响应非生物胁迫的表达模式,构建了 *SpHSP23.8* 基因的超表达载体,并转化野生型拟南芥,通过草铵膦(PPT)筛选获得超表达纯合转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系 OE1 和 OE2 (图 12)。



□: 对照 The control; ■: 干旱处理 Drought treatment.

同一处理时间不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same treatment time indicate the significant ($P < 0.05$) difference among different treatments.

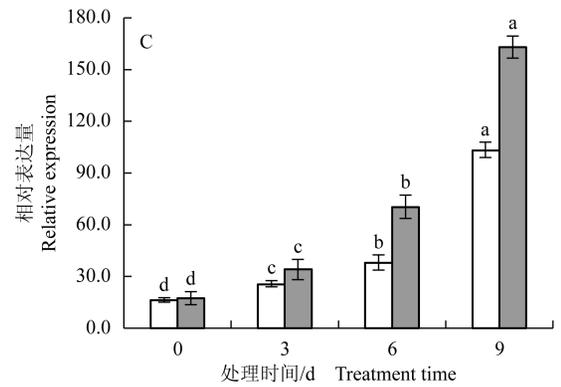
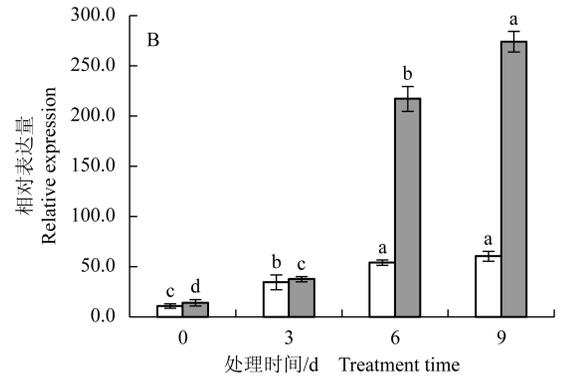
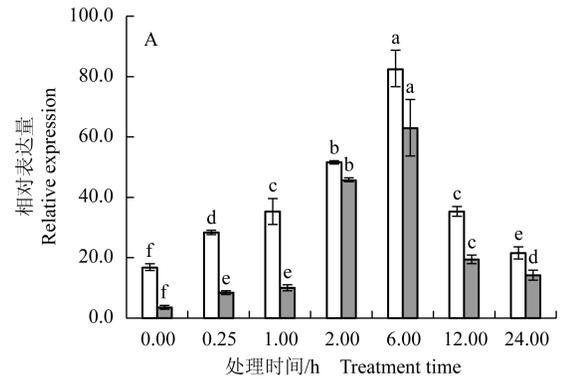
图 11 干旱胁迫下花楸树叶片中 *SpHSP23.8* 基因的表达分析
Fig. 11 Expression analysis on *SpHSP23.8* gene in leaf of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. under drought stress



M: Marker; WT: 野生型拟南芥 Wild type of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

图 12 超表达纯合转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系 OE1 和 OE2 中 *SpHSP23.8* 基因表达的 PCR 验证
Fig. 12 PCR identification of *SpHSP23.8* gene expression in *SpHSP23.8*-overexpressing homozygous transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. line OE1 and OE2

对转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系 OE1 和 OE2 分别进行高温胁迫、NaCl 胁迫和干旱胁迫, 结果 (图 13) 显示: 随着高温胁迫时间的延长, 转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系 OE1 和 OE2 中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量呈先升高后下降的趋势, 其中, 高温胁迫 0.25 h, 2 个转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量即较对照 (高温胁迫 0.00 h) 显著升高; 高温胁迫 6.00 h, 2 个转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量达到峰值; 高温胁迫 24.00 h, 2 个转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量仍显著高于对照。随着 NaCl 胁迫和干旱胁迫时间的延长, 转 *SpHSP23.8*



□: OE1 株系 OE1 line; ■: OE2 株系 OE2 line.

A: 高温胁迫 High temperature stress; B: NaCl 胁迫 NaCl stress; C: 干旱胁迫 Drought stress. 同一株系不同小写字母表示不同处理时间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same line indicate the significant ($P < 0.05$) difference among different treatment times.

图 13 非生物胁迫下超表达纯合转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥株系 OE1 和 OE2 中 *SpHSP23.8* 基因的表达分析
Fig. 13 Expression analysis on *SpHSP23.8* gene in *SpHSP23.8*-overexpressing homozygous transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. line OE1 and OE2 under abiotic stress

基因拟南芥株系 OE1 和 OE2 中 *SpHSP23.8* 基因的相对表达量均呈逐渐升高的变化趋势, 且均较对照 (胁迫 0 d) 显著升高。上述结果说明: 转 *SpHSP23.8* 基因拟南芥中 *SpHSP23.8* 基因能够被高温胁迫、NaCl 胁迫以及干旱胁迫诱导表达。

3 讨论和结论

植物小热激蛋白的高度多样化以及与稳定蛋白结合等特点反映了植物对特定应激条件的适应性,表明小热激蛋白在植物抗逆性中起重要作用^[32]。本研究从花楸树中分离出1个小热激蛋白20家族基因*SpHSP23.8*,该基因的开放阅读框包含648个碱基,编码215个氨基酸;*SpHSP23.8*蛋白氨基酸序列的羧基端存在小热激蛋白中保守的氨基酸残基序列P-x(14)-x-V/L/I-V/L/I和P-x(14)-G-V-L,进一步证实该基因为花楸树小热激蛋白基因^[33]。同时,这些保守基序的存在也是小热激蛋白二聚体形成的前提^[34],推测该小热激蛋白能够发挥分子伴侣的功能。

植物小热激蛋白中内含子数量多变,且插入位点也存在较大差异。大多数小热激蛋白不含或含有1个内含子,如:马铃薯48个小热激蛋白基因中,20个不含内含子,23个含有1个内含子,5个含有2个及以上内含子^[9];水稻39个小热激蛋白基因中,19个不含内含子,17个含有1个内含子,3个含有2个及以上内含子^[35]。另有研究发现,一般在内质网、过氧化物酶体以及细胞质I和II亚族中小热激蛋白不含内含子,而在叶绿体和线粒体亚族中小热激蛋白含有1个内含子,且内含子插入位点相似,这些亚族小热激蛋白具有较近的亲缘关系^[36]。本研究中,花楸树*SpHSP23.8*基因包含1个内含子,该小热激蛋白属于线粒体亚族,这一结果进一步论证了含有1个内含子的线粒体亚族小热激蛋白在进化上的亲缘关系较近。

花楸树*SpHSP23.8*蛋白二级结构包含23.26%的 α 螺旋、4.19%的 β 转角、13.02%的延伸链和59.53%的无规卷曲,其中, β 转角有助于*SpHSP23.8*蛋白形成反向平行结构^[37-38],进而发挥功能。蛋白质磷酸化是蛋白质翻译后修饰过程中较为重要和普遍的调节方式之一,*SpHSP23.8*蛋白包含28个磷酸化位点,分别为23个丝氨酸磷酸化位点和5个苏氨酸磷酸化位点。该结果进一步说明在非生物胁迫时,*SpHSP23.8*蛋白在翻译后可能通过磷酸化修饰发挥抗性作用^[39]。

花楸树*SpHSP23.8*基因在花楸树不同器官中均有表达,表明该基因参与了花楸树各器官正常的生长发育。对兰州百合[*Lilium davidii* var. *willmottiae* (E.

H. Wilson) Raffill]小热激蛋白的研究结果显示:*LimHSP16.45*基因在花药中特异性高表达^[40]。而本研究中*SpHSP23.8*基因在花楸树花中的相对表达量最低,推测该基因在花的发育过程中参与较少。对橡胶树*HbHSP23.8*基因的组织特异性表达进行分析,发现该基因在胶乳中的相对表达量最高,且在叶片不同发育时期也存在明显差异^[41]。茶树[*Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze]4个小热激蛋白基因在组织中的相对表达量也存在差异,其中,*CsHSP22.4*和*CsHSP27.4*基因在叶片中的相对表达量最高,*CsHSP17.5*和*CsHSP25.2*基因在茎中的相对表达量最高^[42]。本研究中,*SpHSP23.8*基因在花楸树茎中的相对表达量最高,其次是果实和根。不同植物小热激蛋白基因在不同组织中的差异表达也进一步表明小热激蛋白进化存在差异。

在对花楸树进行高温(42℃)胁迫的过程中,*SpHSP23.8*基因的相对表达量呈现先急剧升高后降低的变化趋势,高温胁迫0.25h时*SpHSP23.8*基因即出现显著性变化,高温胁迫2.00h时*SpHSP23.8*基因的相对表达量达到峰值。这一结果与大多数植物小热激蛋白基因在高温胁迫下的变化趋势一致,如:茶树*CsHSP17.2*基因表达量在38℃下0.5h出现显著变化,于1.0h达到峰值后开始下降^[43];水稻中*OsHSP18.2*基因的表达量在45℃下0.25h出现显著变化,于2.00h达到峰值后开始下降^[44]。高温胁迫下,植物的细胞结构、代谢进程、活性氧和抗氧化物质含量、信号传导以及渗透调节物质含量都会产生变化,此时小热激蛋白寡聚体与底物结合残基随着温度升高而被解离和激活^[45],增强了其分子伴侣活性,起到维持植物体内环境稳定的作用。花楸树*SpHSP23.8*基因在高温胁迫不同时间的差异表达表明其可能参与了花楸树对高温胁迫的应激反应。对转*SpHSP23.8*基因拟南芥株系的高温(42℃)胁迫结果亦显示:转*SpHSP23.8*基因拟南芥中*SpHSP23.8*基因的相对表达量的变化趋势与其内源表达趋势一致,进一步表明*SpHSP23.8*基因参与了花楸树对高温胁迫的响应。

花楸树原生境土壤偏酸性,低海拔引种地区土壤的偏碱性可能对其生长发育带来一定影响。本研究中,200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫2d,花楸树*SpHSP23.8*基因的相对表达量随NaCl浓度升高而显著升高,表明*SpHSP23.8*基因能够响应NaCl胁迫;而高浓度(300 mmol·L⁻¹)NaCl胁迫7d,*SpHSP23.8*基因的相

对表达量降低,这可能是由于花楸树幼苗在高浓度NaCl胁迫下出现萎蔫所致。此外,在150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下,2个转*SpHSP23.8*基因拟南芥株系中*SpHSP23.8*基因的相对表达量的变化趋势与其内源表达相一致,进一步表明*SpHSP23.8*基因能够响应NaCl胁迫。

干旱胁迫5 d,花楸树*SpHSP23.8*基因的相对表达量未出现显著变化,可能是此时花楸树尚未受到明显的干旱胁迫;干旱胁迫10 d,土壤含水量持续下降,*SpHSP23.8*基因的相对表达量显著升高,表明*SpHSP23.8*基因能够响应干旱胁迫。此外,在干旱胁迫下,2个转*SpHSP23.8*基因拟南芥株系中*SpHSP23.8*基因相对表达量的变化趋势与其内源表达相一致,也进一步表明*SpHSP23.8*基因能够响应干旱胁迫。

综上所述,花楸树*SpHSP23.8*基因表现出对高温、干旱及NaCl等非生物胁迫的应激响应,这为揭示*SpHSP23.8*基因响应非生物胁迫的分子机制奠定了基础。但与野生型拟南芥相比,2个转*SpHSP23.8*基因拟南芥株系未表现出明显的表型差异。究其原因,一方面,依据微效多基因假说,推测*SpHSP23.8*基因的单超表达不足以提升拟南芥整个抗逆网络对非生物胁迫的抵抗;另一方面,植物对于非生物胁迫的响应包括感知、传导和应答等方面,而*SpHSP23.8*蛋白作为分子伴侣可能需要其他蛋白质或者转录因子的协同参与,因此,转*SpHSP23.8*基因拟南芥响应和参与非生物胁迫相关基因的表达还有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] BASHA E, O'NEILL H, VIERLING E. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37: 106-117.
- [2] LASKOWSKA E, MATUSZEWSKA E, KUCZYŃSKA-WIŚNIK D. Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11: 146-157.
- [3] SUN Y, MACRAE T H. The small heat shock proteins and their role in human disease [J]. The FEBS Journal, 2005, 272: 2613-2627.
- [4] VAN MONTFORT R, SLINGSBY C, VIERLING E. Structure and function of the small heat shock protein/ α -crystallin family of molecular chaperones [J]. Advances in Protein Chemistry, 2001, 59: 105-156.
- [5] MYMRIKOV E V, SEIT-NEBI A S, GUSEV N B. Large potentials of small heat shock proteins [J]. Physiological Reviews, 2011, 91: 1123-1159.
- [6] ZUPANSKA A K, DENISON F C, FERL R J, et al. Spaceflight engages heat shock protein and other molecular chaperone genes in tissue culture cells of *Arabidopsis thaliana* [J]. American Journal of Botany, 2013, 100: 235-248.
- [7] ALAM M N, ZHANG L, YANG L, et al. Transcriptomic profiling of tall fescue in response to heat stress and improved thermotolerance by melatonin and 24-epibrassinolide [J]. BMC Genomics, 2018, 19: 224.
- [8] SPOKEVICIUS A V, TIBBITS J, RIGAUULT P, et al. Medium term water deficit elicits distinct transcriptome responses in *Eucalyptus* species of contrasting environmental origin [J]. BMC Genomics, 2017, 18: 284.
- [9] ZHAO P, WANG D, WANG R, et al. Genome-wide analysis of the potato *Hsp20* gene family: identification, genomic organization and expression profiles in response to heat stress [J]. BMC Genomics, 2018, 19: 61.
- [10] CHEN X, LIN S, LIU Q, 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: 818-828.
- [11] DENG X, WANG J, LI Y, et al. Comparative transcriptome analysis reveals phytohormone signalings, heat shock module and ROS scavenger mediate the cold-tolerance of rubber tree [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 4931.
- [12] JIA J, ZHOU J, SHI W, et al. Comparative transcriptomic analysis reveals the roles of overlapping heat-/drought-responsive genes in poplars exposed to high temperature and drought [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43215.
- [13] BOSTON R S, VIITANEN P V, VIERLING E. Molecular chaperones and protein folding in plants [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 32: 191-222.
- [14] 张研妍, 白卉, 卢慧颖, 等. 哈尔滨市主栽花楸生物学特性研究 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42 (36): 12951-12952, 12959.
- [15] YU X, WANG Z, SHU Z, et al. Effect and mechanism of *Sorbus pohuashanensis* (Hante) Hedl. flavonoids protect against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017, 88: 1-10.
- [16] YIN Y, ZHANG Y, LI H, et al. Triterpenoids from fruits of *Sorbus pohuashanensis* inhibit acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2019, 109: 493-502.
- [17] 郑健, 郑勇奇, 吴超, 等. 花楸树的地理分布及天然更新方式 [J]. 林业科学, 2007, 43 (12): 86-93.
- [18] 郑健, 郑勇奇, 张川红, 等. 花楸树天然群体的异交率 [J]. 林业科学, 2009, 45 (11): 44-49.
- [19] 郑健, 胡增辉, 郑勇奇, 等. 花楸树种源间表型性状的地理变异分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21 (3): 50-56.
- [20] 沈海龙, 杨玲, 张建瑛, 等. 花楸树种子休眠影响因素与萌发特性研究 [J]. 林业科学, 2006, 42 (10): 133-137.

- [21] 杨玲, 沈海龙. 花楸树体细胞胚与合子胚的发生发育[J]. 林业科学, 2011, 47(10): 63-69.
- [22] YANG L, SHEN H. Effect of electrostatic field on seed germination and seedling growth of *Sorbus pohuashanensis*[J]. Journal of Forestry Research, 2011, 22: 27-34.
- [23] BLAN L, YANG L, WANG J A, et al. Effects of KNO₃ pretreatment and temperature on seed germination of *Sorbus pohuashanensis* [J]. Journal of Forestry Research, 2013, 24: 309-316.
- [24] 林玉梅, 任军, 杨轶因, 等. 长白山区三种观赏树木物候与生长节律研究[J]. 吉林林业科技, 2013, 42(5): 1-3.
- [25] 彭松, 郑勇奇, 马森, 等. 高温胁迫下花楸树幼苗的生理响应[J]. 林业科学研究, 2011, 24(5): 602-608.
- [26] 彭松, 马森, 郑勇奇, 等. 不同种源花楸树幼苗越冬能力的比较[J]. 生态学杂志, 2014, 33(2): 321-327.
- [27] 刘聪聪, 张泽, 关雪莲, 等. 花楸树热激蛋白70基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(19): 6276-6286.
- [28] LIU C, DOU Y, GUAN X, et al. *De novo* transcriptomic analysis and development of EST-SSRs for *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.[J]. PLOS ONE, 2017, 12: e0179219.
- [29] ZHENG J, CHEN F, WANG Z, et al. A novel role for histone methyltransferase KYP/SUVH4 in the control of *Arabidopsis* primary seed dormancy [J]. New Phytologist, 2012, 193(3): 605-616.
- [30] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [31] 续九如, 李颖岳. 林业试验设计[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 177-182.
- [32] WANG W, VINOCUR B, SHOSEYOV O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9: 244-252.
- [33] WATERS E R, LEE G J, VIERLING E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 1996, 47: 325-338.
- [34] CHEN J, FEIGE M J, FRANZMANN T M, et al. Regions outside the α -crystallin domain of the small heat shock protein Hsp26 are required for its dimerization [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 398: 122-131.
- [35] OUYANG Y, CHEN J, XIE W, et al. Comprehensive sequence and expression profile analysis of *Hsp20* gene family in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70: 341-357.
- [36] WATERS E R, AEVERMANN B D, SANDERS-REED Z. Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns[J]. Cell Stress and Chaperones, 2008, 13: 127-142.
- [37] STAMLER R, KAPPÉ G, BOELEN W, et al. Wrapping the α -crystallin domain fold in a chaperone assembly [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 353: 68-79.
- [38] DUDICH I V, ZAV'YALOV V P, PFEIL W, et al. Dimer structure as a minimum cooperative subunit of small heat-shock proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1253: 163-168.
- [39] HASLBECK M, FRANZMANN T, WEINFURTNER D, et al. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins[J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2005, 12: 842-846.
- [40] MU C, WANG S, ZHANG S, et al. Small heat shock protein LimHSP16.45 protects pollen mother cells and tapetal cells against extreme temperatures during late zygotene to pachytene stages of meiotic prophase I in *David Lily*[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30: 1981-1989.
- [41] 李德军, 郭会娜, 邓治, 等. 巴西橡胶树 *sHSP23.8* 基因的克隆、生物信息学及表达分析[J]. 植物生理学报, 2015, 51(11): 1955-1962.
- [42] 陈江飞, 高童, 万思卿, 等. 茶树小分子热激蛋白基因 *CsHSP22.4*、*CsHSP27.4*、*CsHSP17.5* 和 *CsHSP25.2* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2018, 45(6): 1160-1172.
- [43] 王明乐, 朱旭君, 王伟东, 等. 茶树小分子量热激蛋白基因 *CsHSP17.2* 的克隆与表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 389-394.
- [44] KAUR H, PETLA B P, KAMBLE N U, et al. Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 713.
- [45] FU X. Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2014, 46: 347-356.

(责任编辑: 张明霞)