

DOI:10.12171/j.1000-1522.20210272

板栗 *Hsp90* 基因家族的鉴定及在胚珠发育过程中的表达分析

崔艳红 李玲 白倩 杨清 苏淑钗
(北京林业大学林学院, 森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要:【目的】热激蛋白(Hsp90)是一种在细菌、植物、动物中均广泛存在的高度保守的蛋白质分子,在植物应激反应和生长发育等过程中发挥着重要的作用。板栗作为我国重要的坚果树种,雌雄花比例不同、授粉受精困难及胚败育等现象致使板栗单产低,严重制约板栗的产量。近期有研究发现 *Hsp90* 基因家族参与植物的胚形成,本研究首次对板栗中 *Hsp90* 基因家族进行鉴定及表达分析,旨在揭示 *Hsp90* 基因家族的功能及其在授粉受精和胚珠发育过程中的作用,进而为提高板栗产量提供理论依据。【方法】利用生物信息学方法对板栗 *Hsp90* 基因家族成员进行了鉴定,分析家族成员的理化性质、基因结构、进化关系、启动子元件。基于转录组数据分析 *CmHsp90* 基因在板栗胚珠不同发育时期的表达情况。【结果】本研究在板栗中共鉴定到 10 个 *CmHsp90* 基因,该基因家族成员的编码区(CDS)长度范围是 2 112 ~ 2 481 bp,含有 4 ~ 22 个外显子,编码 703 ~ 826 个氨基酸,相对分子量范围为 80.67 ~ 94.21 kDa,等电点 pI 范围介于 4.81 ~ 5.26;不稳定系数介于 36.15 ~ 46.75 之间,除 *CmHsp90-6*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-9* 外,其他基因编码的蛋白质相对比较稳定。对 *CmHsp90* 基因家族蛋白进行亚细胞定位预测发现:5 个成员(*CmHsp90-1*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-5*、*CmHsp90-9*、*CmHsp90-10*)定位到了细胞质上,2 个成员(*CmHsp90-7*、*CmHsp90-8*)定位到了内质网上,其余 3 个成员分别定位到细胞核(*CmHsp90-3*)、线粒体(*CmHsp90-2*)和叶绿体上(*CmHsp90-6*)上。对 *CmHsp90* 基因家族蛋白信号肽预测发现,仅 *CmHsp90-7* 和 *CmHsp90-8* 存在潜在的信号肽位点。*CmHsp90* 基因家族蛋白的 motif、保守结构域基本一致,均包含 Hsp90 结构域(PF00183)和 HATPase_C 结构域(PF02518)。基于系统进化树分析,10 个 *CmHsp90* 家族蛋白被分为 5 个组。对 *CmHsp90* 基因家族启动子区域进行顺式作用元件预测,发现光响应元件是 *CmHsp90* 基因家族启动子上的主要调控元件,其次为 ABA 响应元件,此外,有 4 个基因(*CmHsp90-1*、*CmHsp90-5*、*CmHsp90-7*、*CmHsp90-8*)存在温度响应元件。通过对板栗胚珠不同发育阶段的 RNA-seq 数据进行分析发现:除 *CmHsp90-3* 基因外,其他基因在受精前胚珠中的表达量均高于受精后胚珠;*CmHsp90-2*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-5*、*CmHsp90-7*、*CmHsp90-8*、*CmHsp90-9*、*CmHsp90-10* 基因在发育胚珠中的表达量高于败育胚珠。【结论】*CmHsp90* 基因在胚珠不同发育过程中的表达存在差异,在同一子房内发育胚珠和败育胚珠中的表达情况也不尽相同,研究结果为下一步研究 *CmHsp90* 基因在板栗授粉受精以及胚发育过程中的具体作用奠定理论基础。

关键词: 板栗; 热激蛋白; 基因家族; 胚发育; 表达模式

中图分类号: S792.17; S664.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2022)11-0010-10

引文格式: 崔艳红, 李玲, 白倩, 等. 板栗 *Hsp90* 基因家族的鉴定及在胚珠发育过程中的表达分析 [J]. 北京林业大学学报, 2022, 44(11): 10-19. Cui Yanhong, Li Ling, Bai Qian, et al. Identification and expression analysis during ovule development of *Hsp90* gene family in *Castanea mollissima* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2022, 44(11): 10-19.

Identification and expression analysis during ovule development of *Hsp90* gene family in *Castanea mollissima*

Cui Yanhong Li Ling Bai Qian Yang Qing Su Shuchai

(Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

收稿日期: 2021-07-20 修回日期: 2021-08-24

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFD1000605)。

第一作者: 崔艳红, 博士生。主要研究方向: 经济林培育与利用。Email: 1170161858@qq.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。

责任作者: 白倩, 博士, 讲师。主要研究方向: 经济花果调控理论与技术。Email: baiqian0219@bjfu.edu.cn 地址: 同上。苏淑钗, 教授。主要研究方向: 经济林培育与利用。Email: sushuchai@sohu.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

Abstract: [Objective] Recent studies have found that *Hsp90* gene family is related to embryo development, but the details of *Hsp90* gene family in chestnut are not clear. The identification and analysis of *Hsp90* gene family in chestnut provide a theoretical basis for studying the function of *Hsp90* gene family and its role in pollination, fertilization and ovule development, so as to improve the yield of chestnut. [Method] The members of chestnut *Hsp90* gene family were identified by bioinformatics. The physical and chemical properties, gene structure, evolutionary relationship and promoter elements of the family members were analyzed. The expression of *CmHsp90* genes at different developmental stages of ovule was analyzed based on transcriptome data. [Result] A total of 10 *CmHsp90* genes were identified in Chinese chestnut. The length of CDS of 10 *CmHsp90* gene family members ranged from 2 112 to 2 481 bp, the number of amino acids encoded ranged from 703 to 826. The relative molecular weight ranged from 80.67 to 94.21 kDa, and the pI ranged from 4.81 to 5.26 kDa. The coefficient of instability ranged from 36.15 to 46.75. Except *CmHsp90-6*, *CmHsp90-4* and *CmHsp90-9*, the proteins encoded by other genes were relatively stable. According to the subcellular localization prediction of *CmHsp90* family protein members, five members (*CmHsp90-1*, *CmHsp90-4*, *CmHsp90-5*, *CmHsp90-9* and *CmHsp90-10*) were located in the cytoplasm, two members (*CmHsp90-7* and *CmHsp90-8*) were located in the endoplasmic reticulum, and the other three members were located in the nucleus (*CmHsp90-3*), mitochondria (*CmHsp90-2*) and chloroplast (*CmHsp90-6*). By predicting the signal peptide of *CmHsp90* gene family proteins, it was found that only *CmHsp90-7* and *CmHsp90-8* had potential signal peptide sites. The motif and protein domains of *CmHsp90* gene family proteins were basically the same, including *Hsp90* domain (PF00183) and *HATPase_c* domain (PF02518). Based on phylogenetic tree analysis, 10 *CmHsp90* proteins were divided into 5 groups. The *cis* acting elements in the promoter region of *CmHsp90* gene family were predicted. It was found that the light response element was the main regulatory element on the promoter of *CmHsp90* gene family, followed by ABA response element. In addition, four genes (*CmHsp90-1*, *CmHsp90-5*, *CmHsp90-7*, *CmHsp90-8*) had temperature response elements. By analyzing the RNA-seq data of ovules at different developmental stages, it was found that the expression of other genes in ovules before fertilization was higher than that after fertilization, except *CmHsp90-3* gene; the expression of *CmHsp90-2*, *CmHsp90-4*, *CmHsp90-5*, *CmHsp90-7*, *CmHsp90-8*, *CmHsp90-9* and *CmHsp90-10* genes in developing ovules was higher than that in abortive ovules. [Conclusion] The *CmHsp90* genes in chestnut were identified and analyzed for the first time. The results show that the expression of *Hsp90* genes is different in varied ovule development processes, and the expression in developing ovules and abortive ovules in the same ovary is also different. The research results lay a foundation for the further study of the specific role of *CmHsp90* gene in chestnut pollination, fertilization and embryo abortion.

Key words: *Castanea mollissima*; heat shock protein; gene family; embryo development; expression pattern

热激蛋白(*Hsp90*)是一种在细菌、植物、动物中均广泛存在的高度保守的蛋白质分子^[1-2],在ATP作用下,辅助参与细胞周期控制、激素信号传导和细胞凋亡等过程,是生物中一类非常重要的分子伴侣蛋白^[2-4]。*Hsp90*主要是以同型二聚体存在,具有3个结构域:高度保守的N端ATP结合结构域(NTD)、中间结构域(MD)和C端结构域(CTD)^[5]。*Hsp90*促进200多种蛋白质的正确构象和活化^[5-7],是维持细胞稳态的重要蛋白^[8]。*Hsp90*的缺失会影响应激反应、生长发育以及胚胎发生等过程^[9],对动物和植物的发育具有重要意义。对植物而言,胚胎不仅是植物体的基本形态,也是植物种子的的重要组成部分^[10]。

同时,胚胎也为人类生存提供了不可替代的物质基础。目前在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等模式植物的研究中发现,*Hsp90*蛋白参与植物的胚胎发育。Samakovli等^[11]在对拟南芥的研究中发现:*Hsp90*蛋白与YDA信号通路成员之间的遗传互作会影响胚体和胚柄的发育,*Hsp90s*功能受损对其他基因的表达有影响,同时揭示了该基因在细胞命运决定和生长素分布中起重要作用。Luo等^[12]通过对拟南芥*Hsp90*家族成员进行研究,首次确定了At*Hsp90.6*为胚胎发生所必需的蛋白质,分析了At*Hsp90.6*与ATP或ADP结合的构象变化,进一步了解了*Hsp90*的作用机制。Lee等^[13]通过对红藻(*Griffithsia japonica*)

雌雄配子体混合群体的 cDNA 文库进行差异筛选,发现 *Hsp90* 在雌配子体发育过程中表现活跃。由此可见, *Hsp90* 在生殖发育过程中起着重要作用。

板栗(*Castanea mollissima*)原产中国,是著名的坚果树种。中国年产板栗坚果量占全球产量的80%以上,居世界首位,但单产较低^[14]。雌雄花比例失调、授粉受精不良和胚败育造成的结实率低是中国板栗低产的主要原因^[15]。受精且胚胎正常发育是保证板栗产量的关键环节,二者任一时期发生败育均会降低其结实率,从而严重影响产量^[16]。因此,研究板栗胚珠败育的机理,对提高板栗产量具有重要意义。

综上所述, *Hsp90* 基因家族在模式植物中已经被鉴定与胚发育有关,但是在板栗胚珠发育过程中的作用机理目前尚不清楚。本研究利用生物信息学方法对板栗 *Hsp90* 基因家族进行鉴定,对其基因结构以及在授粉受精过程中胚珠中的表达情况进行分析,为进一步研究板栗 *Hsp90* 基因的功能,以及与胚珠发育、败育的关系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自河北省遵化市魏进河国家板栗良种繁育基地(117°45'11"E, 40°21'22"N),试验母株为‘遵化短刺’(*C. mollissima* ‘Zunhuaduanci’),授粉品种为‘紫珀’(*C. mollissima* ‘Zibo’)和‘东陵明珠’(*C. mollissima* ‘Donglingmingzhu’),树龄10年。花期进行套袋不授粉和人工充分授粉处理,每种方式处理10株树,每株树选取50个总苞。套袋不授粉:6月3日用硫酸纸袋套住雌花簇以隔离花粉,当栗园雄花序散粉结束后取下纸袋;人工充分授粉:6月15日柱头分叉30°~45°(最佳授粉期)进行人工辅助授粉,上午11点将刚采集的混合花粉用毛笔对套袋雌花簇点授,并于次日11点重复上述操作以确保授粉充分^[17-18]。

1.2 研究方法

1.2.1 *Hsp90* 基因家族成员的鉴定

通过在线网站 GigaDB(<http://gigadb.org/dataset/view/id/100643>)搜索并下载板栗的基因组蛋白序列及注释文件,通过 TAIR 网站(<https://www.arabidopsis.org/>)搜索并下载拟南芥的全基因组蛋白序列及基因注释文件,利用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)搜索并下载水稻(*Oryza sativa*)和毛果杨(*Populus trichocarpa*)的全基因组蛋白序列及注释文件。*Hsp90*(PF00183)隐马尔科夫模型(HMM)从 Pfam 网站(<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1>)

下载,并将其作为搜索模型,以 $E\text{-value} < 10^{-5}$ 为搜索标准,利用 HMMER(V3.2.1)软件构建本地蛋白数据库进行搜索。为了使得到的 *Hsp90* 家族基因更加准确,通过 TBtools 软件^[17]中的双向 blast 比对功能,对 *Hsp90* 基因家族做进一步比对,得到所有家族基因成员,随后与基因组结果进行比对,得到 *Hsp90* 基因家族的所有成员。通过 NCBI-CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 *Hsp90* 蛋白结构域进行预测^[19],剔除不含有 *Hsp90* 家族蛋白结构域的序列。利用在线网站 ExPASy(https://web.expasy.org/compute_pi/)对 *Hsp90* 基因家族的理化性质进行分析。使用在线服务器 SignalP 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测 *Hsp90* 基因家族蛋白是否存在信号肽以及所在的位点。

1.2.2 *Hsp90* 基因家族蛋白序列及结构分析

利用在线网站 MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)预测 *Hsp90* 蛋白序列的保守基序, motif 的最大值设为15,构建基因家族成员的蛋白保守基序。利用 TBtools 可视化工具结合基因组注释文件对基因的结构进行可视化^[20]。利用 WoLFPSORT 网页在线工具(<https://wolfsort.hgc.jp/>)预测板栗 Cm*Hsp90* 家族蛋白的亚细胞定位。

1.2.3 *Hsp90* 基因家族启动子的顺式作用元件分析

利用 TBtools 工具提取 *Hsp90* 基因转录起始位点上游2000 bp 长度的序列作为其启动子区,并通过在线网站 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 *Hsp90* 启动子区的顺式作用元件进行预测和分析,最后利用 TBtools 工具进行启动子位置可视化分析。

1.2.4 *Hsp90* 基因家族多序列比对与系统发育进化树构建

利用 DNAMAN 软件将板栗、拟南芥、毛果杨、水稻4个物种的 *Hsp90* 蛋白序列进行比对,并采用邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树。利用在线网站 iTOL(<https://itol.embl.de/>)对进化树进行美化,分析板栗 *Hsp90* 家族基因与其他物种 *Hsp90* 的进化关系。

1.2.5 *Hsp90* 基因在胚珠不同发育时期的表达分析

本课题组在前期研究中基本确定板栗在授粉后18 d 时胚珠已完成受精^[20]。以授粉后18 d 为参考时间点,采集充分授粉后7 d(7SF)、15 d(15SF)、18 d(18SF)、21 d、27 d 以及套袋未授粉(18WF,与18 d 授粉胚珠同时采集)胚珠作为试验材料,7SF、15SF 为授粉受精前胚珠,18SF、21 d、27 d 为受精后胚珠,21、27 d 胚珠又分为发育(21FY、27FY)与败育

(21BY、27BY)胚珠。试验材料剥取后经液氮冷冻,放入 -80°C 超低温冰箱保存。

剥取的胚珠样品均装于 1.5 mL 冻存管中,每个样品进行 3 个重复,共 24 个样品。采集来的样品使用 Omega 公司(美国)Plant RNA 试剂盒进行胚珠总 RNA 提取,并使用 Thermo Scientific 公司(美国)RapidOut DNA Removal 试剂盒进行 DNA 消化,将提取的胚珠 RNA 样品进行纯度、浓度和完整性检测,操作步骤参考文献^[21]。随后委托北京百迈客生物科技有限公司(北京,中国)进行不同时期胚珠样品的 cDNA 文库构建和 Illumina HiSeqTM 2000 高通量双端测序,用 HISAT2^[22]RNA 测序实验 reads 的高效比对系统将板栗基因组(<http://gigadb.org/dataset/100643>)作为参考基因组进行序列比对,比对分析完成后利用 StringTie^[23]对对比上的 reads 进行组装和定量分析。利用百迈客云平台(<http://www.Biocloud.net/>)从 RNA-seq 数据中提取 *CmHsp90* 家族成员的表达量,并利用 Sigmaplot 12.5 软件绘制表达图,对不同样品中 *Hsp90* 的表达情况进行分析。

2 结果与分析

2.1 *CmHsp90* 家族基因的鉴定

利用 HMMER 软件和双向 blast 比对最终确定了 10 个板栗 *Hsp90* 家族基因,分别命名为:*CmHsp90-1*~*CmHsp90-10*(表 1)。10 个 *CmHsp90* 基因家族成员的编码区序列(CDS)长度范围是 2 112~2 481 bp,含有 4~22 个外显子,编码的氨基酸数目范围是 703~826,相对分子量范围是 80.67~94.21 kDa,等电点 pI 范围介于 4.81~5.26。不稳定系数介

于 36.15~46.75 之间,除 *CmHsp90-4*、*CmHsp90-6*、*CmHsp90-9* 外,其他基因编码的蛋白相对比较稳定。利用 WoLF PSORT 网站对 *CmHsp90* 家族蛋白进行亚细胞定位预测,结果显示:有 5 个成员(*CmHsp90-1*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-5*、*CmHsp90-9*、*CmHsp90-10*)定位到了细胞质上,2 个成员(*CmHsp90-7*、*CmHsp90-8*)定位到了内质网上,其余 3 个成员分别定位到细胞核(*CmHsp90-3*)、线粒体(*CmHsp90-2*)和叶绿体上(*CmHsp90-6*)(表 1)。利用 SignalP 5.0 对该基因家族的氨基酸序列进行信号肽预测,发现除 *CmHsp90-7* 和 *CmHsp90-8* 存在潜在的信号肽位点外,其余成员均不含有信号肽(图 1)。

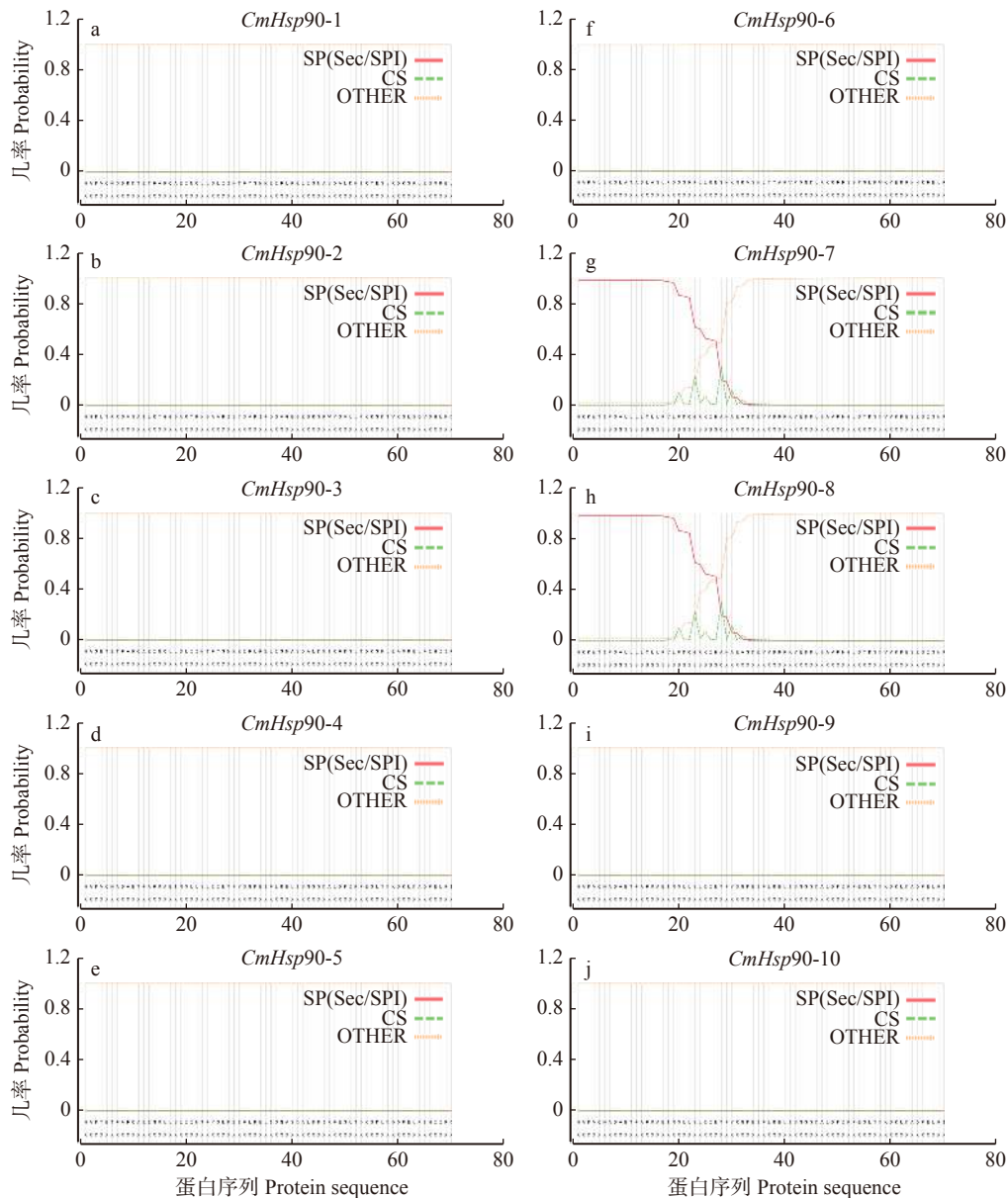
2.2 *CmHsp90* 基因家族蛋白的结构分析

利用 DNAMAN 软件对板栗 *CmHsp90* 基因家族成员的氨基酸序列进行同源多序列比对发现:*CmHsp90* 基因家族蛋白的序列相似性为 64.12%,均含有 HATPase_c 和 Hsp90 superfamily 保守结构域,说明 *CmHsp90* 家族蛋白在结构和组成上具有保守性(图 2)。利用在线 MEME 软件对 *CmHsp90* 蛋白的 motif 进行分析,共鉴定到 15 个 motif(图 3)。*CmHsp90-1*、*CmHsp90-3*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-5*、*CmHsp90-9*、*CmHsp90-10* 中包含所有 15 个 motif,*CmHsp90-2*、*CmHsp90-6*、*CmHsp90-7*、*CmHsp90-8* 均不含 motif14,*CmHsp90-6* 除不含有 motif14 外,还不含有 motif11;*CmHsp90-8* 不含有 motif12、13、14。对 *CmHsp90* 蛋白结构进行预测,结果发现,10 个 *CmHsp90* 家族蛋白成员均包含 Hsp90 蛋白保守的 Hsp90 superfamily、HtpG superfamily、HATPase_c、PTZ00272 superfamily 结构域(图 4)。总之,10 个

表 1 板栗 *CmHsp90* 基因家族信息

Tab. 1 Information of *CmHsp90* gene family in *Castanea mollissima*

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	亚细胞定位 Subcellular localization	编码区长度 CDS length/bp	外显子数目 Exon number	编码蛋白质特性 Characteristic of the coding protein			
					氨基酸长度 Amino acid length/aa	不稳定性系数 Instability coefficient	分子量 Molecular mass/kDa	等电点 Isoelectric point
<i>CmHsp90-1</i>	BUA.CMHBY201654	细胞质 Cytosol	2 118	4	705	39.04	81.22	5.03
<i>CmHsp90-2</i>	BUA.CMHBY202913	线粒体 Mitochondrion	2 415	22	804	36.97	91.02	5.26
<i>CmHsp90-3</i>	BUA.CMHBY204630	细胞核 Nucleus	2 127	3	708	38.93	81.11	4.94
<i>CmHsp90-4</i>	BUA.CMHBY213842	细胞质 Cytosol	2 112	4	703	40.96	80.74	4.97
<i>CmHsp90-5</i>	BUA.CMHBY214124	细胞质 Cytosol	2 118	3	705	39.89	80.67	4.97
<i>CmHsp90-6</i>	BUA.CMHBY216742	叶绿体 Chloroplast	2 406	19	801	46.75	91.45	4.99
<i>CmHsp90-7</i>	BUA.CMHBY217539	内质网 Endoplasmic reticulum	2 481	14	826	36.38	94.21	4.87
<i>CmHsp90-8</i>	BUA.CMHBY217715	内质网 Endoplasmic reticulum	2 358	15	785	36.15	89.42	4.81
<i>CmHsp90-9</i>	BUA.CMHBY217794	细胞质 Cytosol	2 115	4	704	40.28	80.97	4.95
<i>CmHsp90-10</i>	BUA.CMHBY229404	细胞质 Cytosol	2 112	4	703	37.98	80.72	5.05



SP(Sec/SPI). 由 Sec 转座子转运并被信号肽酶 I 裂解的“标准”分泌信号肽; CS. 裂解位点; OTHER. 序列没有任何信号肽。SP(Sec/SPI), ‘standard’ secretory signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by signal peptidase I; CS, the cleavage site; OTHER, no signal peptide at all.

图 1 CmHsp90 家族蛋白序列的信号肽位点预测

Fig. 1 Prediction of signal peptide sites in CmHsp90 family protein sequence

CmHsp90 蛋白的 motif 在顺序及组成上基本一致, 均包含了 Hsp90 蛋白的保守结构域, 表明了 Hsp90 家族蛋白在板栗中具有高度的保守性(图 3、图 4)。

2.3 CmHSP90 基因家族的顺式作用元件预测

本研究通过在线网站 PlantCARE 对板栗 CmHsp90 基因家族的启动子顺式作用元件进行了预测分析, 结果发现, CmHsp90 基因家族启动子上主要包含激素调控、逆境胁迫及光响应等相关顺式作用元件(图 5)。与光响应相关的顺式作用元件在 10 个 CmHsp90 家族成员中均有预测到, 且数量最多, 这表明了 CmHsp90 基因可能参与植物光响应的相关调控; 其次为 ABA 响应元件(Hsp90-10 除外)及厌

氧诱导元件(Hsp90-2 除外)。值得注意的是: Hsp90-3 和 Hsp90-6 基因启动子包含干旱响应元件, 推测这 2 个基因在干旱胁迫中起重要作用; 同时 Hsp90-1、Hsp90-5、Hsp90-7、Hsp90-8 含有低温响应元件, 推测这 4 个基因可能与温度调控有关; Hsp90-2、Hsp90-4、Hsp90-7、Hsp90-8、Hsp90-9 含有茉莉酸甲酯响应元件, 其中 Hsp90-2、Hsp90-7、Hsp90-8 还含有玉米醇溶蛋白代谢调节元件。这些结果表明, CmHsp90 基因家族成员可能在光响应、逆境胁迫、激素响应等通路中发挥着重要的作用。

2.4 CmHsp90 基因家族系统进化分析

为了进一步确定板栗 CmHsp90 基因家族的功

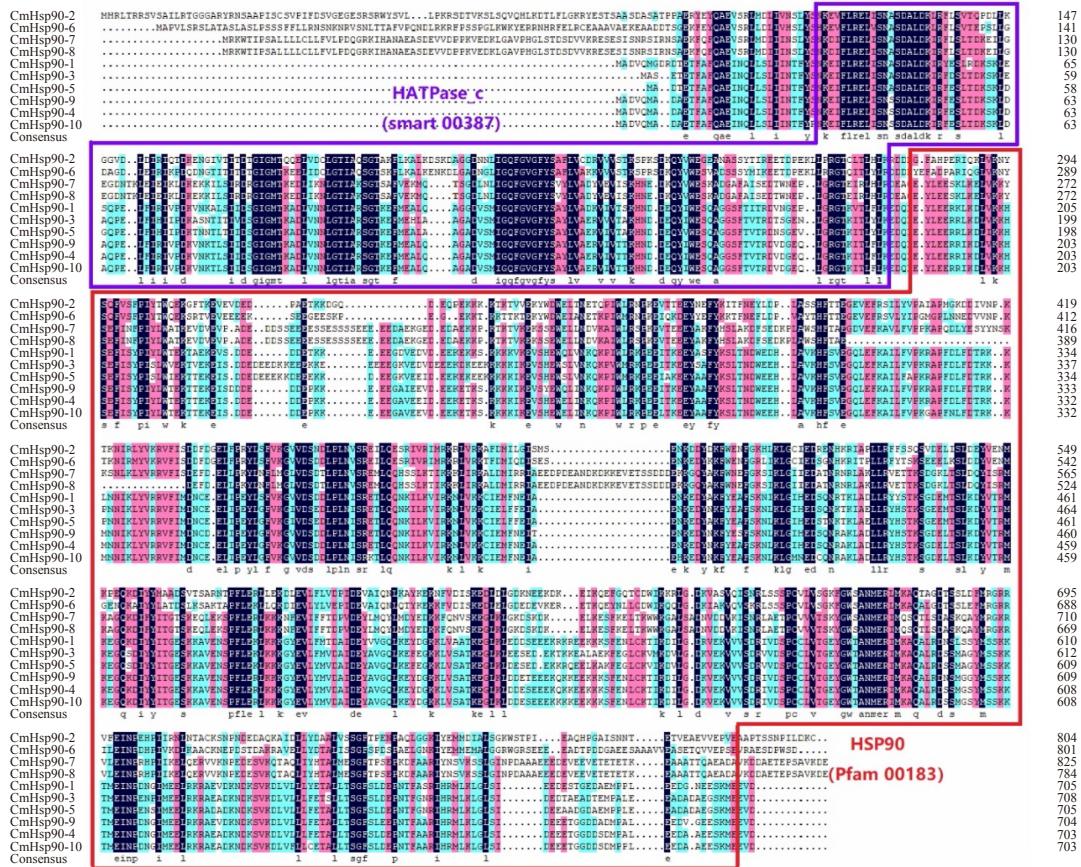


图 2 CmHsp90 家族氨基酸多序列比对

Fig. 2 Amino acid multiple sequence alignment of CmHsp90 gene family

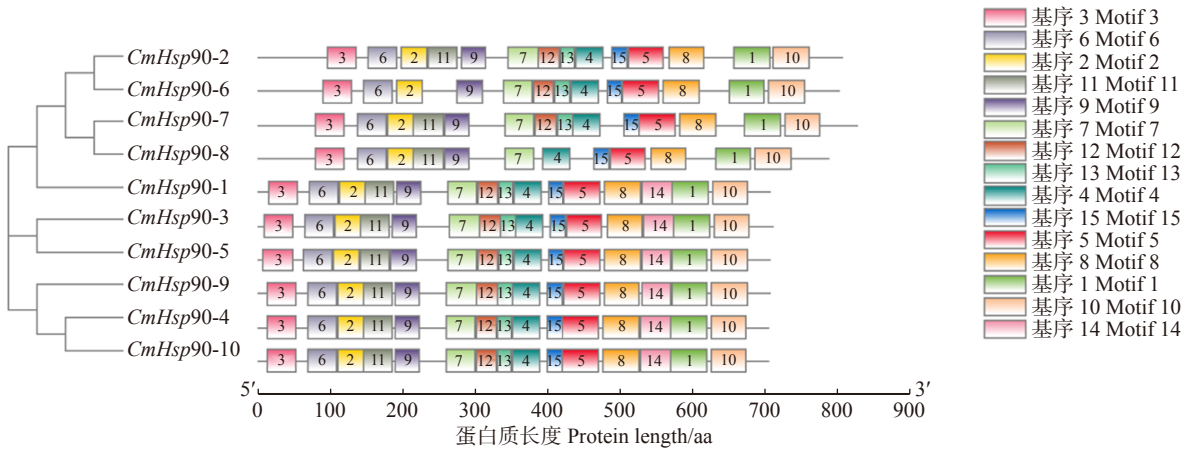


图 3 CmHsp90 家族蛋白基序预测分析

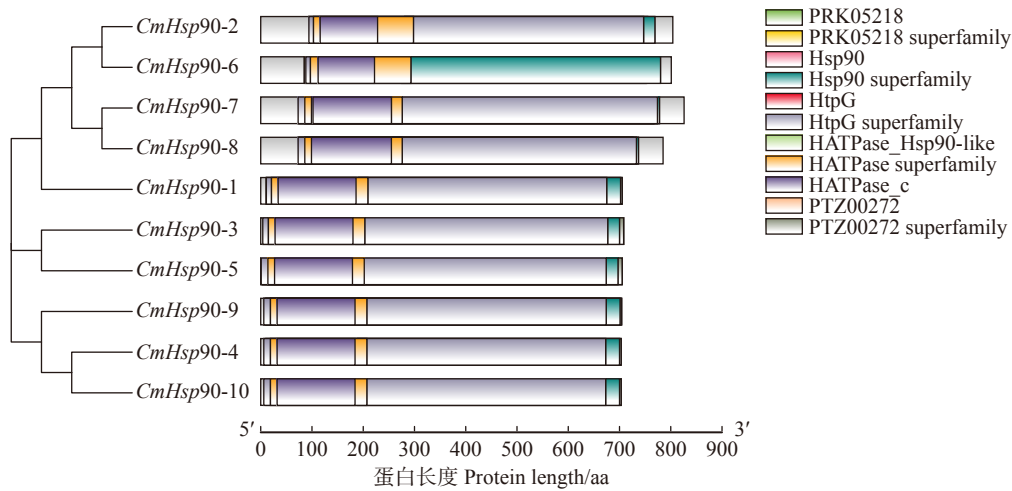
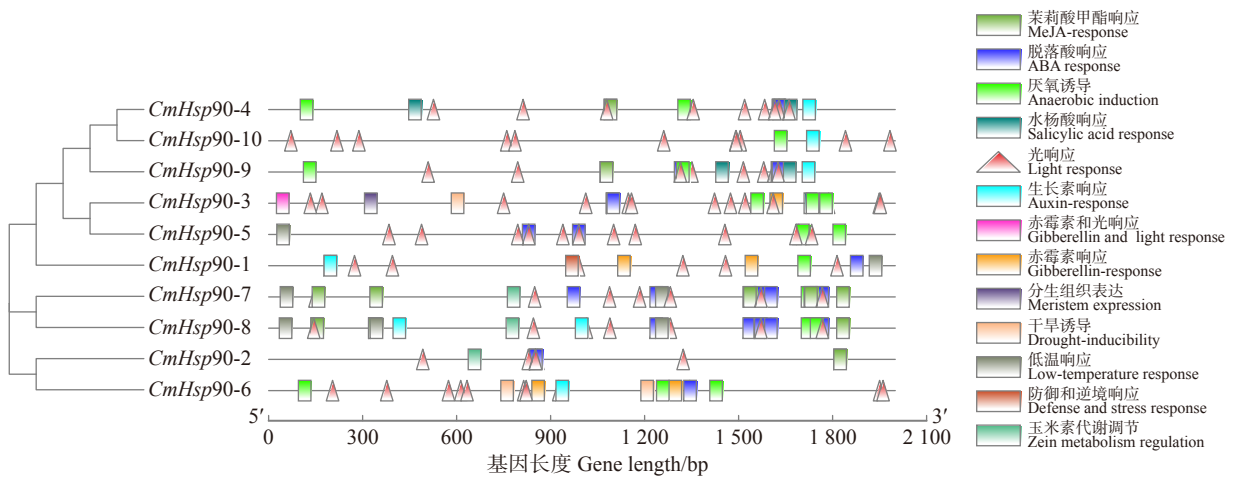
Fig. 3 Motif prediction and analysis of CmHsp90 family protein

能及特点, 我们利用 10 个板栗、7 个拟南芥、8 个水稻、10 个毛果杨 *Hsp90* 蛋白序列构建系统进化树 (图 6)。参考拟南芥^[24-25]、水稻^[26]、毛果杨^[27]*Hsp90* 基因家族中的分组依据, 35 个 *Hsp90* 蛋白可以分为 5 组 (I ~ V), 5 个分组中分别含有 4、5、6、8、12 个基因, 且每个分组中均有板栗 *CmHsp90* 家族蛋白分布。其中, IV 组中含有板栗 *CmHsp90* 家族成员最多, 包括 *CmHsp90-1*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-9*、*CmHsp90-10*; I 组和 V 组均含有 2 个 *Hsp90* 蛋白,

分别为 *CmHsp90-7*、*CmHsp90-8* 和 *CmHsp90-3*、*CmHsp90-5*; II 组和 III 组均含有 1 个蛋白, 分别为 *CmHsp90-2* 和 *CmHsp90-6*。聚为一组的蛋白具有较高的同源性, 在功能上可能存在共性, 因此, 可参考其他物种 *Hsp90* 的研究结果对板栗 *CmHsp90* 基因家族的功能做出初步判断。

2.5 *CmHsp90* 基因家族成员在胚发育过程中的表达分析

已有研究表明:*Hsp90* 基因家族参与植物胚胎

图4 板栗 *CmHsp90* 蛋白功能域预测Fig. 4 Functional domain prediction of *CmHsp90* protein in *C. mollissima*图5 板栗 *CmHsp90* 家族基因启动子顺式作用元件预测分析Fig. 5 Functions of promoter *cis*-acting elements in *CmHsp90* family genes in *C. mollissima*

的发育,在植物胚形成和发育过程中发挥着重要的作用。因此,为了确定板栗 *CmHsp90* 基因家族成员是否参与板栗胚发育过程,我们利用转录组测序技术对板栗 *CmHsp90* 基因家族成员在胚发育不同时期的表达进行了分析(图7)。结果发现:除 *CmHsp90-3* 外,其他 *CmHsp90* 基因在受精前胚珠中的表达量均高于受精后胚珠,说明板栗 *CmHsp90* 基因可能在早期雌配子体发育过程中发挥重要作用。对授粉后 18 d 胚珠及未授粉胚珠中 *CmHsp90* 基因的表达量进行分析(图8),发现除 *CmHsp90-3* 在授粉胚珠中的表达量高于未授粉胚珠外,其余 *CmHsp90* 基因均低于未授粉胚珠,说明 *CmHsp90* 基因可能参与调控板栗的受精过程。对授粉后同一时期发育胚珠与败育胚珠中 *CmHsp90* 基因的表达情况做进一步分析(图9),结果显示:*CmHsp90-2*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-5*、*CmHsp90-7*、*CmHsp90-8*、*CmHsp90-9*、*CmHsp90-10* 基因在发育胚珠中的表达量高于败育胚珠,其中,

CmHsp90-4 和 *CmHsp90-9*、*CmHsp90-10* 的差异最明显,说明这些基因可能正调控受精后胚珠的发育。

3 讨论

目前,*Hsp90* 基因家族在多种植物中已被鉴定^[24-27],但板栗中 *Hsp90* 基因家族的信息尚不清楚。本研究利用多种生物信息学方法在板栗基因组中共鉴定到 10 个 *Hsp90* 家族基因。通过对 10 个 *CmHsp90* 基因家族蛋白序列的 motif 和蛋白结构域进行分析,发现该家族的蛋白具有很高的同源性,达 64.12%。蛋白结构除全部匹配到 *Hsp90* superfamily 外,还匹配到 *HATPase_c* 结构域。*Hsp90* superfamily 结构域和 *HATPase_c* 结构域是 *Hsp90* 蛋白的保守结构域,对 *Hsp90* 蛋白行使功能具有至关重要的作用。杜志如^[28]研究发现:水稻中 *Hsp90* 蛋白的 *HATPase_c* 结构域能与 ATP 相结合,同时还与 CPS 结合,共同作用合成氨甲酰磷酸,与水稻的抗性相关。将鉴定到的

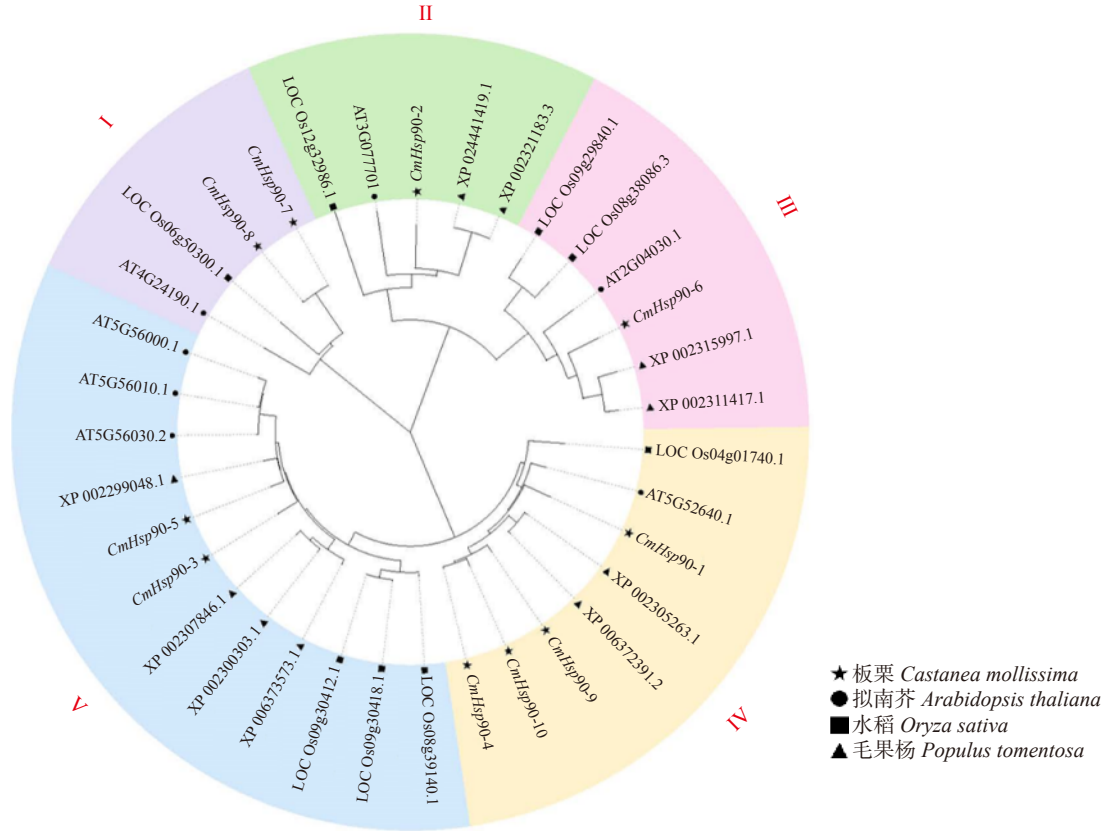
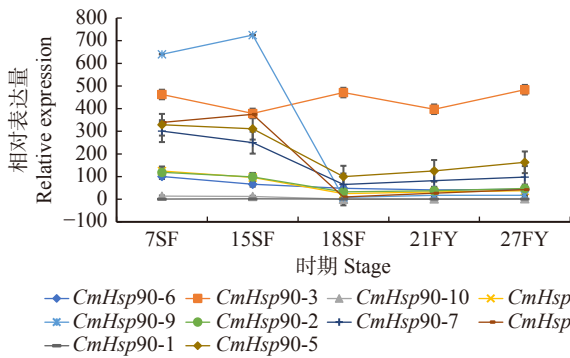


图 6 Hsp90 家族蛋白进化树

Fig. 6 Unrooted phylogenetic tree of Hsp90 gene family

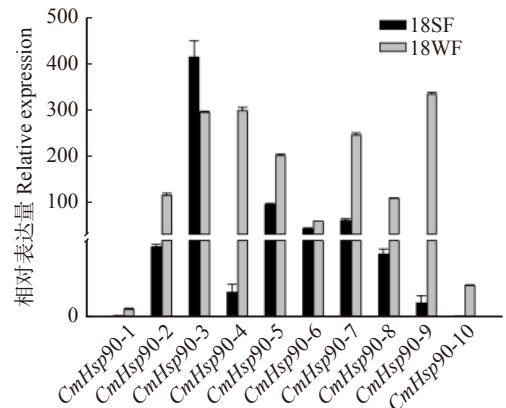


7SF. 授粉后 7d; 15SF. 授粉后 15 d; 18SF. 授粉后 18 d; 21FY. 授粉后 27 d 发育胚珠; 27FY. 授粉后 27 d 发育胚珠。下同。7SF, 7 days after pollination; 15SF, 7 days after pollination; 18SF, 18 days after pollination; 21FY, ovule developed 27 days after pollination; 27FY, ovule developed 27 days after pollination. The same below.

图 7 *CmHsp90* 基因在胚珠不同发育时期的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *CmHsp90* gene family in different development stages of ovule

10 个板栗 *CmHsp90* 蛋白与拟南芥、水稻、毛果杨 *Hsp90* 蛋白构建进化树, 35 个 *Hsp90* 蛋白被分为 5 个组, 聚为一组的基因具有相似的蛋白结构和亚细胞定位结果^[24-27], 表明它们之间亲缘关系较近。目前, 对模式植物拟南芥、水稻以及木本植物毛果杨的 *Hsp90* 基因家族研究较多, 可参考拟南芥、水稻以及毛果杨 *Hsp90* 基因的研究结果预判同源关系较近的板栗 *CmHsp90* 的基因功能^[24-27]。

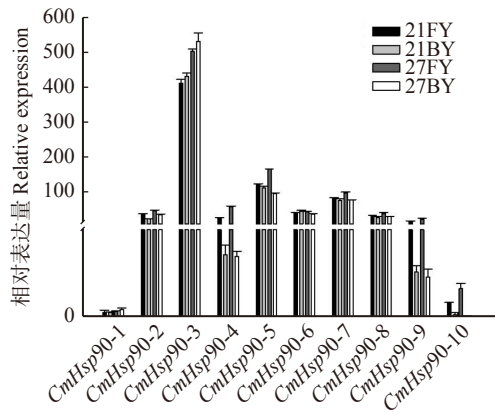


18WF. 未授粉, 与 18 d 授粉胚珠(18SF)同时采集。18WF, unpollinated, collected at the same time with 18 day pollinated ovules (18SF).

图 8 *CmHsp90* 基因在授粉后 18 d 和未授粉胚珠中的表达情况

Fig. 8 Expression of *CmHsp90* gene in 18 days after pollination and unpollinated ovules

随后我们对 *CmHsp90* 家族基因的启动子进行顺式作用元件预测, 发现所有 *CmHsp90* 基因启动子上均预测到了光响应元件。Feng 等^[29]研究发现 *AtHsp90-5* 突变会导致拟南芥的叶绿体发育被抑制, 胚胎发生缺陷; 在对毛果杨 *Hsp90* 基因家族的研究中发现, 定位到叶绿体上的 *PtHsp90-5a* 和 *PtHsp90-5b* 基因主要在幼叶和成熟叶中表达^[24], 因此推测板栗 *CmHsp90* 家族基因可能也与叶绿体相关。除预测到大量光响应元件外, 还预测到了与逆境和激素相关



21BY. 授粉后 21 d 败育胚珠; 27BY. 授粉后 27 d 败育胚珠。21BY, ovule aborted 21 days after pollination; 27BY, ovule aborted 27 days after pollination.

图9 *CmHsp90* 基因在发育胚珠与败育胚珠中的表达情况

Fig. 9 Expression of *CmHsp90* gene in ovule of pollination development and pollination abortion

的元件,说明 *CmHsp90* 基因参与了不同非生物胁迫的调控,这与早先 Panaretou 等^[30]的研究结果一致。目前,对热激蛋白的研究大部分都集中在其对温度胁迫的响应上,如对白菜(*Brassica pekinensis*)^[31]、拟南芥^[27]、番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[32]和烟草(*Nicotiana tabacum*)^[33]等物种的研究,均说明 *Hsp90* 有助于提高植物的耐热性,但也有研究证明热激蛋白能提高植物抵抗冷胁迫的能力^[34-36]。Prasinos 等^[37]研究发现:当胚胎组织受到热激时,胚胎中高度特异性的 *AtHsp90-1* 和 *AtHsp90-3* 的启动子驱动基因表达发生了数量和质量上的变化,说明 *Hsp90* 基因参与了胚珠发育过程中对温度的响应过程。

我国板栗的单产相对较低,造成这一现象的原因与授粉受精不良和胚败育等密切相关^[1]。为了研究影响板栗授粉受精及胚珠发育的原因,我们采集了授粉与不授粉、授粉后不同发育阶段的胚珠,进行转录组测序并分析了 *CmHsp90* 基因家族在胚胎发育的不同时期的表达情况。通过对转录组数据进行分析发现:除 *CmHsp90-3* 外,其他 *CmHsp90* 基因在受精前后胚珠中的表达量变化较大,受精前胚珠中的表达量均高于受精后胚珠中的表达量,说明这些基因可能参与了板栗早期胚珠发育相关途径的调控。Sangster 等^[38]通过抑制拟南芥 *Hsp90* 的表达发现:抑制表达的转基因植株其开花时间显著晚于对照,说明 *Hsp90* 基因可能与花器官的形成相关,这暗示了 *CmHsp90* 基因可能也参与板栗花器官的发育。Luo 等^[12]在对拟南芥的研究发现:*AtHsp90.6* 功能丧失可能导致胚胎致死,而拟南芥中 *AtHsp90.6* 基因与板栗中的 *CmHsp90-2* 聚为一类,同属于 II 组,且都定位于线粒体,说明这 2 个基因的同源性较高,推

测 *CmHsp90-2* 可能参与板栗的胚珠发育的调控。对授粉后 21 和 27 d 同一子房中发育和败育胚珠的转录组数据进行分析,发现发育胚珠中 *CmHsp90-2* 的表达量均高于败育胚珠,进一步说明该基因可能与胚珠发育相关。研究发现拟南芥中 *AtHsp90-1* 的启动子活性在胚胎发育的整个早期阶段普遍较低,但在胚胎成熟前变高,在子叶中表达最为突出^[37],而与 *AtHsp90-1* 聚为一组的 *CmHsp90-1*、*CmHsp90-4*、*CmHsp90-9*、*CmHsp90-10*,以及同样定位在胞质中的 *CmHsp90-5* 在授粉后 21 d 的表达量均低于授粉后 27 d,即胚珠发育前期的表达量低于胚珠发育后期,与 Prasinos 等^[37]的研究结果基本一致,推测板栗中的这 5 个基因可能具有与 *AtHsp90-1* 基因相同的功能,可在后期实验加以验证。*CmHsp90* 基因家族的功能在很大程度上仍是未知的,需要后期通过实验来确定其精确功能。本研究通过对板栗 *Hsp90* 基因家族的系统发育和在胚珠发育过程中的表达情况进行分析,为未来 *CmHsp90* 的综合功能分析奠定了坚实的基础。

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: 83-94.
- [2] 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.
- [3] Chen J, Gao T, Wan S, et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the HSP gene superfamily in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 2633.
- [4] Hu W, Hu G, Han B. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice[J]. *Plant Science*, 2009, 176(4): 583-590.
- [5] Sangster T A, Queitsch C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8: 86-92.
- [6] Johnson J L. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823: 607-613.
- [7] Kravats A N, Hoskins J R, Reidy M, et al. Functional and physical interaction between yeast Hsp90 and Hsp70[J]. *PNAS*, 2018, 115(10): E2210.
- [8] Mayer M P, Breton L L. Hsp90: breaking the symmetry[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58: 8-20.
- [9] Jackson S E. Hsp90: structure and function[J]. *Topics in Current Chemistry*, 2013, 328: 155-240.
- [10] Goldberg R B, de Paiva G, Yadegari R. Plant embryogenesis: zygote to seed[J]. *Science*, 1994, 266: 605-614.

- [11] Samakovli D, Tichát, VavrdováT, et al. HEAT SHOCK PROTEIN 90 proteins and *YODA* regulate main body axis formation during early embryogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2021, 186(3): 1526–1544.
- [12] Luo A, Li X, Zhang X, et al. Identification of AtHsp90.6 involved in early embryogenesis and its structure prediction by molecular dynamics simulations[J/OL]. *Royal Society Open Science*, 2019, 6: 190219[2021–08–11]. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.190219>.
- [13] Lee Y K, Kim S H, Hong C B, et al. Heat-shock protein 90 may be involved in differentiation of the female gametophytes in *Griffithsia japonica* (Ceramiiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 1998, 34: 1017–1023.
- [14] 智研咨询集团. 2019 年全球及中国板栗行业产量、进出口贸易分析 [Z]. 中国产业信息, 2020–10–11.
Zhiyan Consulting Group. Analysis of global and Chinese chestnut industry output and import and export trade in 2019[Z]. *Industry Information of China*, 2020–10–11.
- [15] 李玲. 板栗受精作用与胚发育分子机理的初步研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
Li L. Basic study on the molecular mechanism of fertilization and embryonic development in *Castanea mollissima* BL.[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020.
- [16] 杜国华, 周良骝, 谢中稳, 等. 板栗空苞机理的研究 [J]. *果树学报*, 1995, 12(1): 5–9.
Du G H, Zhou L L, Xie Z W, et al. Study on empty bud mechanism of chestnut[J]. *Journal of Fruit Science*, 1995, 12(1): 5–9.
- [17] 王倩. 品种配置对燕山板栗结实情况及果实品质影响研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
Wang Q. Effect on fruiting conditions and nut quality from variety configuration[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.
- [18] 李玲, 苏淑钗, 寇艳茹. 板栗座果及果实早期发育与内源激素质量分数的关系 [J]. *东北林业大学学报*, 2020, 48(5): 55–61.
Li L, Su S C, Kou Y R. Fruit-set and early fruit development in chestnut are associated with endogenous hormones contents[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2020, 48(5): 55–61.
- [19] Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D458–D460.
- [20] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [21] 刘阳. 板栗花发育相关 MADS-box 基因的挖掘和表达分析 [D]. 北京: 北京农学院, 2019.
Liu Y. Mining and expression analysis of *MADS*-box genes related to flower development of *Castanea mollissima* [D]. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2019.
- [22] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357–360.
- [23] Perteau M, Perteau G M, Antonescu C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290–295.
- [24] Mayer M P, Bukau B. Molecular chaperones: the busy life of Hsp90[J]. *Current Biology*, 1999, 9: R322–R325.
- [25] Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6: 238–246.
- [26] 张海. 水稻 OsHSP90 基因家族功能研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
Zhang H. Function analysis of the OsHSP90 family in rice[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2016.
- [27] Zhang J, Liu B B, Zhang L, et al. Genome-wide analysis of the *Populus* Hsp90 gene family reveals differential expression patterns, localization, and heat stress responses[J]. *BMC Genomics*, 2013, 13: 532.
- [28] 杜志如. 水稻热激蛋白 *Hsp90* 基因的克隆及互作蛋白的筛选 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
Du Z R. Cloning of heat shock protein90 gene from rice and screening for interacted proteins[D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2008.
- [29] Feng J, Fan P, Jiang P, et al. Chloroplast-targeted Hsp90 plays essential roles in plastid development and embryogenesis in *Arabidopsis* possibly linking with VIPP1[J]. *Plant Physiology*, 2014, 150(2): 292–307.
- [30] Panaretou B, Prodromou C, Roe S M, et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo[J]. *The EMBO Journal*, 1998, 17(16): 4829–4836.
- [31] 袁凌云, 吴颖, 张利婷, 等. 白菜 HSP90 基因家族的鉴定及表达分析 [J/OL]. *分子植物育种*, 2012[2021–06–30]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210311.1553.004.html>.
Yuan L Y, Wu Y, Zhang L T, et al. Identification and expression analysis of *HSP90* gene family in Chinese cabbage[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2012[2021–06–30]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210311.1553.004.html>.
- [32] 刘云飞, 万红建, 杨悦俭, 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.
- [33] Song Z P, Pan F L, Yang C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *HSP90* gene family in *Nicotiana tabacum*[J/OL]. *BMC Genet*, 2019, 20(1): 35[2021–06–30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30890142/>.
- [34] Collins G G, Nie X L, Saltveit M E. Heat shock protein and chilling sensitivity of mung bean hypocotyls[J]. *Journal Experimental Botany*, 1995, 46(7): 795–802.
- [35] Sabehat A, Weiss D, Lurie S, et al. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit[J]. *Plant Physiology*, 1996, 110: 531–537.
- [36] Gilmour S J, Hajela R K, Thomashow M F. Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology*, 1988, 87: 745–750.
- [37] Prasinós C, Krampis K, Samakovli D, et al. Tight regulation of expression of two *Arabidopsis* cytosolic Hsp90 genes during embryo development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(412): 633–644.
- [38] Sangster T A, Bahrami A, Wilczek A, et al. Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels[J/OL]. *PLoS One*, 2007, 2(7): e648 [2021–06–30]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000648>.

(责任编辑 范娟 赵田芸
责任编辑 康向阳)