

# 杧果低分子量热激蛋白基因*MiHSP17.6* 的克隆及表达分析

CAN Van Toan<sup>1,3,\*</sup>, 罗 聪<sup>1,\*</sup>, 董 龙<sup>1</sup>, 刘召亮<sup>1</sup>, 何新华<sup>1,2,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>广西大学农学院, 南宁 530004; <sup>2</sup>广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007; <sup>3</sup>北江农林大学林业系, 越南北江)

**摘 要:** 采用 RT-PCR 与 RACE 相结合的方法获得了杧果低分子量热激蛋白基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *MiHSP17.6*, GenBank 登录号为 KJ459857。序列分析显示, 该基因序列全长为 680 bp, 其中开放阅读框为 462 bp, 编码 154 个氨基酸, 5'非编码区和 3'非编码区长度分别为 80 bp 和 135 bp。杧果 *MiHSP17.6* 与其他物种的低分子量热激蛋白同源性介于 74%~82%。实时荧光定量分析表明, *MiHSP17.6* 在‘四季杧’不同组织器官中均表达, 在果实发育的中期表达水平持续上升。高温 (44 °C)、低温 (4 °C)、盐 (NaCl)、聚乙二醇 (PEG)、脱落酸 (ABA)、双氧水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 和水杨酸 (SA) 处理均诱导该基因表达, 因此推测 *MiHSP17.6* 的功能可能与杧果果实发育和抵御逆境胁迫相关。

**关键词:** 杧果; *MiHSP17.6*; 克隆; 表达分析

**中图分类号:** S 667.7

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 12-2383-10

## Cloning and Expression Analysis of a Small Heat Shock Protein Gene (*MiHSP17.6*) from *Mangifera indica*

CAN Van Toan<sup>1,3,\*</sup>, LUO Cong<sup>1,\*</sup>, DONG Long<sup>1</sup>, LIU Zhao-liang<sup>1</sup>, and HE Xin-hua<sup>1,2,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530004, China; <sup>2</sup>Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China; <sup>3</sup>Bacgiang Agricultural and Forestry University, Bacgiang, Vietnam)

**Abstract:** The full length sequence of cDNA, small heat shock protein 17.6 gene of mango was cloned by RT-PCR and RACE method, which was named *MiHSP17.6* with the GenBank accession number of KJ459857. The results showed that the full-length sequence of *MiHSP17.6* is 680 bp and the open reading frame is 462 bp, which encoding a polypeptide of 154 amino acids. The untranslated region (UTR) 5' and 3' with the length of 80 bp and 135 bp, respectively. Comparison of the amino acids sequences of homologous HSP proteins from other species indicated that *MiHSP17.6* has a range of 74% to 82% identity. The real-time quantitative PCR results showed that *MiHSP17.6* was expressed in all tested organs. And we also found that *MiHSP17.6* was regulated by several treatments, such as high temperature (44 °C), low temperature (4 °C), salt (NaCl), polyethylene glycol (PEG), abscisic acid (ABA), hydrogen

收稿日期: 2014-08-19; 修回日期: 2014-11-14

**基金项目:** 广西自然科学基金项目 (2013GXNSFDA019011, 2014GXNSFBA118102); 广西高校科研项目 (YB2014009); 广西大学科研基金项目 (XBZ120766)

\* 共同第一作者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: honest66222@163.com; Tel: 15177169189)

peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and salicylic acid (SA) treatments. These results showed that the function of *MiHSP17.6* gene has an important role in mango fruit development and stress responses.

**Key words:** *Mangifera indica*; *MiHSP17.6*; cloning; expression analysis

热激蛋白 (Heat shock proteins, HSP) 根据其分子量的大小又分为 HSP100s、HSP90s、HSP70s、HSP60s 和 sHSP (低分子量 HSP, small HSP) 5 类。这是一类非常保守的蛋白质家族, 在不同物种中同一类型的热激蛋白具有很高的同源性, 但同一物种中不同类型的热激蛋白之间无同源性。热激蛋白不仅可以稳定细胞的结构, 保持细胞正常的功能, 使生物体能够抵御不利的环境胁迫 (方丽平和李进步, 2007; 邹杰 等, 2007)。目前研究表明, 热激蛋白基因不仅在高温胁迫下被诱导表达, 在盐、干旱、重金属、低温等不利条件下同样可以被诱导表达 (Vierling, 1991; 裴华丽, 2007; Vásquez-Robinet et al., 2010; Ye et al., 2012)。

低分子量热激蛋白 sHSP 的分子量介于 12 ~ 42 kD 之间, 大部分分布于 15 ~ 22 kD, 在 sHSP 蛋白质的 C 端包含一个高度保守的 HSP20 结构域, 因此这类蛋白质也被称为 HSP20 蛋白质家族 (Waters, 2013)。目前在一些植物中至少有 30 余种低分子量热激蛋白基因被发现, 这些基因的表达不仅受热胁迫的调控, 其他胁迫也对其表达起调控作用 (Waters, 2013)。

芒果对非生物胁迫比较敏感, 特别是花期低温阴雨天气导致芒果授粉受精不良, 坐果期的极端高温天气导致果实发育的畸形。在前期研究中, 利用 cDNA-SCoT 差异显示技术从芒果逆境胁迫诱导的叶片和茎组织中筛选获得了一个低分子量热激蛋白基因片段 (Luo et al., 2012, 2014)。本研究中进一步克隆芒果热激蛋白基因全长, 并对该基因在芒果中的组织表达特性以及在多种逆境胁迫处理下的表达模式进行分析, 为深入了解低分子量热激蛋白基因在芒果中的作用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及其处理

芒果不同组织器官 (老叶、嫩叶、老茎、嫩茎、花) 与果实不同发育时期材料均采自广西大学农学院果树标本园的 13 年生 ‘四季芒’。果实样品采集时间为 2014 年 3—6 月, 从谢花后 10 d 开始, 每 10 d 取 1 次, 直到成熟, 共 7 次。

以长势一致的 1 年生盆栽四季芒嫁接苗为材料 (砧木为 ‘土芒’) 进行逆境处理。逆境胁迫处理方法: ① 分别在光照培养箱中进行 44 °C 高温处理和 4 °C 低温处理, 以常温 25 °C 为对照; ② 300 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl, 清水为对照; ③ 30% PEG-6000 处理, 以清水为对照。采集叶片和茎, 采集时间分别为 0、2、4、8、12、24、48 和 72 h。

信号分子处理方法: 一年生盆栽 ‘四季芒’ 嫁接苗上分别喷 100 μmol · L<sup>-1</sup> 脱落酸、1 mmol · L<sup>-1</sup> 双氧水和 1 mmol · L<sup>-1</sup> 水杨酸, 以清水为对照。采集各处理的叶片, 采样时间为处理后 0、0.5、1、2、8、12、24、48 和 72 h。

上述样品采集后在液氮中速冻, 保存于 -80 °C 冰箱备用。

### 1.2 *MiHSP17.6* 全长的克隆

RNA 提取按照北京华越洋公司 RNA 提取试剂盒的说明书进行, RNA 提取后用 Quawell 仪器测定浓度并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。总 RNA 经 RNase-Free DNase 处理, 以去除含有的基因组 DNA, 逆转录使用 M-MLV 反转录酶 (TaKaRa), 按照公司产品说明书操作。

在前期对杧果逆境胁迫样本进行 cDNA-SCoT 基因差异显示的研究中克隆获得了缺少 5'末端序列的杧果低分子量热激蛋白基因片段 (Luo et al., 2012, 2014)。根据获得的基因片段设计基因特异引物, 利用本实验室改良的 5'末端 RACE 方法克隆其基因全长, 步骤完全参照罗聪等 (2011a) 的方法。

### 1.3 *MiHSP17.6* 生物信息学分析

用 BioXM 2.6 软件预测 *MiHSP17.6* 氨基酸序列, 而后将氨基酸序列提交 NCBI, 在 <http://blast.st-vi.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网址检索杧果与其他物种低分子量热激蛋白的同源性; 下载相关氨基酸序列并用 DNAMAN 软件进行进化树分析; 蛋白分子量和等电点在 <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> 进行计算; 用 WoLF PSORT 和 SOSUI signal 软件分别对杧果低分子量热激蛋白进行亚细胞定位和信号肽分析; 亲水性、二级结构分别用 ExPASy Proteomics Server 软件和 SOPMA 软件进行分析; 用 Motif Scan 工具对其功能结构域进行分析。

### 1.4 实时荧光定量分析

根据 *MiHSP17.6* 全长序列设计荧光定量引物, 用杧果 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *MiGAPDH* (GenBank 登录号为 HQ585994) 为内参 (罗聪等, 2011b)。荧光定量 PCR 仪器型号为 LightCycler 480, 反应体系和程序按 Real Master Mix (SYBR Green I) 试剂盒说明书进行。基因相对含量按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 (Livak & Schmittgen, 2001)。所用引物见表 1。

表 1 引物序列及使用  
Table 1 Sequence of primers and description

编号 Code	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	用途 Usage
AUP1	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	反转录 Reverse transcription
AP long	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGGG	5' RACE
AP short	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
5HSPd2	TCTCCACCTTCACTTCTCTTTCT	
5HSPd1	GGAAACGAGTGGAGAGTGACGAAA	
3Side	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3' RACE
HSP17.6 F	ATGTCGCTAATTCCAAGCTTC	扩增 CDS 序列
HSP17.6 R	CAACATTATTCACTATTTC AAC	Amplification of CDS sequence
qMiHSP17.6 F	GGGTTCTGACTGTTACTGTTC	荧光定量分析
qMiHSP17.6 R	AACGCAACATTATTCACTATTTC A	Real-time PCR analysis
qMiGAPDH F	CTAGTGGTCCAAGTCTCCAAGAAAA	内参
qMiGAPDH R	CAAGGGGCTCATCACAACA	Internal control

## 2 结果与分析

### 2.1 *MiHSP17.6* 全长的克隆

利用新型植物总 RNA 提取试剂盒成功提取了‘四季杧’不同组织器官样品 (叶、茎、花和果实) 的总 RNA, 提取后通过 Quawell DNA/Protein Analyzer 仪器测定和分析, 结果显示每个样品总 RNA OD<sub>260/280</sub> 比值介于 1.8 ~ 2.0 之间, OD<sub>260/230</sub> 比值均大于 2.0, 浓度均大于 0.5  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA, 其 28S 和 18S 条带明晰, 无 DNA 残留, 说明提取的 RNA 完整, 达到后续试验的要求。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 进行逆转录生成第 1 链 cDNA, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 呈弥散状 (图 1, A), 说明逆转录效率高, 可用于基因克隆。

前期研究中获得的杧果低分子量热激蛋白基因长为 500 bp, 包括完整的 3'末端序列, 但缺乏 5'末端序列 (Luo et al., 2012, 2014)。生物信息学分析显示, 该基因离 5'末端全长还差 100 bp 左右, 因此利用本实验室改良的基于 TdT 加尾的 5'末端 RACE 方法克隆其全长 (罗聪 等, 2011a)。经过克隆测序, 获得长度为 240 bp 的 5'末端序列, 包括热激蛋白基因 5'非编码区序列 80 bp。经过 5'序列和 3'序列的拼接, 获得长度为 680 bp 的热激蛋白基因全长序列, 其中 3'非编码区长度为 135 bp。序列分析显示, 该基因包含一个 462 bp 的开放阅读框 (图 1, B), 编码氨基酸 154 个氨基酸, 属于低分子量热激蛋白基因家族, 命名为 *MiHSP17.6*, 基因登录号为 KJ459857。核苷酸序列及其编码氨基酸序列见图 2。

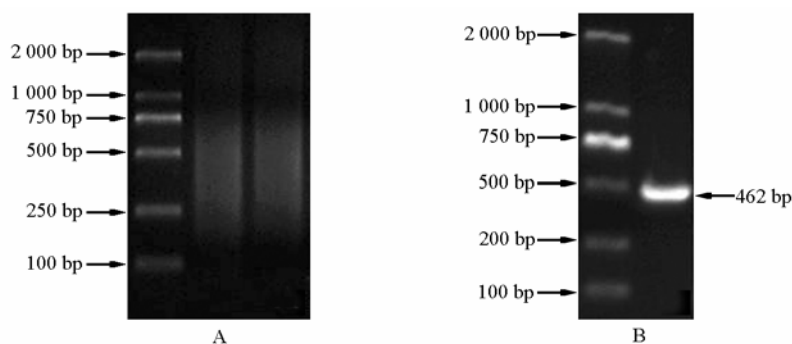


图 1 杧果逆转录 cDNA (A) 及 *MiHSP17.6* 开放阅读框 (B) 琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of cDNA (A) and open reading frame (B) sequence of *MiHSP17.6*

```

1      TGATTCGAGACAATTCTTCAAAGTTGAAGCAGCATCAGATTCATCAATCAATACTATATTCTCGCATTCTTAGAAACA
79     ATATGTCGCTAATTCCAAGCTTCCTTGGCAACCAACGCGGCAGTATTTTCGATCCTTTCTCTCTCGATGTTGGGATC
      M S L I P S F L G N Q R G S I F D P F S L D V W D P
157    CATTCAAGGACTTTTCGTCACCTCCACTCGTTTCCCTCAAGAAACCTCTGCTTTTGTGAGCAGCCGGATAGACTGGA
      F K D F S S L S T R F P Q E T S A F V S T R I D W R
235    GGGAAACCCCGAGGCTCAGTGTTCAAGGCTGATCTTCCAGGGCTCAAGAAAGAGGAAGTGAAGGTGGAGATCGAAG
      E T P E A H V F K A D L P G L K K E E V K V E I E D
313    ATAACAGTGTGCTTCAAATTAGCGGAGAGGAATATAGAGAAGGAAGACAAGACACCTGGCATCGTGTGGAAC
      N S V L Q I S G E R N I E K E D K N D T W H R V E R
391    GTAGTAGTGGCAAATTCTCCAGGAGTTTAAGCTACCGGAGAACGTCAAATTGGAGCAGATTAAGGCTTCCATGGAGA
      S S G K F S R R F K L P E N V K L E Q I K A S M E N
469    ACGGGTTCTGACTGTTACTGTTCTTAAAGTTGAAGTTAAGAAAGCAGACGTTAAGGCAGTTGAAATCTCTGTTGAA
      G V L T V T V P K V E V K K A D V K A V E I S G *
547    ATACTGAATAATGTTGCGTTTGAGAAGAATGCAGTGGATTGTCTGTCTACATAAATTGTGTGCTCGTAATGAATTC
625    GCTTAGAAATAAAATGTAATATCGTTGTTCTGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
  
```

图 2 *MiHSP17.6* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The complete cDNA sequence of *MiHSP17.6* and its predicted amino acid sequence

## 2.2 生物信息学分析

利用 ExPASy ProtParam 对杧果 *MiHSP17.6* 蛋白序列的生物信息学进行分析, 结果显示蛋白分子量为 17.6 kD, 理论等电点为 5.8。SignalP 4.1 Server 和 PSORT 软件分析显示, *MiHSP17.6* 不存在信号肽, 有跨膜结构, 定位于线粒体。用 Motif Scan 工具对蛋白质功能结构域进行分析, 显示有两个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (Casein kinase II phosphorylation) 位于 47 ~ 50 和 127 ~ 130 个氨基酸之间; 有 1 个 N-糖基化位点 (Glycosylation) 位于 96 ~ 99 个氨基酸之间; 有 3 个蛋白激酶 C 磷酸

化位点 (Kinase C phosphorylation) 位于 34 ~ 36、106 ~ 108 和 110 ~ 112 个氨基酸之间; 有 1 个 N-豆蔻酰化位点 (Myristoylation) 位于 9 ~ 14 个氨基酸之间; 在 50 ~ 153 个氨基酸之间存在 1 个 HSP20/ $\alpha$  晶体蛋白家族结构域 (Alpha crystallin)。

## 2.3 系统进化树分析

利用 Blastp 工具对杧果 *MiHSP17.6* (KJ459857) 蛋白序列进行比对, 结果显示: 杧果与可可 (*Theobroma cacao*) 相似性最高, 为 82%, 与紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 相似性为 80%, 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 相似性为 74%。进一步通过 DNAMAN 软件将 *MiHSP17.6* 与 GenBank 数据库中已经登录的 17 个物种的 HSP 氨基酸序构建系统发育树, 结果显示, 杧果 *MiHSP17.6* (KJ459857) 与棉花亲缘关系最近, 与拟南芥最远 (图 3)。

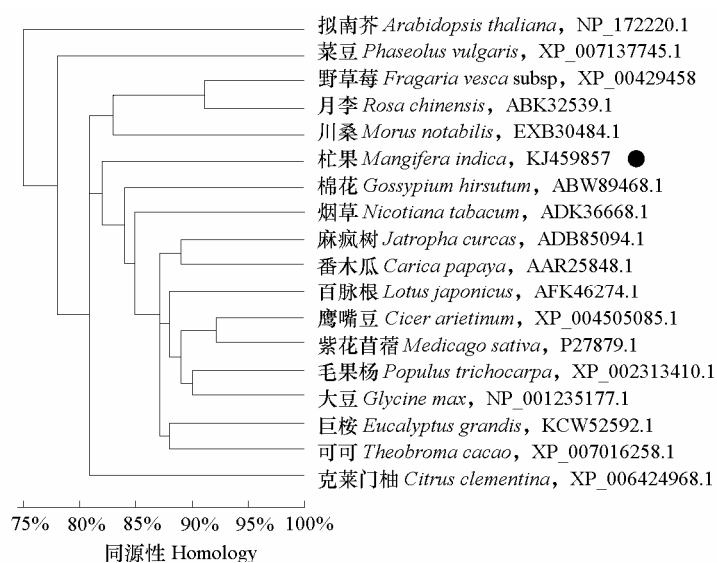


图 3 杧果 *MiHSP17.6* (KJ459857) 与其它物种 HSP 蛋白的同源树

Fig. 3 Homology tree analysis of *MiHSP17.6* (KJ459857) proteins with other species

## 2.4 *MiHSP17.6* 的组织表达特性分析

*MiHSP17.6* 在杧果不同组织器官以及不同发育时期的果实中均有表达。在不同组织器官中, *MiHSP17.6* 在花和嫩叶中表达水平较高 (图 4)。

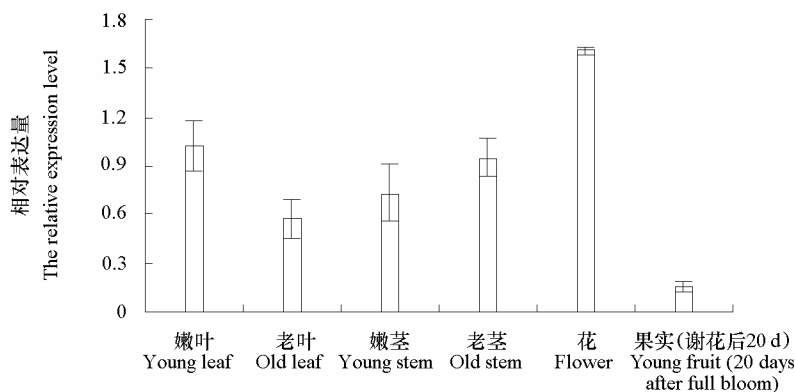


图 4 *MiHSP17.6* 在杧果不同组织的表达

Fig. 4 Expression of *MiHSP17.6* in different organs of mango

在不同发育时期的果实中, *MiHSP17.6* 的表达水平在谢花后 10 d 下降, 在 20 d 时表达水平最低, 而后开始逐渐上升, 在谢花后 60 d 时达到表达高峰, 是谢花后 10 d 的 3.5 倍, 其后又有所下降 (图 5)。

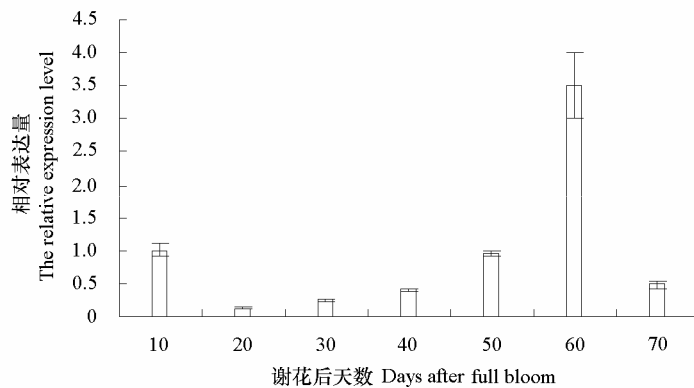


图 5 *MiHSP17.6* 在芒果不同发育时期果实中的表达

Fig. 5 Expression of *MiHSP17.6* at different fruit developmental stages in mango

## 2.5 *MiHSP17.6* 在逆境胁迫下的表达分析

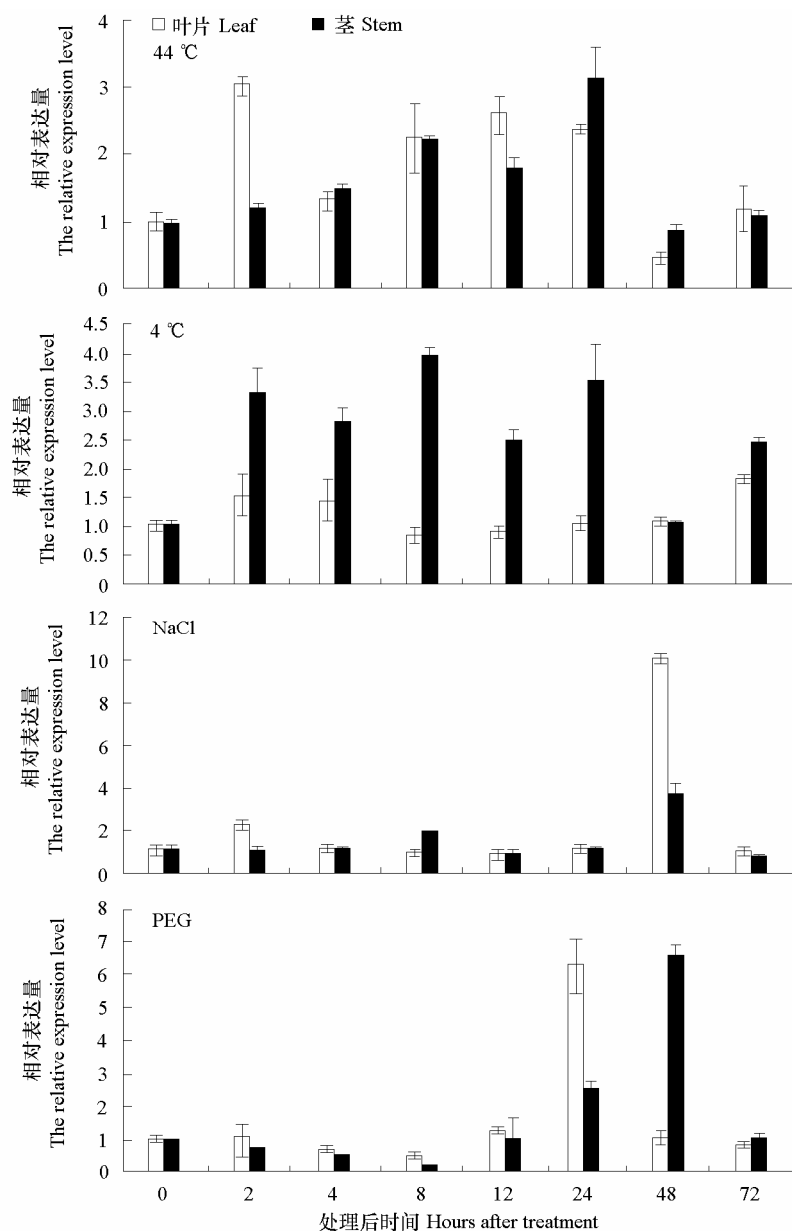
为了探讨芒果 *MiHSP17.6* 在不同逆境胁迫下的表达水平, 采用实时荧光定量技术对 *MiHSP17.6* 在高温胁迫、低温胁迫、盐胁迫和干旱胁迫下的表达水平进行分析。结果表明, 高温胁迫、低温胁迫、盐胁迫和干旱胁迫均诱导其表达, 但表达水平存在差异 (图 6)。

44 °C 高温处理, 叶片中, *MiHSP17.6* 的表达水平在处理 2 h 时急剧上升达到峰值, 是处理前样品的 3 倍, 而后在 4 h 时有所下降, 但依然高于处理前样品的表达水平, 在 8 ~ 24 h 之间维持较高的水平, 而后开始下降, 在 48 h 时为最低, 在 72 h 时又恢复到处理前类似的水平。茎中, *MiHSP17.6* 的表达水平从处理后 2 h 就开始持续上升, 在 24 h 时达到峰值, 是处理前的 3.1 倍, 在 48 h 时下降, 在 72 h 时又恢复到处理前类似的水平。

4 °C 低温处理, 叶片中, 在处理后的 2 ~ 4 h 和 24 ~ 72 h 之间, *MiHSP17.6* 的表达水平高于处理前, 其表达最高峰出现在处理后的 72 h, 是处理前样品的 1.8 倍, 而在 8 ~ 12 h 之间, 表达水平与处理前的表达水平类似。茎中, 低温处理后 *MiHSP17.6* 的表达水平均高于处理前样品, 在处理 2 h 时其表达水平就迅速上升, 在 8 h 时达到峰值, 是处理前的 3.9 倍。

盐处理, 叶片中, *MiHSP17.6* 的表达水平在处理 2 h 时上升, 是处理前的 2.2 倍, 在处理后的 4 ~ 24 h 之间, 维持与处理前相当的水平, 而在处理后 48 h 时, 其表达水平又急剧上升达到峰值, 是处理前的 10.1 倍, 而后开始下降, 在 72 h 时恢复到处理前类似的水平。茎中, *MiHSP17.6* 在处理 2 ~ 4 h 时表达水平与处理前持平, 而在 8 h 时上升到处理前的 1.9 倍, 在 12 ~ 24 h 之间, 其表达水平又恢复到处理前的水平, 在 48 h 时急速上升并达到峰值, 是处理前的 3.6 倍, 而后下降, 在 72 h 时恢复到处理前类似的水平。

干旱处理, 叶片中, *MiHSP17.6* 的表达水平在处理 4 h 时开始下降, 在 8 h 时达到最低值, 表达水平只有处理前的一半, 而在 12 h 时表达水平开始上升, 在 24 h 时达到高峰, 是处理前的 6.3 倍, 而后开始下降, 在 48 ~ 72 h 之间维持与处理前类似的水平。茎中, *MiHSP17.6* 的表达水平在处理 2 h 时开始下降, 在 8 h 时最低, 而后在 12 ~ 24 h 之间开始逐渐上升, 在 48 h 时达到最高值, 是处理前的 6.6 倍, 在 72 h 时又恢复到处理前类似的水平。

图 6 芒果 *MiHSP17.6* 在不同逆境胁迫下的表达分析Fig. 6 Expression of *MiHSP17.6* in leaves and stems of mango under different stress treatments

## 2.6 *MiHSP17.6* 在脱落酸、双氧水和水杨酸处理下的表达分析

脱落酸、双氧水和水杨酸均诱导 *MiHSP17.6* 表达 (图 7)。脱落酸处理后 0.5 h, *MiHSP17.6* 的表达水平上调, 在 2 h 时达到峰值, 是处理前的 10.9 倍, 而后其表达水平急速下降, 在 8 h 时, 为处理前的 90%, 在 24 h 时达到最低值, 而后又开始上升, 在 48 h 时达到第 2 个表达高峰, 是处理前的 7.9 倍, 而后又有所下降, 在 72 h 时是处理前的 3.8 倍。

双氧水处理 0.5 h, *MiHSP17.6* 的表达水平在处理后的显著上调而达到峰值, 是处理前的 10.6 倍, 在 1~2 h 表达水平有所下降, 但依然高于处理前的表达水平。在 2 h 后, 其表达水平迅速下降。在 8~48 h 之间, 维持较低的表达水平, 最低值出现在处理后的 12 h, 只有处理前的 0.15 倍, 而在 72 h 时表达水平又上升到处处理前的 2.6 倍。

水杨酸处理, *MiHSP17.6* 的表达水平在处理后 0.5 h 开始持续上升, 在处理后 2 h 时达到峰值, 是处理前的 5.7 倍, 而后开始逐渐下降, 在 12 h 时下降到最低值, 而后在 24 h 时表达水平开始有所上升, 在 72 h 时恢复到处理前类似的水平。

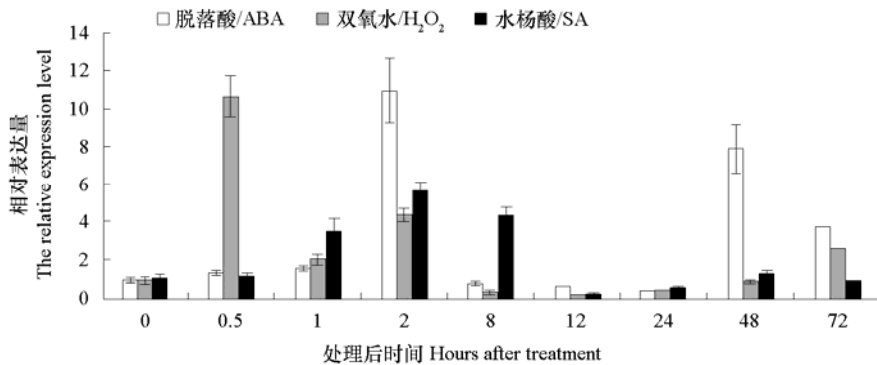


图 7 *MiHSP17.6* 在脱落酸、双氧水和水杨酸处理下的表达情况

Fig. 7 Expression of *MiHSP17.6* in leaves of mango under ABA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SA treatments

### 3 讨论

研究表明低分子量热激蛋白基因与植物的生长发育相关, 如种子发育、花粉发育以及果实发育等 (Sun et al., 2002; Reddy et al., 2014)。拟南芥 *At-HSP17.6A* 在授粉后大量表达 (Sun et al., 2001)。Omar 等 (2011) 研究发现, *JcHSP-1* 的表达水平随着麻风树种子的不断发育而显著上升。Volkov 等 (2005) 对 12 个烟草低分子量热激蛋白基因表达分析显示, 这些基因在烟草花粉发育过程中均表达。Tao 等 (2012) 在芥菜中发现了 8 个分子量介于 17.1 ~ 18.4 kD 的热激蛋白基因, 表达特性分析显示, 这些基因在营养组织的根、叶和茎中不表达, 而在生殖器官中特异表达。Ye 等 (2012) 研究发现, 水稻中的 *OsHsp24.15* 和 *OsHsp18.03* 在种子萌发、花器官以及胚乳中高表达。在本试验中, *MiHSP17.6* 在各个组织中均表达, 其中在花和嫩叶中表达量较高。在果实发育过程中, 表现为早期下降, 中期持续上升, 而后期下降的趋势, 在谢花后 60 d 的果实中表达水平最高, 这些数据说明 *MiHSP17.6* 可能参与调控芒果果实的发育。

低分子量热激蛋白最典型的特点是受热胁迫诱导。荷花在 42 °C 热激后 1 h *NnHSP17.5* 表达水平显著上升 (Zhou et al., 2012)。胡萝卜在 40 °C 热激 4 h 后, 热激蛋白量开始积累, 在处理后的 48 h 内 *DcHsp17.7* 依然保持较高的表达水平 (Park et al., 2013)。报春花在 42 °C 热激处理 10 min 后 *PfHSP17.1* 表达水平开始上升, 在处理后的 1.5 ~ 2 h 之间达到高峰 (Zhang et al., 2013)。本研究中, 44 °C 热激 2 h 后, 在叶片和茎中 *MiHSP17.6* 的表达水平均明显上升, 说明 *MiHSP17.6* 与芒果抵御高温胁迫有关。

低分子量热激蛋白不仅受热胁迫诱导, 其他胁迫处理也诱导其表达。拟南芥 *At-HSP17.6A* 在 NaCl 和 PEG 胁迫处理后 2 h 时表达水平开始上升, 在 14 h 时达到表达高峰, 超量表达的 *At-HSP17.6A* 可以提高转基因拟南芥对盐和干旱的抵抗能力 (Sun et al., 2001)。水稻 *OsHsp17.0* 在 PEG 和 ABA 处理后 1.5 h 其表达水平也上升, 而盐胁迫其表达水平没有明显变化, 但超量表达的 *OsHsp17.0* 使转基因水稻增强对干旱和盐胁迫的抵御能力 (Zou et al., 2009, 2012)。胡萝卜 *DcHsp17.7* 在脱落酸和水杨酸处理后 4 h 表达水平明显上升, 重金属处理后 3 h 表达水平上升, 在 NaCl 盐处理下, *DcHsp17.7* 在叶片中的表达水平迅速上升 (Song & Ahn, 2011; Park et al., 2013)。荷花 *NnHSP17.5* 不仅受热胁迫诱导上调表达, 并且在双氧水的处理下其表达水平也明显上升, 超量表达的 *NnHSP17.5* 提高转



基因拟南芥对热的耐受性 (Zhou et al., 2012)。报春花 in 低温、NaCl、PEG、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 ABA 处理 3 h 后 *PfHSP17.1* 表达均上升 (Zhang et al., 2013)。Tao 等 (2012) 在荠菜中发现的 8 个低分子量热激蛋白基因受脱落酸处理和热激处理诱导, 且表达模式存在差异。Chandel 等 (2013) 在水稻中发现了多个低分子量热激蛋白基因, 表达模式分析显示, 同一基因在不同热激温度下其表达水平存在差异, 同一基因在同一温度热激下在不同品种中其表达水平也存在差异。以上研究表明, 低分子量热激蛋白在植物抵御非生物逆境胁迫过程中起非常重要的调控作用。在本试验中, 44 °C 高温、4 °C 低温胁迫、NaCl 盐胁迫和 PEG 干旱胁迫以及信号分子脱落酸, 双氧水和水杨酸的处理下, 杧果 *MiHSP17.6* 对这些处理均产生不同程度的应答反应。说明杧果的 *MiHSP17.6* 在抵御不利胁迫因素方面起重要的调控作用。目前对杧果低分子量热激蛋白的研究还未见报道, 本研究的结果将为 *MiHSP17.6* 的功能研究以及杧果逆境胁迫分子机理的研究奠定基础。

## References

- Chandel G, Dubey M, Meena R. 2013. Differential expression of heat shock proteins and heat stress transcription factor genes in rice exposed to different levels of heat stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22 (3): 277 – 285.
- Fang Li-ping, Li Jin-bu. 2007. Advanced in the research of heat shock protein in plant. *Journal of Huaibei Coal Industry Teacher College: Natural Science*, 28 (1): 43 – 47. (in Chinese)
- 方丽平, 李进步. 2007. 植物热激蛋白研究进展. 淮北煤炭师范学院学报: 自然科学版, 28 (1): 43 – 47.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25: 402 – 408.
- Luo C, He X H, Chen H, Hu Y, Ou S J. 2012. Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: Revealed through SCoT analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 1505 – 1515.
- Luo C, He X H, Hu Y, Yu H X, Ou S J, Fang Z B. 2014. Oligo-dT anchored cDNA-SCoT: A novel differential display method for analyzing differential gene expression in response to several stress treatments in mango. *Gene*, 548 (2): 182 – 189.
- Luo Cong, He Xin-hua, Chen Hu, Hu Ying, Ou Shi-jin. 2011b. Molecular cloning and expression analysis of a *MGAPDH* homologous gene from mango. *Journal of Fruit Science*, 28 (6): 1019 – 1024. (in Chinese)
- 罗 聪, 何新华, 陈 虎, 胡 颖, 欧世金. 2011b. 杧果 *MGAPDH* 同源基因的克隆及其表达分析. 果树学报, 28 (6): 1019 – 1024.
- Luo Cong, He Xin-hua, Chen Hu, Wei Yong-li, Li Ming-juan. 2011a. A high-efficient method of RACE technique for obtaining the gene 5' end. *Plant Physiology Journal*, 47 (4): 409 – 414. (in Chinese)
- 罗 聪, 何新华, 陈 虎, 韦泳丽, 李明娟. 2011a. 一种高效获取基因 5'末端的 RACE 方法. 植物生理学报, 47 (4): 409 – 414.
- Omar S A, Fu Q T, Chen M S, Wang G J, Song S Q, Elsheery N I, Xu Z F. 2011. Identification and expression analysis of two small heat shock protein cDNAs from developing seeds of biodiesel feedstock plant *Jatropha curcas*. *Plant Science*, 181: 632 – 637.
- Park H, Ko E, Jang E, Park S, Lee J, Ahn YJ. 2013. Expression of *DcHsp17.7*, a small heat shock protein gene in carrot (*Daucus carota* L.). *Horticulture Environment Biotechnology*, 54 (2): 121 – 127.
- Pei Hua-li. 2007. Studies on the relationship of heat shock protein and heat resistant of plant. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 30 (1): 44 – 46. (in Chinese)
- 裴华丽. 2007. 热激蛋白与植物抗热性关系的研究. 热带农业科技, 30 (1): 44 – 46.
- Reddy P S, Kavi Kishor P B, Seiler C, Kuhlmann M, Eschen-Lippold L, Lee J, Reddy M K, Sreenivasulu N. 2014. Unraveling ueregulation of the small heat shock proteins by the heat shock factor HvHsfB2c in barley: Its implications in drought stress response and seed development. *PLoS One*, 9 (3): e89125.
- Song N H, Ahn Y J. 2011. *DcHsp17.7*, a small heat shock protein in carrot, is tissue-specifically expressed under salt stress and confers tolerance to salinity. *New Biotechnology*, 28 (6): 698 – 704.
- Sun W N, Bernard C, van De Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N. 2001. *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal*, 27 (5): 407 – 415.

- Sun W N, Montagu M V, Verbruggen V. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577: 1 - 9.
- Tao P, Liu L, Wang J B. 2012. Characterization of eight cytosolic sHSP genes and their expression in *Capsella bursa-pastoris*. *Biologia Plantarum*, 56 (4): 648 - 656.
- Vásquez-Robinet C, Watkinson J I, Sioson A A, Ramakrishnan N, Heath L S, Grene R. 2010. Differential expression of heat shock protein genes in preconditioning for photosynthetic acclimation in water-stressed loblolly pine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 256 - 264.
- Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 579 - 620.
- Volkov R A, Panchuk I I, Schoffl F. 2005. Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 57: 487 - 502.
- Waters E R. 2013. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *Journal of Experimental Botany*, 64 (2): 391 - 403.
- Ye S F, Yu S W, Shu L B, Wu J H, Wu A Z, Luo L J. 2012. Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice. *Chinese Science Bulletin*, 57 (4): 336 - 343.
- Zhang L, Gao Y K, Pan H T, Hu W J, Zhang Q X. 2013. Cloning and characterisation of a *Primula* heat shock protein gene, *PfHSP17.1*, which confers heat, salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 3191 - 3200.
- Zhou Y L, Chen H H, Chu P, Li Y, Ding Y, Tsang E W T, Jiang L W, Wu K Q, Huang S Z. 2012. *NnHSP17.5*, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor and seedling thermo tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 31: 379 - 389.
- Zou J, Liu A L, Chen X B, Zhou X Y, Gao G F, Wang W F, Zhang X W. 2009. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *Journal of Plant Physiology*, 166: 851 - 861.
- Zou J, Liu C F, Liu A L, Zou D, Chen X B. 2012. Overexpression of *OsHsp17.0* and *OsHsp23.7* enhances drought and salt tolerance in rice. *Journal of Plant Physiology*, 169: 628 - 635.
- Zou Jie, Chen Xin-bo, Liu Ai-ling, Gao Guo-fu, Zhu Mu-lan. 2007. Plant heat shock proteins and crop abiotic stress tolerance improvement. *Plant Physiology Journal*, 43 (5): 981 - 985. (in Chinese)
- 邹杰, 陈信波, 刘爱玲, 高国赋, 朱木兰. 2007. 植物热激蛋白与作物非生物抗逆性的改良. *植物生理学通讯*, 43 (5): 981 - 985.

## 征 订

### 欢迎订阅 2015 年《西北园艺·果树》和《西北园艺·蔬菜》

《西北园艺·果树》: 全国优秀农业期刊, 陕西省优秀科技期刊, 全国“农家书屋工程”重点推荐期刊。立足西北, 面向全国, 深入追踪北方果业品种更新、技术创新、产业发展和营销动向, 突出先进生产技术和实用经营方略, 专心服务专业果农和果业一线人士。2015 年编辑改版, 期发文章更多, 信息量更大, 实用性更强。订阅期价 6.00 元, 全年 6 期 36.00 元。邮发代号 52-224。表示感谢, 特向 2015 年度订户赠送本刊精编《2015 年苹果历书》或《2015 年猕猴桃历书》, 寄邮局订单复印件或电子邮件告知即赠。索要杂志样刊信附 1.20 元邮资即寄。地址: 西安市习武园 27 号。邮编: 710003; 电话: 029-87322643。传真: 029-87345539。电子信箱: xbyy@vip.163.com。网址: <http://xbyyg.agri.sn.cn>。

《西北园艺·蔬菜》: 全国优秀农业期刊, 陕西省优秀科技期刊, 全国“农家书屋工程”重点推荐期刊。立足陕西, 扎根西北, 深入追踪菜业品种更新、技术创新、产业发展和市场动向, 突出先进生产技术和实用经营方略, 专心服务专业菜农和菜业一线人士。2015 年编辑改版, 期发文章更多, 信息量更大, 实用性更强。订阅期价 6.00 元, 全年 6 期 36.00 元。邮发代号 52-223。表示感谢, 特向 2015 年度订户赠送本刊精编《2015 设施蔬菜历书》, 寄邮局订单复印件或电子邮件告知即赠。索要杂志样刊, 信附 1.20 元邮资即寄。地址: 西安市习武园 27 号。邮编: 710003。电话: 029-87322643。传真: 029-87345539。电子信箱: xbyy@vip.163.com。网址: <http://xbyyc.agri.sn.cn>。