

李静婷, 刘子记, 赵旭耀, 等. 小麦小分子热激蛋白 *TasHSP16.9* 基因在逆境应答中的表达分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 39–41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.010

小麦小分子热激蛋白 *TasHSP16.9* 基因 在逆境应答中的表达分析

李静婷¹, 刘子记², 赵旭耀¹, 朱小叶¹

(1. 平顶山学院化学化工学院, 河南平顶山 467000; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 571737)

摘要:小分子热激蛋白(sHSP)是一类结构非常保守并具有分子伴侣功能的应激蛋白,可在高温和其他胁迫条件下诱导合成。为进一步研究 sHSP 在小麦耐胁迫性方面的作用,分析了小麦 *HSP16.9* 基因在逆境胁迫下的表达趋势,定量 RT-PCR 表达谱分析结果显示,高温、低温、干旱、高盐胁迫都诱导小麦 *TasHSP16.9* 表达,表达量均有增加,表明 *TasHSP16.9* 基因可能在小麦抗逆反应中发挥重要作用。

关键词:小麦;抗逆反应;基因表达;应激蛋白

中图分类号: Q786; S512.103.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2016)07-0039-03

热胁迫下,生物体内大部分蛋白质合成被抑制,分子量从 8 ku 至 110 ku 的热激蛋白(heat shock protein, HSP)被迅速诱导合成。在高等植物中,几乎所有的 HSP 都与细胞耐热性提高有关,其中表达最丰富的 HSP 为小分子热激蛋白(small HSP, sHSP)。根据序列相似性和细胞内定位特征,植物 sHSP 分为 6 类,2 类定位于细胞质,1 类定位于细胞核内,其他 3 类位于质体、内质网、线粒体等细胞器内^[1-3]。小麦小分子热激蛋白 HSP16.9(TaHSP16.9)属于第一类小分子热激蛋白。研究发现,sHSP 具有分子伴侣功能,以不依赖 ATP 的方式选择性地结合热变性蛋白防止其被蛋白酶降解或帮助其正确折叠^[3]。此外,高等植物中的 sHSP 可在低温、光氧化条件、氧化剂、干旱等胁迫条件下,在特定的发育时期(如种子成熟、种子萌发)被大量诱导合成,在正常环境条件下 sHSP 表达量很低,几乎不表达,这表明 sHSP 可能在植物耐胁迫性方面发挥重要作用^[2-9]。小麦是我国重要的粮食作物之一,其播种面积占全国耕地面积的 20%~30%,随着全球气候的变化,小麦种植必然受到影响,尤其在北方小麦主产区。影响小麦生长发育和产量的生态因素较多,主要有温度、水分、光照、土壤性质等。由于温室气体排放量增加导致全球气候变暖,因此,近些年局部地区极端高温天气频发,导致小麦早熟、减产。同时,温室气体排放还导致我国水量分布不均,西南、华北、长江中下游地区降水量增加,西北和东部地区降水量减少,致使西南冬麦区和西北冬麦区减产^[10]。近年来,由于气候干旱、过度放牧等因素,我国土壤盐渍化趋势逐渐加重,土壤肥力下降,导致小麦减产。培育抗性品种是提高小麦产量的有效手段之一,对小麦抗性相关基因功能的研究为培育小麦抗病品种提供了理论依据。笔者前期根据已公布的小麦

16.9 ku sHSP 基因的 cDNA 序列,利用 Genome Walking 技术克隆了 *TasHSP16.9* 基因全长,发现该基因只有 1 个外显子,没有内含子^[11]。笔者利用 PlantCARE 数据库分析该基因启动子区域顺式作用调控元件,发现一些参与防卫反应和逆境应答的调控元件,推测 *TasHSP16.9* 基因可能参与小麦抗逆反应。本试验就 *TasHSP16.9* 基因对逆境应答模式进行研究,旨在为进一步研究 *TasHSP16.9* 基因在小麦抗逆反应中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦品种 TAM107 为耐热品种,由中国农业大学作物遗传育种系小麦组惠赠。试验所需引物由北京赛百盛生物技术公司合成,所用 Trizol 试剂、DNase I、TIANScript II RT Kit、Taq PCR Mastermix 均购自北京天根生化科技有限公司,SYBR Premix Ex Taq 购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 非生物逆境胁迫条件的设定 选取籽粒饱满的种子,采用 1% 次氯酸钠溶液表面消毒 30 min,蒸馏水冲洗 3 遍,利用 1% 双氧水处理过夜,蒸馏水清洗 3 遍,选择露白的种子进行水培,在光照培养箱中培养,光—暗周期为 16 h—8 h(昼—夜),昼夜温度 22 ℃/18 ℃,湿度 60%^[11]。培养 10 d 后进行如下胁迫处理:(1)将小麦幼苗置于 42 ℃ 进行高温胁迫处理,分别于处理后 0.5、1.0、2.0、3.0 h 取样;(2)将小麦幼苗置于 0 ℃ 进行冷处理,处理后分别于 3.0、12.0 h 取样;(3)将小麦幼苗的根部冲洗干净并用吸水纸沾去多余水分,置于干燥滤纸上进行干旱处理,分别于处理后 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 h 取样^[12];(4)将小麦幼苗进行高盐(200 mmol/L NaCl 溶液)胁迫处理,分别于处理后 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 h 取样;(5)将小麦幼苗进行 200 μmol/L ABA 溶液处理,分别于处理后 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 h 取样^[13]。以未经处理的正常培养小麦幼苗作为对照,每个处理组重复 3 次。胁迫处理后迅速剪取叶片放入液氮中速冻,−80 ℃ 保存备用。

收稿日期:2015-11-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31501310);平顶山学院高层次人才科研启动基金(编号:2011015G)。

作者简介:李静婷(1983—),女,内蒙古包头人,博士,讲师,主要从事小麦遗传育种学研究。E-mail:jingting_lee@163.com。

1.2.2 总 RNA 提取纯化和 cDNA 第 1 链的合成 利用 Trizol 试剂提取小麦叶片的总 RNA,经 DNase I 纯化后,电泳检测 RNA 的完整性,利用 Thermo Scientific NaNoDrop 2000c 检测 RNA 的浓度、纯度,利用 TIANScript II RT Kit 试剂盒进行第一条单链 cDNA 的合成,−20 ℃ 保存备用。

1.2.3 *TasHSP16.9* 基因 mRNA 表达谱分析 以小麦不同胁迫处理下不同时间点合成的第 1 链 cDNA 为模板,采用半定量 RT-PCR 法检测 *TasHSP16.9* 基因转录表达水平。以小麦 Actin 为内参,引物序列为 Actin-L: 5′-AATTACCCGATGGGCA-3′, Actin-R: 5′-TCATACTCGGCCTTGA-3′。扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 28 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。*TasHSP16.9* 特异性引物序列为 TasHSP16.9-L: 5′-AGTTCGTCAGGCGCTTCCG-3′, TasHSP16.9-R: 5′-CGCAATACAGAGATGCTCGTC-3′; 扩增程序同上, 33 个循环。

以小麦冷胁迫处理后不同时间点合成的第 1 链 cDNA 为模板,用 *TasHSP16.9* 特异性引物(上游引物: 5′-CGAGGTCAAGAAGCCTGAGG-3′, 下游引物: 5′-CGTCAGACTCGCAAGAACA-3′)进行扩增,以小麦 Actin 为内参(上游引物: 5′-ACTCATCATACTCGCCCTTCG-3′, 下游引物: 5′-CAAGCAGCATGAAGATCAAGGT-3′),利用实时定量 PCR 仪检测 *TasHSP16.9* 在冷胁迫下的表达模式,每个样品至少独立重复 3 次。反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 10 s, 56 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 38 个循环。每次循环的第 3 步设定荧光采集,绘制融解曲线。采用荧光定量 PCR 仪自动读取的数据进行分析^[14]。

2 结果与分析

2.1 *TasHSP16.9* 启动子的生物学分析

为了进一步探究 *TasHSP16.9* 的转录调控模式,本研究前期克隆到 *TasHSP16.9* 启动子序列(ATG 起始密码子上游 1 115 bp 的基因组序列),利用 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析该基因启动子区域的顺式作用调控元件(表 1),发现 *TasHSP16.9* 启动子含有一系列对低温、厌氧、防卫、逆境应答的调控元件(LTR、ARE、TC-rich repeats),还含有茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif、TGACG-motif)、机械损伤诱导响应元件(W-box)、光响应元件(Box I、G-Box、GT1-motif 等)、

真菌诱导响应元件(Box-W1)、参与分生组织和胚乳发育调控元件(CAT-box、Skn-1-motif)、典型的启动子核心元件(TATA-box)和增强子元件(CAAT-box)。

表 1 小麦 *TasHSP16.9* 启动子顺式作用元件分析

顺式元件	核心序列	功能
ARE	TGGTTT	厌氧诱导响应元件
LTR	CCGAAA	低温响应元件
TC-rich repeats	ATTTTCTCCA	防卫和逆境应答元件
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸甲酯响应元件
TGACG-motif	TGACG	茉莉酸甲酯响应元件
W-box	TTGAC	机械损伤诱导响应元件
Box-W1	TTGACC	真菌诱导响应元件
Box I	TTTCAAA	光响应元件
G-Box	CACGTT	光响应元件
GT1-motif	GGTTAAT	光响应元件
CAT-box	GCCACT	分生组织发育相应元件
Skn-1-motif	GTCAT	胚乳发育响应元件
TATA-box	TAATA	核心启动子元件
CAAT-box	CAAAT	启动子和增强子元件

2.2 非生物胁迫下 *TasHSP16.9* 基因表达模式分析

为了明确小麦小分子热激蛋白基因 *TasHSP16.9* 在抗逆反应过程中的具体作用,采用半定量 RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 方法分析 *TasHSP16.9* 在高温、低温、干旱、高盐、ABA 处理后小麦幼苗中的表达情况。结果表明,*TasHSP16.9* 对高温诱导反应较灵敏,处理后 0.5 h 即可检测到较强的表达量,此后随诱导时间的延长表达量逐渐升高,3.0 h 达到最高(图 1-A)。干旱胁迫下,处理后 0.5 h 能检测到该基因的微量表达,2.0 h 表达量最高,此后随胁迫时间的延长表达量逐渐下降,5.0 h 处已检测不到(图 1-B);*TasHSP16.9* 对高盐胁迫诱导反应较迟缓,1.0 h 后才检测到基因表达,3.0 h 处表达量达到高峰,此后表达量明显下降(图 1-C);在 ABA 处理下,检测不到 *TasHSP16.9* 基因表达,即 *TasHSP16.9* 表达不受外源 ABA 影响(图 1-D)。*TasHSP16.9* 基因对低温胁迫应答反应缓慢,3 h 处检测到该基因表达,处理 3 h 后表达量降低,恢复到常温水平(图 2),说明非生物逆境胁迫能快速诱导 *TasHSP16.9* 基因表达,但只诱导该基因 mRNA 在短期内的积累,诱导一定时间后,该基因的诱导表达将会受到抑制,该基因 mRNA 会迅速降解。*TasHSP16.9* 基因表达谱分析结果表明,高温、干旱、高盐胁迫诱导 *TasHSP16.9* 表达,低温胁迫对其诱导表达不显著,外源 ABA 对该基因表达没有影响。

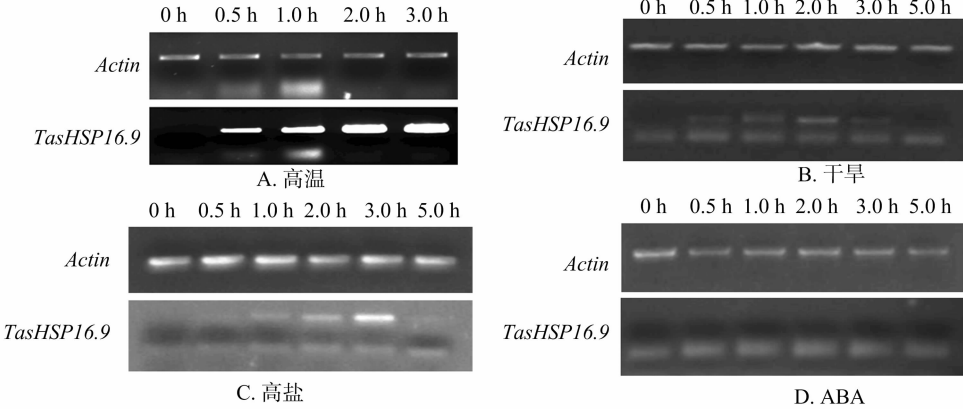


图1 *TasHSP16.9*基因在高温、干旱、高盐、ABA胁迫下的半定量 RT-PCR 检测

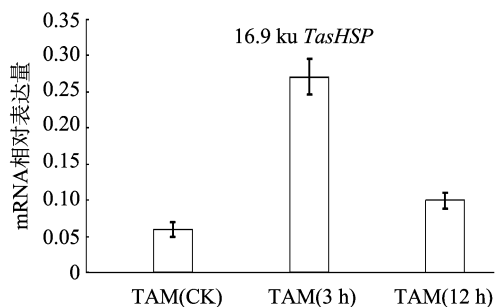


图2 *TasHSP16.9* 基因在冷胁迫下的 RT-PCR 检测

3 结论与讨论

小麦是我国乃至全球重要的粮食作物之一,在气候恶化、环境污染、病虫害侵染等因素的影响下,小麦的种植、生长、产量受到严重威胁,提高小麦的抗病虫害和抗逆性已成为当前小麦遗传育种工作的主要目标。当高等植物受到高温或持续升温胁迫时,细胞内会迅速诱导合成大量热激蛋白,其中以 sHSP 最为丰富。研究表明,诸多非生物胁迫(如高温、低温、干旱、氧化剂等)都可诱导 sHSP 的产生。如过表达 sHSP17.7 可以显著提高转基因水稻的耐旱性^[4]。热激和冷处理可诱导紫茎泽兰 *HSP17.7* 基因的表达^[5]。高温和低温可诱导番茄线粒体小分子热激蛋白 *LEHSP23.8* 基因的表达^[6]。高温和氧化剂 H_2O_2 可诱导水稻叶绿体小分子热激蛋白 *OsHSP26* 基因的表达^[8]。高温可快速诱导玉米 *ZmHSP17.7* 基因的表达^[15]。

TasHSP16.9 启动子区具有 LTR、ARE、TC-rich repeats 3 种参与低温、厌氧、防卫和逆境应答的顺式作用元件,这些顺式作用元件可以增强植物对非生物胁迫的抗性,推测 *TasHSP16.9* 基因可能参与小麦抗逆反应。本研究表达谱分析结果显示,高温、低温、干旱、高盐胁迫均可诱导 *TasHSP16.9* 表达,其中低温胁迫对该基因诱导表达不显著。 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温胁迫下,0.5 h 处即可在小麦苗期叶片中检测到 *TasHSP16.9* 基因显著表达,3.0 h 处基因表达量达到高峰,这种高温诱导的特性与其他植物中小分子热激蛋白基因的表达特性一致,而且胁迫温度越高,基因表达响应越快,基因表达量达到高峰所需时间越短,如 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温胁迫下,处理 1.0 h 后才可在小麦苗期叶片中检测到 *TasHSP16.9-1* 基因的表达,在胁迫 4.0 h 后基因表达量才达到高峰^[16]。但 *TasHSP16.9* 基因诱导产物不随胁迫时间的延长无限积累,当表达量达到高峰后很快下降,直至完全消失。本研究中,在低温、干旱、高盐胁迫下, *TasHSP16.9* 基因诱导表达量达到高峰后,随着胁迫时间的延长,表达量显降低直至完全消失。 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温胁迫下, *TasHSP16.9-1* 基因在胁迫 4.0 h 时表达量达到高峰,随后逐渐降低^[16]。推测本研究中 *TasHSP16.9* 基因表达量在热胁迫 3.0 h 后,随着热胁迫时间的延长,表达量将逐渐降低。ABA 在植物响应非生物胁迫过程中具有重要功能,根据基因是否受 ABA 调控,往往将基因分为 2 类,即依赖于和不依赖于 ABA 的胁迫响应基因。*TasHSP16.9* 表达不受外源 ABA 诱导,表明该基因属于不依赖于 ABA 的胁迫响应基因。但需要进一步就内源 ABA 是否影响该基因表达进行验证。通过

分析非生物胁迫下 *TasHSP16.9* 基因的表达谱,结果表明,小麦 *TasHSP16.9* 参与对逆境胁迫抗逆反应过程,今后本研究将利用转基因拟南芥对 *TasHSP16.9V* 的生物学功能作进一步验证,以明确该基因在小麦抗逆反应过程中的调控功能,为小麦抗性育种提供理论参考。

参考文献:

- [1] Wang X, 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(5): 244-252.
- [2] Sun W N, van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1577(1): 1-9.
- [3] Mahmood T, Safdar W, Abbasi B H, et al. An overview on the small heat shock proteins[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(25): 7290-7302.
- [4] Sato Y, Yokoya S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(2): 329-334.
- [5] 杨娟, 戴伟民, 强胜. 紫茎泽兰细胞质小热激蛋白 *HSP17.7* 基因的 cDNA 克隆与表达[J]. 北京林业大学学报, 2009, 31(1): 106-112.
- [6] Liu J, Mariko S. Molecular cloning the gene of small heat shock protein in the mitochondria and endoplasmic reticulum of tomato[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(2): 138-145.
- [7] Downs C A, Ryan S L, Heckathorn S A. The chloroplast small heat shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidation stress and photoinhibition[J]. Journal of Plant Physiology, 1999, 155(4/5): 488-496.
- [8] Lee B H, Won S H, Lee H S, et al. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice[J]. Gene, 2000, 245(2): 283-290.
- [9] Wehmeyer N, Vierling E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance[J]. Plant Physiology, 2000, 122(4): 1099-1108.
- [10] 居辉, 熊伟, 许吟隆, 等. 气候变化对我国小麦产量的影响[J]. 作物学报, 2005, 31(10): 1340-1343.
- [11] Li J T, Wang Z Z, Peng H R, et al. A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of *TaHSP16.9* in common wheat[J]. The Crop Journal, 2014, 2(6): 381-387.
- [12] 安艳秋, 蔺瑞明, 冯晶, 等. 小麦热激蛋白基因 *TaHSP70* 克隆及其在植物防卫和抗逆反应中的表达分析[J]. 分子植物育种, 2011, 9(4): 402-409.
- [13] 胡笛, 徐兆师, 崔晓玉, 等. 小麦盐胁迫响应基因 *TaSRP* 的克隆及功能鉴定[J]. 中国农业科学, 2014, 47(12): 2292-2299.
- [14] Li J, Guo G H, Guo W W, et al. miRNA164-directed cleavage of *ZmNAC1* confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(11): 220.
- [15] 孙爱清, 葛淑娟, 董伟, 等. 玉米小分子热激蛋白 *ZmHSP17.7* 基因的克隆与功能分析[J]. 作物学报, 2015, 41(3): 414-421.
- [16] 牛洪斌, 陈小霞, 白润娥, 等. 小麦 16.9 kD 热激蛋白 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(5): 719-723.