



大豆 *Hsp20* 基因家族生物信息学分析及高温高湿胁迫响应的分析

徐乐¹, 何宏泰¹, 刘浩然¹, 林紫依¹, 刘燕敏¹, 王泽博¹, 魏家萍², 刘骥骠¹

(1. 湖州学院 生命健康学院, 浙江 湖州 313000; 2. 甘肃农业大学 农学院/农作物生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 热激蛋白(Hsps)家族中的小热激蛋白(Hsp20)在保护植物免受非生物胁迫方面发挥至关重要的作用,为探究大豆 Hsp20 家族基因的特性及其对高温高湿胁迫的响应,对大豆进行了全基因组分析,本研究采用生物信息学方法对进化关系、保守结构域、染色体位置、启动子顺式调控元件和组织特异性表达情况进行预测分析,并采用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术对湘豆3号和宁镇1号两个大豆品种在高温高湿胁迫下不同时间的蛋白表达量进行了分析。结果表明:在大豆基因组中共查找出33个 *GmHsp20* 基因,不均匀分布在16条染色体上并根据系统发育分析和亚细胞定位结果分为11个亚族。序列分析表明 *GmHsp20* 蛋白表现出较高的结构保守性,含有典型的ACD结构域,32个 *GmHsp20* 基因(96.96%)没有内含子,或只有1个内含子。启动子分析表明, *GmHsp20* 基因含有大量与胁迫相关的顺式作用元件,其中MYB数目最多(110)个。基因组织特异性表达预测分析结果显示,除 *GmHSP22.6* 外,其余基因在各种组织和器官中均有表达。其中 *GmHSP18.5*、*GmHSP23.7*、*GmHSP15.2* 基因在所有组织中均高度表达。蛋白定量分析结果表明,与对照相比,宁镇1号和湘豆3号两个品种中,经高温高湿胁迫处理后, *GmHSP18.5*、*GmHSP23.7*、*GmHSP26.0B*、*GmHSP17.8*、*GmHSP25.9* 5个蛋白均上调表达,并且在两个品种间表达趋势基本一致,表明这些小热激蛋白家族成员可能参与了大豆对高温高湿胁迫的应答反应过程。本研究结果为进一步研究大豆小热激蛋白 *GmHsp20* 家族成员的功能提供有价值的信息。

关键词: 大豆;小热激蛋白 Hsp20;生物信息学分析;高温高湿胁迫;蛋白表达量

Bioinformatics Analysis of Soybean *Hsp20* Gene Family and Its Response to High Temperature and Humidity Stress

XU Le¹, HE Hongtai¹, LIU Haoran¹, LIN Ziyi¹, LIU Yanmin¹, WANG Zebo¹, WEI Jiaping², LIU Sushuang¹

(1. School of Life and Health Sciences, Huzhou College, Huzhou 313000, China; 2. College of Agriculture, Gansu Agricultural University/State Key Laboratory of Aridland Crop Biology, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Soybean is an important economic crop in the world. However, Soybean is often subjected to various stresses during its growth and development, which seriously affects its yield and quality. As a member of the heat shock protein family, small heat shock protein (Hsp20) plays an important role in protecting plants from abiotic stress. In order to explore the characteristics of soybean Hsp20 family genes and their responses to high temperature and humidity stress, the whole genome analysis was carried out, and the evolutionary relationship, conservative domain, chromosome position, promoter *cis* regulatory elements and tissue specific expression were predicted and analyzed using bioinformatics methods. The protein expression of Xiangdou 3 and Ningzhen 1 soybean varieties under high temperature and high humidity stress at different times was analyzed by using isotope labeled relative and absolute quantification (iTRAQ) techniques. The results showed that 33 *GmHsp20* genes were identified in soybean genome, distributed unevenly on 16 chromosomes and divided into 11 subgroups according to phylogenetic analysis and subcellular localization results. Sequence analysis showed that the *GmHsp20* protein was highly conserved in structure and contained a typical ACD domain. Most of the *GmHsp20* genes (96.96%) had no introns or only one intron. Promoter analysis showed that the *GmHsp20* gene contained a large number of *cis* acting elements related to stress, with the largest number of MYBs (110). The prediction of tissue specific expression of genes showed that all genes except *GmHSP22.6* were expressed in various tissues and organs. Among them, *GmHSP18.5*, *GmHSP23.7* and *GmHSP15.2* were highly expressed in all tissues. Quantitative proteomics results showed that *GmHSP18.5*, *GmHSP23.7*, *GmHSP26.0B*, *GmHSP17.8* and *GmHSP25.9* were up-regulated and expressed in both Ningzhen 1 and Xiangdou 3 varieties after high temperature and high humidity stress treatment compared to the control, and the expression trends were essentially the same between the two varieties. This suggests that these members of the small heat shock protein family might participate in the response process of soybean to heat and humidity stress. The results of this study provide valuable information for further investigation of *GmHsp20* function.

Keywords: soybean; small heat shock protein; bioinformatics analysis; high temperature and humidity stress; protein expression level

收稿日期:2023-01-15

基金项目:浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2022R485A003);浙江省教育厅一般科研项目(Y202248468);国家级大学生创新创业训练计划项目(202213287008);湖州市公益性应用研究项目(2021GZ26)。

第一作者:徐乐(2001—),男,本科,专业为生物工程。E-mail:2731980001@qq.com。

通讯作者:刘骥骠(1990—),男,博士,讲师,主要从事种子学、植物耐逆分子生物学研究。E-mail:837870552@qq.com。

温度和湿度是影响种子田间生长发育的两个关键环境因素。高温高湿条件不仅会影响种子的品质和产量,还会降低种子的活力和储存能力^[1-2],导致种质变劣。在我国南方春大豆种子成熟时期,正值高温多雨的夏季(6月底至8月初),因此极易发生田间劣变,造成严重的经济损失^[3-4]。

Hsp20 蛋白作为分子伴侣,在植物中分布广泛,是参与植物响应非生物胁迫最丰富的热激蛋白家族^[5-6]。据报道,在辣椒、番茄、黄瓜和坛紫菜中,Hsp20 都参与了高温胁迫响应^[7-10],大豆中有 47 个 Hsp20 基因受热胁迫被高度诱导^[11]。然而对大豆 Hsp20 基因在响应高温高湿等非生物胁迫过程中的功能鲜有报道。本课题组前期研究发现大豆小热激蛋白 *GmPM31* 基因参与了春大豆种子发育和高温高湿胁迫响应过程^[3],进一步以田间劣变抗性种质湘豆 3 号和不抗种质宁镇 1 号为试验材料,通过定量蛋白质组学鉴定得到在高温高湿胁迫下上调表达的 5 个蛋白(*GmHSP18.5*、*GmHSP23.7*、*GmHSP26.0B*、*GmHSP17.8*、*GmHSP25.9*),这 5 个蛋白属于植物小分子热激蛋白(small heat shock proteins, sHSPs)家族。小热激蛋白因其分子量范围为 15~42 kDa,也被称为小热休克蛋白(Hsp20),大部分 Hsp20 C 端都包含 1 个 80~100 个氨基酸序列的 α -晶体蛋白(ACD)结构域^[5]。Hsp20 在高等植物中极为丰富,且为核基因编码,广泛分布于细胞的各个部位,根据拟南芥中亚细胞定位和氨基酸序列的同源性分析结果,Hsp20 可分为 5 个亚家族:细胞质(C)亚家族(CI-CVI)位于细胞质或细胞核中;线粒体(M)亚家族(MTI 和 MTII)位于线粒体中;ER、CP 和 PX 亚家族分别位于内质网、叶绿体和过氧化物酶体中^[13]。Hsp20 家族中所有成员都存在高度保守的 α 晶体结构域(ACD),该结构域位于 C 端区域,由约 90 个氨基酸编码。包含多个 β 链结构,1 个相反的 80~100 个氨基酸序列和两个保守区域:CRI(N 端共识区 I)和 CRII(C 端共识区 II)^[3,12,14]。近年来,随着基因组测序技术的完善和发展,对不同物种中的 Hsp20 基因家族进行了全面的鉴定和分析。如李子^[15]、葡萄^[12]、苹果^[16]、水稻^[17]、小麦^[18] 和马铃薯^[19],分别有 24, 48, 41, 23, 163 和 48 个 Hsp20 基因。Hsp20 在植物中含量丰富,是热胁迫下产生最多的蛋白质,广泛参与到植物对生物和非生物胁迫响应过程^[20-24]。在番茄中,过表达 *SlHsp17.7* 基因可以减少细胞中活性氧的积累,从而增强对冷胁迫的耐受性^[25]。发现犬牙草的 Hsp20 基因家族与非生物胁迫有关,*CtHsp20-9* 和 *CtHsp20-10* 基因可能在进化过程中响应极端温

度^[26]。在黄瓜中,苗期黄瓜经过高温胁迫处理后,大多数 *CsHsp20* 基因上调,表明这些基因响应了高温胁迫^[7]。同样,经过高温处理后辣椒中大多数 Hsp20 基因也高度表达^[27]。此外,转 *TaHSP23.9* 基因拟南芥在高温环境下对拟南芥具有保护作用,通过转入外源基因可以增强拟南芥的耐热性^[28-29]。综上所述,Hsp20 在提高植物非生物胁迫方面发挥着重要的积极作用,特别在高温耐受性方面起着至关重要的作用。

此前,Valéria 等^[11]鉴定得到了 51 个大豆 Hsp20 基因,通过系统发育分析和亚细胞定位分类为 15 个亚族,对大豆 51 个 Hsp20 基因的结构进行分析,并研究了生物(爪哇分枝杆菌)和非生物(热和冷)胁迫条件下 *GmHsp20* 基因的表达谱,对能够响应生物(爪哇分枝杆菌)和非生物(热和冷)胁迫基因的启动子中顺式作用元件(cis-regulatory element, CRE)进行分析。但是并未对高温高湿胁迫下 *GmHsp20* 蛋白的表达进行相关研究,也并未对 *GmHsp20* 家族中其它成员启动子进行高温高湿、干旱、缺氧等其它非生物胁迫的分析。通过长期对高温高湿胁迫下春大豆种子田间劣变抗性的研究,本课题组基于蛋白质组学得到诸如 *GmPM31*、*GmHSP26.0B* 等多个能响应高温高湿胁迫的热激蛋白,而在已被报道的 51 个大豆 Hsp20 基因中(2013)未有体现^[11]。课题组前期对大豆 *GmPM31* 的组织表达模式及高温高湿处理下的表达量变化进行分析时发现,高温高湿胁迫处理 96 和 168 h 时 *GmPM31* 的表达量显著高于对照组,说明 *GmPM31* 基因能够响应高温高湿胁迫从而上调表达^[3]。

Lopes-Caitar 等^[11]使用 Superfamily 1.75 和 Phytozome v8.0 数据库中信息进行 Blast 搜索,在转录水平上对该家族成员进行生物和非生物胁迫的分析,但并无高温高湿胁迫条件的分析结果。本研究采用 NCBI 数据库中 Williams 82 栽培品种大豆作为序列信息来源(日期:2021-03-10),并利用 Phytozome v13.0 搜索候选基因作为补充方法,利用定量蛋白质组学研究了不同品种大豆经高温高湿胁迫后,Hsp20 家族成员蛋白的表达情况,旨在进一步鉴定大豆 Hsp20 家族成员,并揭示 Hsp20 家族成员在高温高湿胁迫响应中的作用。

1 材料与方法

1.1 植物材料和高温高湿胁迫处理

供试品种为田间劣变抗性春大豆种质湘豆 3 号和不抗种质宁镇 1 号^[30]。试验材料播种于花盆中,每盆 1 株,每个品种 30 盆。于 R7 期将其分为两组。

高温高湿胁迫组:白天 40 °C、RH100%、10 h,黑夜 30 °C、RH70%、14 h;对照组:白天 30 °C、RH75%、10 h,黑夜 20 °C、RH70%、14 h。分别处理 24、96 和 168 h,每种处理进行 3 次生物学重复并在每个时间点处理 10 盆。分别取相同部位的叶片,立即放入液氮中冷冻,−80 °C 冰箱保存备用。

1.2 大豆 Hsp20 家族成员的鉴定

大豆全基因组序列和 Hsp20 保守结构域 (PF00011) 的隐马尔可夫模型 (HMM) 通过 NCBI 数据库 [National Center for Biotechnology Information (nih.gov)] 获取。利用软件 HMMER3 (<http://eddylab.org/software/hmmer3/3.0>) 建立本地数据库,通过 HMM 模型于本地数据库中进行 Blast 比对。以“Hsp20”为关键词在数据库 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) 搜索候选基因作为补充方法,并手动去除冗余序列。最后利用 Pfam 32.0 (<http://pfam.xfam.org/>) 在线搜寻大豆 Hsp20 基因家族成员编码蛋白序列的功能结构域 (Domain),去除不存在功能结构域的基因,得到大豆 Hsp20 基因家族全部成员。

1.3 大豆 Hsp20 基因家族基本信息获取

大豆 Hsp20 基因家族成员的 CDS 序列和编码区长度通过 DNASTAR Lasergene 软件中的 EditSeq 获得。利用 ExPasy (SIB Swiss Institute of Bioinformatics | ExPasy) 在线分析并获得大豆 Hsp20 基因家族的分子质量、不稳定系数、理论等电点、亲水指数、氨基酸序列长度等基本信息,并根据其分子量对大豆 Hsp20 基因家族成员命名。使用 plant-multi 网站 [Plant-mPLoc server (sjtu.edu.cn)] 进行亚细胞定位预测。再通过数据库 Phytozome 获取大豆 Hsp20 基因家族成员的氨基酸序列和 CDS 序列,同时获得大豆 Hsp20 家族成员在不同组织部位表达的 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped) 值。

1.4 大豆 Hsp20 基因的系统发育分析与分类

下载水稻和拟南芥的 Hsp20 蛋白质序列,利用 MEGA11 软件对大豆、水稻和拟南芥 Hsp20 基因家族编码蛋白进行多重序列比对,分析其相似性。采用邻接法 NJ (Neighbor-Joining) 构建大豆、拟南芥和水稻的 Hsp20 家族氨基酸序列的系统发育树,校验参数 Bootstrap = 1 000。最后,根据 GmHsp20 基因的亚细胞定位预测、其他物种中 Hsp20 的分类以及系统发育树结果,将 GmHsp20 基因分为不同亚族。

1.5 大豆 Hsp20 基因的结构及结构域分析

使用 GSDS 网站 [Gene Structure Display Server 2.0 (gao-lab.org)] 在线分析大豆中 Hsp20 基因的结构特征,利用软件 MEME [MEME - MEME Suite (meme-suite.org)],鉴定 GmHsp20 蛋白中 10 种蛋白的基序组成结构,并通过软件 TBtools 绘图。

1.6 大豆 Hsp20 基因的染色体位置

大豆 Hsp20 基因的基因 ID 及染色体位置信息来自 Phytozome 数据库,根据这些信息用 TBtools 软件 (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>) 绘制大豆 Hsp20 基因在染色体上的物理分布图。

1.7 大豆 Hsp20 基因启动子的顺式作用元件分析

将大豆 Hsp20 基因起始位点上游 1.5 kb 序列提交给 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),计算并预测各种调控元件,再利用 TBtools 绘制启动子序列中顺式作用元件分布图。

1.8 大豆 Hsp20 基因在不同组织的表达分析

用 TBtools 软件,根据 Phytozome 数据库中大豆 Hsp20 基因家族成员在不同大豆组织的表达量分别绘制根 (root)、茎 (stem)、叶 (leave)、花 (flower)、荚果 (pod)、种子 (seed)、根毛 (root hair)、根瘤 (nodule)、茎尖分生组织 (shoot apical meristem) 9 个组织的热图。

1.9 蛋白质提取、消化和标记

参照 Ma 等^[31] 提取蛋白质,以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准溶液,通过 Bradford 法^[32] 测定蛋白质浓度。分别取各样品 (100 μg 蛋白质) 在 37 °C 下用 10 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇还原 1 h,并在室温下用 20 mmol·L⁻¹ 碘乙酰胺烷基化 1 h,再用测序级胰蛋白酶 (与底物比例为 1:20) 在 37 °C 下消化过夜,然后使用 iTRAQ 试剂盒 (Applied Biosystems, California, USA) 标记处理 24、96 和 168 h 的上述叶片总蛋白质酶解产物。

1.10 iTRAQ 分析

将 iTRAQ 试剂溶解于 50 μL 异丙醇后加入到相应的肽混合物中。按照制造商说明 (AB Sciex) 用 iTRAQ 试剂标记已被胰蛋白酶酶解成肽的 36 份叶片样品 (2 个品种 × 2 组对照 × 3 个处理时间 × 3 次生物学重复)。

首先,利用高 pH C18 色谱柱 (Waters Bec C18, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 μm) 在 Waters UPLC 上分馏肽,然后在二级反相分析柱 (Eksigent, C18, 3 μm, 150 mm × 75 μm) 上通过纳米 HPLC 分析分馏结果。再使用线性梯度洗脱肽,从 5% 至 45% 缓冲液 B 开始 (缓冲液 A, 98% 水与 0.1% 甲酸;缓冲液 B, 98% 乙腈

与0.1%甲酸),总流速保持在 $300\text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$,70 min内完成。

质谱仪采用 TripleTOF 5600 系统结合 2.3 kV 纳喷雾在数据依赖模式下运行,可在 MS 和 MS/MS 采集之间自动切换。利用高分辨率模式在 350 ~ 1 250 m/z 的质量范围内采集 MS 谱图,每个光谱信号累积时间 250 ms。在高灵敏度模式下扫描 100 ~ 1 250 m/z 串联质谱(带有滚动碰撞能量)。每个循环选择 20 个最强烈的前体进行碎裂,动态排除时间为 9 s。

1.11 质谱数据和蛋白质定量

利用 Maxquantv. 1.5.2.8 软件进行大规模串联质谱数据分析^[33]。数据库来源于 *Glycine max* UniProtKB/Swiss-Prot 数据库。使用 20 ppm 母离子质量允差和 50 mmu 片段质量允差直接搜索 TripleTOF 5600 仪器生成的 wiff 文件。错误发现率(FDR)均动态设置为 1%,再通过诱饵数据库搜索

(使用参考数据库的反向序列版本)计算,保证每个可信蛋白质至少包含 1 个独特的肽^[34]。通过 BLAST 鉴定注释蛋白质以及从大豆基因组翻译中鉴定的蛋白质之间的冗余^[35]。DAP 的筛选标准如下:2 个重复组 *t* 检验 $P < 0.05$ 的蛋白质,肽 ≥ 2 ,蛋白质比值 > 1.5 或 < 0.67 变化^[36]。

2 结果与分析

2.1 大豆 *Hsp20* 家族成员的全基因组鉴定

经过数据库 Phytozom 的筛选并通过 Pfam 网站鉴定总共获得 33 个 *GmHsp20* 基因家族成员(表 1)。鉴定得到的大豆 *Hsp20* 基因编码的蛋白质长度为 133 ~ 231 个氨基酸。*GmHsp20* 蛋白的理论等电点(pI)和分子量分别为 4.80 (*GmHSP17.5C*)至 9.52 (*GmHSP25.3*)和 15.24 kDa (*GmHSP15.2*)至 26.06 kDa (*GmHSP26.0A*)。

表 1 大豆 *Hsp20* 基因家族信息
Table 1 Family information of soybean *Hsp20* gene

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	编码区长度 Length of coding region/bp	CDS 长度 Length of CDS/bp	氨基酸序列		理论等电点 Isoelectric point	不稳定系数 instability index	亲水性指数 Hydropathy index	亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction
				长度 Amino acid sequence length/aa	分子质量 Molecular weight/kDa				
<i>GmHSP17.4A</i>	Glyma.08G068800.1	462	462	153	17.42	5.52	40.85	-0.608	Cytoplasm
<i>GmHSP17.5A</i>	Glyma.07G200500.1	462	462	153	17.54	5.33	42.12	-0.654	Cytoplasm
<i>GmHSP17.5D</i>	Glyma.08G068700.1	462	462	153	17.48	5.80	43.81	-0.624	Cytoplasm
<i>GmHSP17.5B</i>	Glyma.13G176200.1	465	465	154	17.53	5.98	42.86	-0.669	Cytoplasm
<i>GmHSP18.5</i>	Glyma.07G200200.1	486	486	161	18.51	5.99	44.25	-0.693	Cytoplasm
<i>GmHSP17.9C</i>	Glyma.17G224900.1	480	480	159	17.88	5.95	38.96	-0.545	Cytoplasm
<i>GmHSP18.0B</i>	Glyma.04G054400.1	477	477	158	17.94	6.62	39.52	-0.558	Cytoplasm
<i>GmHSP18.0C</i>	Glyma.20G015900.1	477	477	158	17.92	6.62	41.17	-0.592	Cytoplasm
<i>GmHSP17.9D</i>	Glyma.14G099900.1	480	480	159	17.86	5.49	50.82	-0.443	Cytoplasm
<i>GmHSP17.8</i>	Glyma.06G054700.1	477	477	158	17.80	6.62	46.88	-0.489	Cytoplasm
<i>GmHSP18.2</i>	Glyma.07G043600.1	576	489	162	18.21	6.97	43.81	-0.540	Cytoplasm
<i>GmHSP18.0A</i>	Glyma.16G012000.1	685	486	161	17.97	6.16	46.98	-0.338	Cytoplasm
<i>GmHSP21.9</i>	Glyma.20G213900.1	579	579	192	21.96	6.24	39.47	-0.527	Cytoplasm
<i>GmHSP22.4</i>	Glyma.10G176400.1	588	588	195	22.38	5.74	45.06	-0.508	Cytoplasm
<i>GmHSP15.2</i>	Glyma.13G205800.1	714	402	133	15.24	5.32	38.21	-0.428	Cytoplasm
<i>GmHSP15.4</i>	Glyma.15G106700.1	647	402	133	15.38	5.20	44.98	-0.471	Cytoplasm
<i>GmHSP22.2</i>	Glyma.13G286300.1	1117	579	192	22.24	5.97	48.65	-0.713	Cytoplasm
<i>GmHSP22.3</i>	Glyma.12G215300.1	1160	579	192	22.32	5.81	46.79	-0.795	Cytoplasm
<i>GmHSP25.7</i>	Glyma.08G212000.1	1449	678	225	25.66	6.92	46.96	-0.824	Mitochondrion
<i>GmHSP23.7</i>	Glyma.12G013100.2	949	639	211	23.75	6.46	50.21	-0.622	Mitochondrion
<i>GmHSP16.5</i>	Glyma.09G223800.1	571	444	147	16.49	6.43	45.12	-0.635	Mitochondrion
<i>GmHSP17.4C</i>	Glyma.15G159700.1	453	453	150	17.40	6.44	38.12	-0.497	Endoplasmic reticulum
<i>GmHSP17.4B</i>	Glyma.12G115300.1	453	453	150	17.40	6.44	38.12	-0.497	Endoplasmic reticulum
<i>GmHSP22.6</i>	Glyma.20G078400.1	1772	588	195	22.60	6.39	36.57	-0.646	Endoplasmic reticulum
<i>GmHSP22.5</i>	Glyma.16G206200.1	594	594	197	22.51	6.40	35.08	-0.549	Endoplasmic reticulum
<i>GmHSP17.0</i>	Glyma.11G187200.1	782	447	148	17.01	6.16	38.41	-0.553	Endoplasmic reticulum
<i>GmHSP25.3</i>	Glyma.08G318900.1	778	681	226	25.35	9.52	37.34	-0.560	Chloroplast
<i>GmHSP26.0A</i>	Glyma.06G134900.2	1685	696	231	26.06	6.98	36.98	-0.705	Chloroplast

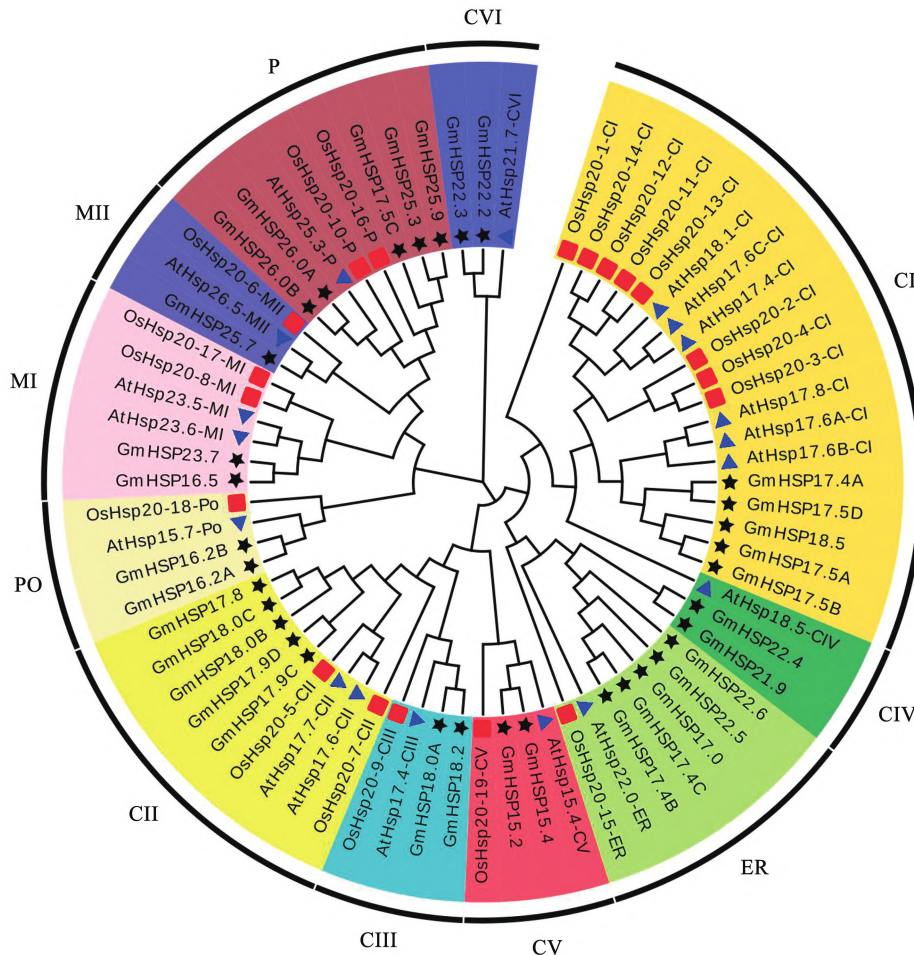
表 1 (续)

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	编码区长度 Length of coding region/bp	CDS 长度 Length of CDS/bp	氨基酸序列长度 Amino acid sequence length/aa	分子质量 MW/kDa	理论等电点 Isoelectric point	不稳定系数 instability index	亲水性指数 Hydropathy index	亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction
<i>GmHSP26.0B</i>	Glyma.04G229800.1	1741	696	231	25.99	7.74	41.73	-0.685	Chloroplast
<i>GmHSP17.5C</i>	Glyma.18G010500.1	453	453	150	17.49	4.80	68.96	-0.675	Chloroplast
<i>GmHSP25.9</i>	Glyma.18G094600.1	791	693	230	25.91	9.40	41.20	-0.583	Chloroplast
<i>GmHSP16.2A</i>	Glyma.02G244300.1	915	435	144	16.24	6.98	45.83	-0.401	Peroxisomal
<i>GmHSP16.2B</i>	Glyma.14G214800.1	914	435	144	16.16	6.92	55.32	-0.417	Peroxisomal

2.2 大豆 *Hsp20* 基因家族的系统发育分析与分类

根据 33 个大豆 *Hsp20* 基因、18 个水稻 *Hsp20* 基因、15 个拟南芥 *Hsp20* 基因,利用 MEGA11 的邻接法构建系统发育树,根据系统发育树和亚细胞定位结果进行系统发育分析,将 *GmHsp20* 蛋白分为 11 个亚族,包括 5 个 CI、5 个 CII、2 个 CIII、2 个 CIV、2 个 CV、2 个 CVI、2 个 MI、1 个 MII、5 个 ER、5P 和 2 个

PO 亚族(图 1)。其中 CI 与 CII 是最大的亚族,各包含 5 个成员,MI12 亚族最小,仅包含 1 个大豆 *Hsp20* 基因。在 11 个亚家族中总共有 18 个(54.5%) *Hsp20* 定位于细胞质中,表明细胞质可能是大豆 *Hsp20* 家族的主要功能区。其中 CIV 亚族未发现单子叶植物(水稻)的 *Hsp20* 基因。



注: 拟南芥、水稻、大豆 *Hsp20* 基因的系统发育关系。利用 MEGA11 构建邻接进化树(引导值 = 1 000), 11 个亚科用不同的颜色表示, 黑色五角星代表大豆、蓝色三角块代表拟南芥、红色方块代表水稻。

Note: Phylogenetic relationship of *Hsp20* gene in *Arabidopsis*, rice and soybean. MEGA11 was used to construct the adjacency evolution tree (guide value = 1 000). Eleven subfamilies were represented by different colors, with black pentagram representing soybean, blue triangle representing *Arabidopsis*, and red square representing rice.

图 1 拟南芥、水稻和大豆 *Hsp20* 蛋白的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Hsp20* proteins from *Arabidopsis*, rice and *Glycine max*

2.3 大豆 *Hsp20* 基因的结构及结构域分析

多序列比对结果表明,大豆 *Hsp20* 蛋白质序列的一致性不是很高,但具有由保守区 I 和保守区 II 构成的 ACD 结构域(图 2)。利用 GSDS 网站分析大豆中 *Hsp20* 基因的结构特征,结果表明大多数 *GmHsp20* 基因成员只含有 1 个或 0 个内含子(16 个没有内含子,16 个有 1 个内含子,1 个有两个内含子)。每个亚族中不同的 *GmHsp20* 基因表现出相似的外显子-内含子结构(图 3),表明具有高度的保守

性和密切的进化关系。

对 33 个 *GmHsp20* 序列保守基序的预测结果如图 4 所示;共预测了 10 个基序,基序的长度范围为 6~50 个氨基酸。motif 1 和 motif 2 广泛分布于所有亚族中,并且所有亚族都拥有 motif 1。motif 5 仅分布于亚族 CIV 和 ER 中,motif 6 是亚族 CI 所特有的,Motif 9 则仅存在于 CVI 亚族。总体而言,同一亚族中的大豆 *Hsp20* 蛋白具有相似的结构域和基序分布模式,这意味着这些基因可能具有相似功能。

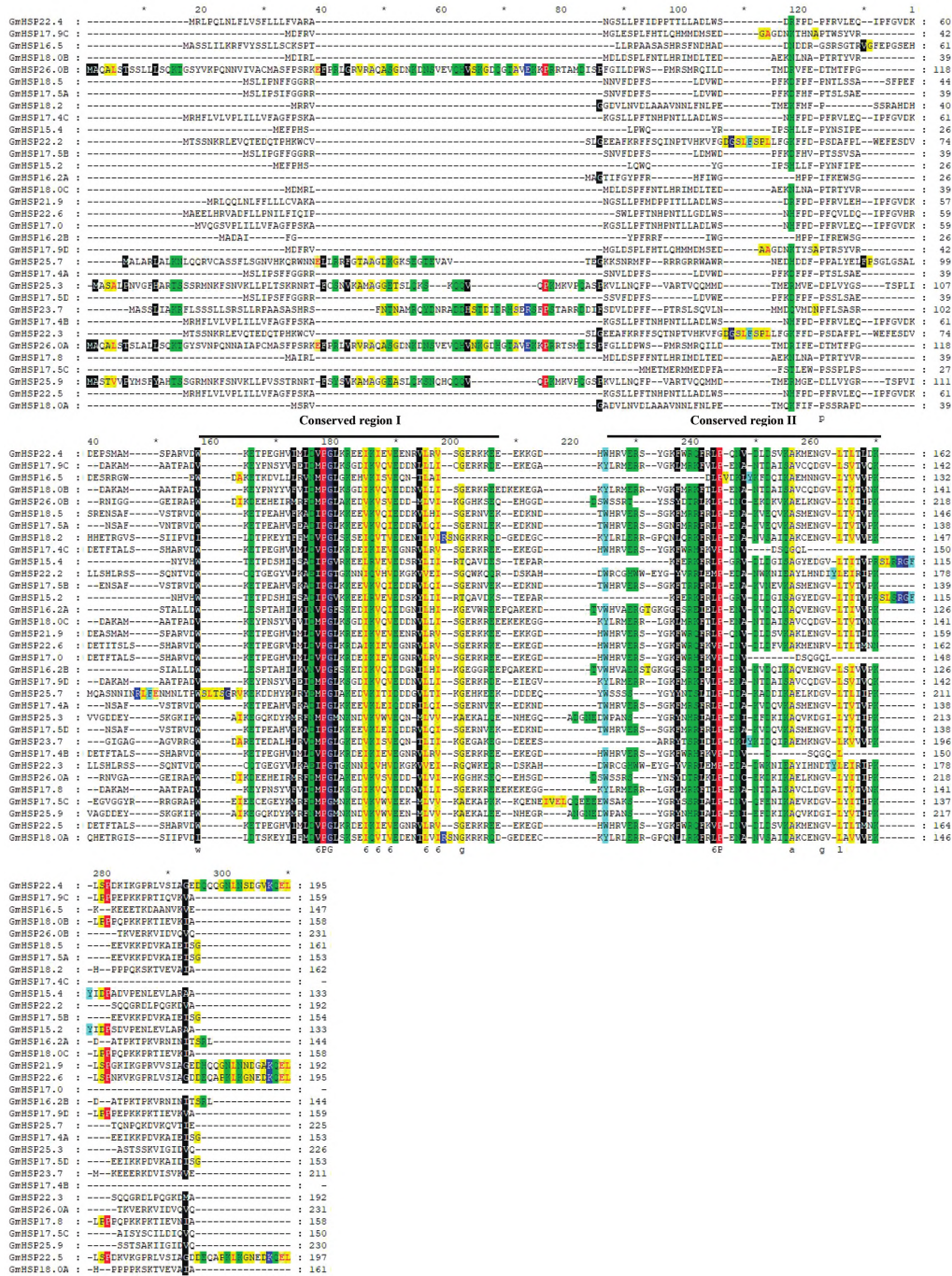


图 2 大豆 *Hsp20* 基因家族编码蛋白质多序列对比图

Fig. 2 Multi-sequence alignment of protein family coded by *GmHsp20*

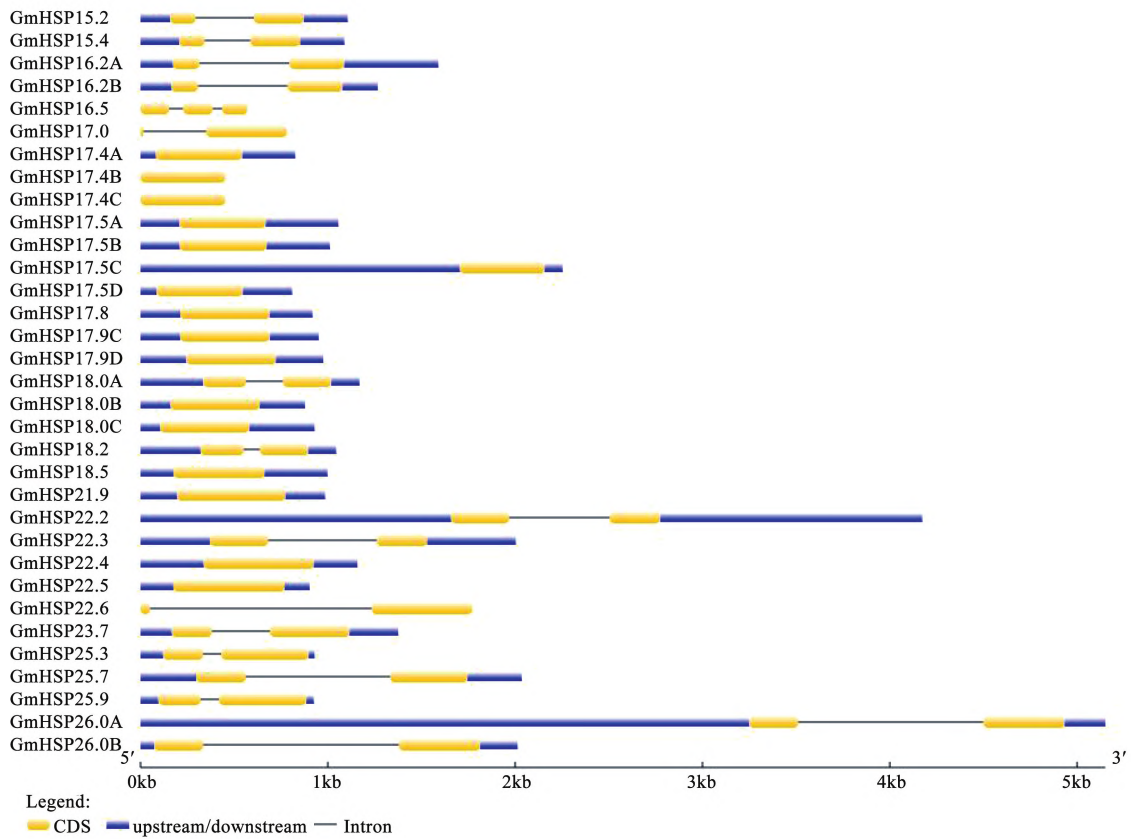


图 3 大豆 *Hsp20* 基因的外显子/内含子结构

Fig. 3 Exon/intron structure of the *GmHsp20* gene

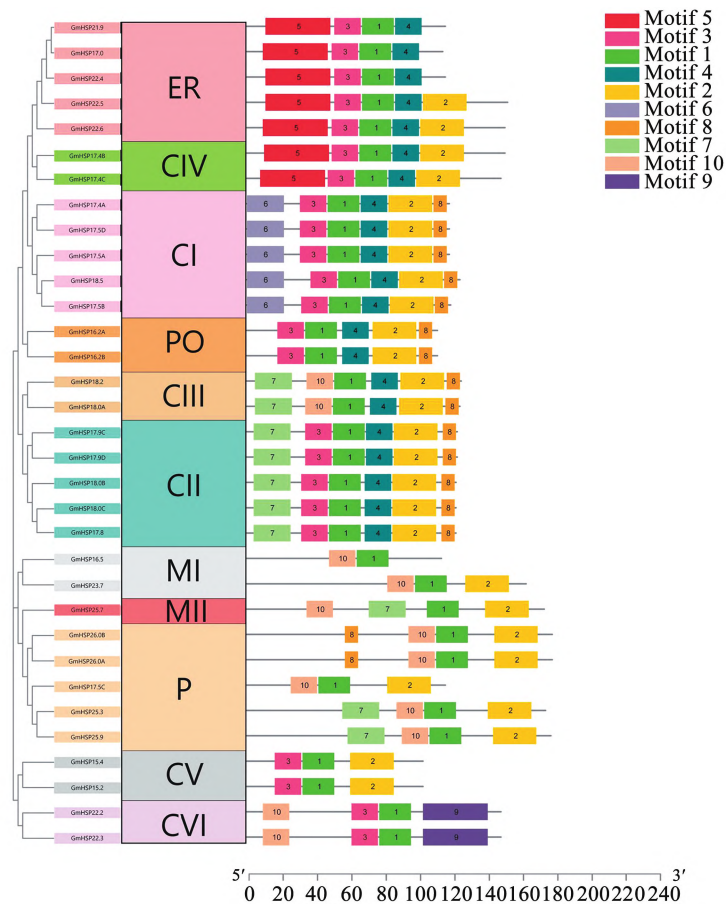


图 4 *GmHsp20* 蛋白的系统发育关系和基序组成

Fig. 4 Phylogenetic relationships and motif composition of *GmHsp20* proteins

2.4 大豆 *Hsp20* 基因的染色体位置

如图5所示,33个大豆 *Hsp20* 基因不均匀分布在16条染色体上,并且大多数位于染色体的近端或

远端只有1或2个 *Hsp20* 基因,其中8号染色体上分布最多(4个基因),7、12、13、20号染色体上 *Hsp20* 基因数目相同(3个基因)。

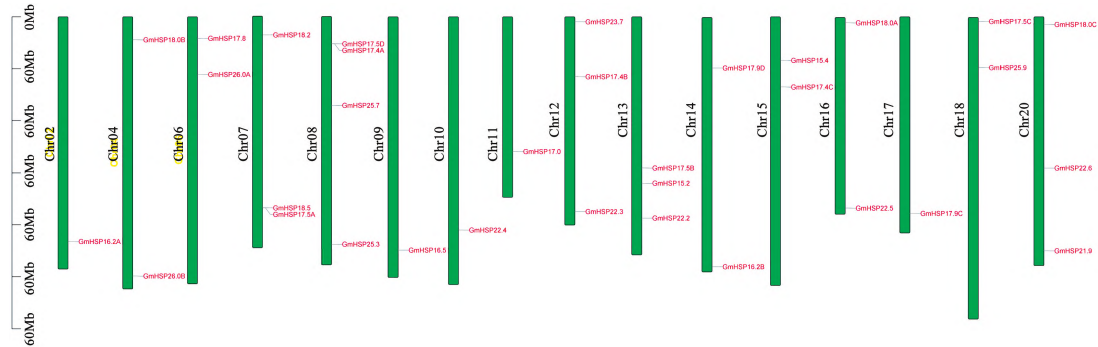


图5 大豆 *Hsp20* 基因的染色体定位

Fig. 5 Chromosomal mapping of the *GmHsp20* gene

2.5 大豆 *Hsp20* 基因启动子中与胁迫相关的顺式元件分析

启动子顺式作用元件预测结果如图6所示,共预测到239个顺式作用元件(CRE),9个CRE包括ABRE, DRE_core, G-Box, LTR, TC-rich, W-box, MBS, CCAAT-box和MYB。在33个大豆 *Hsp20* 基因中,除 *GmHSP25.3* 只含有1个CRE以外,其他基因至少含有2个及以上CRE,其中 *GmHSP22.4* 中CRE

数目最多(16个),表明大豆 *Hsp20* 基因的表达与各种胁迫反应有关。大豆33个 *Hsp20* 基因中MYB数目最多(110个),仅 *GmHSP25.3* 和 *GmHSP22.6* 两个基因不含有,其次是ABRE(56个)。此外,有13个 *GmHsp20* 基因存在TC-rich,而DRE_core、W-box、LTR、MBS、CCAAT-BOX和G-box的数目分别是1,9,17,14,5和5(表2)。分析结果表明 *GmHsp20* 基因可以参与多种胁迫响应。

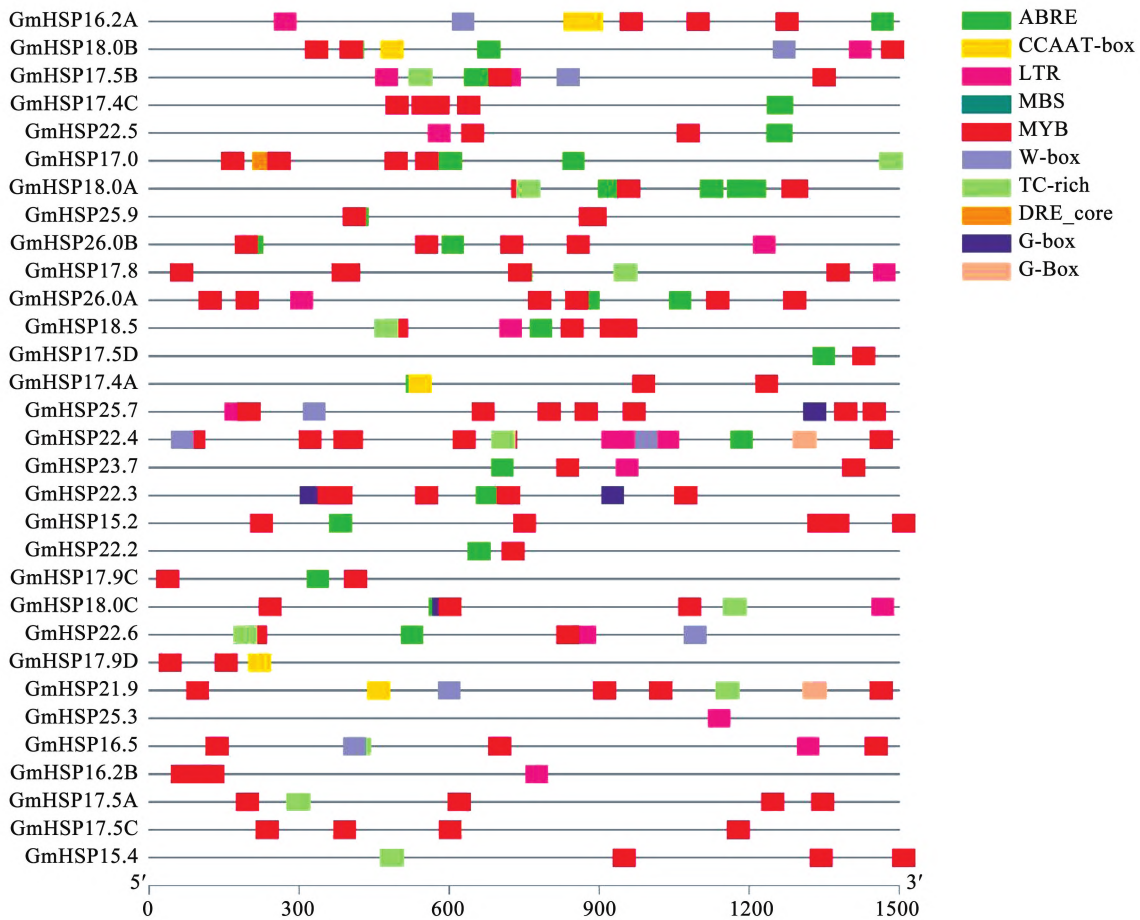


图6 *GmHsp20* 启动子区与胁迫相关的顺式元件

Fig. 6 *GmHsp20* promoter region is a cis element related to stress

表 2 胁迫相关顺式作用元件统计
Table 2 Stress related *cis* acting element statistics

基因 Gene	ABRE	CCAAT-box	DRE_core	G-Box	LTR	MBS	MYB	TC-rich	W-box
<i>GmHSP16.2A</i>	1	2	0	0	1	1	3	0	1
<i>GmHSP17.4A</i>	2	1	0	0	1	0	3	0	1
<i>GmHSP25.7</i>	2	0	0	0	1	1	4	0	0
<i>GmHSP25.3</i>	1	0	0	0	1	0	5	1	0
<i>GmHSP16.5</i>	2	0	0	0	1	3	6	0	0
<i>GmHSP22.4</i>	5	0	0	0	1	0	2	1	1
<i>GmHSP17.0</i>	1	0	0	0	1	0	4	1	0
<i>GmHSP23.7</i>	0	0	0	0	0	1	4	1	0
<i>GmHSP17.4B</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>GmHSP22.3</i>	1	1	0	0	0	0	2	0	0
<i>GmHSP17.5B</i>	1	0	0	1	1	0	7	0	1
<i>GmHSP18.0B</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>GmHSP15.2</i>	0	0	0	0	1	0	3	1	1
<i>GmHSP22.2</i>	1	0	0	1	3	1	7	1	2
<i>GmHSP17.9D</i>	2	0	1	0	0	1	4	1	0
<i>GmHSP16.2B</i>	1	0	0	0	1	0	2	0	0
<i>GmHSP15.4</i>	3	0	0	0	0	1	5	0	0
<i>GmHSP17.4C</i>	5	0	0	2	0	0	5	0	0
<i>GmHSP18.0A</i>	5	0	0	0	2	1	2	1	1
<i>GmHSP22.5</i>	2	0	0	0	0	1	5	0	0
<i>GmHSP17.9C</i>	2	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>GmHSP17.5C</i>	0	1	0	0	0	1	2	0	0
<i>GmHSP26.0B</i>	0	0	0	0	1	0	3	0	0
<i>GmHSP25.9</i>	0	0	0	0	0	0	3	1	0
<i>GmHSP18.0C</i>	3	0	0	0	0	1	5	0	0
<i>GmHSP22.6</i>	5	0	0	0	0	0	4	1	0
<i>GmHSP21.9</i>	3	0	0	0	1	0	2	0	0
<i>GmHSP17.8</i>	1	0	0	0	0	1	2	0	0
<i>GmHSP26.0A</i>	0	0	0	0	0	1	4	0	0
<i>GmHSP18.2</i>	2	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>GmHSP18.5</i>	3	0	0	1	1	0	3	1	0
<i>GmHSP17.5A</i>	1	0	0	0	1	2	0	1	1
<i>GmHSP17.5D</i>	0	1	0	1	0	0	4	1	1

2.6 大豆 *Hsp20* 基因在不同组织的表达分析

如图 7 所示,除 *GmHSP22.6* 外,*GmHsp20* 基因在所有组织中都有表达,其中 *GmHSP18.5*、*GmHSP15.2* 和 *GmHSP23.7* 3 个基因在所有组织中均高度表达。一些 *GmHsp20* 基因在各种组织中出现相似的表达模式,如 *GmHSP18.0B*、*GmHSP18.0C*

和 *GmHSP17.8* 在茎、根瘤和种子等组织中表达水平相对较高,但在叶中很低,几乎不表达。*GmHSP16.2A* 和 *GmHSP16.2B* 在根瘤中高度表达,*GmHSP17.4C*、*GmHSP18.0A* 和 *GmHSP17.4B* 在所有组织中表达量偏低。*GmHSP15.2* 和 *GmHSP15.4* 在花和叶中表现出较高的表达水平。

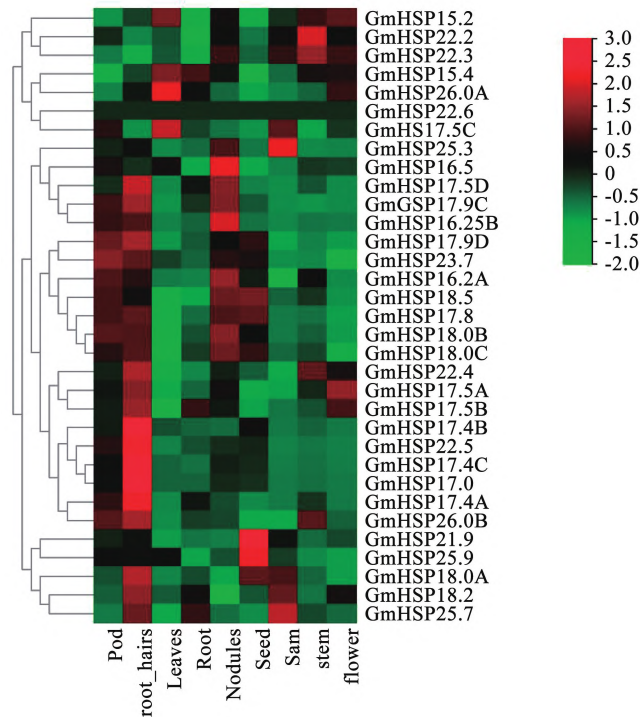


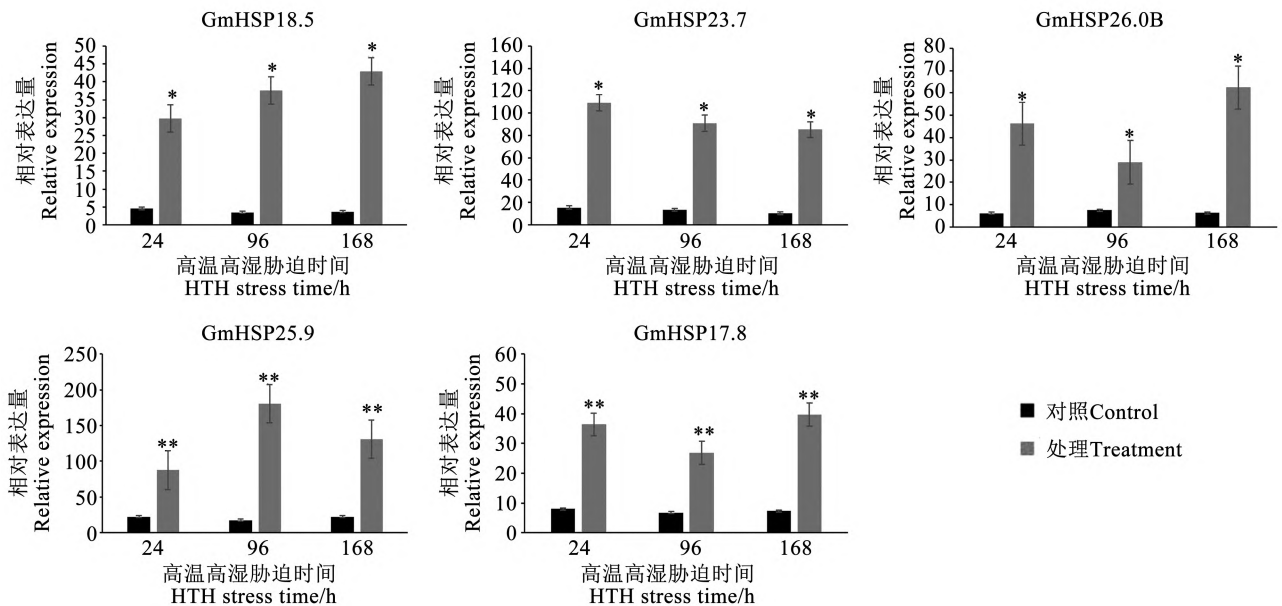
图7 *GmHsp20* 在不同组织和器官中的表达情况

Fig. 7 Expression of *GmHsp20* in different tissues and organs

2.7 高温高湿胁迫下 *GmHsp20* 蛋白的表达

定量蛋白质组学研究表明,经高温高湿胁迫处理后, *GmHSP18.5*、*GmHSP23.7*、*GmHSP26.0B*、*GmHSP17.8*、*GmHSP25.9* 5个蛋白在宁镇1号和湘豆3号中均上调表达,并且在两个大豆品种间除 *GmHSP23.7* 蛋白,其余蛋白的表达趋势基本一致(图10)。在宁镇1号中, *GmHSP18.5* 蛋白表达量随胁迫时间增加而积累, *GmHSP23.7* 蛋白则随胁迫

时间增加而减少; *GmHSP26.0B* 和 *GmHSP17.8* 蛋白表达趋势一致,在168 h时间段到达峰值,在96 h时间段为最低值; *GmHSP25.9* 蛋白的表达则随时间增加先上升后下降(图8)。在湘豆3号中,除 *GmHSP23.7* 蛋白以外,其余4个蛋白表达趋势与宁镇1号一致。湘豆3号中 *GmHSP23.7* 蛋白的表达趋势与 *GmHSP26.0B* 和 *GmHSP17.8* 蛋白一致,蛋白表达量在168 h时间段到达峰值,96 h为最低值(图9)。

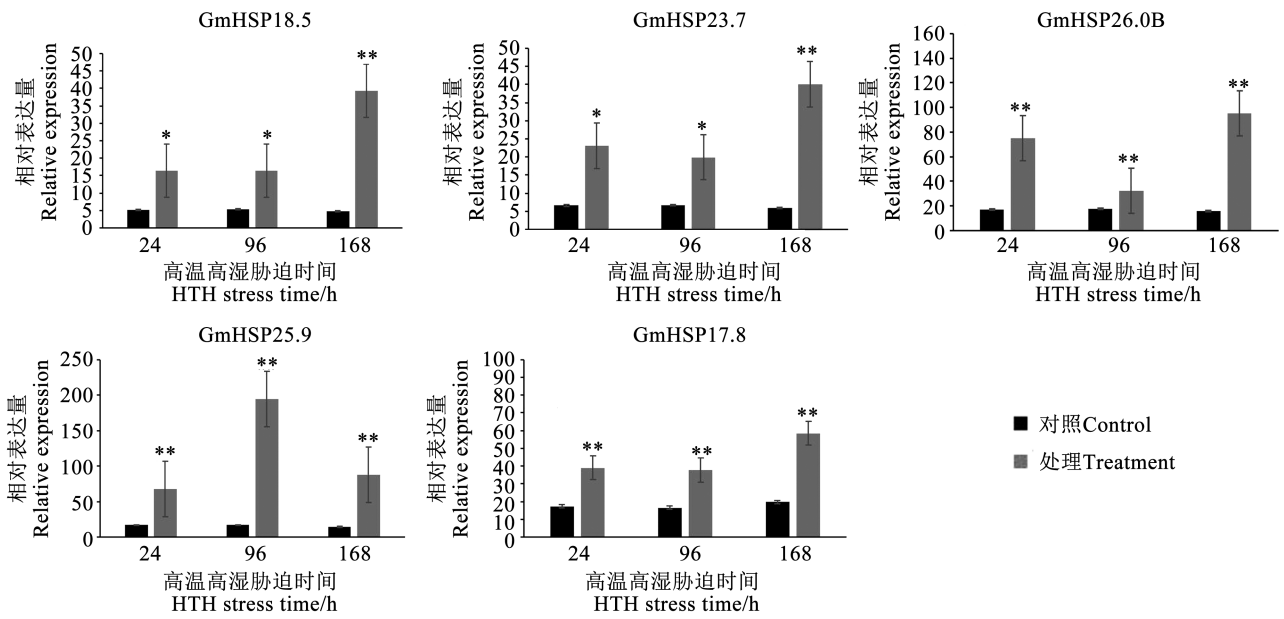


注: * 代表显著水平差异 ($P < 0.05$); ** 代表极显著水平差异 ($P < 0.01$)。

Note: * indicate that the differences are significant at 0.05 level; ** indicate that the differences are significant at 0.01 level.

图8 高温高湿胁迫下宁镇1号中 *GmHsp20* 蛋白的表达

Fig. 8 The expression of *GmHsp20* protein in Ningzhen 1 under high temperature and humidity stress



注: * 代表显著水平差异 ($P < 0.05$); ** 代表极显著水平差异 ($P < 0.01$)。

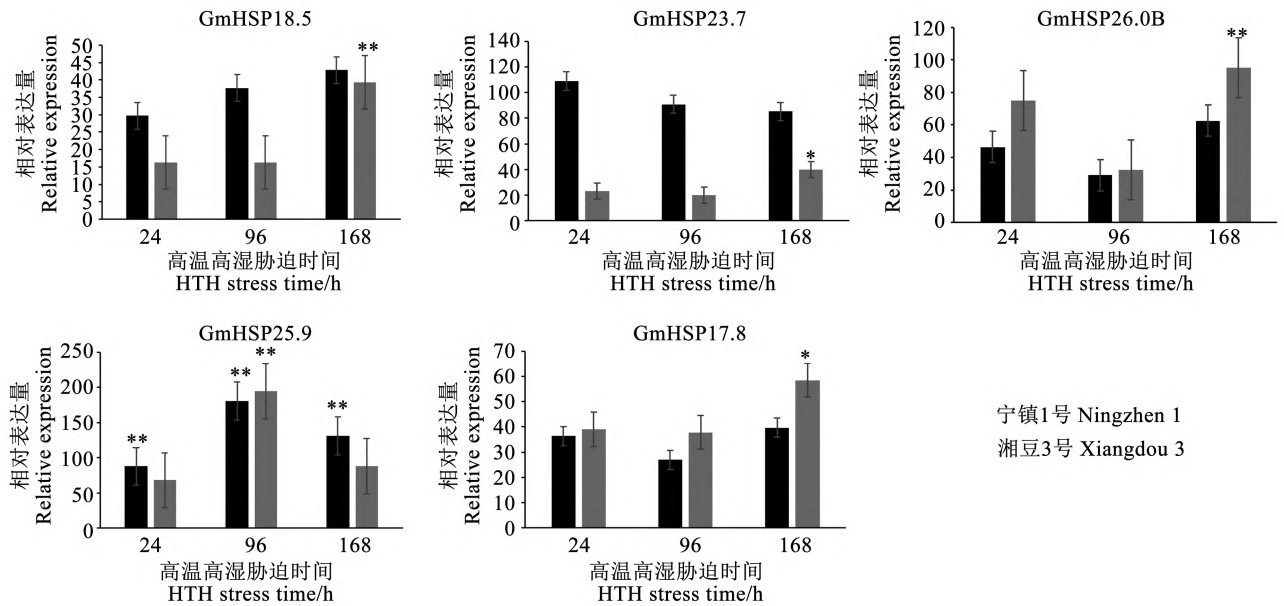
Note: * indicate that the differences are significant at 0.05 level; ** indicate that the differences are markedly significant at 0.01 level.

图 9 高温高湿胁迫下湘豆 3 号中 GmHsp20 蛋白的表达

Fig. 9 GmHsp20 protein expression in Xiangdou 3 under high temperature and humidity stress

在宁镇 1 号和湘豆 3 号中,不同时间 5 个蛋白表达量均出现显著差异,GmHSP17.8 和 GmHSP25.9 蛋

白含量存在极显著差异,GmHSP26.0B 蛋白则只在湘豆 3 号中表现出极显著差异(图 10)。



注: * 代表显著水平差异 ($P < 0.05$); ** 代表极显著水平差异 ($P < 0.01$)。

Note: * indicate that the differences are significant at 0.05 level; ** indicate that the differences are very significant at 0.01 level.

图 10 高温高湿胁迫下 GmHsp20 蛋白在宁镇 1 号和湘豆 3 号中的表达对比

Fig. 10 Expression comparison of GmHsp20 protein in Ningzhen 1 and Xiangdou 3 under high temperature and humidity stress

3 讨论

本研究利用大豆基因组数据库共鉴定了 33 个大豆 *Hsp20* 基因,采用生物信息学预测了 *Hsp20* 基因家族成员的进化关系、基因结构、染色体位置、启

动子中与胁迫相关的顺式作用元件、组织特异性表达情况。结果表明,33 个 GmHsp20 蛋白与拟南芥和水稻物种的典型 Hsp20 家族蛋白相似,共 11 个亚族,根据亚细胞定位结果可分为 5 大亚家族。表明大豆、水稻和拟南芥之间存在密切关系^[12,16]。本文

与 Valéria 等^[11] 对大豆鉴定得到的 51 个 *Hsp20* 基因家族成员并不相同,在 CVI 亚族、ER 家族、MI 家族中分别得到 2,5,2 个 *GmHsp20* 基因,多于 Valéria 等研究结果(CVI 亚家族 1 个、ER 亚家族 4 个、MI 亚家族 1 个)。此外,大多数大豆 *Hsp20* 基因被归类为 CI-CVI,表明细胞质可能是 *GmHsp20* 家族的主要功能区。在 CIV 亚族未发现单子叶植物(水稻)的 *Hsp20* 基因,与先前研究结果一致^[16,19,37]。基因结构已被证明在多个基因家族的进化中起直接作用^[12]。基因结构分析表明,大多数 *GmHsp20* 基因没有内含子(48.48%)或 1 个内含子(48.48%),表明基因结构相对简单。同样,大多数(92.6%)苹果 *Hsp20* 基因没有内含子或短内含子^[16]。当植物在响应各种胁迫时,为及时应对外界刺激,内含子数目少或没有的基因会被迅速激活^[38]。Valéria 等^[11] 对 51 个大豆 *Hsp20* 基因结构进行分析,发现序列之间的同一性从 17.50% 到 98.99% 不等,最低值在不同亚家族的成员之间,在 51 个 *GmHsp20* 基因中,33 个是无内含子,而 11 个仅包含 1 个内含子,7 个包含出两个及以上内含子,并未对 *GmHsp20* 基因中的保守基序进行分析^[11]。本文 33 个 *GmHsp20* 基因保守基序的分析结果则表明,大多数 *GmHsp20* 基因具有 4~6 个保守基序,几乎所有 *Hsp20* 基因都含有 motif 1,这表明进化速度缓慢^[16]。此外,同一亚族中的大多数 *Hsp20* 基因拥有相同的保守基序和相似的外显子/内含子结构,支持了其亚族的分类和密切的进化关系,这一结果同样在番茄、马铃薯和黄瓜中被报道^[9,19]。

当植物受环境胁迫时,启动子中的与胁迫相关的顺式作用元件起重要作用^[39]。Valéria 等^[11] 对响应生物(爪哇分枝杆菌)和非生物(热和冷)胁迫的候选基因中启动子的顺式作用元件进行分析,但是并未对 *GmHsp20* 家族中其它成员的启动子进行高温高湿、干旱、缺氧等其它非生物胁迫的分析,因此我们对 33 个 *GmHsp20* 基因中与胁迫相关的顺式作用元件进行鉴定。在大豆 33 个 *GmHsp20* 基因中共预测到 239 个顺式作用元件,其中 MYB 数目最多共 110 个(46.02%),而 MYB 转录因子作为植物中分布最广泛的转录因子家族之一,已被证明在植物胁迫响应中起关键作用,特别是在高温、干旱等非生物胁迫^[40-41]。其中,当植物受高温胁迫时 MYB 会通过调节细胞内的钙信号来响应热胁迫反应^[42],而钙信号在陆生植物受高温和其他非生物胁迫时的热信号传导中起关键作用^[43],继而推测 *GmHsp20* 基因家族通过调控细胞中的钙信号来参与高温胁迫的响应。

Hsp20 基因在植物中的组织表达情况已经在多个物种中被检测和分析,例如水稻、黄瓜、苹果和南

瓜^[7,16,44-45]。数据结果表明,*GmHsp20* 基因在各种组织中都有表达,参与到植物各组织的发育过程中。但大多数 *GmHsp20* 基因在所有发育阶段均以低表达,只有少数基因在特定器官或发育过程中高表达。同样结果在棉花中也被报道,并推测大豆 *GmHsp20* 基因与棉花 *GhHsp20* 功能相似,是调节雄蕊发育的复杂转录网络的组成部分^[46]。此外,*GmHSP18.5*、*GmHSP15.2* 和 *GmHSP23.7* 基因在所有组织中均高度表达,与番茄中 *SlHsp17.7A*、*SlHsp17.6B*、*SlHsp17.6C* 和 *SlHsp24.5* 4 个基因相似,意味着在正常生长条件下这 3 个基因在大豆细胞中可能具有特定的管家功能^[9]。但是一些 *GmHsp20* 基因在不同组织中的表达情况存在差异,如 *GmHSP18.0B*、*GmHSP18.0C* 和 *GmHSP17.8* 在荚果和种子中表达水平相对较高,但在叶中很低,几乎为 0,表明这些 *GmHsp20* 基因主要参与到大豆种子的生长发育中。种子作为大豆重要的生殖器官,在未受到胁迫下这些 *GmHsp20* 基因仍然在种子中特异性积累,进一步说明其在减数分裂、受精和种子形成过程中维持细胞稳态起着至关重要的作用^[47]。大豆 *GmHsp20* 基因没有统一的表达模式,表明大豆中不同的 *GmHsp20* 蛋白可能在植物的生长、发育和胁迫响应中具有多样化的功能,也支持了植物中所有 *Hsp20* 基因没有统一的表达模式这一观点,与拟南芥、水稻和辣椒中得到的结果一致^[6]。

当大豆受高温高湿胁迫时,将影响其籽粒品质,造成其产量和种子活力下降^[48]。目前,Valéria 等^[11] 研究了生物(爪哇分枝杆菌)和非生物(热和冷)胁迫条件下 *GmHsp20* 基因的表达谱,在非生物胁迫中 47 个 *Hsp20* 基因受热胁迫被高度诱导,5 个 *Hsp20* 基因受冷胁迫被诱导,在生物胁迫中除了 *GMAcd* 基因外,其余 4 个 *Hsp20* 基因对爪哇分枝杆菌感染有反应,并未对高温高湿胁迫条件下 *Hsp20* 基因进行相关研究^[11]。本文采用 iTRAQ 技术研究了在高温高湿胁迫下两个品种大豆叶片中 *GmHsp20* 的蛋白表达水平,发现 *GmHsp18.5*、*GmHsp23.7*、*GmHsp26.0B*、*GmHsp17.8*、*GmHsp25.9* 5 个蛋白在热胁迫时均上调且蛋白表达趋势一致,在 Valéria 等^[11] 的研究中发现这 5 个蛋白受热胁迫时被高度诱导。据报道大多数植物 *Hsp20* 基因在热胁迫下上调,一些 *Hsp20* 基因在响应热应激时表现出相同的表达谱^[7,16,49]。为了应对高温胁迫,植物进化出能够有效感知温度升高的机制,它们通过感知细胞外部的信号并将这些信息传递进细胞内进行级联扩增,调控相关抗性基因的转录和翻译,以抵御高温胁迫^[50]。而 Ca^{2+} 在热信号传导过程中起重要作用,在热信号传导中, Ca^{2+} 的瞬时增加会促进钙调蛋白(CaM)基因的表达,继而引起一系列反

应,最终促进热休克蛋白(HSP)的表达^[51-52]。研究表明,在水稻中,OsCaM1-1 被证明具有正调节 Ca^{2+} 信号,导致 HSP 积累的作用^[53-54]。在小麦中,已发现在 37 °C 下 CaM1-2 作用于 *Hsp26* 和 *Hsp70* 的上游^[51]。大豆中 *GmLEA4* 和 *GmCaM1* 在种子中的表达水平高于其他组织,并且参与高温高湿胁迫的响应^[55]。表明 CaM 可以参与到大豆对高温高湿胁迫的响应,因此推测植物中 Hsp20 家族可能通过钙信号来响应高温高湿胁迫,进而增强种子对高温高湿胁迫的耐受性,提高种子的活力。

4 结论

本文对大豆 *GmHsp20* 基因家族进行了全基因组分析,鉴定并得到了 33 个 *GmHsp20* 基因。随后,基于生物信息学的方法对 *GmHsp20* 基因的系统发育、基因结构、染色体定位、与胁迫相关顺式作用元件、不同组织中的表达模式进行了分析。并采用 iTRAQ 技术对湘豆 3 号和宁镇 1 号两个大豆品种在高温高湿胁迫下不同时间的小热激蛋白表达量进行了分析。结果表明,经高温高湿胁迫处理后 GmHSP18.5、GmHSP23.7、GmHSP26.0B、GmHSP17.8、GmHSP25.9 5 个 *GmHsp20* 蛋白均上调表达并且在两个品种间表达趋势基本一致,因此这些小热激蛋白家族成员可能参与了大豆对高温高湿胁迫的应答反应过程。该研究提供了 *GmHsp20* 基因家族的全面信息,将有助于确定 *GmHsp20* 基因的功能。

参考文献

- [1] LIU S, LIU Y, LIU C, et al. Isolation and characterization of the *GmMT-II* gene and its role in response to high temperature and humidity stress in *Glycine max*[J]. *Plants*, 2022, 11(11): 1503.
- [2] WANG S, TAO Y, ZHOU Y, et al. Translationally controlled tumor protein GmTCTP interacts with GmCDPKSK5 in response to high temperature and humidity stress during soybean seed development[J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, 82: 187-200.
- [3] 刘骥骧, 邱颖胜, 刘燕敏, 等. 大豆 *GmPM31* 基因生物信息学,组织表达及高温高湿响应分析[J]. *大豆科学*, 2021, 40(5):612-619. (LIU S S, QIU Y S, LIU Y M, et al. Analysis of soybean *GmPM31* bioinformatics, tissue expression and response to high temperature and high humidity[J]. *Soybean Science*, 2021, 40(5): 612-619.)
- [4] 刘骥骧. 大豆基质金属蛋白酶基因 Gm1-MMP 和 Gm2-MMP 的分离以及响应高温高湿胁迫的功能分析[D]. 南京:南京农业大学, 2017. (LIU S S. Isolation and functional analysis of soybean matrix metalloproteinases Gm1-MMP and Gm2-MMP involved in high temperature and high humidity stress response [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.)
- [5] 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(1): 1-13.
- [6] WATERS E R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHsps[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(2): 391-403.
- [7] HUANG J, HAI Z, WANG R, et al. Genome-wide analysis of *Hsp20* gene family and expression patterns under heat stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:968418.
- [8] GUO M, LIU J H, LU J P, et al. Genome-wide analysis of the *CaHsp20* gene family in pepper: Comprehensive sequence and expression profile analysis under heat stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 806.
- [9] YU J, CHENG Y, FENG K, et al. Genome-wide identification and expression profiling of tomato *Hsp20* gene family in response to biotic and abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1215.
- [10] PENG L N, HUANG L B, GUI T Y, et al. Identification and expression profiling of *Hsp20* genes in *Neoporphyra haitanensis* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2022, 34(2): 1089-1097.
- [11] LOPES-CAITAR V S, DE CARVALHO M C C G, DARBEN L M, et al. Genome-wide analysis of the *Hsp20* gene family in soybean: Comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14:577.
- [12] JI X R, YU Y H, NI P Y, et al. Genome-wide identification of small heat-shock protein (*Hsp20*) gene family in grape and expression profile during berry development [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1-15.
- [13] 王敏, 江彪, 林毓娥, 等. 小分子热激蛋白参与植物抗逆性方面的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(18): 29-32. (WANG M, JIANG B, LIN Y E, et al. Advances of small heat shock proteins participating in plant resistance [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2018, 46(18): 29-32.)
- [14] BONDINO H G, VALLE E M, TEN H A. Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/ α -crystallin family in higher plants[J]. *Planta*, 2012, 235(6): 1299-1313.
- [15] WAN X, YANG J, GUO C, et al. Genome-wide identification and classification of the *Hsf* and *sHsp* gene families in *Prunus mume*, and transcriptional analysis under heat stress[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7312.
- [16] YAO F, SONG C, WANG H, et al. Genome-wide characterization of the *Hsp20* gene family identifies potential members involved in temperature stress response in apple [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 609184.
- [17] SARKAR N K, KIM Y K, GROVER A. Rice *sHsp* genes: Genomic organization and expression profiling under stress and development [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 1-18.
- [18] PANDEY B, KAUR A, GUPTA O P, et al. Identification of *Hsp20* gene family in wheat and barley and their differential expression profiling under heat stress [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(5): 2427-2446.
- [19] 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(1): 1-13.
- [20] PEPPER S, GONÇALVES D, MORANO K A. Regulation of the Hsf1-dependent transcriptome via conserved bipartite contacts with Hsp70 promotes survival in yeast [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(32): 12191-12202.
- [21] WU D, VONK J J, SALLES F, et al. The N terminus of the small heat shock protein HspB7 drives its polyQ aggregation suppressing activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(25): 9985-9994.
- [22] DING X, GUO Q, LI Q, et al. Comparative transcriptomics

- analysis and functional study reveal important role of high-temperature stress response gene *GmHSFA2* during flower bud development of CMS-based F1 in soybean[J]. *Frontiers in plant science*, 2020, 11: 600217.
- [23] HE Y, YAO Y, LI L, et al. A heat-shock 20 protein isolated from watermelon (ClHsp22. 8) negatively regulates the response of *Arabidopsis* to salt stress *via* multiple signaling pathways [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10524.
- [24] 刘骅骅, 刘燕敏, 李阳. 植物热激蛋白在非生物胁迫响应中的研究进展[J]. *广东蚕业*, 2020. (LIU S S, LIU Y M, LI Y. Research progress of plant heat shock proteins in response to abiotic stress[J]. *Guangdong Sericulture*, 2020.)
- [25] ZHANG N, ZHAO H, SHI J, et al. Functional characterization of class I *SlHsp17. 7* gene responsible for tomato cold-stress tolerance [J]. *Plant Science*, 2020, 298: 110568.
- [26] CUI F, TAIER G, WANG X, et al. Genome-wide analysis of the *HSP20* gene family and expression patterns of *HSP20* genes in response to abiotic stresses in *Cynodon transvaalensis* [J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 732812.
- [27] GUO M, LIU J H, LU J P, et al. Genome-wide analysis of the *CaHsp20* gene family in pepper: Comprehensive sequence and expression profile analysis under heat stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 806.
- [28] WANG J, GAO X, DONG J, et al. Over-expression of the heat-responsive wheat gene *TaHsp23. 9* in transgenic *Arabidopsis* conferred tolerance to heat and salt stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 243.
- [29] CHEN X, XUE H, ZHU L, et al. ERF49 mediates brassinosteroid regulation of heat stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Biology*, 2022, 20(1): 1-17.
- [30] WANG L, MA H, SONG L, et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(7): 2109-2127.
- [31] MA H Y, SONG L R, SHU Y J, et al. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes[J]. *Journal of Proteomics*, 2012;75(5): 1529-1546.
- [32] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976,72:248-254.
- [33] ZHOU T, LI C Y, ZHAO W, et al. MaxReport: An enhanced proteomic result reporting tool for MaxQuant [J]. *PLoS One*, 2016,11(3):e0152067.
- [34] ZHENG X, FAN S, WEI H, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals cold responsive proteins involved in leaf senescence in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *International of Journal of Molecular Sciences*, 2017,18:1984.
- [35] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215:403-410.
- [36] WANG Y, WANG X, WANG C, et al. Proteomic profiling of the interactions of cd/Zn in the roots of dwarf polish wheat (*Triticum polonicum* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016,7:1378.
- [37] SIDDIQUE M, GERNHARD S, VON KOSKULL-DÖRING P, et al. The plant sHsp superfamily: Five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2008, 13(2): 183-197.
- [38] JEFFARES D C, PENKETT C J, BÄHLER J. Rapidly regulated genes are intron poor [J]. *Trends in Genetics*, 2008, 24(8): 375-378.
- [39] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters[J]. *Trends inPlant Science*, 2005, 10(2): 88-94.
- [40] WANG X, NIU Y, ZHENG Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 6125.
- [41] LI J, HAN G, SUN C, et al. Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, 14(8): 1613131.
- [42] LIAO C, ZHENG Y, GUO Y. MYB30 transcription factor regulates oxidative and heat stress responses through ANNEXIN - mediated cytosolic calcium signaling in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2017, 216(1): 163-177.
- [43] VIRDI A S, SINGH S, SINGH P. Abiotic stress responses in plants; Roles of calmodulin-regulated proteins [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 809.
- [44] 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(3): 341-357.
- [45] HU Y, ZHANG T, LIU Y, et al. Pumpkin (*Cucurbita moschata*) *HSP20* gene family identification and expression under heat stress [J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 753953.
- [46] MA W, ZHAO T, LI J, et al. Identification and characterization of the *GhHsp20* gene family in *Gossypium hirsutum* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-13.
- [47] DENG Y, ZHENG H, YAN Z, et al. Full-length transcriptome survey and expression analysis of *Cassia obtusifolia* to discover putative genes related to aurantio-obtusin biosynthesis, seed formation and development, and stress response [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2476.
- [48] SHU Y, ZHOU Y, MU K, et al. A transcriptomic analysis reveals soybean seed pre-harvest deterioration resistance pathways under high temperature and humidity stress [J]. *Genome*, 2020, 63(2): 115-124.
- [49] LIAN X, WANG Q, LI T, et al. Phylogenetic and transcriptional analyses of the *Hsp20* gene family in peach revealed that *PpHsp20-32* is involved in plant height and heat tolerance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10849.
- [50] 田尉婧, 殷学仁, 李鲜, 等. 热激转录因子调控植物逆境响应研究进展 [J]. *园艺学报*, 2017, 44(1): 179-192. (TIAN W J, YIN X R, LI X, et al. Regulation of stress responses by heat stress transcription factors (Hsfs) in plants [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(1): 179-192.)
- [51] LIU H T, LI B, SHANG Z L, et al. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1186-1195.
- [52] SAIDI Y, FINKA A, GOLOUBINOFF P. Heat perception and signalling in plants; A tortuous path to thermotolerance [J]. *New Phytologist*, 2011, 190(3): 556-565.
- [53] WU H C, JINN T L. Oscillation regulation of Ca²⁺/calmodulin and heat-stress related genes in response to heat stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(9): 1056-1057.
- [54] WU H U I C, LUO D A N L I, VIGNOLS F, et al. Heat shock - induced biphasic Ca²⁺ signature and OsCaM1-1 nuclear localization mediate downstream signalling in acquisition of thermotolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(9): 1543-1557.
- [55] SHEN Y, WEI J, ZHOU Y, et al. Soybean late embryogenesis abundant protein GmLEA4 interacts with GmCaM1, enhancing seed vigor in transgenic *Arabidopsis* under high temperature and humidity stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2023, 99: 583-595.