

# 大麦 HSF 基因家族成员的鉴定与表达分析

石明玉<sup>1</sup>, 冯浩<sup>2</sup>, 李柱刚<sup>1</sup>

(1. 黑龙江大学生命科学学院/农业微生物技术教育部工程研究中心/黑龙江省寒区植物基因与生物发酵重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080; 2. 北京市农林科学院生物技术研究所, 北京 100097)

**摘要:** 热激转录因子(heat shock transcription factor, HSF)家族与植物生长发育、胁迫响应密切相关。为了解大麦 HSF 家族成员的功能,本研究利用生物信息学方法在大麦全基因组水平进行 HSF 家族成员鉴定,并对其理化性质、亚细胞定位、进化关系和共线性关系及基因结构、启动子顺式作用元件、蛋白互作网络进行了分析。结果发现,在大麦中共鉴定到的 29 个 HSF 基因, HvHSF 蛋白的分子量介于 10.24~56.59 kDa 之间,属于稳定性较差的亲水蛋白,均预测定位于细胞核。进化树将大麦 *HvHSF* 基因分为 A、B、C 三类;共线性分析显示, *HvHSF5d* 和 *HvHSF7b* 为共线基因对。结构域和基因结构分析发现,亲缘关系较近的 *HvHSF* 具有相似的结构域和基因结构。启动子顺式作用元件分析发现, *HvHSF* 启动子含有多种与生长发育以及抗逆相关的顺式作用元件。蛋白互作网络预测表明, HvHSF 可能参与植物胁迫响应调节和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除。通过大麦地下部盐、碱胁迫转录组测序结合 qRT-PCR 验证发现, *HvHSF* 在盐、碱胁迫下表达存在差异。盐、碱胁迫下, *HvHSF1a*、*HvHSF1b*、*HvHSF2a*、*HvHSF3c*、*HvHSF5b* 表达量均有所增加; *HvHSF6* 在盐胁迫下表达量增加,碱胁迫下降低。综上, HSF 家族成员可能参与大麦耐盐、碱调控。

**关键词:** 大麦; 热激转录因子(HSF); 生物信息学; 基因表达; 系统进化发育

中图分类号: S512.3; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)07-0922-10

## Identification and Expression Analysis of Barley HSF Gene Family

SHI Mingyu<sup>1</sup>, FENG Hao<sup>2</sup>, LI Zhugang<sup>1</sup>

(1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology/Ministry of Education & Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Plant Genetic Engineering and Biological/Fermentation Engineering for Cold Region/School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China; 2. Institute of Biotechnology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract:** The heat shock transcription factor(HSF) family is closely associated with plant growth, development and stress responses. To explore the function of the barley HSF gene family, this study used bioinformatics methods to identify *HvHSF* genes at the whole genome level and analyze the physicochemical properties, subcellular localization, evolutionary relationships, and collinearity relationships of the HvHSF proteins, as well as the gene structure, promoter *cis*-acting elements, and protein interaction networks of HvHSF. The results showed that the molecular weight of 29 HvHSF proteins ranges from 10.24 kDa to 56.59 kDa, classified as relatively unstable hydrophilic proteins, with a predicted localization in the nucleus. Evolutionary analysis showed that barley *HvHSF* genes can be divided into A, B and C groups and are more closely related to rice. Collinearity analysis revealed that *HvHSF5d* and *HvHSF7b* are collinear gene pairs. Domain and gene structure analyses revealed that closely related *HvHSF* genes have similar domain structures and gene structures. Promoter *cis*-acting element analysis showed that the *HvHSF* promoter contains various *cis*-acting elements

related to growth and development, as well as stress responses. Protein interaction network predictions indicated that HvHSF may be involved in plant stress response regulation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging. Through analysis of the barley stress transcriptome combined with qRT-PCR validation, it was found that *HvHSF* exhibited differential expression under salt and alkali stresses. The expression levels of *HvHSF1a*, *HvHSF1b*, *HvHSF2a*, *HvHSF3c* and *HvHSF5b* were increased under salt and alkali stresses. However, *HvHSF6* performed increased expression level under salt stress, but decreased expression level under alkali stress. This study confirmed that the HSF gene family responds to salt and alkali stresses and may contribute to the regulation of salt-alkali tolerance.

**Keywords:** *Hordeum vulgare*; Heat shock transcription factor(HSF); Saline-alkali stress; Gene expression; Genome-wide identification

热激转录因子(heat shock transcription factor, HSF)家族是一类与热激应答相关的转录因子<sup>[1]</sup>,在真核生物中广泛存在。HSF 家族基因已被证明与植物抗盐性有关<sup>[2]</sup>,如 *AtHSFA7b* 通过调节包含 E-box-like 元件和热休克元件的靶基因转录调节细胞渗透压和清除活性氧,增加拟南芥耐盐性<sup>[3]</sup>; *AtHSF4A* 通过与促分裂原活化蛋白激酶 MPK3 和 MPK6 相互作用,激活 *HSP17.6A* 的转录,介导植物对高盐的耐受能力<sup>[4]</sup>;过表达花生 *AhHsf20* 能够增强转基因拟南芥的耐盐性<sup>[5]</sup>,而过表达 *PtHSF21* 可通过特异性结合 HSE 元件提高杨树的耐盐性<sup>[6]</sup>。 *AeHSFA2b* 可以与 *AeRFS4* 启动子结合调节后者的表达,过表达 *AeHSFA2b* 能够增强转基因拟南芥耐盐性<sup>[7]</sup>。 *Zm-Hsf08* 在盐胁迫下负调控多个 ABA 应答基因从而响应盐胁迫<sup>[8]</sup>。然而,尚未见关于大麦 HSF 家族成员与盐碱等胁迫关系的报道。

本研究在全基因水平对大麦 HSF 家族成员进行鉴定,并对其理化性质、亚细胞定位、染色体分布、系统发育及启动子顺式作用元件等进行分析 and 预测,结合大麦盐、碱胁迫转录组及 qRT-PCR 验证 HSF 家族成员在盐、碱胁迫下的表达,为探究 HSF 在盐、碱胁迫响应中的作用机制和大麦抗逆育种提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

供试大麦品种为 Morex。大麦种子用 75% 乙醇灭菌 15 s 后,放置于湿润滤纸上,在 16 h 光照/8 h 黑暗、25 °C/18 °C 培养箱中萌发 2 d;取 20 棵幼苗移入含有 1/4 Hoagland 培养液(pH 5.8)的水培盒中,共 3 盒;培养条件同上,培养至两叶

一心期,对 3 盒幼苗分别用 1/4 Hoagland 培养液、含 200 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl (pH 5.8) 的 1/4 Hoagland 培养液、含 200 mmol · L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0) 的 1/4 Hoagland 培养液进行处理;处理 0 h、12 h、24 h 分别取 3 棵幼苗根部、混合,用液氮冷冻后保存于 -80 °C 冰箱中。3 次重复。

### 1.2 大麦 HvHSF 家族成员的鉴定

使用 HSF 家族 HMM 模型(PF00447),通过 HMMER 软件搜索大麦 Morex 基因组注释的所有蛋白序列(<http://doi.org/10.5447/ipk/2021/3>),寻找大麦蛋白序列中潜在的 HSF 家族蛋白。使用 SMART 在线网站(<https://smart.embl.de/>)进行 HvHSF 蛋白质结构域分析,确定含有 PF00447 结构域的 HvHSF 蛋白序列。

### 1.3 大麦 HvHSF 蛋白理化性质及亚细胞定位预测分析

利用 TBtools 软件的 Protein Paramter Calc 功能对 HvHSF 理化性质进行预测,包括其氨基酸残基数、分子量、理论等电点、不稳定指数、亲水性以及脂肪系数。通过 Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)对 HvHSF 蛋白的亚细胞定位进行预测分析。

### 1.4 大麦 HvHSF 的染色体定位及共线性分析

根据大麦 *HvHSF* 基因结构注释信息,使用 TBtools 软件的 Gene Location Visualize from GTF/GFF 功能对大麦 *HvHSF* 染色体定位分析和绘图。根据大麦 Morex 基因组文件获取染色体长度,将大麦基因组蛋白序列进行比对,获取基因组中的相关基因对。染色体长度文件和基因组相关基因对文件共同导入 TBtools 软件,采用 Advanced Cirdos 功能对 *HvHSF* 基因共线性进行可视化。

### 1.5 大麦 HvHSF 蛋白的系统发育进化树分析及互作蛋白预测

利用 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)网站获取拟南芥 AtHSF 蛋白序列。利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得水稻 OsHSF 蛋白序列。使用 MEGA-X 软件利用 MUSCLE 对拟南芥的 AtHSF、水稻的 OsHSF 和大麦的 HvHSF 蛋白序列进行比对,采用邻接法(NJ)构建系统进化树,Bootstrap 值设定为 1 000;将进化树导出使用 evolview 网站(<https://www.evolgenius.info/evolview-v2>)对进化树进行美化。将大麦 HvHSF 蛋白序列导入 String (<http://String-db.org/>)数据库进行蛋白互作预测。

### 1.6 大麦 HvHSF 保守结构域、基因结构分析

根据大麦 Morex 基因组序列及注释信息,获取大麦 HvHSF 基因的外显子、内含子等信息。使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)在默认参数下分析 HvHSF 的保守基序;通过 TBtools 软件绘制 HvHSF 的保守基序和基因结构图。

### 1.7 大麦 HvHSF 基因启动子顺式作用元件分析

根据大麦 Morex 基因组序列及注释信息,通过 TBtools 获取 HvHSF 翻译起始位点前 2 000 bp 序列,通过在线网站 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 HvHSF 成员启动子的顺式作用元

件进行分析,使用 TBtools 软件绘图。

### 1.8 盐碱胁迫下大麦 HvHSF 基因在转录组水平的表达

使用天根公司植物 RNA 提取试剂盒(DP441)提取 1.1 中根样的总 RNA,由诺禾致源公司采用 Illumina NovaSeq 进行 150 bp 双端测序。测序 reads 采用 STAR v2.7.10 比对到大麦 Morex 基因组,利用 featureCounts v2.0.4 进行统计,采用 edgeR package 进行基因差异表达分析。提取大麦 HvHSF 基因表达数据,通过 TBtools 的 Heat map 功能绘制盐碱处理下基因表达情况的热图。

### 1.9 盐碱胁迫下大麦 HvHSF 基因的表达

选取在盐、碱胁迫下均差异表达的 HvHSF 基因,根据 HvHSF 的基因序列,使用 Primer Premier 5 进行 qRT-PCR 的引物设计,引物序列如表 1。使用诺唯赞 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒将提取的大麦植株地下部总 RNA 反转录为 cDNA,体系及反应程序参见说明书。以 cDNA 为模板,以诺唯赞 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 qRT-PCR 检测。反应体系 20 μL:10 μL 的 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix,正、反向引物各 0.4 μL,2 μL 的 cDNA 模板,7.2 μL 的 ddH<sub>2</sub>O。反应程序:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 34 s,循环 40 次;95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析相对表达量,使用 GraphPad Prism 8 绘图。三次重复。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

目标基因 Target gene	引物序列 Primer sequences(5'-3')	
	上游引物 Upstream primer	下游引物 Downstream primer
HvUBI	TGGATGTTGTAGTCGGCGAG	ACGTCAAGGCCAAGATCCAG
HvHSF1b	AGAGCAATGCGTAACCCACT	GACACCCGAATCAAACAAGA
HvHSF2a	ATTTTGGTCTTGGCACCTGT	GGCTCATCACTCTCATCGCT
HvHSF3b	CTTCGTCGCCAGCTCAACA	CTCCTCGCACACTCCCTCC
HvHSF3c	GCATCGATTGAAAAATATCC	CATTCTCACACTTGAGCCTC
HvHSF5b	GGGCGGTGCGTTCGTGGTGTG	TGCCGGAGAGGAGGCTTTGC
HvHSF6	AAGGTTATCCGGGTTAGATT	CTCAGGGTGATGAGGTTGCT

## 2 结果与分析

### 2.1 大麦 HSF 家族成员的鉴定、理化性质及亚细胞定位分析

根据 HMMER 软件的比对结果结合 SMART 网站对 HSF 蛋白质结构域的预测,共鉴定到 29 个 HvHSF 蛋白,其具体名称见表 1,长度为 92(HvHSF2e)~510(HvHSF5f) aa;分子量为 10.24~56.59 kDa,平均 36.56 kDa;等电点为 4.7(HvHSF7c)~9.61(HvHSF4a),平均为 5.98, HvHSF3b、HvHSF7a、HvHSF5a、HvHSF5b 和 HvHSF4a 的等电点大于 7,其余 24 个蛋白的等电点均小于 7(表 2),说明大麦 HvHSF 蛋白大部分属于酸性蛋白。

29 个大麦 HvHSF 蛋白亲水指数为 -0.856~-0.135,均属于亲水性蛋白。除 HvHSF7d 外,其余 HvHSF 蛋白的不稳定系数均大于 40,这表明 HvHSF 蛋白的稳定性较差。HvHSF4a 被预测定位在叶绿体或细胞核,其余 HvHSF 蛋白均定位于细胞核。

### 2.2 大麦 HvHSF 的染色体分布

对 29 个大麦 HvHSF 基因的染色体位置进行分析显示(图 1),HvHSF 基因在大麦七条染色体上均有分布,每条染色体上的数量各不相同。2 号与 5 号染色体上 HvHSF 数量最多,均分布有 6 个;1 号染色体最短,分布有 2 个 HvHSF 基因;6 号染色体 HvHSF 数量最少(1 个);3、4 和 7 号染色体上分别有 3、5 和 5 个 HvHSF 基因。

表 2 大麦 HvHSF 家族成员的理化特性、亚细胞定位

Table 2 Physical and chemical properties, subcellular localization of the HvHSF

名称 Symbol	氨基酸数 Amino acid length/aa	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 Isoelectric point/pI	不稳定指数 Instability index	亲水性 Hydrophilic index	脂肪系数 Fat index	亚细胞定位 Subcellular localization
HvHSF1a	431	48 727	5.37	53.22	69.93	-0.67	Nucleus
HvHSF1b	372	42 116	4.99	56.25	71.85	-0.78	Nucleus
HvHSF2a	418	46 039	4.95	47.71	77.63	-0.57	Nucleus
HvHSF2b	316	34 677	6.78	53.28	66.74	-0.51	Nucleus
HvHSF2c	495	54 215	5.72	54.51	76.26	-0.51	Nucleus
HvHSF2d	196	21 919	6.08	62.58	73.16	-0.59	Nucleus
HvHSF2e	92	10 240	5.43	42.50	82.61	-0.14	Nucleus
HvHSF2f	299	32 485	5.21	55.89	62.81	-0.72	Nucleus
HvHSF3a	327	36 059	5.90	59.63	73.12	-0.36	Nucleus
HvHSF3b	235	26 071	7.03	52.84	66.13	-0.47	Nucleus
HvHSF3c	432	48 545	5.37	57.30	57.85	-0.86	Nucleus
HvHSF3d	314	34 917	6.47	67.17	71.18	-0.43	Nucleus
HvHSF4a	266	29 763	9.61	51.93	77.07	-0.29	Chloroplast/ Nucleus
HvHSF4b	384	43 059	5.05	61.30	71.17	-0.69	Nucleus
HvHSF4c	344	39 916	5.07	66.03	72.56	-0.71	Nucleus
HvHSF4d	264	28 864	5.58	46.39	67.65	-0.44	Nucleus
HvHSF4e	266	29 409	5.73	51.18	65.98	-0.40	Nucleus
HvHSF5a	388	41 423	7.85	58.86	64.74	-0.39	Nucleus
HvHSF5b	301	32 496	9.26	54.49	64.88	-0.51	Nucleus
HvHSF5c	402	41 745	4.90	56.93	67.44	-0.42	Nucleus
HvHSF5d	371	41 041	5.46	47.78	64.42	-0.68	Nucleus
HvHSF5e	360	40 245	5.56	60.03	67.42	-0.68	Nucleus
HvHSF5f	510	56 588	5.00	59.75	70.96	-0.57	Nucleus
HvHSF6	457	50 174	5.45	42.82	58.62	-0.67	Nucleus
HvHSF7a	142	16 273	7.08	55.91	63.24	-0.62	Nucleus
HvHSF7b	390	41 870	5.50	56.10	67.56	-0.45	Nucleus
HvHSF7c	352	38 046	4.70	60.82	75.91	-0.31	Nucleus
HvHSF7d	266	28 277	6.11	33.05	67.89	-0.23	Nucleus
HvHSF7e	225	25 044	6.24	47.48	68.93	-0.60	Nucleus

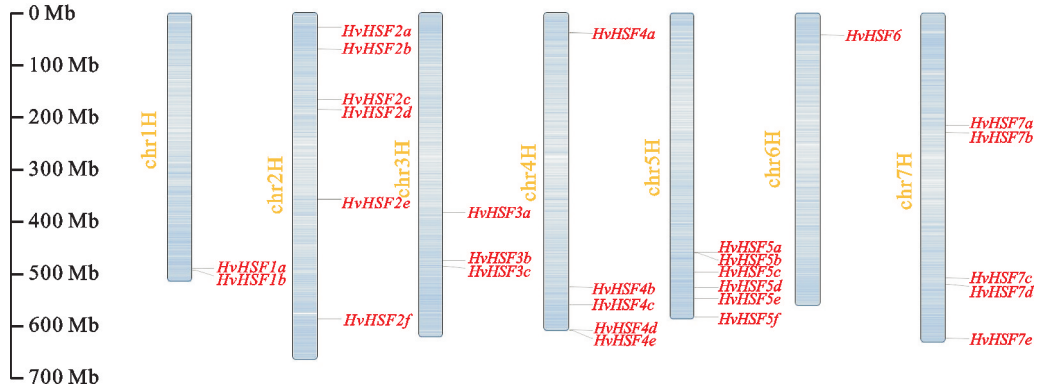


图 1 HvHSF 基因在染色体上的分布

Fig. 1 Distribution of the HvHSF genes on chromosomes

2.3 大麦 HvHSF 家族成员的系统进化分析

对拟南芥、水稻和大麦 HSF 蛋白序列进行比对,通过邻接法构建系统发育树(图 2)发现,来自 3 个物种的 68 个 HSF 蛋白被分为 A、B 和 C 类,暗示其在进化过程中产生了功能分化。A 类包含的 HvHSF 数量最多,共有 20 个,如 HvHSF5e、

HvHSF2a、HvHSF5d 等; B 类有 HvHSF2b、HvHSF2f、HvHSF5a 等共 6 个 HvHSF; C 类有 HvHSF1a、HvHSF3c 和 HvHSF6。大麦 HvHSF 成员与水稻 OsHSF 成员亲缘关系更近,这可能是因为大麦和水稻均为禾本科单子叶作物,而拟南芥为十字花科双子叶植物。

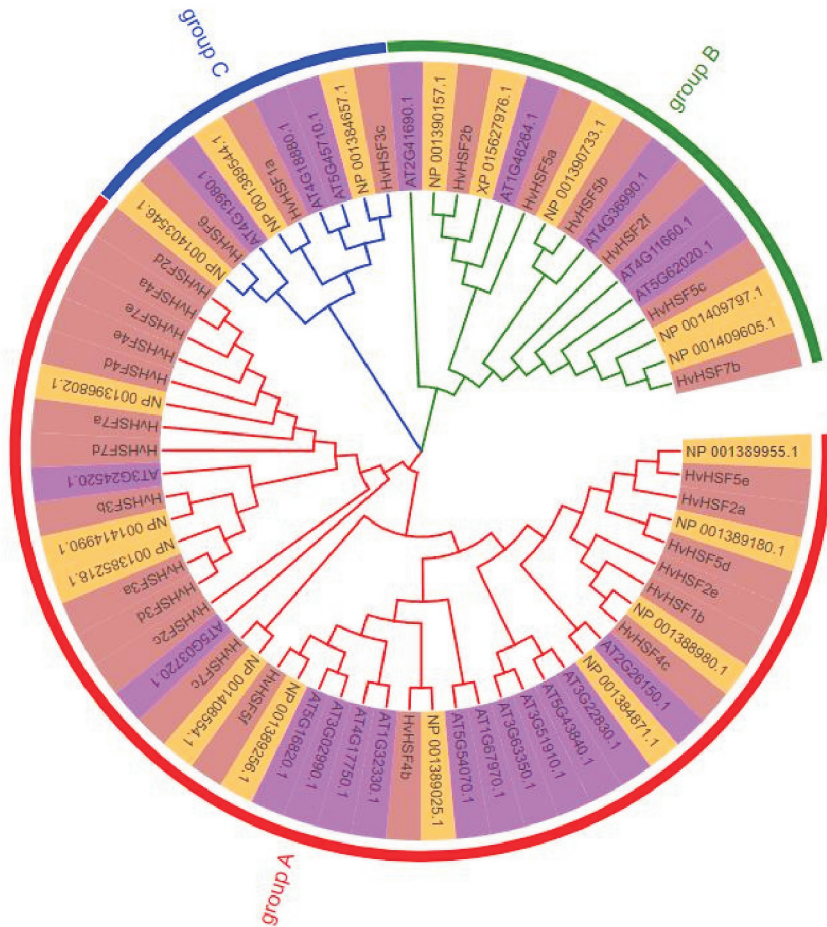


图 2 拟南芥、水稻和大麦 HSF 基因家族成员的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of HSF family proteins from barley, rice and *Arabidopsis thaliana*

### 2.4 大麦 HvHSF 蛋白结构域预测及基因结构分析

通过 TBtools 对大麦 HvHSF 的结构域进行预测,结果(图 3A)显示,HvHSF 成员的 motif 数量为 1~9 个。其中 HvHSF2e 的 motif 数量最少,只有 1 个;HvHSF1b、HvHSF2a、HvHSF4、HvHSF5e 的 motif 数量最多,均含有 9 个。在进化树相同分支中的 HvHSF 成员 motif 结构相似,推测相同分支的 HvHSF 蛋白功能相似。

通过 TBtools 对 HvHSF 基因结构进行分析(图 3B),发现 HvHSF 基因内含子的数量在 0~3 之间,不含内含子的 HvHSF 基因有 7 个,17 个 HvHSF 基因外显子数量为 1 或 2。大多数亲缘关系较近的 HvHSF 基因的内含子数量、内含子

和外显子长度相同,具有相似的基因结构。

### 2.5 大麦 HvHSF 的共线性分析

为了深入了解大麦 HvHSF 基因的进化史,对其进行种内共线性分析。结果(图 4)显示,5 号染色体的 HvHSF5d 和 7 号染色体的 HvHSF7b 具有共线性,推测二者可能具有相似的功能。

### 2.6 大麦 HvHSF 基因启动子顺式作用元件分析

为了解大麦 HvHSF 基因的潜在功能和调控机制,使用 PlantCARE 网站对翻译起始位点上游近 2 000 bp 的启动子区域进行顺式作用元件分析(图 5)。发现除 HvHSF2e、HvHSF2f、HvHSF3a、HvHSF3e 外,其余 HvHSF 基因均含有多种顺式作用元件。具体为激素类响应元件、生长发育类响应元件、非生物胁迫类响应元件及核心启动子

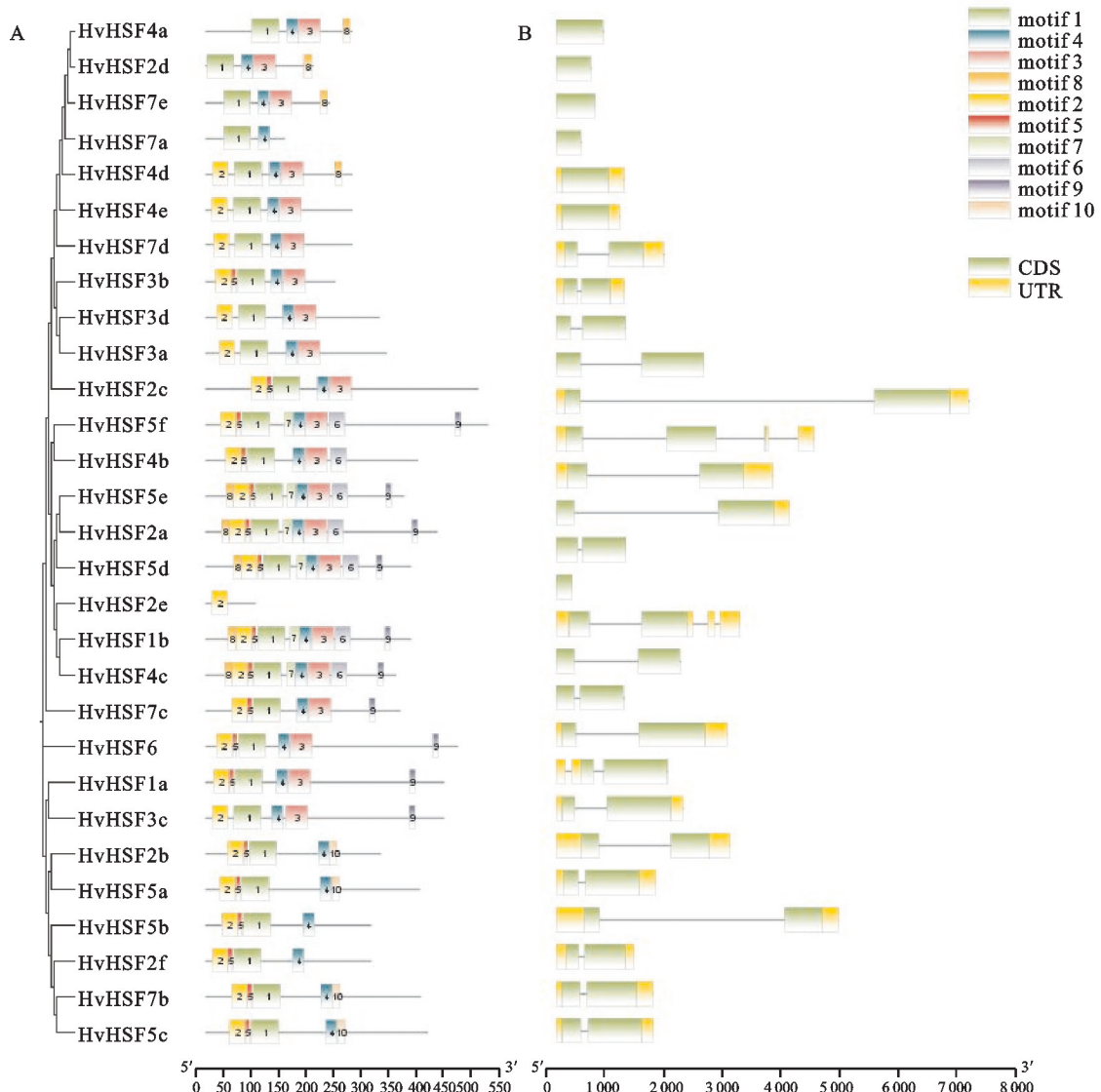


图 3 HvHSF 成员蛋白保守结构域(A)和基因结构(B)分析

Fig. 3 Conserved domain(A) and gene structure(B) analysis of HvHSFs

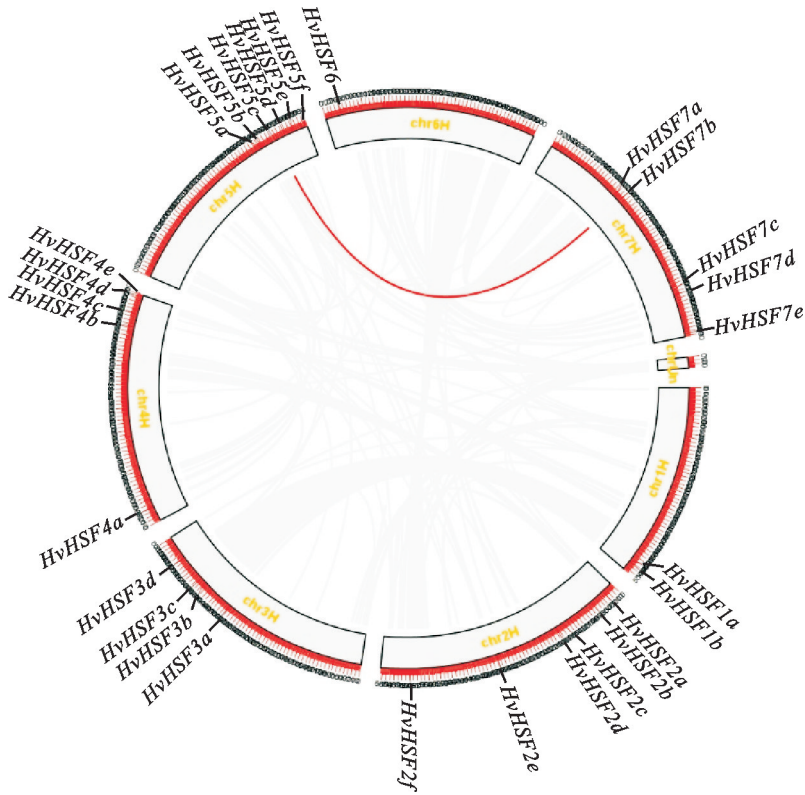


图 4 大麦HvHSF 基因共线性分析

Fig. 4 Collinearity analysis of HvHSF genes

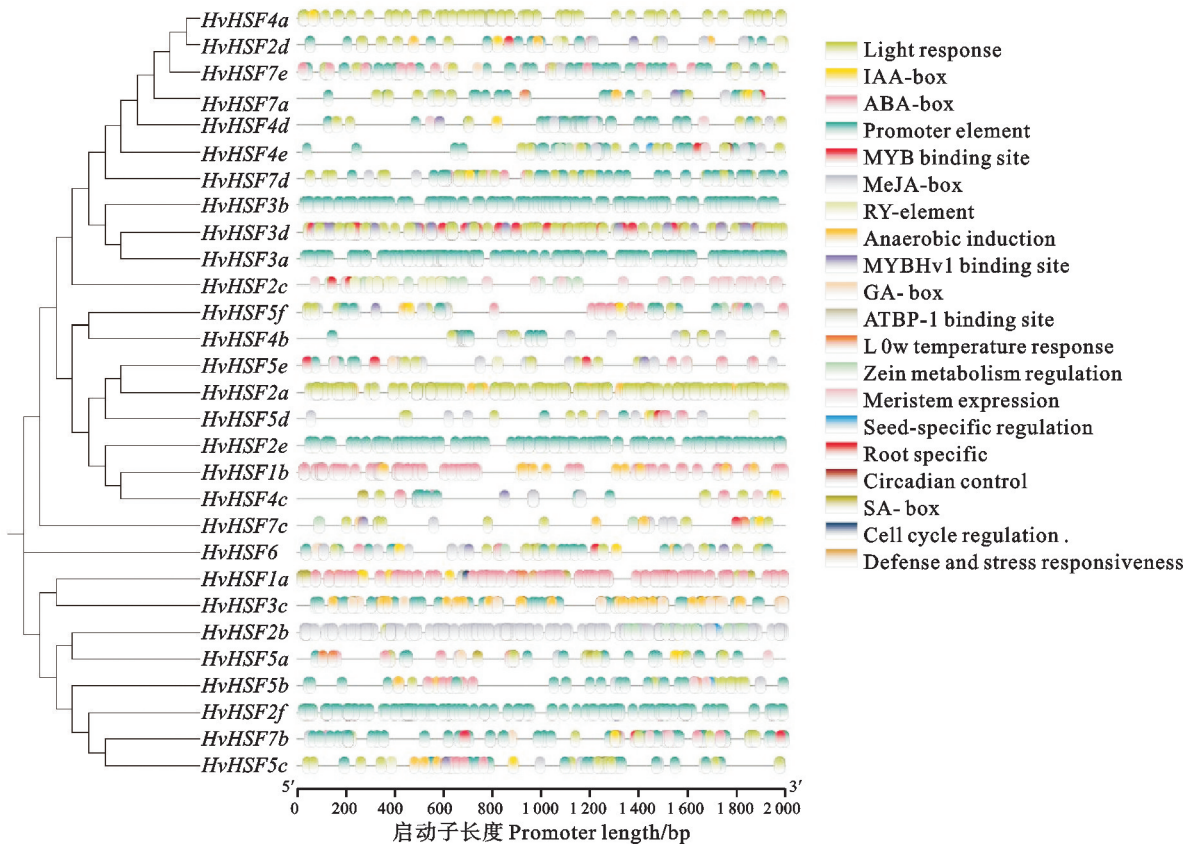


图 5 HvHSF 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis of cis-acting elements in the promoters of HvHSF genes

元件。其中, *HvHSF1a* 和 *HvHSF1b* 启动子区富含大量脱落酸(ABA)响应元件。推测大麦 *HvHSF* 基因主要在生长发育以及抗逆过程中发挥作用。

## 2.7 大麦 *HvHSF* 蛋白互作网络分析

为探索大麦 *HvHSF* 成员的潜在功能及其可能参与的信号转导和代谢途径,通过 String 在线

工具构建了 *HvHSF* 蛋白互作网络。结果(图 6)表明, *HvHSF* 多数成员都与植物耐热性关键蛋白 CLPB1、HSP21、HSBP、HSP18-1 存在互作关系,说明大麦 *HvHSF* 可能响应热胁迫。此外,部分 *HvHSF* 成员与坏血酸过氧化物酶 2(APX2)互作,表明 *HvHSF* 可能参与  $H_2O_2$  的清除。

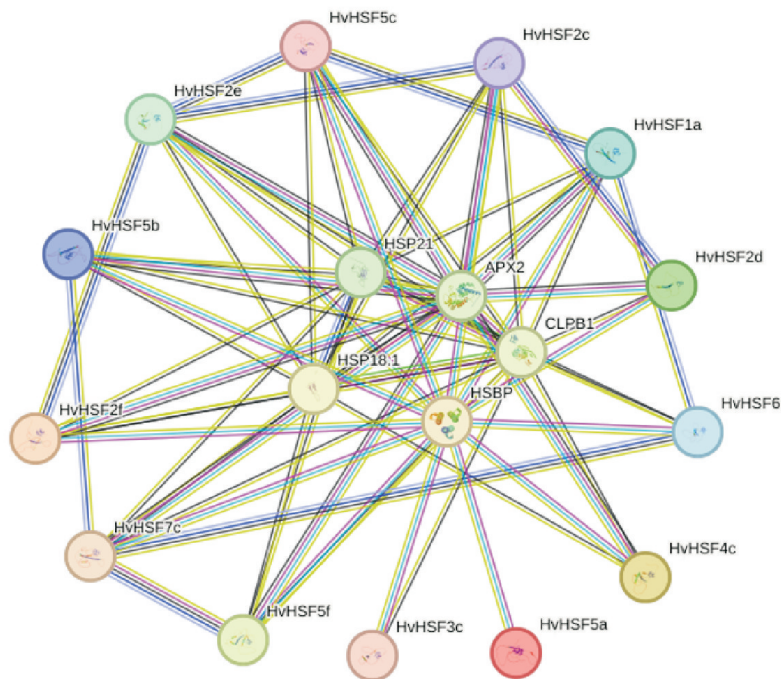


图 6 大麦 *HvHSF* 蛋白互作网络

Fig. 6 Protein interaction network of barley *HvHSF* proteins

## 2.8 大麦 *HvHSF* 基因在盐碱处理下的表达

转录组测序分析结果(图 7)显示,与无胁迫组(CK)相比,盐、碱胁迫处理后,几乎所有的 *HvHSF* 基因表达量都发生显著变化( $P < 0.05$ ),如 *HvHSF2e*、*HvHSF4c*、*HvHSF6*、*HvHSF2b*、*HvHSF5a* 和 *HvHSF5f* 表达量在碱胁迫下表现为下调; *HvHSF4c*、*HvHSF3a*、*HvHSF2b*、*HvHSF5a* 在盐胁迫下表达量显著降低( $P < 0.05$ )。这表明这些基因可能负调控大麦对盐、碱胁迫的响应。

与 0 h 相比, *HvHSF3b*、*HvHSF7d* 和 *HvHSF5b* 共 3 个基因在盐胁迫 12 h 后表达量显著升高,而 *HvHSF5e*、*HvHSF5d*、*HvHSF5f*、*HvHSF3c*、*HvHSF7b* 和 *HvHSF5c* 在盐胁迫 24 h 后表达量显著升高,说明不同 *HvHSF* 基因可对大麦响应盐胁迫的时间不同。

相比于盐胁迫处理,更多的 *HvHSF* 成员响应碱胁迫。相较于 0 h, *HvHSF5e*、*HvHSF5d*、*HvHSF1b*、*HvHSF4b*、*HvHSF3c*、*HvHSF7c*、*HvHSF2c*、

*HvHSF4a*、*HvHSF5b*、*HvHSF2f*、*HvHSF7b*、*HvHSF5c* 在碱处理 12 h 后表达量显著升高, *HvHSF4d*、*HvHSF4e*、*HvHSF7d*、*HvHSF2a* 和 *HvHSF1a* 在碱处理 24 h 后表达量显著升高。碱处理下 *HvHSF* 基因表达量的上调幅度大于其在盐处理的增幅,推测大麦 *HvHSF* 对碱胁迫更敏感。

选取对盐、碱胁迫显著响应的 6 个 *HvHSF* 基因(*HvHSF1a*、*HvHSF1b*、*HvHSF2a*、*HvHSF3c*、*HvHSF5b* 和 *HvHSF6*),通过 qRT-PCR 技术检测其在盐、碱胁迫下的相对表达量。结果(图 8)发现,6 个 *HvHSF* 在盐胁迫下的表达量均有所增加, *HvHSF5b* 表达量增幅最大,推测 *HvHSF5b* 对大麦盐胁迫更敏感。碱处理下,除 *HvHSF6* 表达量降低, *HvHSF1a*、*HvHSF1b*、*HvHSF2a*、*HvHSF3c* 和 *HvHSF5b* 表达量均增加; *HvHSF1a* 表达量增幅最大,推测 *HvHSF1a* 在大麦对碱胁迫响应中发挥重要作用,与转录组结果一致。

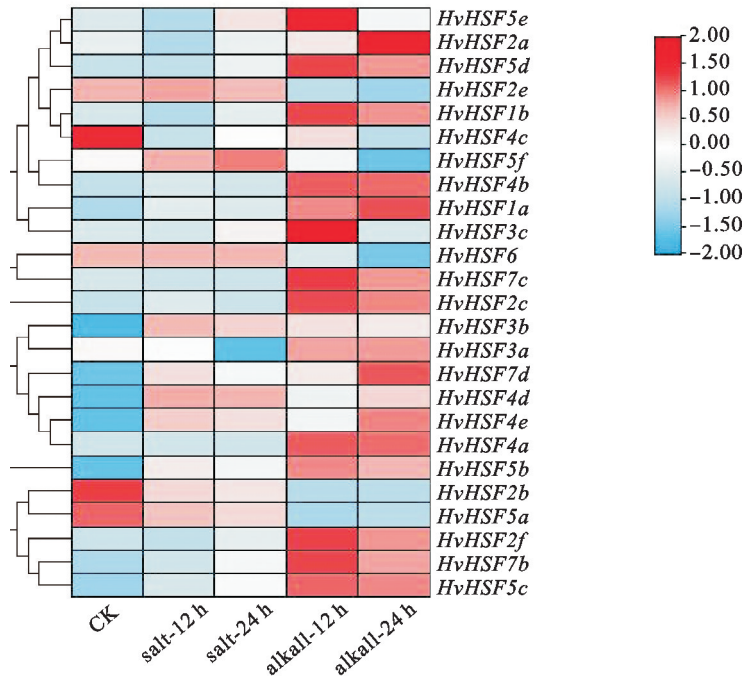


图 7 HvHSF 家族成员在不同胁迫处理的表达量

Fig. 7 Expression of HvHSF family members in barley under different stress treatments

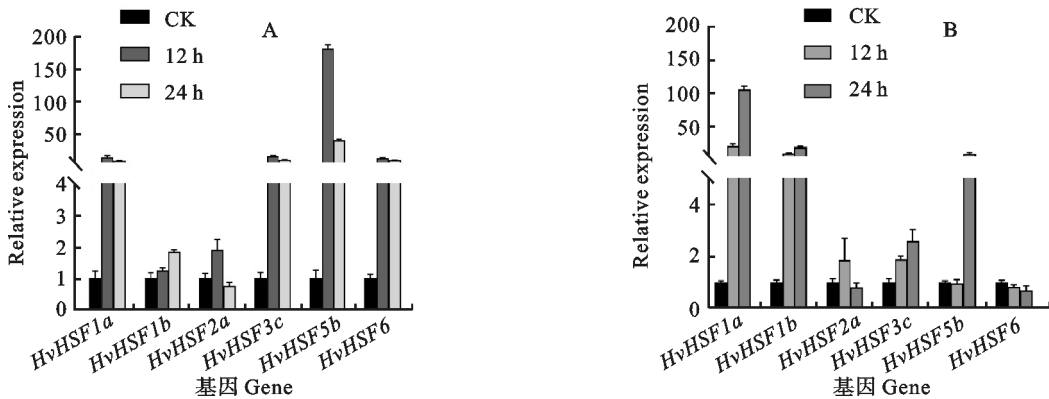


图 8 大麦HvHSF 在盐(A)、碱(B)胁迫下的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of barley HvHSF under salt(A) and alkali(B) stresses

### 3 讨论

#### 3.1 大麦HvHSF 基因数量的扩张可能与其胁迫响应相关

研究发现,拟南芥中有 21 个 HSF 基因,水稻中有 25 个,玉米 15 个<sup>[9]</sup>。本研究经过序列比对分析,共发现 29 个大麦 HSF 基因不均匀分布在七条染色体上(图 1)。根据其序列特征,将这 29 个 HvHSF 基因分为 A、B 和 C 类(图 2)。A 类 HSF 主要以其转录激活潜能为特征;B 类 HSF 可能作为胁迫诱导基因的阻遏子发挥作用;C 类 HSF 在 ABA 介导的非生物胁迫响应(干旱、盐和渗透胁迫)和生殖发育过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。

大麦 HvHSF 启动子区存在激素、生长发育以及种子特异性等顺式作用元件(图 5),表明 HvHSF 可能与大麦的生长发育密切相关;HvHSF 启动子区还具有 ABA 及胁迫、防御反应的响应元件,可能参与各类胁迫响应的调控<sup>[11]</sup>。根据其亚细胞定位结果,除 HvHSF4a 外,其余 HvHSF 均分布在细胞核内,这可能与 HSF 在细胞核内形成三聚体激活下游基因转录有关。预测 HvHSF 基因可能参与大麦对胁迫的响应。

生物信息学预测发现, HvHSF1a、HvHSF2c、HvHSF5b、HvHSF5c 等蛋白与 CLPB1 (HSP1000)、HSP21、HSBP、HSP18.1 及 APX2 存在互作关系(图 6)。热休克蛋白(HSP)是一类耐热应激且普

遍存在的蛋白,主要起分子伴侣的作用。热休克蛋白和热休克因子结合蛋白均参与多种胁迫响应。例如,柑橘中存在 4 个 *HSP90* 基因表达受高温胁迫的诱导<sup>[12]</sup>;茶树大部分 HSP 基因受热胁迫诱导表达<sup>[13]</sup>。*HSBP* 是番茄耐热性的重要调控基因<sup>[14]</sup>;荔枝 *HSP70* 基因响应低温、高温、干旱和盐胁迫<sup>[15]</sup>;干旱胁迫和盐胁迫正调控拟南芥 15 个 *HSP20* 的表达<sup>[16]</sup>。HSF 在植物中通过激活特定基因的表达来调控逆境胁迫的响应,同时还能够通过直接调控 HSP 蛋白的热稳定性来提高植物的耐受性<sup>[11]</sup>。这种调控机制能够帮助植物适应不同的逆境环境,并保护其免受逆境引发的损害。抗坏血酸过氧化物酶 2 (APX2) 参与活性氧 (ROS) 解毒反应,可能与胁迫条件下活性氧的清除和耐逆性的形成有关<sup>[17]</sup>。上述结果表明, *HvHSF* 可能通过与参与胁迫响应的分子伴侣或胁迫调控蛋白互作参与胁迫反应,调节大麦抗逆反应。

转录组分析结果(图 7)表明,大部分大麦 *HvHSF* 基因对盐碱胁迫有响应。盐碱胁迫处理下,与对照组相比,仅有少部分成员表达量降低,大部分成员在盐碱胁迫下的基因表达量升高。这说明不同 *HvHSF* 成员在大麦盐碱胁迫反应中,发挥着正反馈与负反馈两种调节。相比于盐胁迫, *HvHSF* 对碱胁迫更敏感,受碱胁迫诱导差异表达的成员更多,表达量增幅更大,说明 *HvHSF* 可能在大麦对耐碱性的适应中发挥重要的作用。qRT-PCR 的结果与转录组测序结果一致(图 8)。不同的 *HvHSF* 成员对大麦盐、碱胁迫的反应不相同,部分 *HvHSF* 响应盐、碱两种胁迫。对 *HvHSF* 响应盐、碱胁迫的机制需要进一步研究,以确定其在盐碱胁迫下发挥的作用机制。

#### 参考文献:

- [1] KUROP M K, HUYEN C M, KELLY J H, *et al.* The heat shock response and small molecule regulators [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 22: 6113846.
- [2] JACOB P, HIRT H, BENDAHMANE A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(4): 405.
- [3] ZANG D, WANG J, ZHANG X, *et al.* *Arabidopsis* heat shock transcription factor HSF A7b positively mediates salt stress tolerance by binding to an E-box-like motif to regulate gene expression [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(19): 5355.
- [4] PÉREZ-SALAMÓ I, PAPDI C, RIGÓ G, *et al.* The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 [J]. *Plant Physiology*, 2014, 165(1): 319.
- [5] WANG Q, ZHANG Z, GUO C, *et al.* Hsf transcription factor gene family in peanut (*Arachis hypogaea* L.): Genome-wide characterization and expression analysis under drought and salt stresses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 141: 214732.
- [6] GUO Q, WEI R, XU M, *et al.* Genome-wide analysis of HSF family and overexpression of *PsnHSF21* confers salt tolerance in *Populus simonii* × *P. nigra* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 141: 160102.
- [7] LING C, LIU Y, YANG Z, *et al.* Genome-wide identification of HSF gene family in kiwifruit and the function of *AeHsFA2b* in salt tolerance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15638.
- [8] WANG J, CHEN L, LONG Y, *et al.* A novel heat shock transcription factor (*ZmHsf08*) negatively regulates salt and drought stress responses in maize [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11922.
- [9] FAN K, MAO Z, YE F, *et al.* Genome-wide identification and molecular evolution analysis of the heat shock transcription factor (HSF) gene family in four diploid and two allopolyploid *Gossypium* species [J]. *Genomics*, 2021, 113(5): 3112.
- [10] SCHARF K D, BERBERICH T, EBERSBERGER I, *et al.* The plant heat stress transcription factor (HSF) family: Structure, function and evolution [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1819(2): 104.
- [11] WESTERHEIDE S D, RAYNES R, POWELL C, *et al.* HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder [J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2012, 13(1): 86.
- [12] 金龙飞, 李 续, 王 鹏, 等. 柑橘 HSP90s 鉴定及其在高温胁迫下的表达分析 [J/OL]. 分子植物育种, 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231219.1152.009.html>.
- [13] 林俊铭, 赵体跃, 黄翔翔, 等. 茶树响应高温胁迫下生理生化和分子机制的研究进展 [J]. 中国茶叶, 2024, 46(3): 26.
- [14] LIN J M, ZHAO T Y, HUANG X X, *et al.* Research progress on physiological, biochemical, and molecular mechanisms of tea plants in response to high temperature stress [J]. *China Tea*, 2024, 46(3): 26.
- [15] 段金虎. 番茄耐热材料的鉴定及耐热基因的初步挖掘 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2023.
- [16] DUAN J H. Identification of tomato heat-resistant materials and preliminary excavation of heat-resistant genes [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology, 2023.
- [17] 凡 超, 杨 杰, 陈 蓉, 等. 荔枝 HSP70 家族鉴定及其响应非生物胁迫的表达分析 [J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1102.
- [18] FAN C, YANG J, CHEN R, *et al.* Identification and expression analysis of the HSP70 gene family under abiotic stresses in *Litchi chinensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(4): 110.
- [19] 黄思沛, 黄德娅, 付连郭, 等. 拟南芥 Hsp20 基因家族的特征及其在干旱和盐胁迫下的表达分析 [J]. 生命科学研究, 2023, 27(2): 162.
- [20] HUANG S P, HUANG D Y, FU L G, *et al.* Characterization of *Arabidopsis thaliana* Hsp20 gene family and its expression analysis under drought and salt stress [J]. *Life Science Research*, 2023, 27(2): 162.
- [21] LI Z Q, LI J X, ZHANG G F. Expression regulation of plant ascorbate peroxidase and its tolerance to abiotic stresses [J]. *Yi Chuan Hereditas*, 2013, 35(1): 45.