

研究报告

Research Report

白菜 HSP90 基因家族的鉴定及表达分析

袁凌云^{1,2} 吴颖¹ 张利婷¹ 郑禹杉¹ 聂立兵¹ 朱世东^{1,2} 侯金锋^{1,2} 陈国户¹ 唐小燕¹ 汪承刚^{1,2*}

¹ 安徽农业大学园艺学院, 合肥, 230036; ² 安徽省皖江蔬菜产业技术研究院, 马鞍山, 238200

* 通信作者, cgwang@ahau.edu.cn

摘要 本项目为了深入研究白菜(*Brassica rapa*)热激蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90)家族基因在温度胁迫下的响应机理及相关功能, 利用生物信息学的方法对白菜 HSP90 基因家族成员进行了鉴定, 同时分析了这些家族成员的理化性质、基因结构、进化关系、染色体分布、启动子元件以及表达模式。结果表明: 白菜中至少含有 14 个 HSP90 基因, 氨基酸长度在 490~820 之间, 呈酸性, 分布于 10 条染色体上, 含有 1~19 个不等的内含子, 10 个保守基序; 基于系统进化树分析, 将 14 个基因分为 5 个簇; 顺式作用元件分析得到 7 个响应温度胁迫基因; 荧光定量分析表明这些基因在温度胁迫下存在显著差异, 表明这些基因广泛参与温度胁迫响应。本研究为后续白菜 HSP90 基因功能挖掘提供一定基础。

关键词 白菜; 热激蛋白; 全基因组鉴定; 表达分析

Identification and Expression Analysis of HSP90 Gene Family in Chinese Cabbage

Yuan Lingyun^{1,2} Wu Ying¹ Zhang Liting¹ Zheng Yushan¹ Nie Libing¹ Zhu Shidong^{1,2} Hou Jinfeng^{1,2}
Chen Guohu¹ Tang Xiaoyan¹ Wang Chenggang^{1,2*}

¹ College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei, 230036; ² Anhui Wanjiang Vegetable Industrial Technology Institute, Maanshan, 238200

* Corresponding author, cgwang@ahau.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0014

Abstract In order to study the response mechanism and related functions of the heat shock protein 90 (HSP90) gene family under temperature stress in Chinese cabbage, we have identified HSP90 gene family members in Chinese cabbage by bioinformatics analysis. And the physicochemical properties, gene structure, chromosome distribution, evolutionary relationship, promoter elements, and expression patterns of these genes were analyzed. The results showed that more than 14 HSP90 family genes were found in Chinese cabbage, and the amino acids length ranged from 490 to 820. These genes were acidic and distributed on 10 chromosomes, including 1 to 19 introns and 10 conserved motifs. Phylogenetic analysis suggested that 14 genes were divided into 5 clusters. Analysis of cis-elements found 7 genes responded to temperature stress. The transcription level of these genes was markedly altered under thermal stresses, indicating that these genes were widely involved in temperature stress. This study provided a foundation for further study the roles of HSP90 in Chinese cabbage.

Keywords Chinese cabbage; Heat shock protein; Genome-wide identification; Expression analysis

本文首次发表在《分子植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2021 年 3 月 10 日; 接受日期: 2021 年 3 月 12 日; 发表日期: 2021 年 3 月 17 日

引用格式: 袁凌云, 吴颖, 张利婷, 郑禹杉, 聂立兵, 朱世东, 侯金锋, 陈国户, 唐小燕, 汪承刚, 2021, 白菜 HSP90 基因家族的鉴定及表达分析, 分子植物育种 (网络版) 19(14): 1-10 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0014) (Yuan L.Y., Wu Y., Zhang L.T., Zheng Y.S., Nie L.B., Zhu S.D., Hou J.F., Chen G.H., Tang X.Y., and Wang C.G., 2021, Identification and expression analysis of HSP90 gene family in chinese cabbage, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 19(14): 1-10 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0014))

热激蛋白(heat shock proteins, HSP)广泛存在于真菌、动物和植物的细胞中,是一类受到生物逆境胁迫或非生物逆境胁迫诱导而表达提高的蛋白,在生物进化过程中具有高度的保守性。其按照分子量大小可以分为5个亚族,即HSP100、HSP90、HSP70、HSP60以及小分子热激蛋白(small heat shock proteins, sHSPs) (Wang et al., 2004)。而HSP90是真核生物细胞质中广泛存在的一类高度保守的特异蛋白,常作为分子伴侣参与逆境胁迫以及植物的生长发育过程(Oh et al., 2014),主要涉及激酶底物空间结构的形成、DNA修复、底物激活、应激初始信号传导和转录因子空间结构的维持等(Zuehlke and Johnson, 2010)。在胁迫或正常条件下,HSP90基因家族具有阻止蛋白聚集和促进失活蛋白重折叠的功能,与机体中存在的其他伴侣蛋白一起形成了协助蛋白折叠的机制(Picard, 2002)。

目前,HSP90基因家族在水稻(*Oryza sativa* L.) (Hu et al., 2009)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Krishna and Gloor, 2001)等多种作物已被鉴定,但在白菜中的作用机理尚不清楚。白菜属于十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*)植物,因喜冷凉,在春、秋、冬季节栽培较多,是中国重要的绿叶蔬菜之一,目前在世界范围内广泛种植。本研究利用生物信息学的方法对白菜HSP90基因家族进行鉴定,并分析了基因的结构和表达模式,为进一步研究白菜HSP90基因的功能提供一定基础。

1 结果与分析

1.1 白菜 HSP90 家族的鉴定

利用HMMER软件及SMART等网站在白菜中搜索到14个基因家族成员,为了区别于其他的物种,基因的命名方式采用白菜名称的缩写加上基因染色体位置顺序依次编号,即从BrHSP90-1到BrHSP90-14。对所有的HSP90蛋白进行理化性质分析(表1),分析结果显示14个HSP90蛋白的氨基酸长度在490~820之间,平均氨基酸长度为721.5。14个HSP90家族氨基酸等电点范围在4.93~5.65,说明白菜的HSP90基因中含有丰富的酸性氨基酸。不同HSP90的分子量变化较大,波动范围为56.52~93.77 kD。通过WoLF PSORT网站预测显示,6个基因亚细胞定位在溶酶体上,4个基因定位于叶绿体上。

1.2 白菜 HSP90 家族的基因结构及进化分析

在白菜HSP90家族中共找到了10个motif(图1)。

除BrHSP90-14和BrHSP90-5外,其它的BrHSP90基因motif分布的相对比较均匀,通过比较发现,亲缘关系越近的基因,motif分布的数量和位置越相似,具有高度的保守性,可以推测在其结构域和功能单位都基本相似。而白菜HSP90家族在内含子的数量上也存在较大的差异性,1~19不等。

为了进一步了解白菜HSP90基因家族谱系及功能特点,对白菜、甘蓝(*Brassica oleracea* L.)、黑芥(*Brassica nigra*)、拟南芥HSP90家族基因共同构建系统进化树,通过构建系统进化树将其分为5个簇(Group 1~Group 5),而BrHSP90基因则不均匀的分布在5个簇中,其中簇1最多,有5个,而簇2仅一个BrHSP90基因。通过聚类分析发现,白菜与拟南芥、甘蓝和黑芥的HSP90基因有较高的同源性,推测直系同源基因之间可能具有相同的功能。

1.3 白菜 HSP90 家族的染色体分布及共线性分析

利用TBtools工具预测了候选HSP90家族基因在染色体上的分布情况。在白菜中,HSP90基因家族成员在各条染色体上呈不均等分布(图3)。其中,染色体A04与A07未发现BrHSP90家族成员,A03染色体上分布最多,有4个基因,其次是A02,有3个基因。此外,还有部分BrHSP90基因存在串联重复,导致BrHSP90存在同源基因,扩大了白菜的HSP90基因组。利用MCScanX软件对白菜、黑芥、甘蓝和拟南芥HSP90基因进行共线性分析发现(图4),4个HSP90基因家族存在共线性关系。通过Ka/Ks分析发现(表2),12个基因对Ka/Ks \ll 1,说明这些基因在进化中经历了较强的纯化选择作用。

1.4 白菜 HSP90 基因家族的顺式作用元件

对白菜HSP90家族基因的启动子进行了顺式作用元件分析,除启动子区域的核心元件外,主要分析了与激素调控和逆境胁迫等相关元件的分布。结果发现14个HSP90基因的顺式作用元件均预测到了与激素调控和逆境胁迫相关。其中BrHSP90-1、BrHSP90-3、BrHSP90-4、BrHSP90-5、BrHSP90-9、BrHSP90-13和BrHSP90-14等7个基因含有低温响应元件,这7个基因可能在温度胁迫中起主要作用;BrHSP90-1、BrHSP90-13同时具有低温、干旱和逆境胁迫等响应元件;除BrHSP90-3和BrHSP90-4外,其他12个基因均含有茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif和TGACG-motif)。因此,白菜HSP90基因家族成员可在不同非生物胁迫下进行转录调控(图5)。

表 1 白菜 HSP90 家族基因成员基因组信息和理化特征分析

Table 1 Analysis of genomic information and protein characterization of HSP90 gene family members in *Brassica rapa*

基因 ID	基因名称	染色体	位置(5'→3')	开放阅读框长度(bp)	氨基酸长度(aa)	等电点	分子量(kD)	亚细胞定位
Gene ID	Gene name	Chromosome	Position(5'→3')	ORF (bp)	Amino acid length (aa)	pI	Molecular weight (kD)	Subcellular localization
BraA01g014950.3C	BrHSP90-1	A01	7 954 325~7 958 037 (-)	2 382	793	4.97	90.58	内质网
BraA01g041350.3C	BrHSP90-2	A01	27 732 630~27 737 188 (-)	2 418	805	5.34	91.08	Endoplasmic reticulum 叶绿体
BraA02g013050.3C	BrHSP90-3	A02	6 603 090~6 605 333 (+)	2 094	697	4.99	79.63	Chloroplast 溶酶体
BraA02g013110.3C	BrHSP90-4	A02	6 626 704~6 628 805 (-)	1 977	658	5.05	75.26	Lysosome 溶酶体
BraA02g036390.3C	BrHSP90-5	A02	25 302 950~25 307 553 (+)	1 476	491	5.26	56.52	Lysosome 溶酶体
BraA03g012970.3C	BrHSP90-6	A03	5 597 559~5 599 866 (-)	2 103	700	4.97	79.96	Lysosome 溶酶体
BraA03g013140.3C	BrHSP90-7	A03	5 718 362~5 720 693 (+)	2 100	699	4.93	79.95	Lysosome 溶酶体
BraA03g013170.3C	BrHSP90-8	A03	5 738 388~5 740 887 (+)	2 103	700	4.95	80.11	Lysosome 溶酶体
BraA03g051700.3C	BrHSP90-9	A03	26 720 320~26 723 845 (-)	2 412	803	5.10	92.14	Lysosome 液泡
BraA05g037940.3C	BrHSP90-10	A05	26 023 896~26 028 262 (-)	2 415	804	5.46	91.29	Vacuole 线粒体
BraA06g038950.3C	BrHSP90-11	A06	25 981 836~25 985 614 (-)	2 367	788	4.99	89.46	Mitochondria 叶绿体
BraA08g020490.3C	BrHSP90-12	A08	15 686 287~15 689 874 (+)	2 463	820	5.22	93.77	Chloroplast 内质网
BraA09g024330.3C	BrHSP90-13	A09	16 320 920~16 324 734 (+)	2 352	783	5.04	88.80	Endoplasmic reticulum 叶绿体
BraA10g010950.3C	BrHSP90-14	A10	9 051 925~9 054 030 (+)	1 683	560	5.65	63.82	Chloroplast 叶绿体 Chloroplast

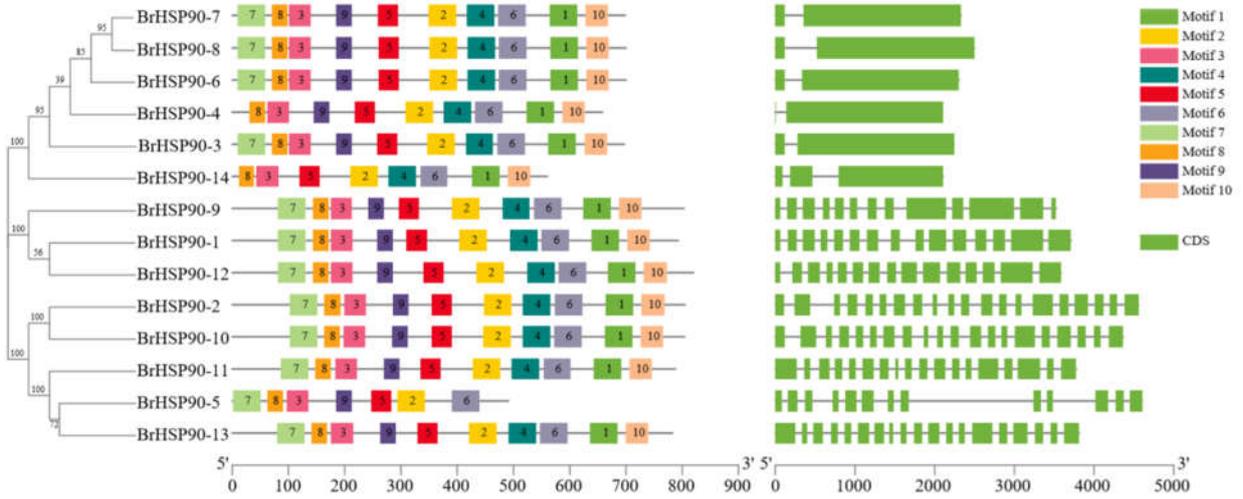


图 1 白菜 HSP90 基因家族蛋白结构域与基因结构
 Figure 1 Protein domain and sequence structure of HSP90 gene family in *Brassica rapa*

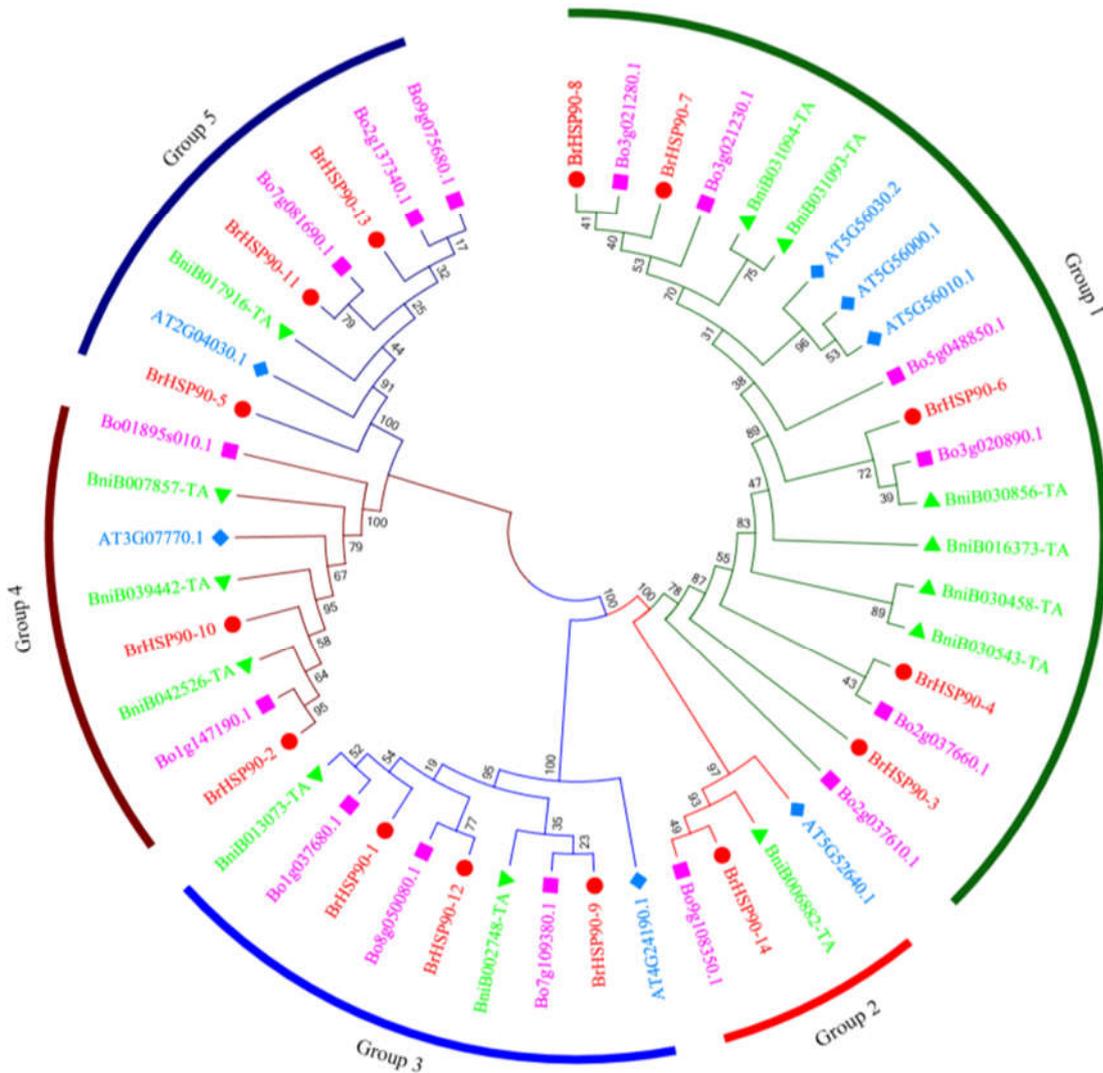


图 2 白菜(*Br*), 甘蓝(*Bo*), 黑芥(*Bni*), 拟南芥(*At*) HSP90 家族基因系统进化树
 Figure 2 The unrooted phylogenetic tree of HSP90 gene family in *Brassica rapa* (*Br*), *Brassica oleracea* L. (*Bo*), *Brassica nigra* (*Bni*) and *Arabidopsis thaliana* (*At*)

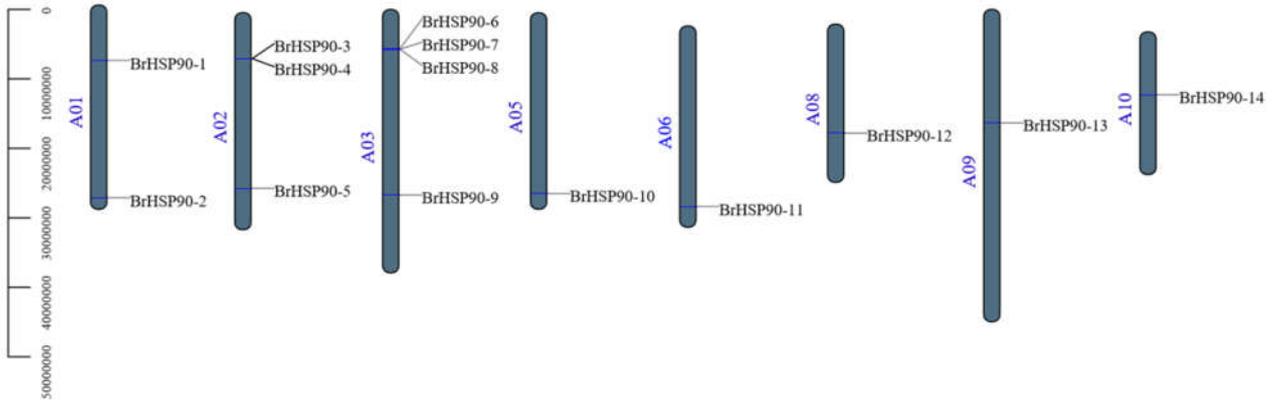


图 3 白菜 HSP90 家族基因在染色体上的分布

Figure 3 The distribution of HSP90 gene family on chromosomes in *Brassica rapa*

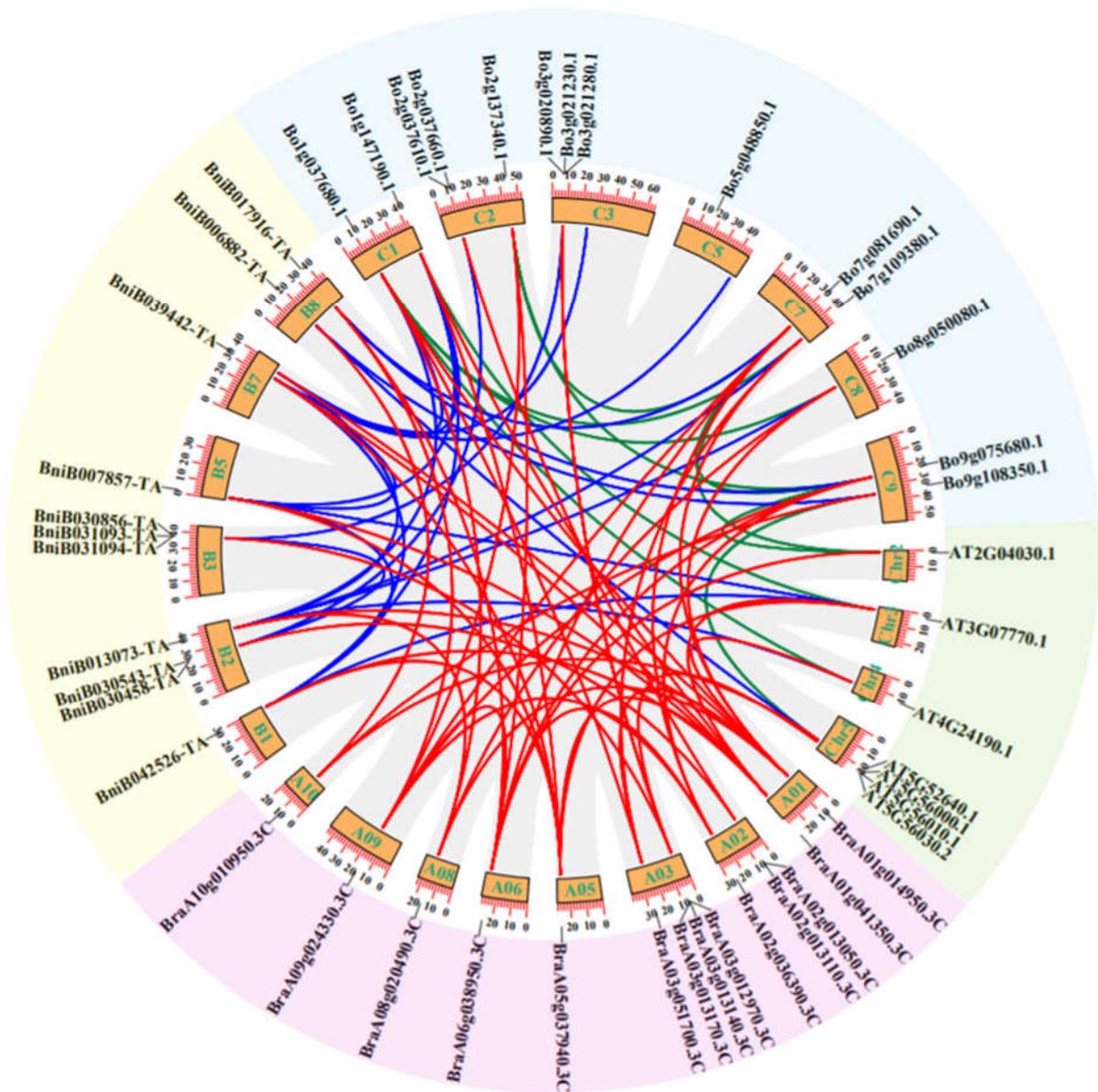


图 4 白菜, 甘蓝, 黑芥和拟南芥中 HSP90 基因的共线关系

Figure 4 Syntenic analysis of HSP90 genes in *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* L., *Brassica nigra* and *Arabidopsis thaliana*

表 2 白菜和拟南芥 HSP90 基因家族 Ka/Ks 分析

Table 2 Analysis of Ka/Ks of HSP90 gene family in *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*

Seq-1	Seq-2	Ka	Ks	Ka/Ks
BraA01g014950.3C	BraA03g051700.3C	0.018 861 069	0.479 316 515	0.039 349 925
BraA01g041350.3C	BraA05g037940.3C	0.024 392 025	0.321 753 698	0.075 809 618
BraA01g014950.3C	BraA08g020490.3C	0.021 282 861	0.384 677 958	0.055 326 438
BraA01g041350.3C	AT3G07770.1	0.051 411 986	0.527 180 605	0.097 522 529
BraA01g014950.3C	AT4G24190.2	0.033 353 549	0.402 241 677	0.082 919 178
BraA02g036390.3C	BraA06g038950.3C	0.036 219 286	0.344 193 344	0.105 229 477
BraA02g036390.3C	BraA09g024330.3C	0.031 151 454	0.440 839 999	0.070 663 856
BraA03g013140.3C	AT5G56000.1	0.022 283 778	0.616 973 951	0.036 117 858
BraA05g037940.3C	AT3G07770.1	0.052 349 239	0.514 083 417	0.101 830 242
BraA06g038950.3C	BraA09g024330.3C	0.015 832 208	0.396 994 171	0.039 880 203
BraA06g038950.3C	AT2G04030.1	0.021 059 849	0.511 283 262	0.041 190 178
BraA10g010950.3C	AT5G52640.1	0.059 674 389	0.790 288 592	0.075 509 617

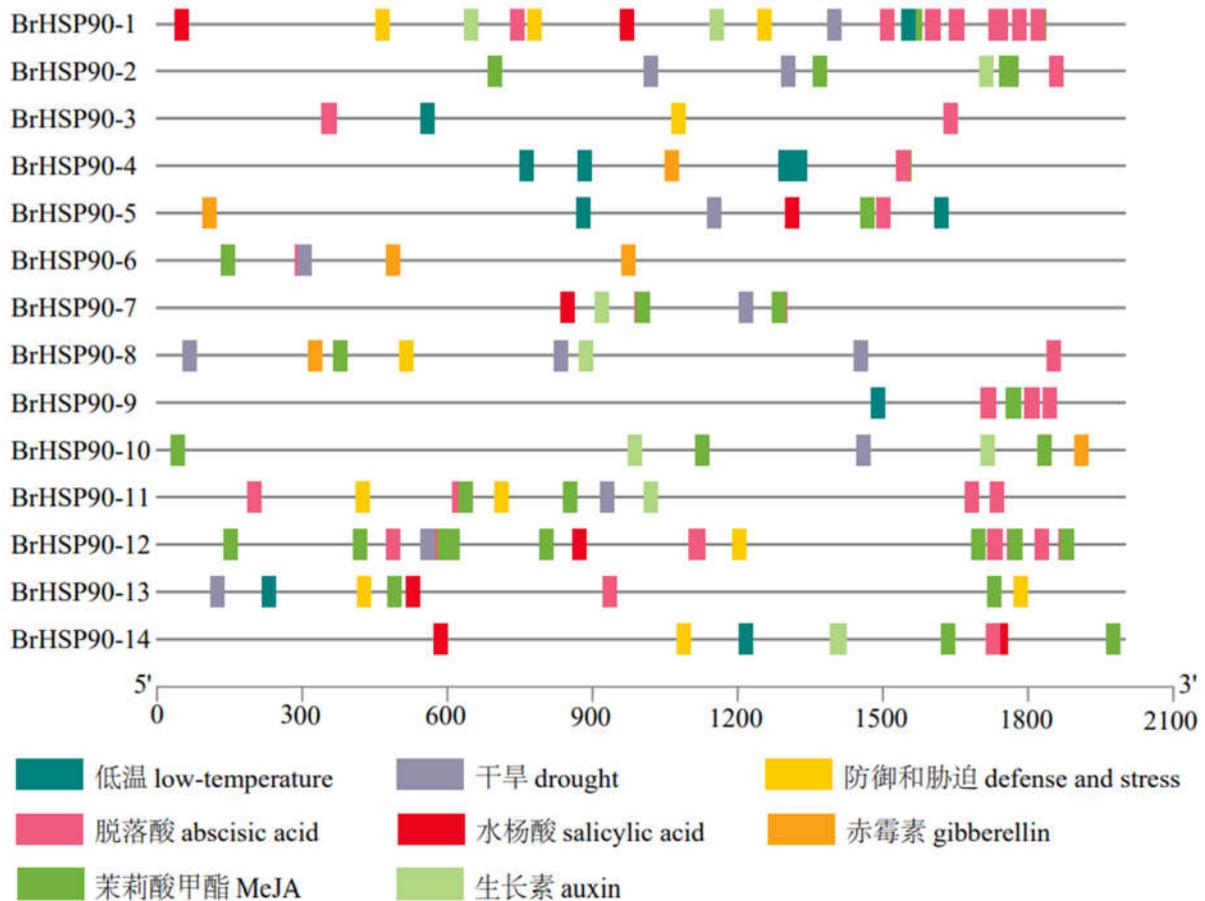


图 5 白菜 HSP90 家族基因启动子顺式作用元件功能

Figure 5 Functions of promoter cis-acting elements in HSP90 family genes in *Brassica rapa*

1.5 白菜 HSP90 家族基因的表达模式分析

为了研究 HSP90 家族基因在不同胁迫下的表达模式, 将启动子顺式作用元件分析得到的 7 个与温度胁迫相关的基因, 在乌菜‘WS-1’中进行荧光定量

分析。结果发现在空间表达中 (图 6), *BrHSP90-1*、*BrHSP90-3*、*BrHSP90-4*、*BrHSP90-5* 和 *BrHSP90-9* 在茎上的相对表达水平最高, 而 *BrHSP90-13* 和 *BrHSP90-14* 在叶上的相对表达水平最高。此外,

BrHSP90-1 在各个组织中有明显差异表达, 表明 *BrHSP90-1* 可能在茎的生长发育中发挥了作用。

为了进一步分析白菜 HSP90 家族基因在温度胁迫下的表达情况, 将‘WS-1’分别在高温和低温胁迫下处理(图 7)。结果发现, 白菜中 HSP90 家族基因在经过温度胁迫处理后都有不同程度的上调, 而 *BrHSP90-3* 和 *BrHSP90-4* 在高温胁迫下超量表达, 说明 *BrHSP90-3* 和 *BrHSP90-4* 可能在响应高温胁迫时发挥调控作用。

2 讨论

植物响应温度胁迫对植物的生长发育具有重要的意义, 温度胁迫通常会改变生物体中相关基因的表达。当植物受到高温胁迫时, 一些蛋白质的合成受到抑制, 而热激蛋白的合成反而会被促进, 热激蛋白可提高植物细胞的应激能力, 尤其是耐热能力。HSP90 是一种进化上高度保守的多效分子伴侣, 在

植物生长发育过程中起着重要的作用。据报道, *HSP90* 基因参与激酶和转录因子折叠、应激信号转导和 DNA 修复。它们在维持和调节细胞内蛋白质的构象和功能方面起着重要的作用(Ticha et al., 2020)。HSP90 已经在许多植物物种中被鉴定, 然而, 关于白菜中 HSP90 的研究很少。在这里, 本文重点对白菜 *HSP90* 基因进行相关分析。

本研究利用生物信息学的方法在白菜中共分离和鉴定 14 个 *HSP90* 基因, 与前人在水稻(Hu et al., 2009)、拟南芥(Krishna and Gloor, 2001)和大豆(*Glycine max*) (Xu et al., 2013)中分别鉴定出 9 个、7 个和 12 个 HSP90 基因相比, 白菜中 HSP90 基因家族最多, 共有 14 个。这些 HSP90 家族基因在白菜的环境适应性发挥着关键的作用, 使其能够在高温胁迫等应激环境中生存。在本研究中, 白菜 HSP90 的等电点范围为 4.93~5.65, 蛋白均呈酸性, 这与已经报道的拟南芥(Krishna and Gloor, 2001)、番茄(*Solanum lycopersicum*)

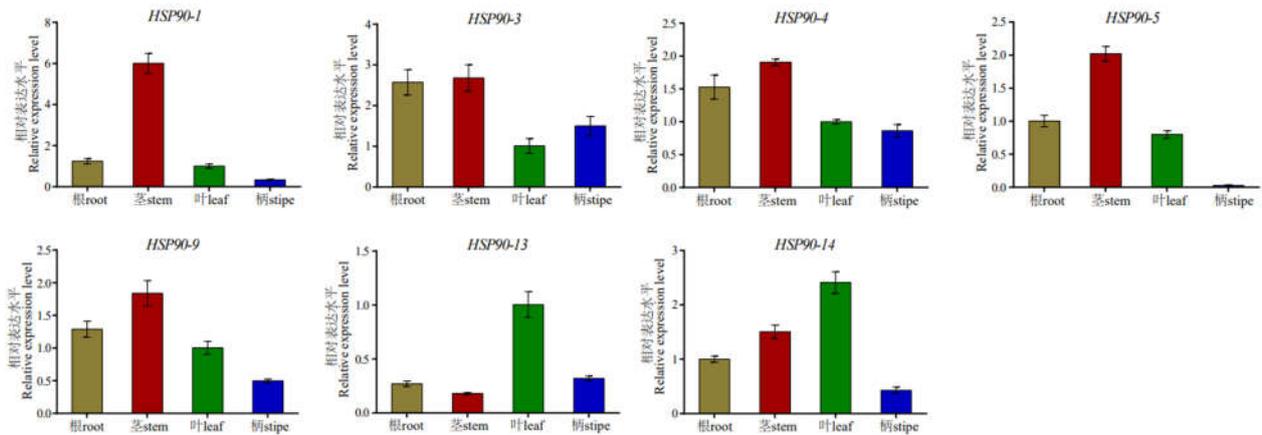


图 6 白菜 HSP90 基因在不同组织器官中的表达分析

Figure 6 Expression analysis of HSP90 gene family in various tissues and organs in *Brassica rapa*

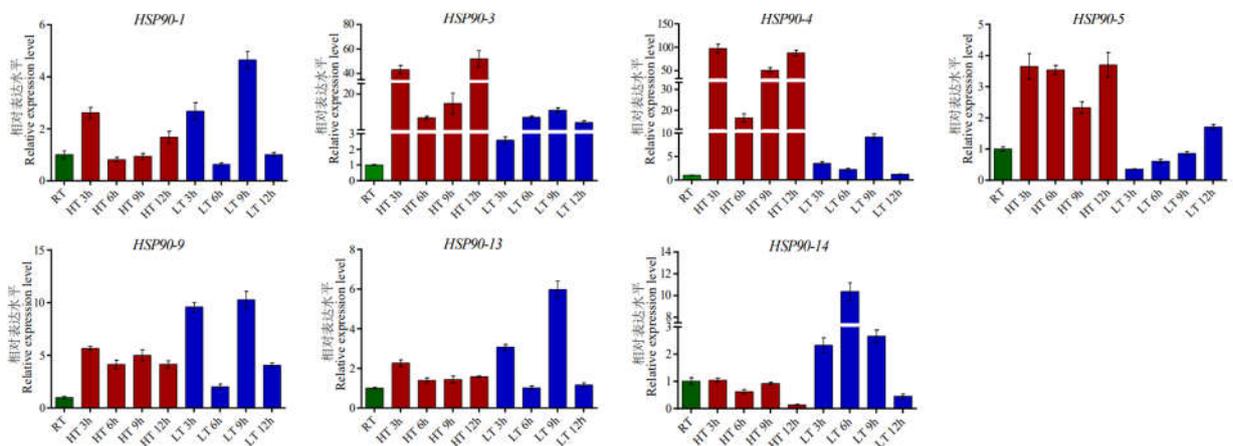


图 7 白菜 HSP90 基因家族在温度胁迫下的表达分析

Figure 7 Expression analysis of HSP90 gene family under temperature stress in *Brassica rapa*

(刘云飞等, 2014)和烟草(*Nicotiana tabacum* L.) (Song et al., 2019)的结果一致。通过分析白菜、黑芥、甘蓝和拟南芥系统进化树发现,一共分为5个簇,每簇中白菜与其他物种具有较高的同源性;簇2中HSP90基因家族成员数量最少,且每个物种仅一个基因,推测这4个物种可能在进化发育中产生了基因丢失事件。基因结构的多样性决定了它的功能(Skolnick and Fetrow, 2000),白菜14个HSP90家族基因具有数量不等的外显子与内含子,聚类分析发现亲缘关系相近的成员基因结构相似;启动子顺式作用元件发现,白菜HSP90家族基因在激素响应和抗逆性等方面可能发挥着一定的作用。

研究表明,HSP90基因参与了非生物胁迫的响应(Panaretou et al., 1998),对植物的抗逆、抗病和生长发育起着重要的作用(Sangster and Queitsch, 2005)。本研究分析了白菜HSP90家族基因在温度胁迫下的转录水平,发现大部分白菜HSP90家族基因在经过温度胁迫处理后与正常相比,均有显著性差异,这与已经报道的辣椒(*Capsicum annuum* L.) (王静等, 2020)和番茄结果一致,说明这些基因广泛参与对温度胁迫的响应。其中,*BrHSP90-1*、*BrHSP90-9*、*BrHSP90-13*和*BrHSP90-14*响应低温胁迫,推测这些基因可能在冷驯化中发挥着重要的作用,与已经报道的甘蓝型油菜(*Brassica napus*)的结果一致(Krishna et al., 1995);而*BrHSP90-3*、*BrHSP90-4*和*BrHSP90-5*则响应高温胁迫,则表明*BrHSP90-3*、*BrHSP90-4*和*BrHSP90-5*在热胁迫信号途径中可能发挥调节作用。本研究利用生物信息学的方法对白菜HSP90家族基因进行分析和预测,发现该基因家族在白菜中广泛响应温度胁迫,为进一步研究白菜HSP90基因的功能奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 白菜 HSP90 家族的全基因组鉴定

首先从白菜数据库(Wang et al., 2011) (<http://brassicadb.org/brad/>)下载白菜的全基因组蛋白序列文件及基因注释文件(V3.0),从Ensembl Plants网站(<http://plants.ensembl.org/index.html>)下载拟南芥、甘蓝和黑芥的全基因组蛋白序列文件及基因注释文件(V3.0);然后从Pfam(Finn et al., 2016)网站(<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1>)下载隐马尔科夫模型HSP90(PF00183),用其作为搜索模型,以 $E < 0.001$ 为搜索标准,利用HMMER(V3.2.1)软件构建本地蛋白

数据库并进行搜索。为防止遗漏,利用NCBI-CDD数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和SMART网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行结构域预测,剔除不含有HSP90家族蛋白结构域的序列。利用在线网站ExPASy-Compute pI/Mw tool (https://web.expasy.org/compute_pi/)对HSP90家基因家族的理化性质进行分析,最后利用WoLF PSORT网站(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)在线预测HSP90家族成员的亚细胞定位。

3.2 白菜 HSP90 家族基因结构分析及进化分析

利用在线网站MEME(Finn et al., 2016) (<http://meme-suite.org/tools/meme>)预测BrHSP90蛋白序列的保守基序,检索最大的motif数为10,其他均为默认参数,构建蛋白保守基序示意图。根据基因组注释文件利用TBtools(Chen et al., 2020)工具对基因的结构进行可视化。通过MEGA 7.0软件比对拟南芥和芸薹属白菜、甘蓝和黑芥的4个物种共49条HSP90蛋白序列,并采用邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树,从而分析白菜HSP90与其他物种HSP90的进化关系。

3.3 白菜 HSP90 的染色体定位及同源基因分析

利用TBtools工具根据基因组的注释信息将白菜HSP90基因家族成员定位到染色体上,通过拟南芥和芸薹属白菜、甘蓝和黑芥的基因组所有蛋白序列的自身比对,利用MC ScanX获取物种间的共线性关系,并利用TBtools工具进行可视化。

3.4 白菜 HSP90 家族顺式作用元件分析

利用TBtools工具提取HSP90基因转录起始上游2000 bp长度的序列作为其启动子区,并在PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)上对BrHSP90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。

3.5 白菜 HSP90 家族的表达模式分析

本试验材料‘WS-1’是安徽农业大学蔬菜育种团队通过人工授粉多代自交获得的高代自交系(Yuan et al., 2019)。将‘WS-1’种子播于穴盘中,20 d后,幼苗长出4~5片真叶,随机分为3组,每组50株。进行高温(40℃/30℃)、低温(3℃/8℃)和常温(25℃/18℃)处理。分别取处理0、3、6、9、12 h的叶片及正常生长的根、茎、叶和柄进行液氮速冻。RNA提取及

cDNA 第 1 链的合成均采用试剂盒(宝日医生物技术有限公司, 北京), 按照说明书进行操作, 并用凝胶电泳进行检测。利用 Oligo 7.0 将白菜 HSP90 家族基因的 CDS 序列进行引物设计并合成(表 3)。

作者贡献

袁凌云和吴颖是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 吴颖完成数据分析和论文初稿的写作; 张利婷, 郑禹杉和聂立兵参与实验设计和试验结果分析; 张胜男, 蓝天和赵阳协助完成实验。朱世东, 侯金峰, 陈国户, 唐小燕和汪承刚指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31701910)、安徽省重点研究和开发计划(201904a06020057)和安徽省学术和技术带头人后备人项目(2018H181)共同资助。

参考文献

Chen C.J., Chen H., Zhang Y., Thomas H.R., Frank M.H., He Y.H., and Xia R., 2020, TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant.*, 13(8): 1194-1202.

Finn R.D., Coggill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Mistry J., Mitchell A.L., Potter S.C., Punta M., Qureshi M., San-

grador-Vegas A., Salazar G.A., Tate J., and Bateman A., 2016, The Pfam protein families database: towards a more sustainable future, *Nucleic Acids Res.*, 44 (D1): D279-D285.

Hu W., Hu G., and Han B., 2009, 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, *Plant science*, 176(4): 583-590.

Krishna P., and Gloor G., 2001, The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Cell Stress and Chaperones*, 6(3): 238-246.

Krishna P., Sacco M., Cherutti J.F., and Hill S., 1995, Cold-Induced Accumulation of hsp90 Transcripts in *Brassica napus*, *Plant physiology*, 107(3): 915-923.

Liu Y., Wan H., Yang Y., Wei Y., Li Z., Ye Q., Wang R., Ruan M., Yao Z., and Zhou G., 2014, Genome-wide identification and analysis of heat shock protein 90 in tomato, *Hereditas*, 36(10): 1043-1052. (刘云飞, 万红建, 杨悦俭, 韦艳萍, 李志邈, 叶青静, 王荣青, 阮美颖, 姚祝平, 周国治, 2014, 番茄热激蛋白 90 的全基因组鉴定及分析, *遗传*, 36(10):1043-1052.)

Oh S.E., Yeung C., Babaei-Rad R., and Zhao R., 2014, Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone hsp90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*, *Bmc Research Notes*, 7(1): 643.

Panaretou B., Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J. E., Piper P.W., and Pearl L.H., 1998, ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo, *The EMBO journal*, 17(16):

表 3 白菜 HSP90 基因家族表达分析的实时荧光定量引物

Table3 qRT-PCR primers for expression analysis of HSP90 in *Brassica rapa*

基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)
Gene name	Primer sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)
BrHSP90-1	F:TAATGCGGAAGGTGATGT R:GCTGCTGTGTTGTTGAAG	54
BrHSP90-3	F:CCGTCGTGTCTTCATCAT R:TTGTTGTAGTCCTCCTTGTT	54.3
BrHSP90-4	F:ATCATCCCCGACAAGACCA R:GTCGGCAACCAAGTAAG	55.4
BrHSP90-5	F:ACTTGCTCACACTCACTTC R:ACTCCTCCTCGTTCTTGG	53.3
BrHSP90-9	F:CGCTGAAGGTGATGTTGA R:GCTGCTGTGTTGTTGAAG	54
BrHSP90-13	F:TGGTTGGTCGGCTAATATG R:GTTGCTTCACTGCTCTCA	52.7
BrHSP90-14	F:AGAAGTGCCTGGAGATGT R:CGAGTGGTAGCGAAGAAG	54

- 4829-4836.
- Picard D., 2002, Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation, *Cell Mol. Life Sci.*, 59(10): 1640-1648.
- Sangster T.A., and Queitsch C., 2005, The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity, *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1): 86-92.
- Skolnick J., and Fetrow J.S., 2000, From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era, *Trends in Biotechnology*, 18(1): 34-39.
- Song Z.P., Pan F.L., Yang C., Jia H.F., Jiang H.L., He F., Li N.J., Lu X.C., and Zhang H.Y., 2019, Genome-wide identification and expression analysis of HSP90 gene family in *Nicotiana tabacum*, *BMC Genet.*, 20: 12.
- Ticha T., Samakovli D., Kucharova A., Vavrdova T., and Samaj J., 2020, Multifaceted roles of HEAT SHOCK PROTEIN 90 molecular chaperones in plant development, *J Exp Bot.*, 71(14): 3966-3985.
- Wang J., Tan F.J., Liang C.L., Zhang X.L., Ou L.J., Juntawong N., Wang F., Jiao C.H., Zhou X.X., and Chen W.C., 2020, Genome-wide identification and analysis of HSP90 gene family in pepper, *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(4): 665-674. (王静, 谭放军, 梁成亮, 张西露, 欧立军, Juntawong N., 王飞, 焦春海, 邹学校, 陈文超, 2020, 辣椒热激蛋白 HSP90 家族基因鉴定及分析, *园艺学报*, (4): 665-674.)
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., and Altman A., 2004, Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, *Trends in plant science*, 9(5): 244-252.
- Wang X.W., Wang H.Z., Wang J., Sun R.F., Wu J., Liu S.Y., Bai Y.Q., Mun J.H., Bancroft I., Cheng F., 2011, The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*, *Nature Genet.*, 43(10): 1035-U1157.
- Xu J.Y., Xue C.C., Xue D., Zhao J.M., Gai J.Y., Guo N., and Xing H., 2013, Overexpression of GmHsp90s, a Heat Shock Protein 90 (Hsp90) gene family cloning from Soybean, Decrease damage of abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS One*, 8(7): 14.
- Yuan L., Wang J., Xie S., Zhao M., and Wang C., 2019, Comparative proteomics indicates that redox homeostasis is involved in high- and low-temperature stress tolerance in a novel Wucai (*Brassica campestris* L.) Genotype, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15): 3760.
- Zuehlke A., and Johnson J.L., 2010, Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins, *Biopolymers*, 93(3): 211-217.