

引用格式: 凡超, 杨杰, 陈蓉, 等. 荔枝 VQ 基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2024, 44(5): 0739-0750. [FAN C, YANG J, CHEN R, et al. Identification of the VQ gene family and their responses to abiotic stresses in *Litchi chinensis*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(5): 0739-0750.] DOI:10.7606/j.issn.1000-4025.20230629

荔枝 VQ 基因家族鉴定及其对非生物胁迫的响应

凡超, 杨杰, 陈蓉, 刘伟, 向旭*

(广东省农业科学院 果树研究所, 农业农村部亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 广州 510640)

摘要 【目的】VQ 蛋白是一类含有保守 VQ 基序(FxxhVQxhTG)的植物特异性蛋白, 在植物生长发育和非生物胁迫应答中发挥重要作用。研究鉴定了荔枝 VQ 基因家族, 并分析其在不同组织的表达模式及在低温、高温、干旱和盐胁迫下的应答, 为后续研究其抗逆机制奠定了基础。【方法】用生物信息学方法在荔枝全基因组中鉴定 LcVQ 基因, 并对其理化性质、亚细胞定位、基因结构和保守基序等进行分析; 用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树, 分析荔枝、拟南芥和水稻 VQ 蛋白的系统发育关系; 用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术验证 LcVQs 对多种非生物胁迫的响应情况。【结果】荔枝中共鉴定获得可聚类为 9 个亚族的 18 个 VQ 基因(LcVQ1-18), 依次分布在荔枝的 11 条染色体上, 其编码蛋白的氨基酸数介于 111~427 之间, 分子质量为 12.48~45.49 kD; 除 LcVQ15 和 LcVQ17 定位于细胞质之外, 其余 LcVQ 蛋白均定位于细胞核。LcVQs 启动子区域包含大量植物生长发育响应元件、激素响应元件及逆境响应元件。LcVQs 的表达量在不同组织中具有明显差异, 总体上分为普遍性表达和特异性表达。LcVQs 可快速响应非生物胁迫, 在低温、高温、干旱和盐胁迫处理 3 h 内分别有 4, 3, 3, 4 个 LcVQs 明显上调表达。【结论】荔枝全基因组中有 18 个 VQ 家族成员, 具有典型 VQ 保守结构域, 能差异化响应多种非生物胁迫。

关键词 荔枝; VQ 基因家族; 生物信息学; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号 Q943.2; Q786; S667.1 **文献标志码** A

Identification of the VQ gene family and their responses to abiotic stresses in *Litchi chinensis*

FAN Chao, YANG Jie, CHEN Rong, LIU Wei, XIANG Xu*

(Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Guangzhou 510640, China)

Abstract [Objective] VQ proteins are plant-specific proteins with the conserved VQ motifs (FxxhVQxhTG), which play an important role in plant growth and development as well as in response to abiotic stresses. The role of the VQ gene family in litchi (*Litchi chinensis*) had not been systematically studied.

收稿日期: 2023-10-10; 修改稿收到日期: 2023-12-18

基金项目: 乡村振兴战略专项资金(农业科技能力提升)项目(2023TS-2-3); 茂名市科技计划项目(2022DZXHT058); 汕尾市科技计划项目(2022A003)

作者简介: 凡超(1981—), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事荔枝逆境生理与分子生物学研究。E-mail: gdfanchao@163.com

* 通信作者: 向旭, 博士, 研究员, 主要从事栽培生理与分子生物学研究。E-mail: xiangxu@vip.163.com

We identified the *LcVQ* gene family members as well as their expression patterns in different tissues of lychee and their responses to abiotic stresses. This laid a foundation for studying its stress-resistant mechanism. [Methods] The sequences of *LcVQ* genes were obtained from the *L. chinensis* genome using bioinformatics methods, and their physicochemical properties, subcellular localizations, gene structures, and conserved motifs were analyzed; a phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0 to analyze the phylogenetic relationships of the VQ proteins in *L. chinensis*, *Arabidopsis*, and *Oryza sativa*; the responses to various abiotic stresses were verified by the quantitative real-time PCR (qRT-PCR). [Results] A total of 18 *LcVQ* genes were identified from *L. chinensis* genome, named as *LcVQ1-18*, which were clustered into 9 subgroups. They were widely distributed on 11 of 15 chromosomes of lychee. The amino acid numbers of *LcVQ* proteins were ranged from 111 to 427, and molecular weights from 12.48 kD to 45.49 kD. Subcellular localizations showed that except for *LcVQ15* and *LcVQ17* were localized at the cytoplasm, all other *LcVQ* proteins were localized at the nucleus. The *LcVQ* promoters contained a large number of growth and development, plant hormone, and stress-responsiveness related response elements. The *LcVQ* genes expression was varied at different tissues, which was divided into universal expression and specific expression. Under the treatment of low temperature, high temperature, drought, and salt stress, we found that 4, 3, 3, and 4 *LcVQ* genes were significantly up-regulated at 3 hours of treatment, respectively, indicating that these genes could respond to the abiotic stresses. [Conclusion] There are 18 VQ members in the *L. chinensis* genome with typical VQ binding domains and participate in different stress responses.

Key words *Litchi chinensis*; VQ gene family; bioinformatics; abiotic stress; expression analysis

荔枝(*Litchi chinensis*)为无患子科(Sapindaceae)多年生常绿果树,主要分布于北纬 $18^{\circ}-29^{\circ}$,是中国亚热带地区一种重要水果,具有极高的食用价值和经济效益^[1]。然而,荔枝对栽培条件要求较高,易受低温、高温和干旱等非生物胁迫的影响^[2]。因此,解析荔枝抗逆性分子机制对荔枝产量、品质及抗性的遗传改良有着重要意义,可极大促进荔枝产业的健康生产。VQ蛋白是一类能与WRKY转录因子和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)互作的辅助蛋白,以基因家族的形式广泛存在于单、双子叶植物中^[3]。该家族成员因具有高度保守的VQ基序(FxxhVQxhTG)而得名,其中,h代表疏水性氨基酸,x为任一氨基酸^[4]。

自2002年鉴定获得第1个VQ蛋白^[5],迄今已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[6]、水稻(*Oryza sativa*)^[7]、芜菁(*Brassica rapa*)^[8]、大豆(*Glycine soja*)^[9]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[10]等植物中鉴定到VQ基因家族,并对其家族成员调控植物抗逆相关功能进行了深入研究。在拟南芥中,AtVQ9蛋白与WRKY8转录因子相互作用,维持WRKY8介导信号通路的平衡,以参与盐胁迫反应的负调控^[11]; Kim等^[12]对水稻VQ家族成员在干旱胁迫处理后表达的研究中发现,有22个OsVQs的表达量上调,初步证实了OsVQs调控植株的干旱应激反应;在对芜菁VQ基因家族的研究中发现,包括干旱(PEG6000)、

高温(35°C)、低温(4°C)和盐害(NaCl)在内的非生物胁迫下,被检测的57个BrVQ家族成员中有43个BrVQs差异表达,且有44个BrVQs不同程度地响应包括赤霉素($200\ \mu\text{mol/L}$)、脱落酸($100\ \mu\text{mol/L}$)和水杨酸($200\ \mu\text{mol/L}$)在内的激素处理^[8];异位过表达大豆GmVQ47的转基因拟南芥植株增强了对高温(45°C)的敏感性^[9];另外Ding等^[10]利用转基因技术将番茄的SIVQ6转入拟南芥并接受高温(45°C)处理后,发现转基因植株较对照具有更短的下胚轴和更低的存活率,这表明SIVQ6可负调控植株的耐热性。目前,关于荔枝VQ家族成员的序列特征以及是否响应非生物胁迫尚不清楚。

本研究基于荔枝基因组数据,用生物信息学方法对荔枝VQ基因家族进行鉴定,系统分析染色体定位、基因结构、进化关系、顺式作用元件、基因复制及其在不同组织器官的表达模式等,并研究不同胁迫处理下的基因表达特征,以深入了解*LcVQ*家族,探究*LcVQ*家族成员参与多种非生物胁迫应答的可能性,为进一步解析*LcVQ*基因家族的功能奠定基础,亦为挖掘抗性基因和解析抗性机制提供新的科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选用国家果树种质广州荔枝资源圃1年生长势

良好的荔枝品种‘妃子笑’扦插苗,于营养盆(规格 26.5 cm×17.5 cm×21 cm,基质为沙性红土、泥炭土和椰糠丝,按体积比 3:1:1 混合,pH 值为 5.5~6.5)中进行胁迫处理。分别用(4.0±1.0)℃、(38.0±0.5)℃、20% PEG 和 400 mmol/L NaCl 溶液处理荔枝苗用于模拟低温、高温、干旱和盐胁迫条件,于光照 16 h/黑暗 8 h 的环境下培养 24 h。分别取 0,3,6,12,24 h 的嫩叶作为检测材料,液氮速冻后置于-80℃贮藏备用。设置 3 次生物学重复,每次重复随机选择 10 株幼苗。

1.2 方法

1.2.1 荔枝 VQ 家族成员的筛选和鉴定

以来自 Pfam 数据库(<http://pfam-legacy.xfam.org/search#tabview=tab2>)的 VQ 保守结构域(PF05678)隐马尔可夫模型(HMM)为参考,在荔枝基因组^[13]数据中通过 HMM 3.0 软件进行初步筛选,提取 $E < 1 \times 10^{-6}$ 的序列。结合 CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/?term=>)、InterPro 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)和 SMART 数据库(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对候选基因进行确证,剔除无 VQ 结构域蛋白和重复的序列,最终确定荔枝 VQ 基因家族成员,根据其在染色体上位置顺序进行命名。

1.2.2 荔枝 VQ 家族成员的蛋白基本特征分析

用 ExPASy ProtParam 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)对 LcVQ 基因家族编码的蛋白氨基酸数、分子质量、理论等电点、不稳定系数、脂溶指数和总平均疏水指数进行分析;用 HMMTOP 程序(<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>)分析 LcVQ 蛋白序列的跨膜结构;通过 PSORT 网站(<https://www.genscript.com/psort.html>)对 LcVQ 蛋白的亚细胞定位进行预测。

1.2.3 荔枝 VQ 家族成员的染色体定位和共线性分析

基于荔枝基因组的注释文件,用 TBtools 软件^[14]中的 Gene Locatin Visualize from GTF/GFF 插件确定荔枝染色体长度和 LcVQ 家族成员在染色体上位置,可视化 LcVQs 的染色体定位结果。

用 Advanced Circos 插件进行荔枝基因组内的共线性分析,预测 LcVQs 在进化过程中可能发生的复制事件。用 Dual Systemy Plot for McscanX 插件完成荔枝基因组与拟南芥(*A. thaliana*)、水稻(*O. sativa*)基因组间的共线性分析,筛选基因复制对信息。

1.2.4 荔枝 VQ 家族成员的基因结构和蛋白保守基序分析

以 LcVQs 的编码序列(coding sequence,CDS)和基因序列为输入文件,用 GSDS 2.0 服务器^[15]绘制基因结构图。以 LcVQs 的蛋白序列为输入文件,通过 MEME 工具(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)分析蛋白保守基序(motif),基序数为 10,其余参数为默认值,下载 MEME XML 文件,然后用 TBtools 软件的 Visualize Motif Pattern (from meme.xml/mast.xml)插件可视化保守基序分布结果。

1.2.5 荔枝 VQ 家族成员的进化分析

用 MEGA 6.0 软件的邻接法(NJ)构建荔枝、拟南芥和水稻的 VQ 蛋白进化树,设置自展值(Bootstrap)为 1 000 次,缺口为 pairwise deletion,置换模型为 P-distance,其他为默认参数。其中拟南芥 VQ 家族蛋白序列来自拟南芥基因组数据库(<https://www.arabidopsis.org/>),水稻 VQ 家族蛋白序列来自水稻基因组数据库(http://rice.plantbiology.msu.edu/downloads_gad.shtml),命名参照前人命名方式^[10]。

1.2.6 荔枝 VQ 家族成员的蛋白质二级结构和启动子顺式作用元件预测

用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线网站预测分析 LcVQ 家族的蛋白质二级结构。基于 LcVQs 起始密码子上游 2 000 bp 的序列,用 Plant CARE 工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测启动子顺式作用元件,用 Excel 统计分析数据,然后用 TBtools 软件中的 HeatMap 插件可视化启动子顺式作用元件预测的结果。

1.2.7 荔枝 VQ 家族成员的蛋白互作网络预测

用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)构建 LcVQ 家族的蛋白互作网络模型,物种参数为拟南芥,物种置信度为 0.40。

1.2.8 荔枝 VQ 家族成员的表达模式分析

从荔枝基因组数据库下载 RNA-seq 数据以研究 LcVQs 在荔枝根、叶、雄花、雌花、子房、果柄、果皮、假种皮和种子中的表达模式,将得到的 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments)值由 TBtools 软件中的 Heat-Map 插件可视化。红色代表基因表达量上调,蓝色则代表下调。

用植物总 RNA 试剂盒 (SIMGEN, 杭州) 提取荔枝叶片的总 RNA, 通过 NanoDrop-2000c 型微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, America) 检测总 RNA 的浓度和纯度, $OD_{260/280}$ 在 1.8~2.0 之间; 用 cDNA 第一链合成试剂盒 (SIMGEN, 杭州) 反转录合成 cDNA, 合成后的 cDNA 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。根据 *LcVQ* 家族成员的基因序列, 用 TBtools 中的 Batch q-PCR Primer Design 插件设计实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物 (表 1), 并在 Oligo 7.0 软件进行特异性验证, 以 *LcActin*^[16] 为内参基因, 由擎科生物科技有限公司 (广州) 合成。用 QuantStudio™ 3 Real-Time PCR 系统 (Thermo Fisher Scientific, America) 进行定量分析。反应体系 $10\text{ }\mu\text{L}$: $2\times$ SYBR Green PCR Mix (SIMGEN, 杭州) $5\text{ }\mu\text{L}$, 上下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 和 ddH_2O 各 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。每个样品进行 3 次技术重复, 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法^[17] 计算, 差异显著性 ($P < 0.05$) 结果用 DPS 9.01 软件进行分析, 基因表达情况通过 SigmaPlot 14.0 软件进行可视化。

表 1 实时荧光定量 PCR 中所用引物

Table 1 Primers used in quantitative real-time PCR

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')
<i>LcVQ3</i>	GTCCACGATGATCAGCCTCA	GCTGCAACATGCTCTCCC
<i>LcVQ5</i>	TCGCAGCCGAACCTCCAAC	ACGAGGAGGAGCCCTGTT
<i>LcVQ8</i>	TGCAGGTTTCAGAGCGTGG	CGCCTCCAGCATCATCCT
<i>LcVQ9</i>	TAGCCCCAACAGCAGCAC	GCCGACTCCGATCTGGTG
<i>LcVQ11</i>	CTGCCACCAACACGACCT	GGGGCGCCACTTTTCTCA
<i>LcVQ13</i>	AGCGGGGAGGCTAGTTGT	TGCACCCGGTTCTCTTCTG
<i>LcVQ14</i>	CTGGGACTCAGCTTGGCC	TGGTCTCAGTTGCTCCTCG
<i>LcVQ17</i>	AGTTCATGGGGCTGGTGC	CATAACCGCCGCTCCAT
<i>LcVQ18</i>	CGTGCACGAGAAGCCAGT	CCACCCGAATTGGCTCCA
<i>LcActin</i>	CAACTGGTATGTCTTGGATCTCTG	TCATCAAGGCATCGGTAGA

2 结果与分析

2.1 荔枝 VQ 家族成员鉴定和蛋白基本特征分析

通过对荔枝基因组的分析, 共鉴定获得 18 条 *LcVQs* 序列, 根据其在荔枝染色体上的分布依次命名为 *LcVQ1*—*LcVQ18* (表 2)。

表 2 荔枝 VQ 家族成员的蛋白基本理化性质

Table 2 Basic physicochemical properties of VQ family proteins in *L. chinensis*

基因 Gene	基因 ID Gene ID	氨基酸 数量 Numbers of amino acid	分子质量 Molecular mass /kD	pI	不稳定 指数 Instability index	脂溶 指数 Aliphatic index	总平均疏 水指数 Hydrophobicity index of grand average	跨膜结构域数目 Transmembrane domain number	亚细胞定位 Subcellular location
<i>LcVQ1</i>	LITCHI016862.m1	200	21.94	10.05	75.43	58.55	-0.778	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ2</i>	LITCHI013099.m1	247	26.85	9.58	63.03	58.06	-0.738	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ3</i>	LITCHI003601.m1	179	20.67	6.18	40.04	77.77	-0.649	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ4</i>	LITCHI008638.m1	159	17.86	4.60	27.01	61.38	-0.696	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ5</i>	LITCHI010476.m1	427	45.49	6.70	50.87	54.45	-0.613	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ6</i>	LITCHI010560.m1	327	35.30	10.03	91.91	57.03	-0.716	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ7</i>	LITCHI028392.m1	245	27.37	6.28	56.90	45.84	-0.845	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ8</i>	LITCHI028799.m1	111	12.48	6.73	41.65	66.67	-0.627	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ9</i>	LITCHI029182.m1	249	26.81	9.72	64.89	59.56	-0.760	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ10</i>	LITCHI023180.m1	253	27.48	6.42	59.32	43.16	-0.976	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ11</i>	LITCHI007091.m1	177	19.51	9.55	69.94	77.12	-0.329	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ12</i>	LITCHI019832.m1	158	17.71	7.92	48.33	54.30	-0.770	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ13</i>	LITCHI020142.m1	204	23.25	5.11	57.49	75.93	-0.681	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ14</i>	LITCHI020421.m1	335	36.40	10.81	88.93	62.03	-0.688	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ15</i>	LITCHI004322.m1	129	14.66	7.87	40.08	73.33	-0.547	0	细胞质 Cytoplasm
<i>LcVQ16</i>	LITCHI005555.m1	188	20.65	9.55	54.01	59.68	-0.782	0	细胞核 Nucleus
<i>LcVQ17</i>	LITCHI019022.m1	138	15.00	9.33	63.27	74.06	-0.396	0	细胞质 Cytoplasm
<i>LcVQ18</i>	LITCHI019130.m1	170	19.53	8.89	62.39	72.82	-0.699	0	细胞核 Nucleus

对鉴定到的 18 个 LcVQ 蛋白进行理化性质分析发现, LcVQ 蛋白序列差异明显, 氨基酸序列长度在 111~427 aa 之间; 分子质量最大为 45.49 kD, 最小为 12.48 kD, 平均分子质量为 23.83 kD; 理论等电点介于 4.60~10.81 之间, 其中 38.89% 的 LcVQ 蛋白的等电点在 7.00 以下, 为酸性蛋白, 其余 LcVQ 蛋白的等电点均在碱性范围内, 为碱性蛋白; 18 个 LcVQ 蛋白的不稳定指数从 27.01~91.91 不等, 除 LcVQ4 蛋白外, 其余 LcVQ 蛋白的不稳定指数均大于 40, 即大部分 LcVQ 蛋白是不稳定存在的; 脂溶指数在 43.16~77.77 之间, 平均脂溶指数为 62.87; 总平均疏水指数均为负值, 为亲水蛋白;

各蛋白均不包含跨膜结构。亚细胞定位预测结果显示, LcVQ15 和 LcVQ17 定位在细胞质, 其余 16 个 LcVQ 蛋白定位在细胞核。

2.2 荔枝 VQ 家族成员的染色体定位和共线性分析

染色体定位结果显示 18 个 LcVQ 基因不均匀分布在 11 条染色体上 (Chr1、Chr2、Chr6、Chr7、Chr8、Chr9、Chr10、Chr11、Chr12、Chr14 和 Chr15) (图 1)。Chr9 和 Chr12 上 LcVQ 数量最多, 为 3 个; Chr8、Chr14 和 Chr15 上 LcVQ 数量次之, 为 2 个; Chr1、Chr2、Chr6、Chr7、Chr10 和 Chr11 上 LcVQ 数量最少, 为 1 个。

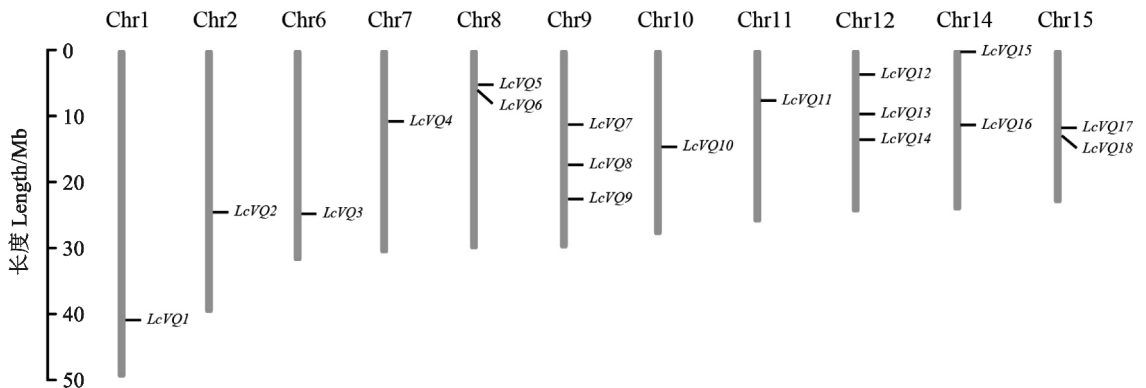


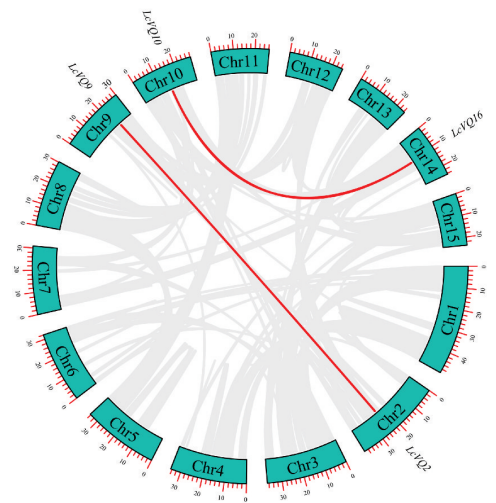
图 1 荔枝 VQ 家族成员在染色体上的位置

Fig. 1 Chromosome location of VQ family members in *L. chinensis*

总的来看, 染色体上长度与其上定位的 LcVQs 数量无正相关关系。此外, 同一染色体上定位的 LcVQs 在进化分析中大多不能聚类为同一亚族, 暗示同一染色体上定位的不同 LcVQs 可能行使不同的功能。

为探究 LcVQ 基因家族成员的进化机制, 对荔枝基因组间可能发生的基因复制事件进行分析。结果(图 2)显示, LcVQ 基因家族内未发生串联重复复制事件, 但 18 个 LcVQs 间存在 2 对片段复制基因: LcVQ2-LcVQ9 和 LcVQ10-LcVQ16, 提示某些 LcVQs 可能是由基因复制产生的, 表明基因复制事件在 LcVQs 数量扩张中发挥一定作用。

为进一步探究 VQ 基因家族在不同物种间的进化机制, 对荔枝、拟南芥和水稻 VQ 家族的复制事件进行分析。结果(图 3)显示, 荔枝与拟南芥之间存在 16 对共线基因, 而荔枝与水稻之间无共线基因对存在, 对比 3 个物种 VQ 家族成员的共线性发现, 荔枝与拟南芥 VQ 基因的共线性显著高于自身和水稻。



Chr1-Chr15 为荔枝 15 条染色体; 0-40 为染色体长度, 单位为 Mb; 红色线连接基因为共线性基因。下同。

图 2 荔枝 VQ 家族成员的共线性分析

Chr1-Chr15 represent fifteen *L. chinensis* chromosomes.

0-40 represent chromosome length, the unit is Mb.

The genes connected by red lines have a collinear relationship.

The same as below.

Fig. 2 Collinear distributions of VQ family members in *L. chinensis*

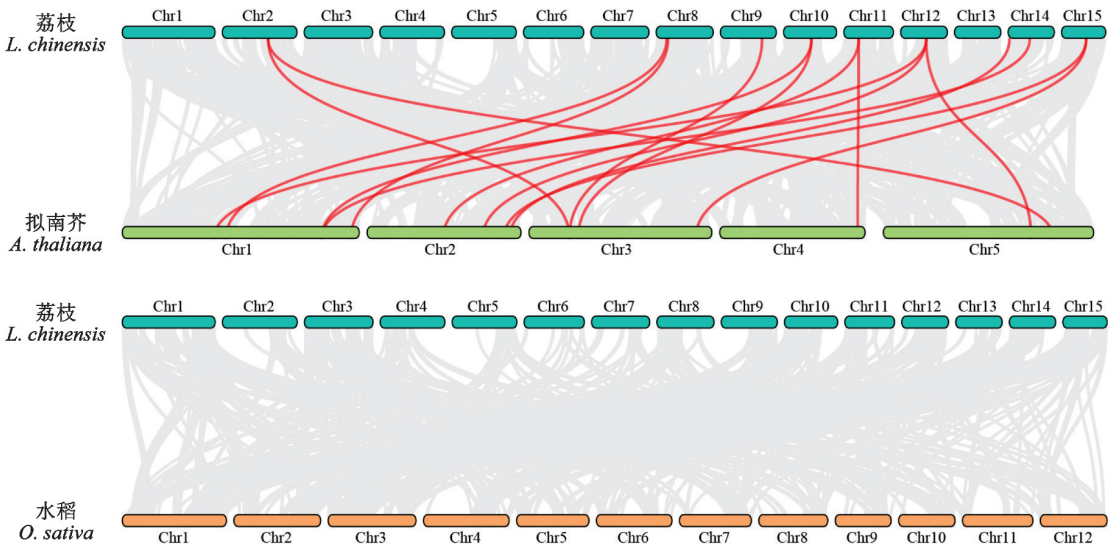


图 3 荔枝、拟南芥和水稻 VQ 家族成员的同源性分析

Fig. 3 Synteny analysis of VQ family members among *L. chinensis*, *A. thaliana*, and *O. sativa*

2.3 荔枝 VQ 家族成员的基因结构和蛋白保守基序分析

对 *LcVQ* 家族成员的基因结构进行分析,结果(图 4,A)显示,18 个 *LcVQs* 的基因序列全长介于 614~3 575 bp 之间,且分别含有数量与长度不等的外显子和内含子;除 *LcVQ3*、*LcVQ13* 和 *LcVQ15* 之外,其他 *LcVQs* 均呈现以非编码区(UTR)开头和结尾的特殊结构;除 *LcVQ3* 含有 3 个外显子和 2 个内含子、*LcVQ9* 和 *LcVQ15* 含有 2 个外显子和 1 个内含子之外,其他 *LcVQs* 均只含有 1 个外显子和表明 *LcVQ3*、*LcVQ9* 和 *LcVQ15* 在进化的过程中可能获得了外显子;系统进化树中同属一个亚族的 *LcVQs* 通常具有相似的基因结构,如 C、D 和 J 亚族中的任一 *LcVQs* 均含有与同亚族内其他基因位置相近的外显子。

为进一步研究荔枝 VQ 家族成员的结构特征,对 18 个 *LcVQs* 的蛋白保守基序进行分析。结果(图 4,B)显示,10 类保守基序不均匀分布在 18 个 *LcVQ* 蛋白序列上,保守基序长度介于 6~26 aa 之间(表 3);所有 *LcVQ* 蛋白均表现出保守基序的缺失,但每个 *LcVQ* 蛋白都含有 motif 1,即 VQ 基序;*LcVQ6* 蛋白的保守基序排列较为特殊,发生了 motif 9 的 3 次串联重复。

总的来看,系统进化树中同一亚族 *LcVQ* 蛋白的保守基序数量、类型和位置相似,如 *LcVQ2*/*LcVQ9*、*LcVQ15*/*LcVQ18* 和 *LcVQ16*/*LcVQ17*;但同一亚族中不同的 *LcVQ* 蛋白含有的保守基序数量也存在差异,如 *LcVQ1* 的基序数量相比同一亚族的其他成员有所增加,推测其可能是基因在串联重复过程中发生碱基的增加。

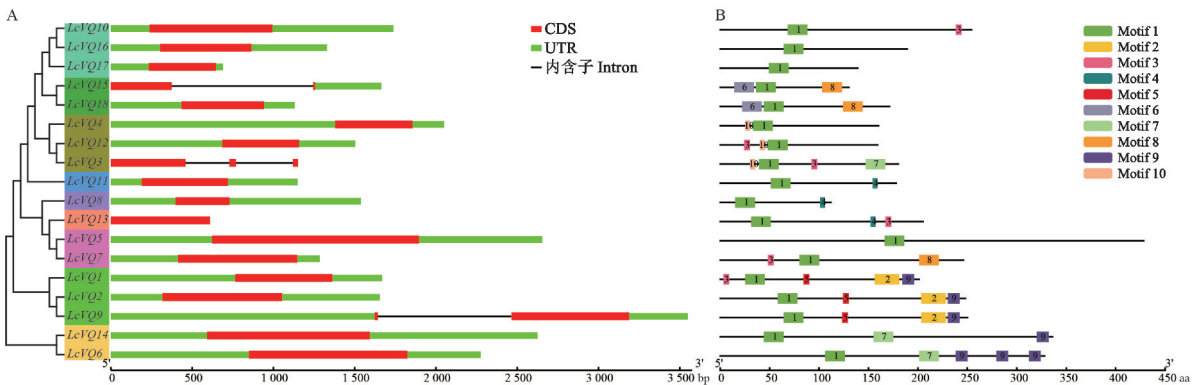


图 4 荔枝 VQ 家族成员的基因结构(A)和保守基序(B)

Fig. 4 Gene structures (A) and conserved motifs (B) of VQ family members in *L. chinensis*

表 3 荔枝 VQ 家族成员的蛋白保守基序

Table 3 Conserved motifs of proteins from VQ family members in *L. chinensis*

基序 Motif	长度 Length of motif/aa	氨基酸保守基序 Conserved sequence of amino acid
Motif 1	21	PTVVQTDTSBFRALVQELTGK
Motif 2	26	EEEKAI AEKGFYLHPSJPJSTPRDAEP
Motif 3	7	HHHHHHQ
Motif 4	6	WDWCAY
Motif 5	7	FKLYERR
Motif 6	21	MHKKSQ LISKDKPKIRIIHIF
Motif 7	21	WDPAPVAVAESPISAYMRDLQ
Motif 8	21	MGTGANSNGNFDLGFYDFDGF
Motif 9	13	LLPLFPLTSPRWS
Motif 10	6	IKVYVI

2.4 荔枝 VQ 家族成员的进化分析

为明确物种间 VQ 基因的进化关系,将荔枝、拟南芥和水稻的 VQ 蛋白序列合并构建系统进化树。结果(图 5)显示,不同植物 VQ 基因分为 10 个亚族(A—J),18 个 *LcVQs* 分布在除 A 亚族之外的 9 个亚族中。其中荔枝 VQ 基因家族成员主要集中在 B、G 和 J 亚族中,包括 *LcVQ1*、*LcVQ2*、*LcVQ3*、*LcVQ4*、*LcVQ9*、*LcVQ10*、*LcVQ12*、*LcVQ16* 和 *LcVQ17*; C、D 和 I 亚族各含 2 个 *LcVQ* 基因,包括 *LcVQ5*、*LcVQ6*、*LcVQ7*、*LcVQ14*、*LcVQ15* 和 *LcVQ18*; 而 E、F 和 H 亚族各仅含 1 个 *LcVQ* 基因,包括 *LcVQ8*、*LcVQ11* 和 *LcVQ13*。

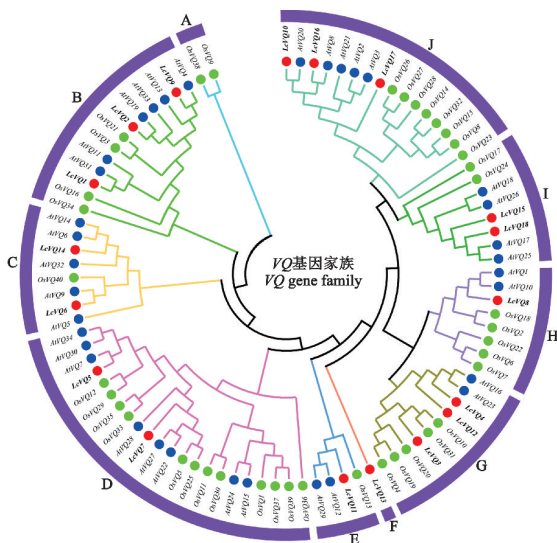


图 5 荔枝、拟南芥和水稻 VQ 家族成员的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of VQ family members among *L. chinensis*, *A. thaliana*, and *O. sativa*

3 种植物中 VQ 基因数量差异较大,双子叶植物荔枝和拟南芥比单子叶植物水稻更易聚在一起,与单、双子叶植物的进化关系一致,暗示 VQ 基因在单、双子叶植物分化后发生了进化上的分歧。

2.5 荔枝 VQ 家族成员的蛋白质二级结构预测

对 *LcVQ* 蛋白的二级结构进行分析,结果如表 4 所示,18 个 *LcVQ* 蛋白的二级结构均存在 α -螺旋、延伸链、 β -折叠和无规则卷曲现象。在 4 种现象中,无规则卷曲占比最高的 *LcVQ* 蛋白为 15 个, α -螺旋占比最高的为 3 个。其中 10 个 *LcVQ* 蛋白(*LcVQ1*、*LcVQ6*、*LcVQ8*、*LcVQ9*、*LcVQ11*、*LcVQ12*、*LcVQ13*、*LcVQ14*、*LcVQ16* 和 *LcVQ18*)二级结构的比例表现为无规则卷曲 $>$ α -螺旋 $>$ 延伸链 $>$ β -折叠; 4 个 *LcVQ* 蛋白(*LcVQ2*、*LcVQ5*、*LcVQ10* 和 *LcVQ17*)二级结构的比例表现为无规则卷曲 $>$ 延伸链 $>$ α -螺旋 $>$ β -折叠; 2 个 *LcVQ* 蛋白(*LcVQ3* 和 *LcVQ15*)二级结构的比例表现为 α -螺旋 $>$ 无规则卷曲 $>$ 延伸链 $>$ β -折叠; *LcVQ4* 二级结构的比例表现为 α -螺旋 $>$ 无规则卷曲 $>$ β -折叠 $>$ 延伸链; *LcVQ7* 二级结构的比例表现为无规则卷曲 $>$ α -螺旋 = 延伸链 $>$ β -折叠。这些结果说明 *LcVQs* 具有复杂的蛋白质结构,暗示其功能的多样性。

表 4 荔枝 VQ 家族成员的蛋白质二级结构

Table 4 Secondary structures of proteins from VQ family members in *L. chinensis*

蛋白 Protein	α -螺旋 Alpha helix/%	延伸链 Extended strand/%	β -折叠 Beta sheet/%	无规则卷曲 Random coil/%
<i>LcVQ1</i>	13.00	12.50	2.00	72.50
<i>LcVQ2</i>	10.93	11.34	1.62	76.11
<i>LcVQ3</i>	41.90	18.44	8.94	30.73
<i>LcVQ4</i>	45.91	5.03	7.00	42.77
<i>LcVQ5</i>	7.96	9.60	1.17	81.26
<i>LcVQ6</i>	10.09	3.67	1.22	85.02
<i>LcVQ7</i>	20.82	20.82	9.39	48.98
<i>LcVQ8</i>	29.73	16.22	3.60	50.45
<i>LcVQ9</i>	10.04	8.84	1.20	79.92
<i>LcVQ10</i>	8.70	12.65	1.98	76.68
<i>LcVQ11</i>	29.38	5.08	0.56	64.97
<i>LcVQ12</i>	25.95	12.66	6.96	54.43
<i>LcVQ13</i>	28.43	6.86	2.94	61.76
<i>LcVQ14</i>	8.66	3.58	1.49	86.27
<i>LcVQ15</i>	41.09	13.18	9.30	36.43
<i>LcVQ16</i>	11.17	10.64	1.06	77.13
<i>LcVQ17</i>	16.67	21.01	2.90	59.42
<i>LcVQ18</i>	36.47	6.47	4.12	52.94

2.6 荔枝 VQ 家族成员的启动子顺式作用元件预测

对 *LcVQ* 家族成员的启动子顺式作用元件进行预测,结果(图 6)显示,18 个 *LcVQs* 的启动子区域共有 133 个顺式作用元件,主要分为 3 类:植物生长发育响应元件、激素响应元件和逆境响应元件。其中,植物生长发育响应元件预测到 10 种与光反应相关的元件(AE-box、G-Box、GATA-motif、Box 4、ATCT-motif、Sp1、TCCC-motif、I-box、GT1-motif、MRE)在 *LcVQs* 的启动子区域均有不同程度的分布,参与玉米醇溶蛋白代谢(O2-site)的元件数量为 7 个,调控分生组织(CAT-box)表达的元件数量为 4

个,调节昼夜节律(circadian)的元件数量为 2 个;激素响应元件预测到 5 种,茉莉酸甲酯响应元件(TGACG-motif、CGTCA-motif)数量最多,为 38 个,其次是脱落酸响应元件(ABRE),数量为 8 个,而生长素(TGA-element、AuxRR-core)、赤霉素(GARE-motif、P-box)和水杨酸(TCA-element)共 3 种响应元件的数量介于 5~6 个之间;逆境响应元件预测到 2 种,参与非生物胁迫(MBS、LTR、GC-motif)的元件数量最多,为 25 个,诱导厌氧反应(ARE)的元件数量最少,仅为 1 个。表明 *LcVQs* 的表达可能响应荔枝生长发育、激素诱导和逆境胁迫的刺激。

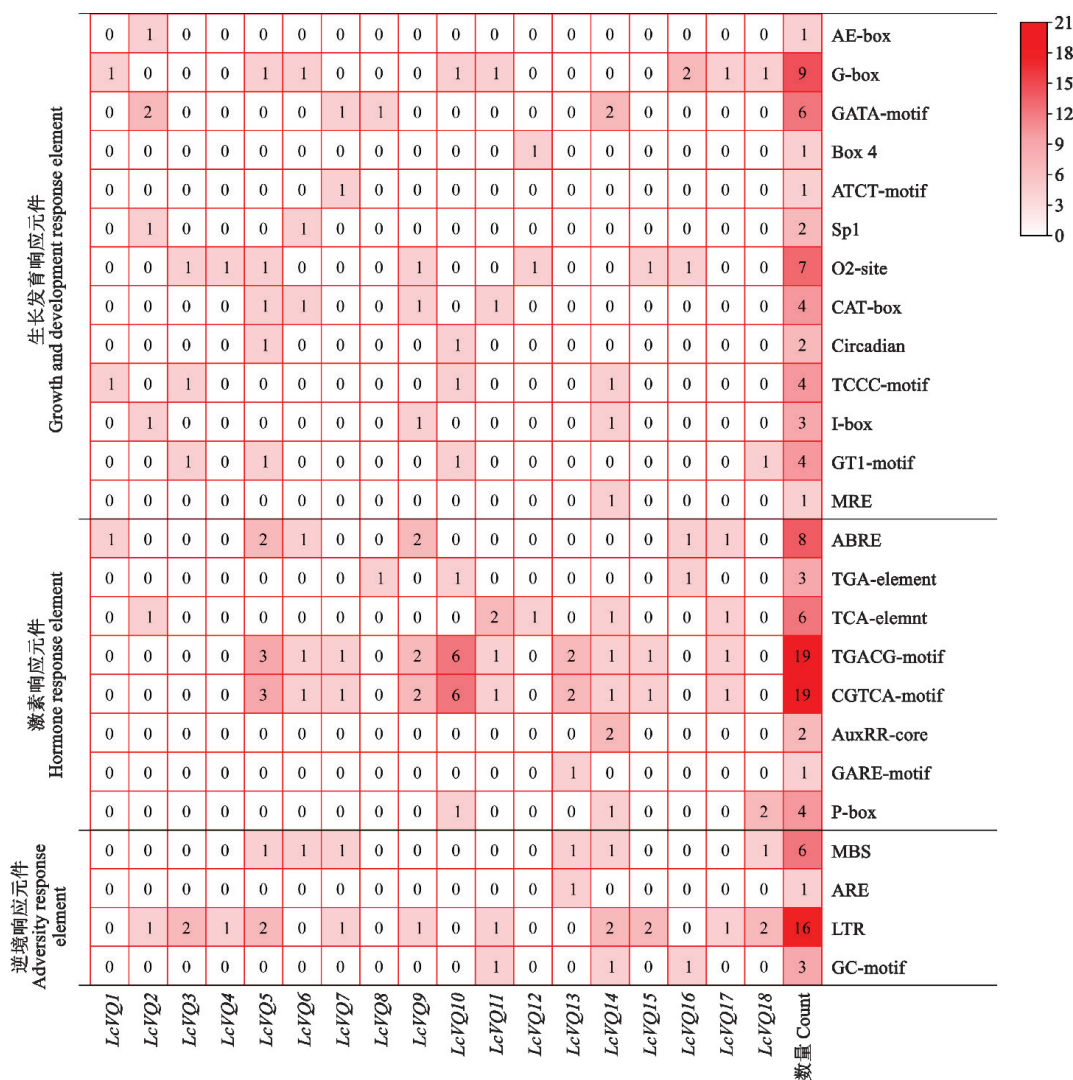


图 6 荔枝 VQ 家族成员的启动子顺式作用元件

Fig. 6 Cis-acting elements in promoters of VQ family members in *L. chinensis*

2.7 荔枝 VQ 家族成员的蛋白互作网络预测

用 STRING 数据库预测 *LcVQ* 家族的蛋白互

作网络发现(图 7), *LcVQ2*、*LcVQ4*、*LcVQ5*、*LcVQ6*、*LcVQ7*、*LcVQ8*、*LcVQ9*、*LcVQ11*、*LcVQ14*、*LcVQ15*、

LcVQ17 和 LcVQ18 共 12 个蛋白参与互动,存在 63 组互动关系,其中线条颜色越深,互动关系越强,线条颜色越浅,互动关系越弱。剩余的 6 个蛋白未发现在设定的参数下参与互动,暗示它们可能独立发挥调控作用。

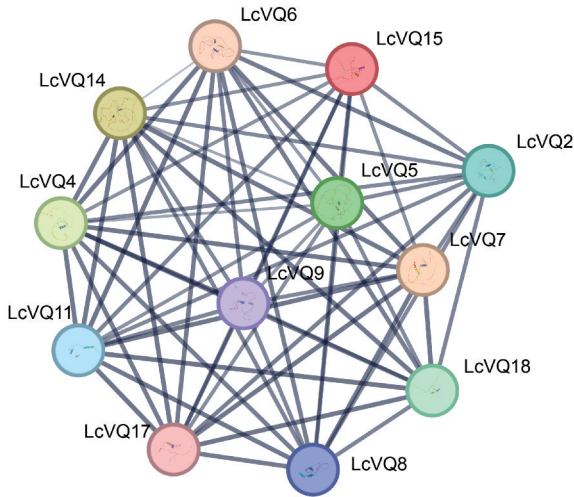


图 7 荔枝 VQ 家族成员的蛋白互动网络
Fig. 7 Protein-protein interaction networks of VQ family members in *L. chinensis*

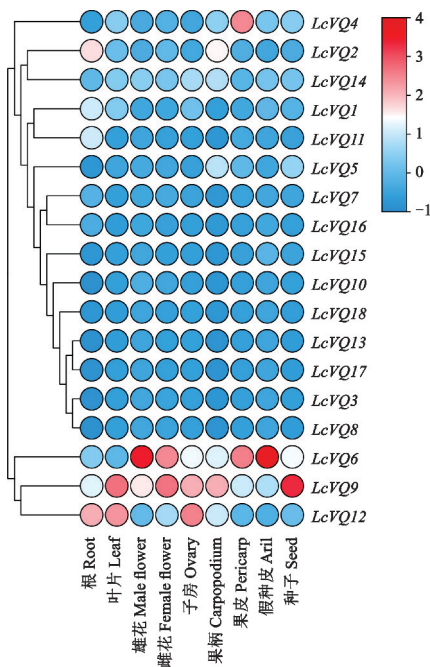


图 8 荔枝 VQ 家族成员在 9 个组织中的表达模式
Fig. 8 Expression patterns of VQ family members in nine tissues in *L. chinensis*

2.8 荔枝 VQ 家族成员在不同组织中的表达模式分析

基于荔枝基因组数据库中的 RNA-seq 数据,对

LcVQ 家族成员的组织特异性表达模式进行分析。结果(图 8)显示,LcVQs 在荔枝不同组织中有明显表达差异。

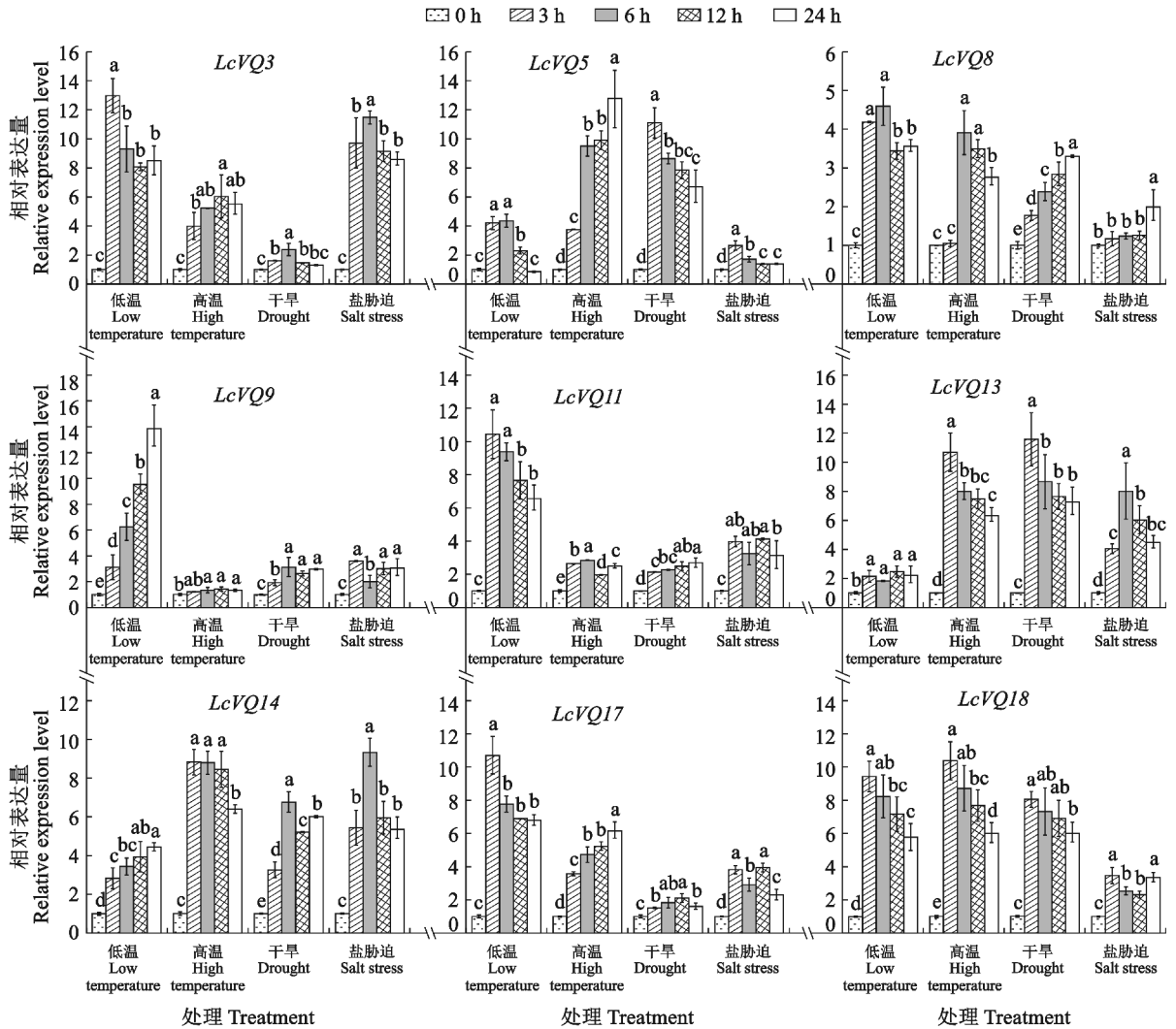
其中,在根中高表达的基因数量最多,达到 10 个,聚类到 G 亚族的 LcVQ12 表达丰度最高;在果皮中高表达的基因有 9 个,表达丰度最高的为 LcVQ6,属于 C 亚族;在叶和种子中高表达的基因均为 8 个,表达丰度最高的均为 LcVQ9,属于 B 亚族;在子房和果柄中高表达的基因均为 7 个,表达丰度最高的基因分别为 LcVQ12 和 LcVQ9;在假种皮中高表达的基因为 6 个,表达丰度最高的为 LcVQ6;在雌花中高表达的基因为 5 个,表达丰度最高的为 LcVQ9;在雄花中高表达的基因数量最少,仅为 4 个,表达丰度最高的为 LcVQ6。该结果说明 LcVQs 在荔枝生长发育过程中发挥重要作用,且 LcVQ6、LcVQ9 和 LcVQ12 为主要调控基因。

2.9 荔枝 VQ 家族成员在低温、高温、干旱及盐胁迫下的表达模式分析

基于系统进化分析和启动子顺式作用元件预测的结果,从 9 亚族中各选择 1 个成员共计 9 个基因,用 qRT-PCR 技术分析其在低温、高温、干旱和盐胁迫处理下的表达情况。结果(图 9)显示,9 个 LcVQs 均可以检测到不同程度的表达。其中在低温胁迫下,4 个 LcVQs (LcVQ3、LcVQ11、LcVQ17 和 LcVQ18) 表达量在 3 h 显著升高并达到最高水平,是对照的 9.44~12.95 倍;而 LcVQ9 和 LcVQ14 表达量在 24 h 达到峰值,表明该基因还未结束对低温胁迫的响应,需进一步试验加以验证;此外,LcVQ5 表达量在 24 h 明显降低,仅为对照的 86.81%。

在高温胁迫下,与低温胁迫相似,多个 LcVQs (LcVQ13、LcVQ14 和 LcVQ18) 响应高温胁迫并在 3 h 达到最高水平后呈现下降趋势;而 LcVQ5 和 LcVQ17 表达量在 24 h 达到峰值,分别是对照的 12.80 倍和 6.15 倍。

在干旱胁迫下,9 个 LcVQs 表达量均有不同程度升高,尤其是 LcVQ5、LcVQ13 和 LcVQ18 表达量在 3 h 显著升高,是对照的 8.05~11.58 倍,快速响应干旱胁迫;而 LcVQ8、LcVQ11 和 LcVQ17 表达量在 24 h 有所升高,相比对照,升高幅度不明显。在盐胁迫下,仅 LcVQ3、LcVQ13 和 LcVQ14 表达量在 6 h 达到最高,是对照的 8.00~11.48 倍;而其他基因表达量在不同时间段呈现升高趋势,但与对照相比,无显著差异。



误差线为标准误。不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上显著差异。

图 9 不同非生物胁迫对荔枝 VQ 家族成员表达的影响

Error bars were the standard errors. Different normal letters indicate significant differences at the 0.05 level.

Fig. 9 Effects of abiotic stress on the expression of VQ family members in *L. chinensis*

3 讨论

3.1 荔枝 VQ 家族成员的鉴定与结构分析

VQ 蛋白作为植物特异性的辅助蛋白,可与多种蛋白互作而调控植物生理生化过程^[18]。对荔枝中 VQ 基因家族的鉴定分析有助于了解 *LcVQs* 的结构和潜在功能。不同植物 VQ 基因家族成员数目不同,在荔枝基因组中鉴定出 18 个 VQ 家族成员,其数目与葡萄(*Vitis vinifera*)(18 个)^[19]一致,但明显少于番茄(26 个)^[10]、拟南芥(34 个)^[6]和 水稻(40 个)^[7],这种差异可能是由于远古时代植物基因组经历重复事件所致。亚细胞定位预测显示,16 个 *LcVQ* 蛋白定位于细胞核,2 个 *LcVQ* 蛋白定位于细胞质,说明 *LcVQ* 家族成员在不同位置行使其功能,与 Guo 等在茶树(*Camellia sinensis*)中 VQ 蛋

白的研究^[20]相似。无内含子是植物中大多数 VQ 基因的共同特征,拟南芥 VQ 家族中 30 个(88.24%)基因^[6],玉米(*Zea mays*)VQ 家族中 54 个(88.52%)基因^[21]和毛竹(*Phyllostachys edulis*)VQ 家族中 25 个(86.21%)基因^[22]无内含子。本研究表明除 *LcVQ3*、*LcVQ9* 和 *LcVQ15* 之外,其他 15 个(83.33%)*LcVQs* 均不含内含子,提示在 *LcVQ* 家族的进化过程中,大多数 *LcVQs* 丢了内含子。植物中大多数 VQ 蛋白的序列长度小于 300 aa^[23],在 *LcVQ* 家族中 15 个(83.33%)成员的蛋白序列长度均小于 300 aa,与前人的研究一致。

聚类在进化树同一分支的基因通常具有相似的基因结构^[24]。该研究根据进化关系将 *LcVQ* 基因家族划分为 9 个亚族(B-J),聚类在同一亚族的 *LcVQs* 具有相似的内含子/外显子结构;然而 B 亚

族中 *LcVQ9* 的内含子/外显子结构不同于 *LcVQ1* 和 *LcVQ2*, G 亚族中 *LcVQ3* 的内含子/外显子结构不同于 *LcVQ4* 和 *LcVQ12*, 说明个别基因 (*LcVQ3* 和 *LcVQ9*) 在进化过程中发生了内含子的增加。为进一步明确 *LcVQ* 家族成员的进化关系, 构建了荔枝、拟南芥和水稻 VQ 基因家族的进化树, 结果显示这些基因被划分为 10 个亚族, 其中 A 亚族只含有 *OsVQs*, 说明该亚族可能形成于单子叶植物和双子叶植物分化之后; *LcVQ13* 未与任一种 *AtVQs* 和 *OsVQs* 聚类在一起, 单独形成分支, 其进化关系有待进一步分析; 相对于单子叶植物水稻而言, 荔枝进化关系更接近于双子叶植物拟南芥, 推测荔枝和拟南芥这些双子叶植物可能起源于一个共同的祖先^[25]。

3.2 荔枝 VQ 家族成员在不同组织及非生物胁迫下的表达

同一植物不同 VQ 基因及不同植物 VQ 基因在不同组织的表达模式有显著差异。巨桉树 (*Eucalyptus grandis*) 中 *EgrVQ18* 主要在木质部、韧皮部和叶片中表达, 而 *EgrVQ4* 仅在根中高度表达^[26]; 黄瓜 (*Cucumis sativus*) 中与其他 *CsVQ* 基因相比, *CsVQ16-2* 和 *CsVQ24* 在根、茎、叶片、花朵、果皮和果肉共 6 种组织中的转录水平最高^[27]; 割手密 (*Saccharum spontaneum*) 中 *SsVQ37* 和 *SsVQ38* 在幼苗期的茎与叶片中高度表达, 而 *SsVQ73* 和 *SsVQ69* 在成熟阶段的茎与叶片中优势表达^[28]。与前人研究类似, 该研究组织表达模式分析结果表明 *LcVQs* 在各组织中表达模式具有明显差异, 如 *LcVQ1* 和 *LcVQ12* 在根、叶片和子房中的相对表达量显著高于其在雄花、雌花、果柄、果皮、假种皮以及种子中的表达, *LcVQ13* 仅在种子中表达, 而在其他组织中未检测到其表达。

研究表明, 顺式作用元件是决定植物启动子能否正确调控基因表达的关键^[29]。脱落酸、赤霉素和茉莉酸甲酯作为调节因子在植物适应非生物胁迫中

发挥重要作用^[30-31]。激素响应元件 (TGACG-motif, CGTCA-motif, ABRE, GARE-motif 和 P-box) 受到相应激素信号刺激, 可以调节相关基因的表达来响应逆境胁迫, 从而提高植物对不良环境的适应性^[32]。此外, MBS 响应元件与 LTR 响应元件也能在一定程度上降低干旱和低温对植物的影响^[33-34]。在荔枝 VQ 家族成员的启动子中预测到大量与植物激素和非生物胁迫相关的顺式作用元件, 其中茉莉酸甲酯响应元件、脱落酸响应元件、赤霉素响应元件、MBS 响应元件和 LTR 响应元件可能调控 *LcVQs* 的表达来应答低温、高温、干旱和盐胁迫。为进一步验证 *LcVQs* 在荔枝抗胁迫中的作用, 通过 qRT-PCR 技术分析不同非生物胁迫下 *LcVQs* 的表达模式, 发现多数 *LcVQs* (*LcVQ3*、*LcVQ5*、*LcVQ11*、*LcVQ13*、*LcVQ14*、*LcVQ17* 和 *LcVQ18*) 能够迅速响应低温胁迫、高温胁迫和干旱胁迫, 并在 3 h 达到最高水平后呈现不同程度的下降趋势。此外, *LcVQ3*、*LcVQ13* 和 *LcVQ14* 表达量在盐胁迫 12 h 才显著升高, 而黄瓜中的 *CsVQ19* 和 *CsVQ24* 在 3 h 就迅速响应盐胁迫^[27], 推测其可能是由于不同物种的 VQ 基因的调控机制存在差异。该研究初步证实 *LcVQ* 家族成员参与了荔枝对非生物胁迫的应答, 为荔枝抗性分子育种提供理论依据。

4 结 论

从荔枝基因组中鉴定获得 18 个 *LcVQs*, 其编码蛋白由 111~427 个氨基酸组成, 蛋白序列都具有高度保守的 VQ 基序。进化分析结果分为 9 个亚族 (B-J), 同一亚族成员具有相似的基因结构和保守基序。 *LcVQs* 具有一定的组织表达特异性, 部分基因对低温、高温、干旱及盐胁迫 4 种逆境有较为敏感的反应趋势, 表明该家族基因可能在荔枝对非生物胁迫的防御反应中起重要调控功能。

参考文献:

- [1] LI C Q, WANG Y, HUANG X M, et al. De novo assembly and characterization of fruit transcriptome in *Litchi chinensis* Sonn and analysis of differentially regulated genes in fruit in response to shading[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 552.
- [2] 白慧卿, 吴建国, 潘学标. 影响我国荔枝分布的关键气候要素分析[J]. *果树学报*, 2016, 33(4): 436-443.
BAI H Q, WU J G, PAN X B. Key climatic factors affecting the distribution of litchi in China[J]. *Journal of Fruit Science*, 2016, 33(4): 436-443.
- [3] MA J F, WANG R B, ZHAO H Y, et al. Genome-wide characterization of the VQ genes in Triticeae and their functional-

- ization driven by polyploidization and gene duplication events in wheat[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 243: 125264.
- [4] CHU W Y, LIU B, WANG Y J, et al. Genome-wide analysis of poplar VQ gene family and expression profiling under PEG, NaCl, and SA treatments[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2016, 12(6): 124.
- [5] MORIKAWA K, SHIINA T, MURAKAMI S, et al. Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor, Sig1, in *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS Letters*, 2002, 514(2/3): 300-304.
- [6] CHENG Y, ZHOU Y, YANG Y, et al. Structural and func-

- tional analysis of VQ motif-containing proteins in *Arabidopsis* as interacting proteins of WRKY transcription factors [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(2): 810-825.
- [7] LI N, LI X H, XIAO J H, *et al.* Comprehensive analysis of VQ motif-containing gene expression in rice defense responses to three pathogens[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(9): 1493-1505.
- [8] ZHANG G Y, WANG F D, LI J J, *et al.* Genome-wide identification and analysis of the VQ motif-containing protein family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 28683-28704.
- [9] ZHOU Y, YANG Y, ZHOU X J, *et al.* Structural and functional characterization of the VQ protein family and VQ protein variants from soybean [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34663.
- [10] DING H D, YUAN G B, MO S R, *et al.* Genome-wide analysis of the plant-specific VQ motif-containing proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*) and characterization of SlVQ6 in thermotolerance [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 143: 29-39.
- [11] HU Y R, CHEN L G, WANG H P, *et al.* Arabidopsis transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance [J]. *The Plant Journal*, 2013, 74(5): 730-745.
- [12] KIM D Y, KWON S I, CHOI C, *et al.* Expression analysis of rice VQ genes in response to biotic and abiotic stresses [J]. *Gene*, 2013, 529(2): 208-214.
- [13] HU G B, FENG J T, XIANG X, *et al.* Two divergent haplotypes from a highly heterozygous lychee genome suggest independent domestication events for early and late-maturing cultivars [J]. *Nature Genetics*, 2022, 54: 73-83.
- [14] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [15] HU B, JIN J P, GUO A Y, *et al.* GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [16] SUN J H, CAO L L, LI H L, *et al.* Early responses given distinct tactics to infection of *Peronophythora litchii* in susceptible and resistant litchi cultivar [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2810.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] CHEN J Q, WANG H P, LI Y, *et al.* Arabidopsis VQ10 interacts with WRKY8 to modulate basal defense against *Botrytis cinerea* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(10): 956-969.
- [19] WANG M, VANNOZZI A, WANG G, *et al.* A comprehensive survey of the grapevine VQ gene family and its transcriptional correlation with WRKY proteins [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 417.
- [20] GUO J H, CHEN J F, YANG J K, *et al.* Identification, characterization and expression analysis of the VQ motif-containing gene family in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 710.
- [21] SONG W B, ZHAO H M, ZHANG X B, *et al.* Genome-wide identification of VQ motif-containing proteins and their expression profiles under abiotic stresses in maize [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1177.
- [22] WANG Y J, LIU H L, ZHU D Y, *et al.* Genome-wide analysis of VQ motif-containing proteins in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Planta*, 2017, 246(1): 165-181.
- [23] CHENG X R, GAO C, LIU X, *et al.* Characterization of the wheat VQ protein family and expression of candidate genes associated with seed dormancy and germination [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 119.
- [24] LIU C H, LIU H, ZHOU C Y, *et al.* Genome-wide identification of the VQ protein gene family of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and analysis of its expression in response to phytohormones and abiotic and biotic stresses [J]. *Genes*, 2020, 11(3): 284.
- [25] LIU Y Z, WANG J P, GE W N, *et al.* Two highly similar popular paleo-subgenomes suggest an autotetraploid ancestor of Salicaceae plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 571.
- [26] YAN H F, WANG Y J, HU B, *et al.* Genome-wide characterization, evolution, and expression profiling of VQ gene family in response to phytohormone treatments and abiotic stress in *Eucalyptus grandis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1765.
- [27] SHAN N, XIANG Z J, SUN J Y, *et al.* Genome-wide analysis of valine-glutamine motif-containing proteins related to abiotic stress response in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 492.
- [28] LIU Y, LIU X L, YANG D D, *et al.* A comprehensive identification and expression analysis of VQ motif-containing proteins in sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) under phytohormone treatment and cold stress [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(11): 6334.
- [29] 张玉玲, 张超, 蒋唤唤, 等. 甘蓝型油菜 RPD3/HDA1 基因家族鉴定及早熟相关基因挖掘 [J]. 西北植物学报, 2023, 43(6): 901-911.
- ZHANG Y L, ZHANG C, JIANG H H, *et al.* Identification of RPD3/HDA1 gene family in *Brassica napus* and mining of early maturity related members [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(6): 901-911.
- [30] 刘建汀, 叶新如, 张前荣, 等. 西葫芦 NCED 基因家族鉴定及其响应干旱胁迫分析 [J]. 西北植物学报, 2023, 43(4): 569-581.
- LIU J T, YE X R, ZHANG Q R, *et al.* Genome-wide identification and response to drought stress of NCED genes family in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(4): 569-581.
- [31] CHEN H Y, HSIEH E J, CHENG M C, *et al.* ORA47 (octadecanoid-responsive AP2/ERF-domain transcription factor 47) regulates jasmonic acid and abscisic acid biosynthesis and signaling through binding to a novel cis-element [J]. *The New Phytologist*, 2016, 211(2): 599-613.
- [32] 李濯雪, 陈信波. 植物诱导型启动子及相关顺式作用元件研究进展 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 8-15.
- LI Z X, CHEN X B. Research advances on plant inducible promoters and related cis-acting elements [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(10): 8-15.
- [33] ZHANG L, SONG Z Q, LI F F, *et al.* The specific MYB binding sites bound by TaMYB in the GAPCp2/3 promoters are involved in the drought stress response in wheat [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 366.
- [34] 张慧琳. 锌指蛋白 PhZFP1 调控矮牵牛耐寒性的机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.