

辣椒 VQ 基因家族的鉴定与低温胁迫下的表达分析

张亚利¹, 谢玲玲³, 欧阳娴², 樊悦¹, 罗娟¹, 童巧珍^{1*}, 刘峰^{2*}

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省农业科学院蔬菜研究所 湖南长沙 410125;

3. 湖南省农业科学院西瓜甜瓜研究所 湖南长沙 410125)

[摘要] 目的 从辣椒(*Capsicum annuum* L.)全基因组中鉴定 VQ 基因,并进行基因结构、基因进化、染色体定位以及组织表达和低温诱导表达分析。方法 利用辣椒基因组数据库,通过生物信息学方法,鉴定辣椒基因(CaVQ)家族成员;利用 MEME、GSDS 2.0、DNAMAN8、MapInspect 等软件进行基因结构及染色体定位分析;采用 MEGA6.0 软件进行系统进化树分析;利用 RNA-seq 数据及 qRT-PCR 的方法进行辣椒组织表达模式和低温胁迫分析。结果 辣椒全基因组中含有 29 个 CaVQ 基因;CaVQ 基因结构相对简单,不均匀地分布在辣椒各染色体上;CaVQ 基因家族分为 2 组(Group I 和 Group II)及 6 个亚组(Group I a、Group I b、Group I c、Group II a、Group II b 和 Group II c);不同组织中 CaVQ 基因的表达量具有一定差异,低温胁迫可抑制或激活部分 CaVQ 基因表达量。结论 CaVQ 基因家族包括 29 个成员,分为 2 组,6 个亚组,分布于 10 条染色体上,其组织表达模式及基因响应具有多样性。

[关键词] 辣椒;VQ 基因家族;鉴定;低温胁迫表达分析

[中图分类号]R286;S641.3

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.07.003

Identification and Low Temperature-induced Expression Analysis of VQ Gene Family in Pepper

ZHANY Yali¹, XIE Lingling³, OUYANG Xian², FAN Yue¹, LUO Juan¹, TONG Qiaozhen^{1*}, LIU Feng^{2*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Institute of Vegetable,

Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China; 3. Institute of Watermelon and Melon, Hunan

Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

[Abstract] **Objective** To identify VQ genes from pepper genome, and analyze the gene structure, phylogeny, chromosome location, tissue expression pattern and low temperature-induced expression of CaVQ genes. **Methods** The CaVQ genes were identified by pepper genome database and bioinformatic method. Gene structure and chromosome localization were analyzed by softwares, such as MEME, GSDS 2.0, DNAMAN 8, MapInspect etc. A phylogenetic tree was created by using the MEGA 6.0 program. Tissue expression pattern and expression under low temperature stress of CaVQ genes were analyzed based on RNA-seq database and qRT-PCR method. **Results** 29 CaVQ genes were identified from pepper. The structure of CaVQ genes were relatively simple, and distributed on different chromosomes unevenly. CaVQ genes were divided into 2 groups (Group I and Group II) and 6 subgroups (Group I a, Group I b, Group I c, Group II a, Group II b and Group II c). The expression of this gene family had tissue specificity, and the low temperature stress could change the expression of partial CaVQ genes. **Conclusion** CaVQ gene family consisted of 29 genes. They were divided into 2 groups, 6 subgroups and distributed on 10 chromosomes with special response to external stimulates and different expression patterns in different tissues and developmental stages.

[Keywords] pepper; VQ gene family; identification; low temperature-induced expression analysis

VQ 基因是一类植物特异性基因,参与植物的生长发育及对抗多种胁迫过程,其编码的蛋白序列

包含一个保守的 VQ 基序。VQ 基序有 57 个氨基酸,其中是否包含一个高度保守的 VQ-motif:

[收稿日期]2016-03-28

[基金项目]国家自然科学基金项目(31470105);湖南省自然科学基金项目(2015JJ2089)。

[作者简介]张亚利,女,在读硕士研究生,研究方向:中药资源与鉴定学。

[通讯作者]*刘峰,男,副研究员,硕士研究生导师,E-mail:liufengrich@126.com;童巧珍,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:qztong88@126.com。

FXXhVQXhTG(h为疏水性氨基酸,“X”表示任意氨基酸),为该家族成员鉴定的主要依据之一^[1]。据报道,第一个VQ蛋白利用酵母双杂交法从拟南芥中鉴定而来^[2]。此后,以生物信息学为手段,陆续从在拟南芥、葡萄、苜蓿、水稻中分别鉴定出34^[3]、18^[1]、25^[4]和39^[5]个VQ成员。

VQ基因在种子发育过程中扮演着不同的角色^[6],如AtVQ14在中央细胞及胚乳中强烈表达^[7],通过调控胚乳的发育进而影响种子的大小。此外,VQ基因还参与病原体等生物胁迫反应的调节,在植物响应非生物胁迫方面也发挥重要作用^[8]。如AtVQ21与WRKY33转录因子相互作用,使PAD3基因表达,提高植物对病原菌的抗性^[2]。AtVQ9通过与WRKY8转录因子相互作用,降低WRKY8与DNA的结合活性,参与盐胁迫反应的负调控^[9]。目前,AtVQ15抵御低温胁迫的功能已被证实^[10],而关于辣椒VQ基因家族低温胁迫下的研究却鲜有报道。

辣椒(*Capsicum annuum* L.),茄科,辣椒属,是重要的蔬菜作物,也是一种药食同源的植物。《药性考》记载辣椒可“温中散寒,除风发汗,去冷僻,行痰逐湿”,还含有多种药用成分,如辣椒素抑制癌细胞增殖、转移,促进癌细胞坏死^[11];辣椒碱具有镇痛、抗炎、抑菌等药理作用^[12];辣椒红素作为一种天然色素广泛应用于医药学领域,且具有一定营养价值和药用价值等^[13]。辣椒全基因组测序的完成为鉴定、分析其基因家族成员和功能预测提供了条件。本文通过辣椒与拟南芥VQ基因家族成员的鉴定和分析,并以湖南省蔬菜研究所提供的遵辣1号(Zunla-1)为实验材料进行低温胁迫处理,运用qRT-PCR方法,对部分CaVQ基因进行表达分析,旨在为以后辣椒功能基因研究、分子育种等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 CaVQ基因的鉴定及染色体定位

辣椒基因组序列及染色体定位信息从辣椒公布测序结果的网站(<http://peppersequence.genomics.cn/page/species/index.jsp>)获得,以Pfam数据库中CaVQ结构域(PF05678.10)为模型,利用HMM程序进行搜索(P-value=10⁻³)^[14]。通过Clustal W程序^[15]、Pfam数据库及NCBI-CDD^[16]工具对VQ蛋白序列再次进行筛选和确认。使用ExPASy在线蛋白分析软件^[17]获取CaVQ蛋白序列相关信息。将辣椒蛋白质序列与TAIR数据库信息进行比对,获得拟南芥同源基因。染色体物理定位图由MapInspect程序^[18]绘制。

1.2 CaVQ蛋白结构域序列比对、基序预测及系统发育树构建

截取CaVQ蛋白序列中的相对保守的中心序列,用生物学软件DNAMAN8进行结构域序列多重比对^[19]。将CaVQ蛋白序列提交到MEME网站(<http://meme-suite.org/tools/meme>)进行基序预测^[20],运行参数设置为:基序重复的数量为“any”;基序的长度为6~50;预测基序的数量为15。由TAIR网站(<https://www.arabidopsis.org/>)获取AtVQ结构域序列,利用MEGA 6.0程序^[21]采用“邻接法”建立系统进化树。

1.3 CaVQ基因结构及组织表达热图绘制

基因结构分析于在线软件GSDS 2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)完成^[22]。从NCBI网站获取(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)Zunla-1根、茎、叶、花、花蕾及果实发育的不同时期RNA-seq数据,利用Tophat和Cufflink软件进行转录组表达差异分析^[23],运用R软件绘制CaVQ基因家族表达热图。

1.4 qRT-PCR材料准备及程序设置

以Zunla-1为材料,催芽后播种,温度设置为27℃~20℃,光周期为16h~8h(光/暗)的光照培养箱中培养。待其生长至4~6片真叶时,选择长势整齐的幼苗于10℃处理,设置0、1、3、6、12h五个时间点,每个时间点选择7株作混样,以锡箔纸包裹,并迅速用液氮冷冻处理,置于-80℃冰箱中保存,备用。

利用Biospin多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(无DNA残留型,北京博迈斯)提取RNA,采用RNA逆转录试剂盒(Takara公司)获取cDNA,用ddH₂O稀释10倍,备用。qRT-PCR实验参考说明书内容,以SYBR Premix Ex TaqTM II Mix (Takara)试剂盒,经ABI7000实时荧光定量PCR仪(ABI Prism,美国)进行分析,每个样品重复3次,采用2^{-ΔΔCT}值方法计算相对表达量^[24]。利用DNAMAN8软件设计特异引物,β-actin为内参基因,PCR反应程序为95℃预变性4min,94℃变性30s,55℃退火25s,72℃延伸20s,进行35个循环,最后72℃延伸10min。

2 结果与分析

2.1 CaVQ家族成员的鉴定和染色体定位

经过Pfam数据库检测发现,29条候选序列均含有VQ结构域。其中CaVQ基因编码的多肽范围为104(Capana10g002468)到478(Capana04g001103)个氨基酸残基,大部分编码的蛋白是少于400个氨基酸

残基的小蛋白;分子量在11.69 kD(Capana10g002468)和 50.65 kD(Capana04g001103)范围内;蛋白的等电点

在4.26(Capana10g002468)和 11.46(Capana09g000424)之间。见表1。

表 1 辣椒 VQ 基因家族信息表

基因组登录号	阅读框(bp)	大小/aa	分子量/kD	等电点	拟南芥同源基因	基因名	E 值
Capana01g000741	450	149	16.8	6.06	AT1G77890	DNA-directed RNA polymerase II protein	1.4
Capana01g001046	1 233	410	44.31	11.19	AT2G35230	IKU1, AtVQ14	3e-22
Capana01g003227	444	147	16.83	6.84	AT2G44340	AtVQ18	5e-04
Capana02g000622	579	192	20.90	5.77	AT4G37710	AtVQ29	0.11
Capana02g001140	609	202	22.24	4.82	AT3G22160	AtVQ22	1e-07
Capana02g001141	621	206	23.43	5.67	AT4G39720	AtVQ30	8e-07
Capana03g000537	510	169	18.06	10.09	AT1G80450	AtVQ11	4e-17
Capana04g000986	969	322	34.41	10.22	AT1G78310	AtVQ9	3e-29
Capana04g001103	1 437	478	50.65	6.45	AT1G35380	AtVQ7	3e-16
Capana04g001403	459	152	16.8	10.03	AT3G18690	MKS1, AtVQ21	1e-14
Capana06g001545	1 092	363	39.27	10.99	AT2G35230	IKU1, AtVQ14	3e-19
Capana06g001665	708	235	26	9.48	AT3G18690	MKS1, AtVQ21	4e-20
Capana07g001972	606	201	22.84	5.3	AT2G22880	AtVQ12	0.005
Capana07g002179	657	218	/	/	AT1G28280	AtVQ4	6e-36
Capana09g000424	621	206	23.53	11.46	AT4G15120	AtVQ27	0.019
Capana09g002310	555	184	19.49	5.27	AT2G22880	AtVQ12	0.003
Capana09g002311	759	252	26.46	4.36	AT4G37710	AtVQ29	0.003
Capana09g002312	474	157	17.2	6.26	AT4G37710	AtVQ29	0.002
Capana10g000151	564	187	20.76	8.76	AT2G22880	AtVQ12	0.054
Capana10g002137	639	212	22.38	7.79	AT3G56880	AtVQ24	2e-08
Capana10g002198	378	125	14.01	6.73	AT3G58000	ATVQ25	1e-16
Capana10g002468	315	104	11.69	4.26	AT3G56710	SIB1, AtVQ23	0.034
Capana10g002491	636	211	22.8	5.48	AT2G41010	ATCAMP25, AtVQ15	2e-22
Capana12g001260	942	313	34.46	6.83	AT5G65170	AtVQ34	6e-17
Capana12g001718	1 341	446	46.88	6.24	AT5G65170	AtVQ34	5e-18
Capana12g002024	714	237	24.5	5.74	AT3G18690	MKS1, AtVQ21	1e-13
Capana00g000229	495	164	17.66	9.39	AT3G22160	AtVQ22	8e-10
Capana00g000949	495	164	17.66	9.39	AT3G22160	AtVQ22	8e-10
Capana00g004669	1 158	385	43.62	7.25	AT1G48830	Ribosomal protein S7e family protein	2e-87

CaVQ 不均匀地分布于 0、1、2、3、4、6、7、9、10 及 12 号染色体,其中 2、9 和 10 号染色体上的 CaVQ 分布相对集中,其余染色体上均分布相对分散。其中 10 号染色体上的 CaVQ 基因家族成员最多,共 5 个,3 号染色体上仅含一个 CaVQ 基因。此外,9 号染色体上的 Capana09g002310、Capana09g002311 和 Capana09g002312 集中分布在染色体的末端,以串联复制形成基因簇结构^[25]。见图 1。

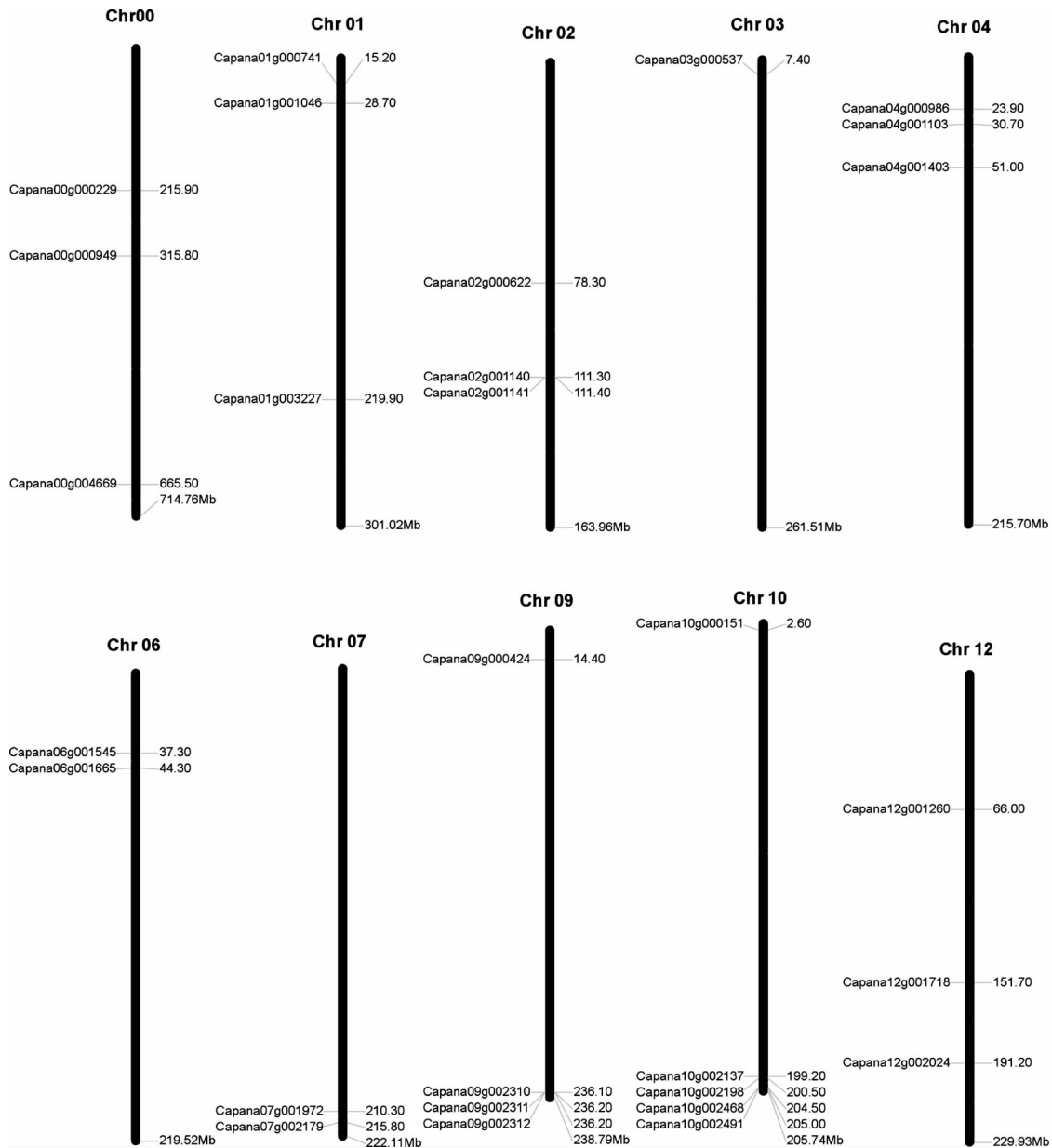
2.2 CaVQ 蛋白结构域及进化树分析

29 条 VQ 蛋白序列中 2 条(Capana01g000741 和 Capana02g001141) 含不完整的 VQ 保守序列,因此把这类基因定义为非标准 VQ 类型基因,其余 27 条定义为标准 VQ 类型基因^[26](见图 2)。

VQ 基序预测的结果显示(见图 3,表 2),Group

I a 中 2 条序列(Capana06g001545 和 Capana01g001046) 中多个 motif 2 排列紧密;Group I c 中的 motif 1 均靠近上游;Group I b 和 Group II a 所含基序相对较少且分布相对集中。使用 Pfam 数据库检测发现,motif 1 和 motif 15 是 CaVQ 结构域的重要组成部分,分布广泛,参与多种生物与非生物胁迫的逆境调节,其他基序在数据库中暂无功能记录。

基于与 AtVQ 结构域比较的情况,CaVQ 基因可分为 2 组及 6 个亚组,其中 Group I a 中有 1 对自举值为 89 的直系同源基因(Capana04g000986/AtVQ9),Group I b (Capana00g004669/AtVQ20,Capana12g002024/AtVQ21) 和 Group II a (Capana07g002179/AtVQ4,Capana03g000537/AtVQ11) 均包含 2 对直系同源基因(见图 4)。此外,CaVQ 基



注:黑色条形代表染色体,染色体的编号标注在每条染色体的正上方;基因的名称放在染色体左侧,染色体右侧的数据表示该基因在染色体上的具体起始位置(单位:Mb)。

图1 CaVQ 基因家族的染色体分布

因家族形成 10 个旁系同源基因对,其中 7 对(Capana06g001545/Capana01g001046, Capana06g001665/Capana04g001403, Capana10g000151/Capana07g001972, Capana01g003227/Capana10g002198, Capana10g002137/Capana10g002491, Capana04g001103/Capana12g001260, Capana00g000229/Capana00g000949)自展值高于 90(见图 5A)。

2.3 CaVQ 基因家族的基因结构及组织表达分析

基因结构分析显示:CaVQ 基因家族结构相对比较简单,除 Capana02g000622、Capana04g001403 和 Capana10g000151 具有 2 个外显子,一个内含子;Capana00g004669 有 6 个外显子,5 个内含子;Ca-

pana01g000741 有 4 个外显子,3 个内含子外,其他基因序列均只有 1 个外显子。说明 Capana01g000741、Capana02g000622、Capana04g001403、Capana10g000151 以及 Capana00g004669 在进化的过程中可能获得了外显子^[27]。见图 5B。

组织表达热图显示(见图 5C),Capana10g002491 在根和果实的破色期表达量较高,可能与根的发育和果实的成熟有关。Capana00g000229 及其同亚组基因 Capana00g000949 在叶中高表达, Capana07g002179 次之,可能参与了叶的发育进程。进一步研究发现, Capana07g001972、Capana09g002311、Capana10g002198 及其旁系同源基因 Capana10g000

Capana01α000741	KVVYKILISLIDISNYYTLCVSKTNFRSLVGNLITNYLCEANKAKEETSKTWIKNEFSNI	58
Capana01α001046	PSFNANSARCCSCPCVYNINKNDFRSIVCCITGSPSPCEPCPRPRPTHNPFPFSM	58
Capana01α003227	SKLKFKIRIIHIIAFETIIKTCVENFRLLVORLTGKNAACVKGRVKKERRKIDIESSP	58
Capana02α000622	SITKKPIAPSSPIPEKIYRVEAVNFRCVVQMLTAPEFC.SHSN . FTSGFCRTCEVLDP	58
Capana02α001140	KPIRRRSRASKKTPTTHLNACASNFRAIVCCFTGCHTANTFI GAHKGPINLNFGLIEN	58
Capana02α001141	KPIRRRSRASKKTPIITRINASIANFRALVCCHTGCHSSPTFK . NCKGFINLSFGPSTDD	58
Capana03α000537	. . . MACPNSSSPN . TTFVCAFPSNFRAVVORLTGATCC . . . S . STLKLVFTGPGFAGPRRPT	54
Capana04α000986	AGSCNLCAACPCCCPFVYNINKSDFRDLVQKLTGSPA . . HERISTFPFICCP . KAASSRLC	58
Capana04α001103	KNEKKRTRASRRAPTIVLTTLTTFNFRCMVCEFTGIPTA . PFT . GSEYT . R . RLDFSTAGST	58
Capana04α001403	CAPPRPFVITYTVSEKVIHANSEFMTLVORLTGPDH . HHSSTCSTSATATSSSFPPFC	58
Capana06α001545	PNFNANSARCCPCPCVYNINKNDFRSIVCCITGSPS . . CEP . P . ARPPCNPSKFPFSMRLCK	58
Capana06α001665	PPPRPPIIITYTVSEKVIHANSEFMSLVORLTGPN . SSSSSSSFFPCENTNLSAIS	58
Capana07α001972	SEKCFNTLIKLIKFKVYITHSSNFKNLVCLTGNNINGSSSSSSSSP . I . ISSSFP	58
Capana07α002179	KTCISRSETTNEYPTTFVCACTSSFKCVVQMLTGSSET . . . A . KCASSSSPAACPSSLSN	58
Capana09α000424	RFIRRRSRVSRPTPTTVYNTCTRNFRAMVCCFTGNCNR . PVC . SCGFVRE . . FGERNINLVN	58
Capana09α002310	. MTKCFIAPLPPTPEKIYRVEPINFKEVQMLTAPEFC.SVDEL . SSSASASGSSSG	57
Capana09α002311	. MTKLPFAPLPPTPEKIYRVEPINFKEVQMLTAPEFC.SVSNFVCSFGFGSGSISG	57
Capana09α002312	. MTKCFIAPLPPTPEKIYRVEPINFKEVQMLTAPFEC.SVCNNSV . ISSVFGSGSFS	57
Capana10α000151	CNKKHFNNLIKFLREKVIYITSSNFKTLVCLTGNGSIS . SISRHEFAKESYPTC	58
Capana10α002137	IVKKRKRPRASKRASTTYITACVDSFRCMVCCVTGI GCLFVNSSTVKEARFVERVCP	58
Capana10α002198	. . MKFKIRIIHIIAFETIIKTCVENFRILVORLTGKESE . INNNNNNIKKRSSISSSTK	56
Capana10α002468 MKVNTSAAEFRALVCLTGCHANCEV . IETVSSSTGGTVLEKKK	43
Capana10α002491	KITKRKRASRRNTTYITACVDNFRHMVCCVTGVRFM . PGE . GCLPVG . NIVPEPCR . VG	58
Capana12α001260	KNEKKRSRARRAPTIVLTTLTTFNFRCMVCEFTGIPTT . PFT . GSAYT . R . RFLDFSTASS	58
Capana12α001718	RNEKKRSRARRAPTIVLTTLTTFNFRAMVCCFTGIPAP . PFT . SSYFPPSRFCLFAIAP	58
Capana12α002024	PSCNPECTVIITYAVSEKVIYHTVSDFMVQVRLT . GSSS . ESETSTAAVAGDGNLSFAAK	58
Capana00α000229	KPIRRRSRARRPTPTTVLNTCTANFRAMVCCFTG . GPVA . PFA . SCGTYIG . . FGSNNCCVVN	58
Capana00α000949	KPIRRRSRARRPTPTTVLNTCTANFRAMVCCFTG . GPVA . PFA . SCGTYIG . . FGSNNCCVVN	58
Capana00α004669	HQCPRHFVIITYTHSEKVIHTHREDMALVQKLT . GLSP . EDCPSSEFPFLQIMPCHKSE	58
Consensus		

图 2 CaVQ 基因家族基序比对分析

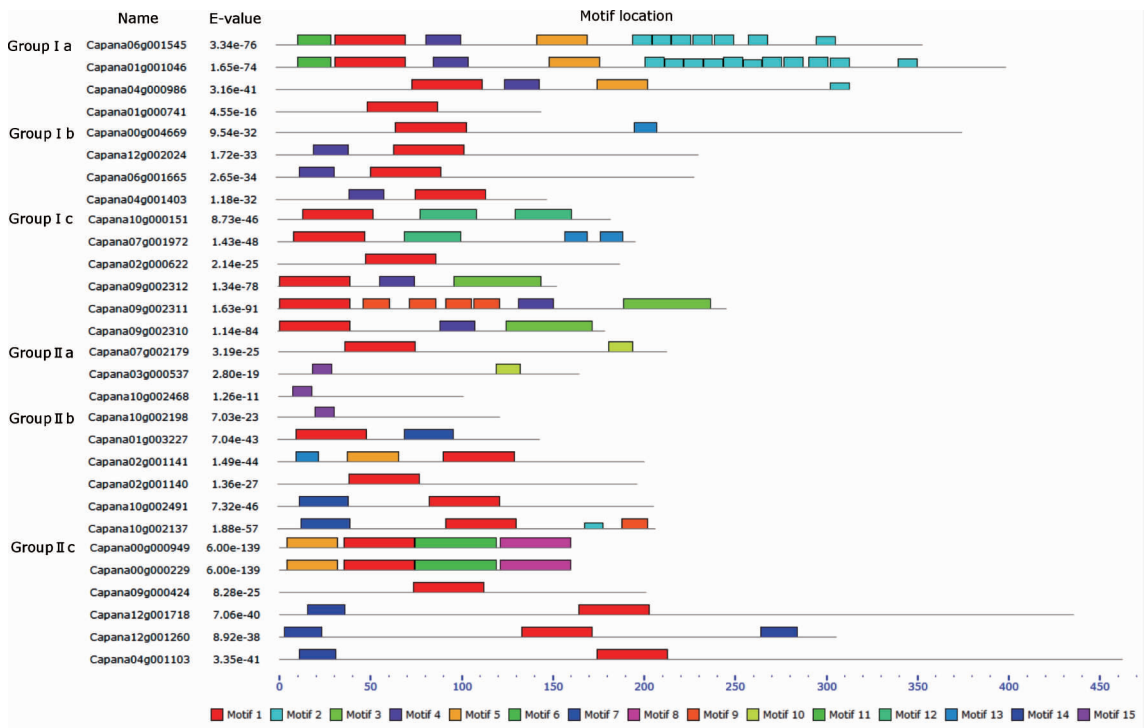


图 3 辣椒 VQ 基因中预测的基序

151、Capana09g002312、Capana10g002198 在根、茎、叶、花及果实等组织中低表达或无表达, Capana01g000741 在所有组织中均不表达, 这些基因可能没有参与到以上组织正常生长发育的调控途径。与此相反, Capana00g004669 在各组织中均有较高的表达量, 说明其可能参与了辣椒生长发育周期中多

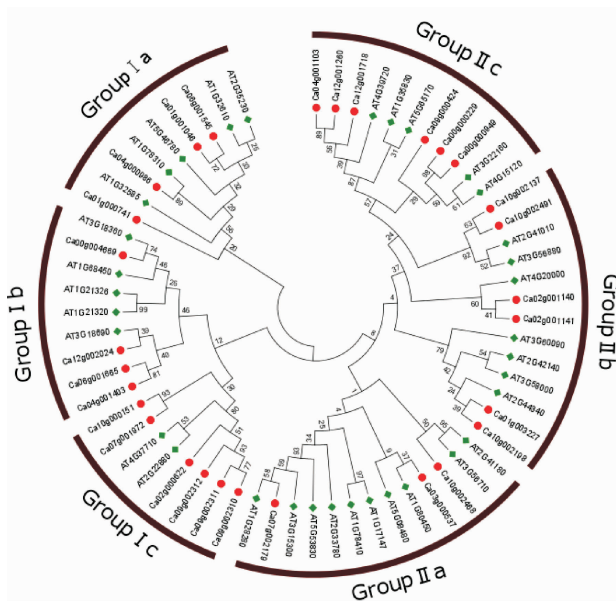
种生理生化转变的转录调控。

2.4 CaVQ 基因在低温胁迫下的表达分析

从各亚组中分别挑选 2 个基因作为代表基因, 对其低温胁迫下的表达情况进行分析。Capana12g002024 和 Capana00g004669 是 12 个 CaVQ 基因家族成员中 2 个负向诱导的基因, 在低温环境

表 2 辣椒 VQ 蛋白中预测基序的多层次一致序列

基序	E 值	序列
Motif1	1.1e-250	XKR[RP][SI]RA[SI]RRTP[PT][TK]V[YL]N[TA]D[TP]SNF[RK]A[LMV]VQQ[LF]TGXPSXPSXS
Motif2	7.5e-051	PP[LF]PSP[RG]MNGP
Motif3	2.9e-031	[IN][NI]E[AE][QP]E[RK]SHV[AMT][PS]RIPSEN[HSY]FGSC[SN]PLANF[PS]LSP[AT]SFAWCSSIL[FL]SPGTL
Motif4	2.2e-026	[RM][RE]LQ[GDK][IPV][RA][PT]PL[DK][LVP][IS][KNP][DVR][SP][LHQ][KQ][IPR]
Motif5	2.2e-015	A[DT]V[VW]T[NT]T[AV][ET]S[PL][IV]SA[YP][MD][HR][HY][LQ][QH][NS][ST][IG][IP][DV]DG[PR][EKV]
Motif6	3.0e-010	QCTYIGFGSNNQVVNPNTAPTSSAGGSYSIHFTQPPPQNQLPYMF
Motif7	1.4e-005	[WY][AG][FM][RM][SN][MA][LF][NQT][DE][TS][CTW][FT][ST][DN][IVY][FR][AMT]KE[TE]E[TS][LS]T[KS][VE][LG][IMQ]
Motif8	5.8e-005	LGSPTDAVVPGRADNFPNRLEDSSSPSNEKSEINNFMF
Motif9	9.0e-004	[DG][FG][GD][FS]G[SF][ID]S[GDF][SCF][GD]F[IGP][ST][GL]
Motif10	1.0e-003	EE[DE]KAIAEK[GK]FYLH
Motif11	1.6e-003	DYLGVNK[FL]GKNIKKSPIHQ
Motif12	1.0e-002	[DH][HIM][HIT][NH][DH][GR][DEQ][AQV][CRY][SM][QK][LF][EV][SH][QH][RY][EQ][SE][IS][NS][QR][ED][LS][SC][LV]D[S][W][KE]GSI
Motif13	1.4e-001	[IQY][HW][EHKM]D[HKVY][DS][AEIQ][DEM][PDH][YT][EGQY][YF][QDE]
Motif14	7.0e-001	[GCK][NAH][SHV][GD][SQV][VGM][QDC][SAK][SV][SGH]G[GD][DF][EDK][EQ][YS]D[SQ][RH][GAH][GAE]
Motif15	8.2e-001	[NE]FR[AE][LV]VQ[RQ]LTG



注:绿色菱形标注和红色圆形标注分别表示拟南芥和辣椒 VQ 基因家族成员。

图 4 辣椒与拟南芥 VQ 基序系统进化树

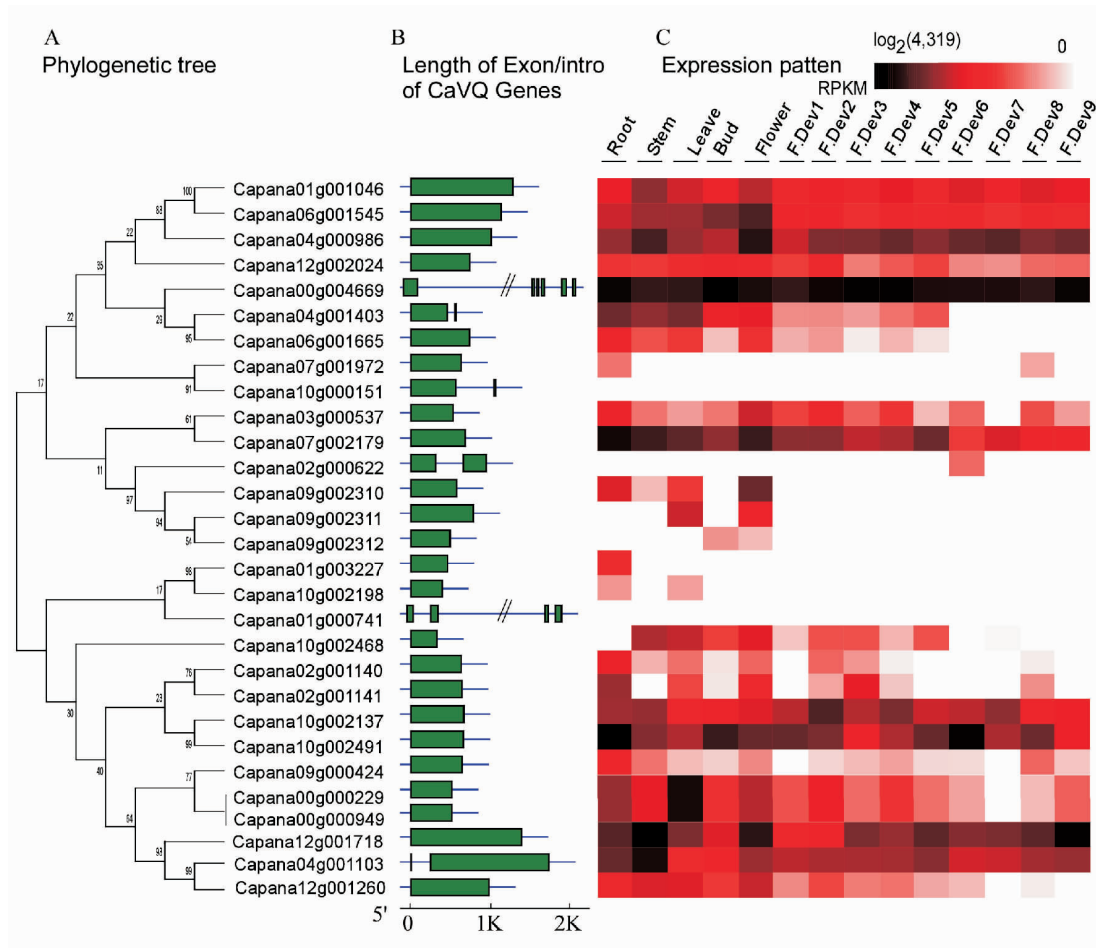
下,表达量下调,3 h 和 6 h 达到最低,此后又呈上调趋势,不同于 Capana00g004669,Capana12g002024 在 12 h 再度下调。在其他 10 个基因中,Capana10g002468 表达量上调最明显,受低温胁迫诱导响应较迅速,在 1 h 即达到最高峰,分别为 0 h 表达量的 63 倍,6 h 则接近对照组。而 Capana 04g000986、Capana06g001545、Capana10g002491 和 Capana04g001103 低温条件下正向诱导不显著,在 6~12 h 趋于正常值,其中 Capana04g000986 和 Capana06g001545 表达量变化最为平缓。此外,Capana07g002179 和 Capana00g000229 在 0~12 h 呈十

分明显的上调趋势,12 h 达到最高峰,分别为 0 h 的 6 倍和 10 倍。Capana10g002137 整体上受低温正向诱导,3 h 和 12 h 有微弱的下调(见图 6)。

3 讨论

植物 VQ 基因在抵御生物与非生物胁迫方面具有重要作用,除拟南芥、葡萄、苜蓿、水稻外,在高粱、玉米、杨树、蓖麻及棉花等物种中均发现了 VQ 蛋白家族成员^[28]。植物 VQ 蛋白主要作为 WRKY 蛋白的辅助因子,在调控 WRKY 介导的基因表达中发挥着重要作用^[9]。本文对辣椒 VQ 基因进行了 Pfam 检索,鉴定出 29 个 CaVQ 基因家族成员。并对其基因结构、基序、进化及基因组织表达进行了分析,还对部分 CaVQ 基因进行了低温胁迫研究,这些研究结果对进一步深入研究辣椒 VQ 基因家族具有重要意义。

不同辣椒 VQ 基因在不同组织的表达模式有显著差异,且与其功能特征密切相关。Capana01g001046 与 Capana06g001545 在进化树中聚为一类,两者具有相对同步的表达模式,相对其他组织,均在茎和花器官中表达量较高。Capana07g002179 在叶中表达量仅次于 Capana00g004669,根据同源比对和进化分析发现 ATVQ4(AT1G28280)与 Capana07g002179 直系同源,研究表明 AtVQ4 参与调控叶的发育^[29],因此其在辣椒中的同源基因可能行使了相似的功能。CaVQ 组织表达模式图显示部分基因在某些组织异常高表达,如 Capana12g001718 在茎部,Capana10g002491 在根器官,Capana00g004669 在叶片,Capana00g004669 在多个组织,如根、茎、叶、花



注:CaVQ 基因在辣椒根(Root)、茎(Stems)、叶(Leaves)、花蕾(bud)、花(Flower)、果实发育 1 期(F-Dev-1)、果实发育 2 期(F-Dev-2)、果实发育 3 期(F-Dev-3)、果实发育 4 期(F-Dev-4)、果实发育 5 期(F-Dev-5)、果实发育 6 期(F-Dev-6)、果实发育 7 期(F-Dev-7)、果实发育 8 期(F-Dev-8)和果实发育 9 期(F-Dev-9)的表达热图,红色的深浅程度显示基因的表达强弱,颜色越深表达量越高,无色表示没有表达信号。果实发育的 1-9 个时期分别是指:五个破色前期(0~1cm, 1~3cm, 3~4cm, 4~5cm 长的果实和绿熟果),破色期(果实开始变红的时期)和三个破色后期(破色后 3、5、7 d)。

图 5 辣椒 VQ 家族进化、结构及表达

及果实发育的 9 个时期表达量均较高,对以后 CaVQ 基因功能研究具有一定的指导意义。

在胁迫方面,AtVQ14 (IKU1 即 AT2G35230)、AtVQ15(AtCaMBP25 即 At2G41070)、AtVQ21(MKS1 即 At3G18690)、AtVQ23 (SIB1 即 At3G56710)和 AtVQ16 (SIB2 即 At2G41180) 的研究最为深入,为 CaVQ 基因家族成员的研究提供了一定的参考。其中,AtVQ14 被证明与 WRKY10 转录因子相互作用^[6],通过 IKU2-MINI3 途径调节胚乳的早期发育^[9]。AtVQ15^[10]、AtVQ23^[31]和 AtVQ16^[32]分别具有负调控渗透压胁迫、抗低温、抵御病原菌等功能。研究发现,AtVQ21 与 Capana12g002024 直系同源,两者可能在抗病原菌方面功能相似^[2,33]。此外,Hu 等人^[9]证实 AtVQ9(AT1G78310)参与盐胁迫反应的负调控,其同源基因 Capana04g000986 在辣椒抗逆反应过程中可能具有相似的作用。

为了解辣椒 VQ 基因家族对逆境的胁迫反应,本研究从 CaVQ 基因家族 6 个亚组中挑选 12 个基因,在低温处理后利用 qRT-PCR 进行了检测。其中 11 个基因均表现出一定的调节作用。Capana12g002024 及其同亚组基因 Capana00g004669 表达受到抑制,其余 9 个基因则为正向调控,其中 Capana10g002468 对低温胁迫反应比较迅速。而 Capana09g002311 对低温刺激不敏感,整体表达量低,其同亚组基因 Capana09g002310 与之类似。值得注意的是,Capana10g002137 与 Capana10g002491 旁系同源,两者在低温条件下,表达量均为上调,且幅度基本一致。

随着测序技术的不断进步,许多具有重要经济价值和研究意义植株的基因组序列得到测定,如拟南芥^[34]、大豆^[35]、水稻^[36]、辣椒^[37]等,这为利用生物信息学手段对基因家族进行鉴定及分析提供了可能。

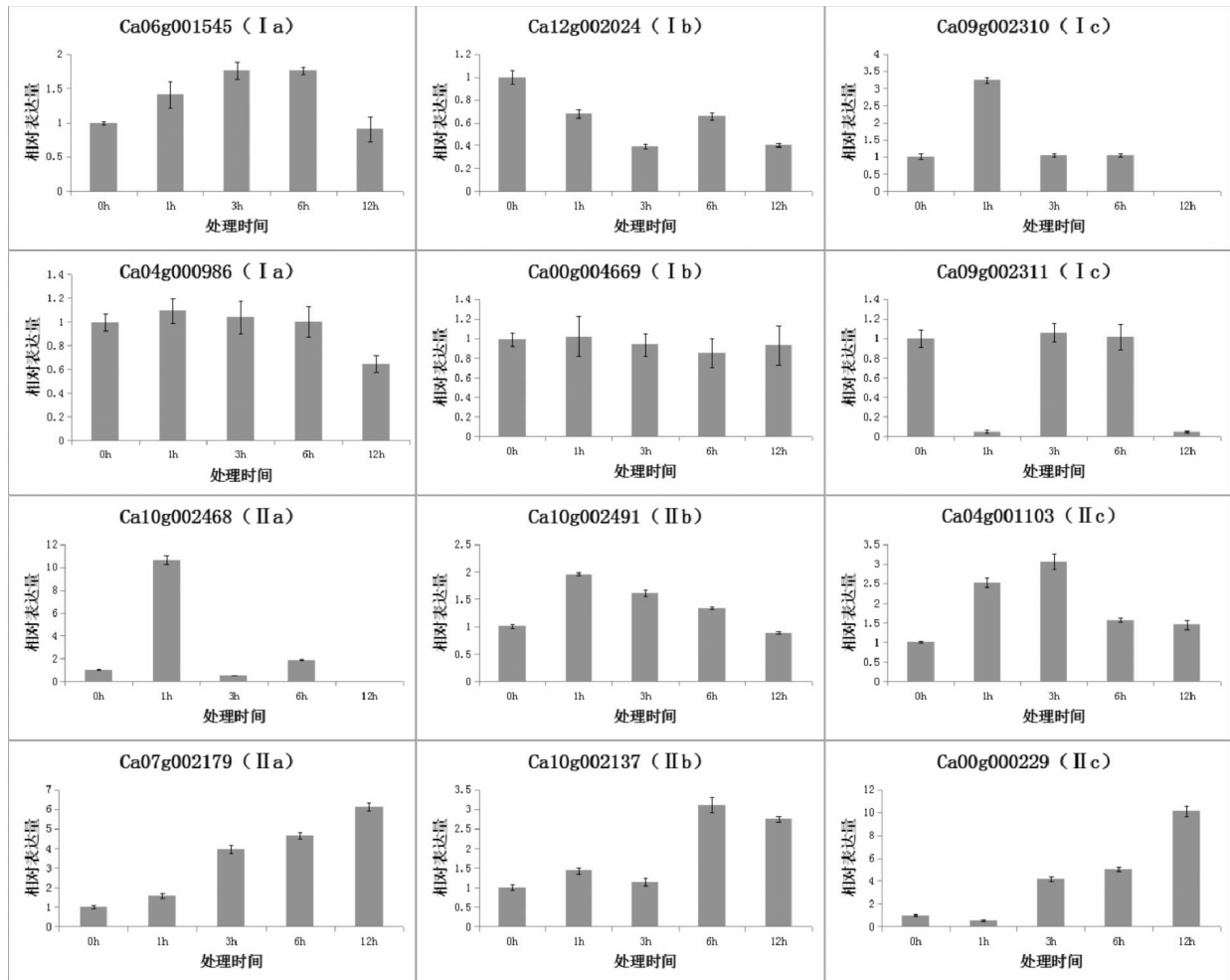


图 6 CaVQ 家族特征序列在低温胁迫下的表达

辣椒 VQ 基因家族分析结果显示, 该基因家族结构域相对保守, 具有一定的组织表达特异性, 部分基因受低温胁迫诱导。辣椒 VQ 基因家族的鉴定和分析为以后辣椒功能基因研究、分子育种提供了参考, 但抗逆相关的分子机制仍需深入研究, 其潜在功能也有待进一步探索。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Erik A, Thomas J, Peter B, et al. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses [J]. *Embo Journal*, 2005, 24(14): 2 579–2 589.
- [3] Cheng Y, Zhou Y, Yang Y, et al. Structural and functional analysis of VQ motif-containing proteins in Arabidopsis as Interacting proteins of WRKY transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(2): 810–825.
- [4] Yunliang L, Yanjun J, Junjiao L, et al. Arabidopsis VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 represses seedling deetiolation by interacting with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(4):2 068–2 080.
- [5] 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.
- [6] Wang A, Garcia D, Zhang H, et al. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in Arabidopsis [J]. *Plant Journal*, 2010, 63(4):670–679.
- [7] Damien G, Virginie S, Pierre C, et al. Arabidopsis haiku mutant s reveal new controls of seed size by endosperm[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(4):1 661–1 670.
- [8] Yanjun J, Rongcheng L. The VQ Motif-Containing Protein Family of Plant-Specific Transcriptional Regulators[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 371–378.
- [9] Hu Y, Chen L, Wang H, et al. Arabidopsis transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2013, 74(5): 730–745.
- [10] Perruc E, Charpentreau M, Ramirez BC, et al. A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana seedlings [J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(3): 410–420.

- [11] 谢乐,周慎,伍大华,等.辣椒素抗癌作用及其机制研究进展[J].湖南中医药大学学报,2014,34(9):58-61.
- [12] 许文频,王欣,李敏,等.比较研究奇正青鹏软膏与辣椒碱软膏的抗炎镇痛作用及机制[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(10):100-105.
- [13] 赵宁.从干红辣椒中提取辣椒红素的研究[D].北京:北京化工大学,2004.
- [14] Remmert M, Biegert A, Hauser A, et al. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment[J]. Nature Methods, 2011, 9(2):173-175.
- [15] Xu Q, Jr DR. Assignment of protein sequences to existing domain and family classification systems: Pfam and the PDB[J]. Bioinformatics, 2012, 28(21): 2763-2772.
- [16] Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 207-210.
- [17] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [18] Lin YX, Jiang HY, Chu ZX, et al. Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize[J]. Bmc Genomics, 2011, 12(1): 1-14.
- [19] Wang X, Yan B, Min S, et al. Overexpression of a Brassica campestris HSP70 in tobacco confers enhanced tolerance to heat stress[J]. Protoplasma, 2015: 1-9.
- [20] Bailey TL, James J, Grant CE, et al. The MEME Suite[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(1): 39-49.
- [21] Oliani LC, Lidani KC, Gabriel JE. Differentiated evolutionary relationships among chordates from comparative alignments of multiple sequences of MyoD and MyoG myogenic regulatory factors [J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2015, 14(4): 12561-12566.
- [22] Barve A, Joshi BK. A Smart Source Code Editor for C [J]. International Journal of Computer Science Engineering & Informa, 2014, 4(3): 23-28.
- [23] Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks [J]. Nature protocols, 2012, 7 (3): 562-578.
- [24] Alaina A, Beiyun C, Marc L, et al. Validation of the 2-Delta Delta Ct calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts [J]. Diagnostic Molecular Pathology, 2006, 15(1): 56-61.
- [25] Whitman SP, Caligiuri MA, Maharry K, et al. The MLL partial tandem duplication in adults aged 60 years and older with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2012, 26(7): 1713-1717.
- [26] 宋辉,南志标.蒺藜苜蓿全基因组中 WRKY 转录因子的鉴定与分析[J].遗传,2014,36(2):152-168.
- [27] Kolkman JA, Stemmer WP. Directed evolution of proteins by exon shuffling [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(5): 423-428.
- [28] 林渊源,余迪求.拟南芥 VQ 基因家族响应抗性相关激素表达谱分析[J].植物分类与资源学报,2012,34(5):509-518.
- [29] Markus S, Davison TS, Henz SR, et al. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development [J]. Nature Genetics, 2005, 37(5): 501-506.
- [30] Ming L, Dennis ES, Frederic B, et al. MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(48): 17531-17536.
- [31] Morikawa K, Shiina T, Murakami S, et al. Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor, Sig1, in Arabidopsis thaliana 1 [J]. Febs Letters, 2002, 514(2/3): 300-304.
- [32] Lai Z, Li Y, Wang F, et al. Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense[J]. The Plant Cell, 2011, 23(10): 3824-3841.
- [33] Qiu J, Katrine FB, Klaus P, et al. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus[J]. Embo Journal, 2008, 27(16): 2214-2221.
- [34] Initiative AG. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana [J]. Nature, 2000, 408(6814): 796-815.
- [35] Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. Nature, 2010, 463(7278): 178-183.
- [36] Goff SA, Darrell R, Tien-Hung L, et al. A Draft Sequence of the Rice Genome (Oryza sativa L. ssp. japonica) [J]. Science, 2002, 296(5565): 92-100.
- [37] Cheng Q, Changshui Y, Yaou S, et al. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into Capsicum domestication and specialization [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(14): 5135-5140.

(本文编辑 杨 璞)