

· 农业生物技术 ·

荔枝 *HSP70* 家族鉴定及其响应非生物胁迫的表达分析

凡超, 杨杰, 陈蓉, 刘伟, 向旭*

广东省农业科学院果树研究所 农业农村部南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, 广东 广州 510640

凡超, 杨杰, 陈蓉, 刘伟, 向旭. 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): 1102-1119.

FAN Chao, YANG Jie, CHEN Rong, LIU Wei, XIANG Xu. Identification and expression analysis of the *HSP70* gene family under abiotic stresses in *Litchi chinensis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1102-1119.

摘要: *HSP70* 蛋白作为热激蛋白(heat shock protein, HSP)家族重要成员之一, 在植物的生长发育、逆境胁迫等过程中发挥着重要作用。为探究荔枝(*Litchi chinensis*) *HSP70* 基因家族成员在应对低温、高温、干旱及盐胁迫环境时的作用, 利用生物信息学方法鉴定荔枝全基因组中的 *HSP70* 基因家族, 并通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术检测 *HSP70* 家族成员在不同非生物胁迫处理下的表达模式。结果显示, *LcHSP70* 基因家族共包含 18 个成员, 不均匀地分布在荔枝的 10 条染色体上, 其蛋白包含 479–851 个不等的氨基酸, 等电点介于 5.07–6.95 之间, 分子质量为 52.44–94.07 kDa。LcHSP70 蛋白在细胞核、细胞质、内质网、线粒体和叶绿体中有分布。系统进化分析发现 LcHSP70 蛋白分布在 5 个亚族, 分别为 I、II、III、IV 和 VI 亚族。LcHSP70s 启动子区域拥有多种与植物生长发育、激素响应及逆境响应相关的顺式作用元件。转录组数据分析显示, *LcHSP70s* 存在明显的组织表达特异性, 总体上可分为普遍性表达和特异性表达。非生物胁迫表达分析显示, 该基因家族成员均可以对低温、高温、干旱和盐胁迫作出不同程度的反应, 且在不同时间表达差异显著。上述研究结果为进一步探究荔枝 *HSP70* 基因家族的功能奠定了基础。

关键词: 荔枝; *HSP70* 基因家族; 生物信息学; 表达分析

资助项目: 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(2022DZXHT058); 汕尾市科技计划(2022A003)

This work was supported by the Special Fund of Rural Revitalization Strategy (Improvement of Agricultural Technology Capabilities) (2023TS-2-3), the Fund for Technology Project in Maoming City (2022DZXHT058), and the Fund for Technology Project in Shanwei City (2022A003).

*Corresponding author. E-mail: xiangxu@vip.163.com

Received: 2023-06-20; Accepted: 2024-01-02; Published online: 2024-03-05

Identification and expression analysis of the *HSP70* gene family under abiotic stresses in *Litchi chinensis*

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

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

Abstract: HSP70 protein, as an important member of the heat shock protein (HSP) family, plays an important role in plant growth, development, and response to biotic and abiotic stresses. In order to explore the role of *HSP70* gene family members in *Litchi chinensis* under low temperature, high temperature, drought, and salt stress, bioinformatics methods were used to identify the *HSP70* gene family members within the entire *L. chinensis* genome. The expression of these genes under various abiotic stresses was then detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that the *LcHSP70* gene family consisted of 18 members, which were unevenly distributed across ten *L. chinensis* chromosomes. The *LcHSP70* protein contained 479–851 amino acids, with isoelectric points ranging from 5.07 to 6.95, and molecular weights from 52.44 kDa to 94.07 kDa. The predicted subcellular localization showed that *LcHSP70* protein was present in the nucleus, cytoplasm, endoplasmic reticulum, mitochondria, and chloroplast. Phylogenetic analysis divided the *LcHSP70* proteins into five subgroups, namely I, II, III, IV, and VI. The promoter regions of the *LcHSP70* genes contained various *cis*-acting elements related to plant growth, development, hormone response, and stress response. Moreover, the expression of *LcHSP70* genes displayed distinct tissue-specific expression level, categorized into universal expression and specific expression. From the selected 6 *LcHSP70* genes (i.e., *LcHSP70-1*, *LcHSP70-5*, *LcHSP70-10*, *LcHSP70-14*, *LcHSP70-16*, and *LcHSP70-18*), their relative expression levels were assessed under different abiotic stresses using qRT-PCR. The results indicated that the gene family members exhibited diverse responses to low temperature, high temperature, drought, and salt stress, with significant variations in their expression levels across different time periods. These results provide a foundation for further exploration of the function of the *LcHSP70* gene family.

Keywords: *Litchi chinensis*; *HSP70* gene family; bioinformatics; expression analysis

随着全球变暖问题的加剧和极端气候的频发,越来越严重的环境胁迫是植物面临的首要挑战,如干旱、盐胁迫、极端温度等非生物胁迫会抑制植物的生长发育,严重时还会造成植物死亡^[1]。为应对各种胁迫,植物在长期进化过程中形成了一系列复杂的调控网络^[2]。热激蛋白(heat shock protein, HSP)是一类能对高温

或其他胁迫作出应答反应并有效提高生物体对恶劣环境适应能力的分子伴侣蛋白^[3],几乎存在于所有生物体中,并且高度保守^[4]。依据分子质量的大小,HSP蛋白可分为5个家族:HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和小分子HSP(10–40 kDa)^[5]。其中,HSP70蛋白由于在植物的非生物胁迫、生长发育以及抗病中发挥重要

作用而被广大科研工作者关注^[6]。

现已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[7]、水稻(*Oryza sativa*)^[7]、大豆(*Glycine max*)^[8]、辣椒(*Capsicum annuum*)^[9]和马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[10]等植物中鉴定到HSP70基因家族,并对其家族成员参与非生物和生物胁迫相关的应答响应进行了深入研究。利用转基因技术将拟南芥的*AtHSP70-15*沉默后,发现基因沉默植株较对照表现出叶片萎蔫、生长迟缓和热应激响应低,这表明*AtHSP70-15*在拟南芥生长发育和热响应的过程中发挥积极的调节作用^[11];Sarkar等^[12]对水稻HSP70家族成员转录本表达的研究中发现,在高温(42℃)处理下,被检测的16个*OsHSP70s*全部上调表达,初步证明了*OsHSP70s*介导植株热胁迫的过程;在对大豆HSP70基因家族的研究中发现,与对照相比,干旱(15% PEG 3 000)胁迫中有30个成员的表达量上调至222倍,高温(42℃)胁迫中有55个成员的表达量上调至241倍^[8];接受致命高温(46℃)处理后,过表达辣椒*CaHsp70-2*的转基因拟南芥株较野生型株具有更高的存活率^[9]。还有研究发现,马铃薯HSP70家族成员不仅广泛参与盐、干旱、热及冷胁迫的反应,还能被马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)诱导表达^[10]。这些结果表明,HSP70家族成员在植物生理和生化过程中起着多种多样的功能。

荔枝(*Litchi chinensis*)为无患子科(Sapindaceae)荔枝属(*Litchi*)常绿乔木,是我国亚热带地区广泛栽培的特产果树,具有极高的经济效益^[13-14]。荔枝性喜温暖湿润气候,生长发育过程中面临着包括低温、高温、干旱在内的多种非生物胁迫,严重制约了荔枝产业的健康发展^[15]。因此,研究荔枝抗逆的分子机理对荔枝抗性育种工作具有重要意义。本研究在荔枝全基因组范围内鉴定HSP70基因家族,并且探究该家族成员在

荔枝不同组织中的表达差异和对低温、高温、干旱及盐胁迫的响应,以期初步解析LcHSP70家族在组织发育及逆境胁迫响应中的功能,为荔枝抗性基因的挖掘奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料及处理

选取生长1年左右(常规培养)的‘妃子笑’荔枝盆栽苗(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值在5.5–6.5之间)进行如下处理:将植株转移至培养箱(光照度1 500–2 000 lx,相对湿度80%)中进行(4.0±1.0)℃低温胁迫处理;将植株转移至培养箱(光照度1 500–2 000 lx,相对湿度80%)中进行(38.0±0.5)℃高温胁迫处理;干旱胁迫处理采用‘浇灌法’,一次性浇灌20%的PEG 6 000溶液,重复将浇灌后流出的溶液倒回盆内直至达到完全吸收;盐胁迫处理以‘浇灌法’浇400 mmol/L的盐溶液。分别在处理0、3、6、12、24 h后剪取荔枝苗嫩叶片,每个处理均设置3次生物学重复。样品采集后进行液氮速冻,置于–80℃冻存备用。

1.2 荔枝HSP70家族的鉴定

荔枝蛋白质序列通过荔枝基因组数据库^[16]获得,HSP70蛋白结构域(PF00012)的隐马尔可夫模型(hidden Markov model, HMM)从Pfam数据库(<http://pfam-legacy.xfam.org/search#tabview=tab2>)获得。通过HMM 3.0软件在E-value<10⁻⁶条件下对荔枝HSP70基因家族进行初步筛选,再结合CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/?term=>)、Hmmscan(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>)和Search InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)对候选序列验证,最后获得的LcHSP70s按照其在染色体上位置顺序进行命名。采用ExPASy ProtParam

(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析 LcHSP70 蛋白的基本特征,在 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)上进行 LcHSP70 蛋白序列的亚细胞定位预测。

1.3 荔枝 *HSP70* 家族的染色体定位及共线性分析

荔枝基因组注释文件来源于荔枝基因组数据库,使用 TBtools^[17]中的 Gene Locatin Visualize from GTF/GFF 插件提取 *LcHSP70* 家族成员在染色体上位置信息和荔枝染色体长度信息,绘制 *LcHSP70s* 的染色体定位图。使用 One Step MCScanX 插件检测 *LcHSP70s* 的复制事件以及物种内和物种间的共线性关系,并分别使用 Advanced Circos 和 Dual Systemy Plot for MescanX 插件进行可视化。

1.4 荔枝 *HSP70* 家族的系统进化分析

查阅文献[7]得到 18 个拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和 32 个水稻(*Oryza sativa*)的 *HSP70* 基因序列号,并分别从拟南芥信息资源数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)和水稻基因组注释数据库(http://rice.plantbiology.msu.edu/downloads_gad.shtml)下载其蛋白序列。然后使用 MEGA 7.0 软件的 ClustalW Parameters 算法对荔枝、拟南芥和水稻 *HSP70* 家族成员的蛋白序列进行多序列比对,使用邻接法(neighbor-joining method, NJ)并设置 1 000 次 bootstrap 值重复检验构建系统进化树。

1.5 荔枝 *HSP70* 家族的基因结构及蛋白保守基序分析

采用 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>)绘制 *LcHSP70s* 的结构分布图。利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)分析 *LcHSP70s* 的蛋白保守基序,基序数设定为 10,其他参数默认,然后使用 Visualize Motif Pattern (from meme.xml/mast.xml)插件绘制 motif 结构

分布图。结合 CDD 数据库对 10 个 motif 进行分析,确证属 *HSP70* 结构域的 motif。

1.6 荔枝 *HSP70* 家族的二级结构及启动子顺式作用元件预测

使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测分析 *LcHSP70* 蛋白的二级结构。使用 TBtools 中的 GXF Sequences Extract 插件提取 *LcHSP70s* 起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的启动子序列,使用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测其顺式作用元件,并在 TBtools 中的 HeatMap 插件上将数据可视化。

1.7 荔枝 *HSP70* 家族的组织特异性分析

结合荔枝基因组数据库提取的 *LcHSP70s* 在荔枝根、叶、雄花、雌花、子房、果柄、果皮、假种皮和种子表达的每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数(fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM)值,使用 TBtools 中的 HeatMap 插件绘制表达热图,绿色到红色代表基因表达量由低到高。

1.8 荔枝 *HSP70* 家族成员在不同非生物胁迫处理下的实时荧光定量 PCR 分析

使用植物总 RNA 提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司)提取保存好的荔枝叶片总 RNA,使用 NanoDrop-2000c 型微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific)检测总 RNA 的浓度和纯度, $OD_{260/280}$ 在 1.8–2.0 之间。*LcHSP70s* 荧光定量分析所需 cDNA 采用 cDNA 第一链合成试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司)对总 RNA 进行反转录得到。使用 TBtools 中的 Batch q-PCR Primer Design 插件设计实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)引物(表 1),经 Oligo 7.0 软件验证后由擎科生

表1 荔枝 *HSP70* 家族成员的 qRT-PCR 引物序列信息Table 1 qRT-PCR primers for *LcHSP70* family members

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>LcHSP70-1</i>	CCGCGTTGAACGAGCATG	TGTTGCTGCTGCTCTGCA
<i>LcHSP70-5</i>	AGCAGCTTGGGAGGGAGA	ACTTCTCACATGCGGCC
<i>LcHSP70-10</i>	CCCAGGAGTTCCCCAGA	TGGGCAAGGTGCTAGCAC
<i>LcHSP70-14</i>	AGCGGAGAGGGTGGTGAT	CCCCACCGACGGTTTCAA
<i>LcHSP70-16</i>	GCCCGGTGTGTTGATCCA	GGAGGAATGCCCGAGAGC
<i>LcHSP70-18</i>	CCCCGATTCGATCGCGA	AGACCTTGTGCGGATGGC
<i>Actin</i>	CAACTGGTATTGTCTGGATTCTG	TCATCAAGGCATCGGTTAGA

物科技有限公司(广州)合成。参照 2×SYBR Green PCR Mix (杭州新景生物试剂开发有限公司)试剂说明书在 QuantStudio™ 3 Real-Time PCR 型仪器(Thermo Fisher Scientific)上分别进行低温、高温、干旱及盐胁迫下 *LcHSP70s* 的表达模式分析。内参基因为荔枝 *Actin*^[18], 反应均为 3 次技术重复。采用 2^{-ΔΔC_t}法^[19]计算 *LcHSP70s* 的相对表达量, 使用 DPS 9.01 软件分析基因表达量间的差异显著性($P < 0.05$), 使用 SigmaPlot 14.0 软件绘制基因表达图。

2 结果与分析

2.1 荔枝 *HSP70* 家族成员的特征分析

本研究鉴定到 18 个 *LcHSP70* 基因家族成员, 根据其在染色体上的定位依次命名为 *LcHSP70-1*–*LcHSP70-18* (表 2)。LcHSP70 蛋白序列差异明显, 氨基酸数目为 479–851 aa; 等电点集中在 5.07–6.95, 18 个 LcHSP70 蛋白的等电点均小于 7, 为酸性蛋白; 分子质量最大为 94.07 kDa, 最小为 52.44 kDa, 平均分子质量为 74.35 kDa; 在 18 个 LcHSP70 蛋白中, 仅有 16.67% (3 个)成员的不稳定系数大于 40, 表明大部分 LcHSP70 蛋白是稳定存在的; 除 *LcHSP70-1* 蛋白外, 其他蛋白的亲水性均小于 0, 为亲水性蛋白; 脂肪系数从 77.31–100.42 不等, 平均脂肪系数为 86.49。亚细胞定位预测发现,

LcHSP70 蛋白分别定位在细胞质(10 个)、内质网(3 个)、细胞核(2 个)、叶绿体(2 个)和线粒体(1 个)中。

2.2 荔枝 *HSP70* 家族成员的染色体定位及共线性分析

染色体定位分析发现 18 个 *LcHSP70* 基因在荔枝 15 条染色体中的第 1、2、3、4、5、6、9、10、13、15 号染色体上呈现不均匀分布(图 1)。Chr2 定位的 *LcHSP70s* 数量最多, 有 4 个; 其次是含有 2 个 *LcHSP70s* 的 Chr1、Chr3、Chr5、Chr13 和 Chr15; Chr4、Chr6、Chr9 和 Chr10 上定位的 *LcHSP70s* 数量最少, 均仅有 1 个。总体来看, 染色体长度与其上定位的 *LcHSP70s* 数量无正相关联系。

物种内共线性分析结果显示, 在 *LcHSP70* 家族中未发现串联重复复制事件, 但 18 个 *LcHSP70s* 中存在 2 对片段复制基因, 分别是 *LcHSP70-5/LcHSP70-6* 和 *LcHSP70-8/LcHSP70-17* (图 2)。说明某些 *LcHSP70s* 可能是由基因复制产生的, 这些结果表明基因复制事件可能在 *LcHSP70* 基因家族的进化和扩张中扮演重要角色。

物种间基因组共线性分析结果显示, 荔枝与拟南芥、水稻 2 物种间分别具有 3 个和 5 个有共线性关系的 *LcHSP70s*, 无 *LcHSP70s* 在拟南芥和水稻中同时具有同源关系(图 3)。此外, 具

表 2 荔枝 *HSP70* 家族成员的基本信息

Table 2 The basic information of *LcHSP70* family members

Gene name	Gene ID	Amino acid number	pI	Molecular weight (kDa)	Instability index	GRAVY	Aliphatic index	Subcellular localization
<i>LcHSP70-1</i>	LITCHI014782.m1	571	5.31	61.85	36.33	0.025	100.42	Cyto
<i>LcHSP70-2</i>	LITCHI016034.m1	654	5.31	71.77	35.37	-0.439	83.81	Cyto
<i>LcHSP70-3</i>	LITCHI012388.m1	669	5.07	73.78	30.26	-0.435	87.44	ER
<i>LcHSP70-4</i>	LITCHI013518.m1	623	5.62	68.88	30.73	-0.381	88.33	Cyto
<i>LcHSP70-5</i>	LITCHI014011.m1	769	6.31	85.45	37.48	-0.385	83.04	Cyto
<i>LcHSP70-6</i>	LITCHI014019.m1	769	6.54	85.35	39.23	-0.395	82.80	Nucl
<i>LcHSP70-7</i>	LITCHI027744.m1	648	5.12	70.96	32.92	-0.393	83.72	Cyto
<i>LcHSP70-8</i>	LITCHI027751.m1	649	5.26	71.14	36.90	-0.412	82.22	Cyto
<i>LcHSP70-9</i>	LITCHI030681.m1	851	5.20	94.07	43.67	-0.440	77.31	Cyto
<i>LcHSP70-10</i>	LITCHI000642.m1	708	5.27	75.97	31.14	-0.331	85.90	Chlo
<i>LcHSP70-11</i>	LITCHI001324.m1	682	5.62	73.22	38.64	-0.313	88.12	Mito
<i>LcHSP70-12</i>	LITCHI004272.m1	662	5.36	73.21	28.82	-0.315	93.96	ER
<i>LcHSP70-13</i>	LITCHI029583.m1	765	5.38	85.42	46.63	-0.342	84.88	Nucl
<i>LcHSP70-14</i>	LITCHI021878.m2	479	6.95	52.44	25.76	-0.200	95.66	ER
<i>LcHSP70-15</i>	LITCHI024869.m1	568	5.70	62.55	29.87	-0.438	84.00	Cyto
<i>LcHSP70-16</i>	LITCHI024871.m1	650	5.17	71.32	34.78	-0.436	81.95	Cyto
<i>LcHSP70-17</i>	LITCHI018457.m1	648	5.10	71.20	33.88	-0.411	82.81	Cyto
<i>LcHSP70-18</i>	LITCHI019212.m1	808	5.97	89.66	43.51	-0.301	90.37	Chlo

Cyto: Cytoplasm; ER: Endoplasmic reticulum; Nucl: Nucleus; Chlo: Chloroplast; Mito: Mitochondrion.

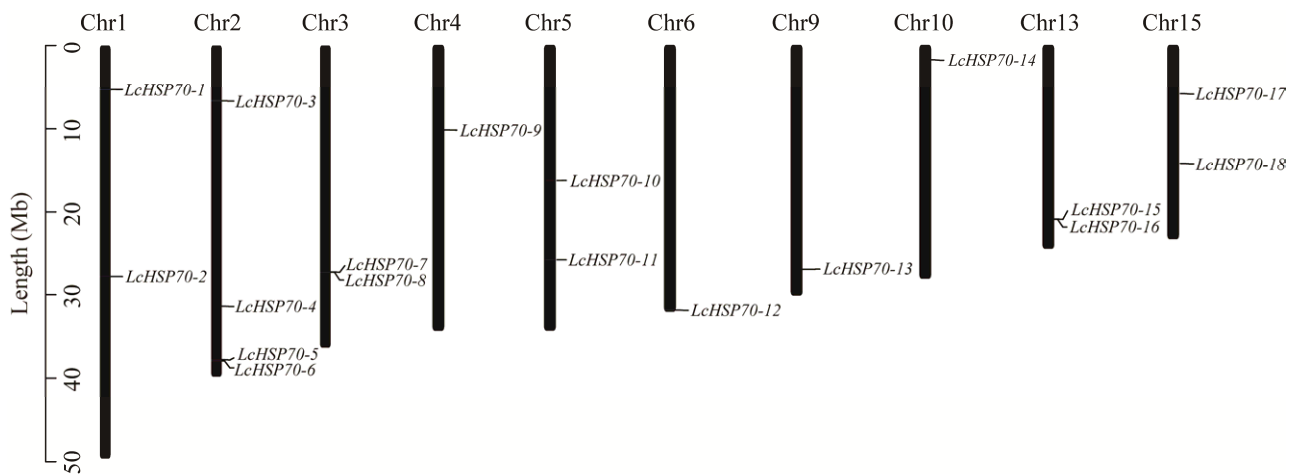


图 1 荔枝 *HSP70* 家族成员的染色体定位

Figure 1 Chromosome location of *LcHSP70* family members.

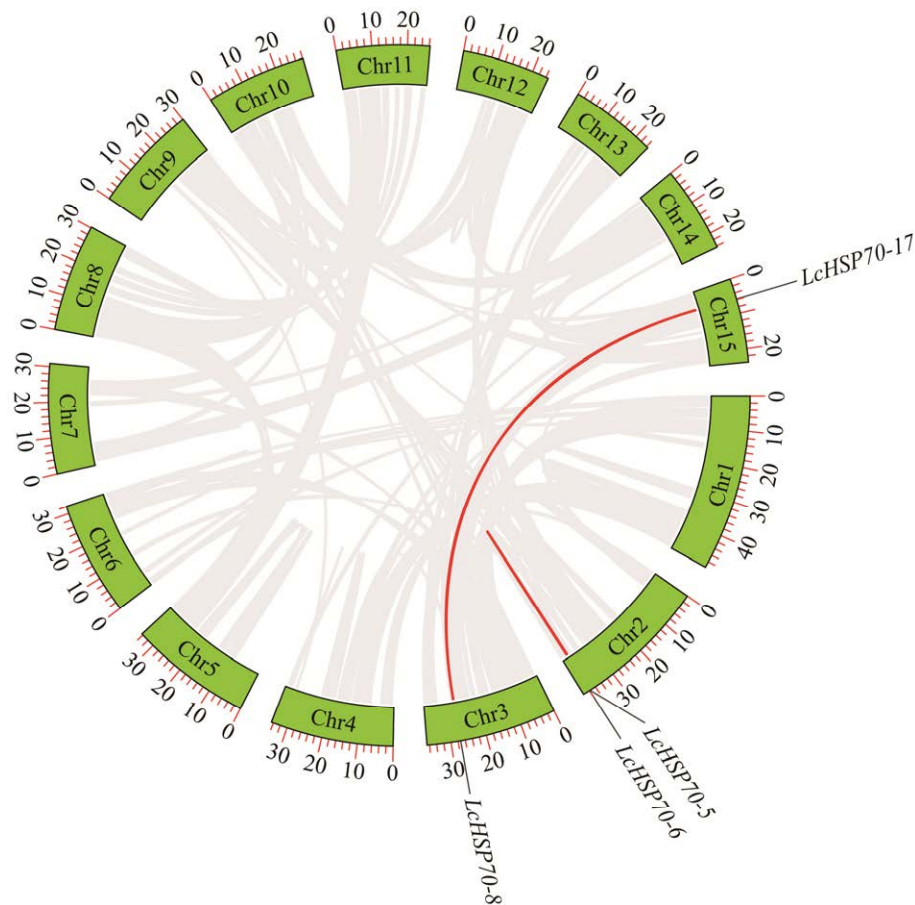


图2 荔枝 *HSP70* 家族成员的共线性分析 Chr1–Chr15 为荔枝 15 条染色体；0–40 为染色体长度，单位为 Mb；红色线连接基因为共线性基因。下同

Figure 2 Collinear distribution of *LcHSP70* family members. Chr1–Chr15 represent fifteen *Litchi chinensis* chromosomes; 0–40 represent chromosome length, the unit is Mb; The genes connected by red lines have a collinear relationship. The same below.

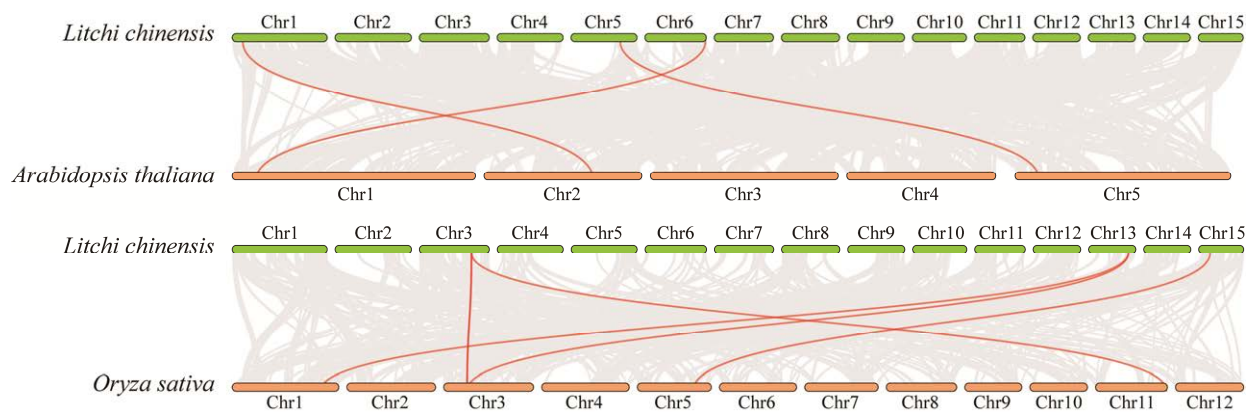


图3 荔枝、拟南芥和水稻 *HSP70* 家族成员的同线性分析

Figure 3 Synteny analysis of *HSP70* family members between *Litchi chinensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*.

有共线性关系的基因在进化过程中高度同源，且在系统进化分析中高度保守。

2.3 荔枝 *HSP70* 家族成员的系统进化分析

基于荔枝、拟南芥和水稻中 *HSP70* 基因的蛋白序列构建系统发育进化树，并根据拟南芥 *HSP70* 基因分类特点对 *LcHSP70* 基因进行分类。结果显示(图 4)，供试 *HSP70* 基因共分为 6 个亚

族(I-IV)，而荔枝 *HSP70* 基因被划分到 5 个亚族，与 *LcHSP70* 蛋白进化树的划分结果一致。其中I亚族的 *LcHSP70s* 数量最多，达到 7 个，其数量显著多于其他亚族，说明I亚族可能为 *LcHSP70* 基因家族中最重要的亚族，暗示该亚族成员在荔枝生长发育过程中起着重要作用；而IV亚族的 *LcHSP70s* 数量最少，仅有 1 个；

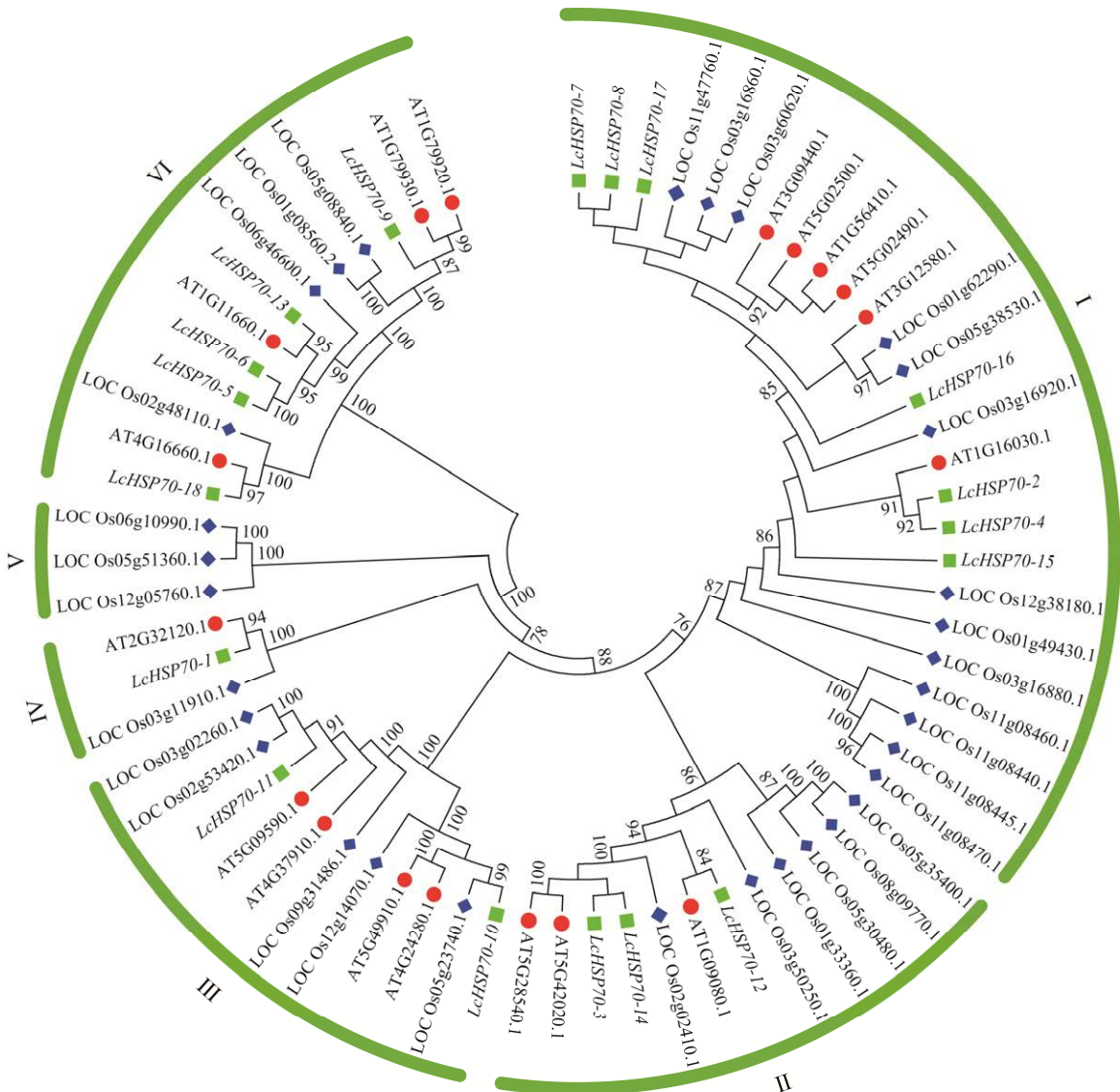


图 4 荔枝、拟南芥和水稻 *HSP70* 家族成员的系统发育进化树 分支上数值表示大于 75% 的自展支持率

Figure 4 Phylogenetic trees of *HSP70* family members between *Litchi chinensis* (*Lc*), *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. The number of the branches indicate the bootstrap confidence values over 75%.

V亚族中则不含 *LcHSP70s*。进一步分析发现, 与水稻相比, 荔枝与同为双子叶植物纲的拟南芥亲缘关系更近。

2.4 荔枝 *HSP70* 家族成员的基因结构及蛋白保守基序分析

为探究 *LcHSP70s* 的基因结构特性, 进行了内含子和外显子组成分析。结果显示(图 5), 所有 *LcHSP70s* 的基因结构相对易变, 因为内含子数量变幅较大, 介于 0-9 个之间。其中, 含有内含子数目最多的为 *LcHSP70-18*, 达到 9 个; 数目最少的为 *LcHSP70-1*、*LcHSP70-2* 和 *LcHSP70-4*, 均不含内含子; 剩余的 14 个 *LcHSP70s* 中, 5 个成员含有 1 个内含子, 2 个成员含有 5 个内含子, 1 个成员含有 6 个内含子, 2 个成员含有 7 个内含子, 4 个成员含有 8 个内含子。系统发育进化树中聚类为同一亚族的 *LcHSP70s* 通常含有相似的内含子-外显子结构, 如在 VI 亚族中约 80.00% (4 个) 的 *LcHSP70s* 均含有 8 个位置相近的内含子。

为探究 *LcHSP70* 蛋白的序列特征, 进行了保守基序组成分析, 得到 10 类保守 motif。结果显示(图 6), *LcHSP70* 蛋白的 motif 数量为 7-10 个不等。其中, 10 个 *LcHSP70* 蛋白中均含有这 10 类 motif, 其余蛋白中均存在保守 motif 的缺失; *LcHSP70-15* 蛋白的基序排列较为特殊, 出现了 motif 9 的 2 次串联重复。总体来看, 同一亚族 *LcHSP70* 蛋白间 motif 的数量、类型和空间分布类似, 如 *LcHSP70-2*、*LcHSP70-4*、*LcHSP70-7*、*LcHSP70-8*、*LcHSP70-16* 和 *LcHSP70-17*; 但同一亚族间不同的 *LcHSP70* 蛋白所含有的保守基序数也存在差异, 如 *LcHSP70-14* 的 motif 数量相比同亚族其他成员有缺失, 这可能是基因串联重复过程中碱基丢失引起的; 88.89% (16 个) 的 *LcHSP70* 蛋白 N 端是 motif 4, 88.89% (16 个) 的 *LcHSP70* 蛋白 C 端是 motif 7。利用 CDD 进一步分析 10 个 motif, 发现 motif 1、motif 2、motif 3、motif 4、motif 6、motif 8 和 motif 10 (图 7) 均属于核苷酸结合结构

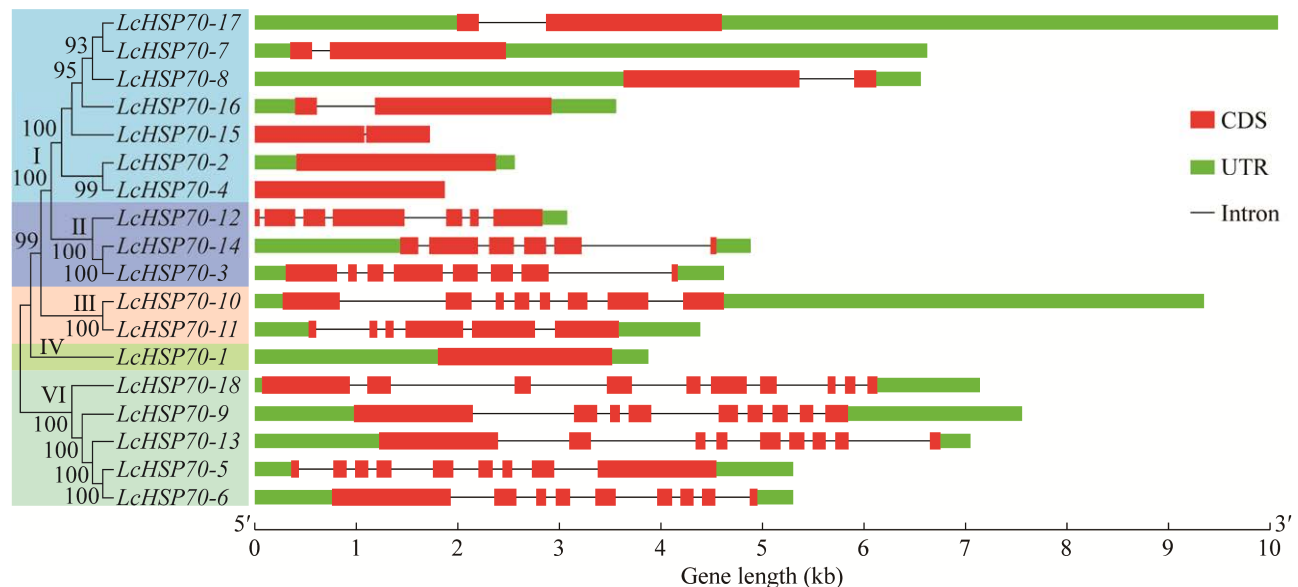


图 5 荔枝 *HSP70* 家族成员的基因结构 数值表示 1 000 次重复抽样所得 75% 以上的置信度

Figure 5 Gene structure of *LcHSP70* family members. The number represent the percentage of 1 000 bootstrap replications, only above 75% was shown.

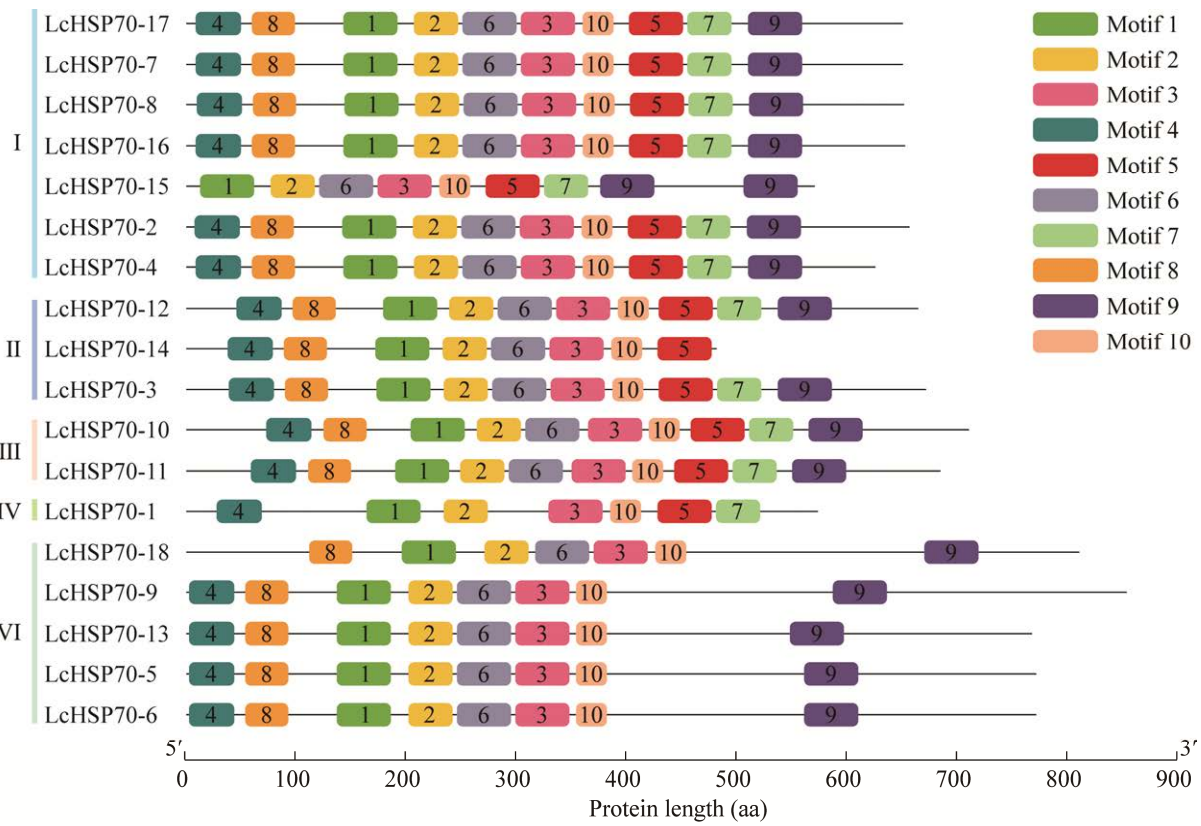


图 6 荔枝 *HSP70* 家族成员的保守基序分布

Figure 6 Distribution of conserved motifs within *LcHSP70* family members.

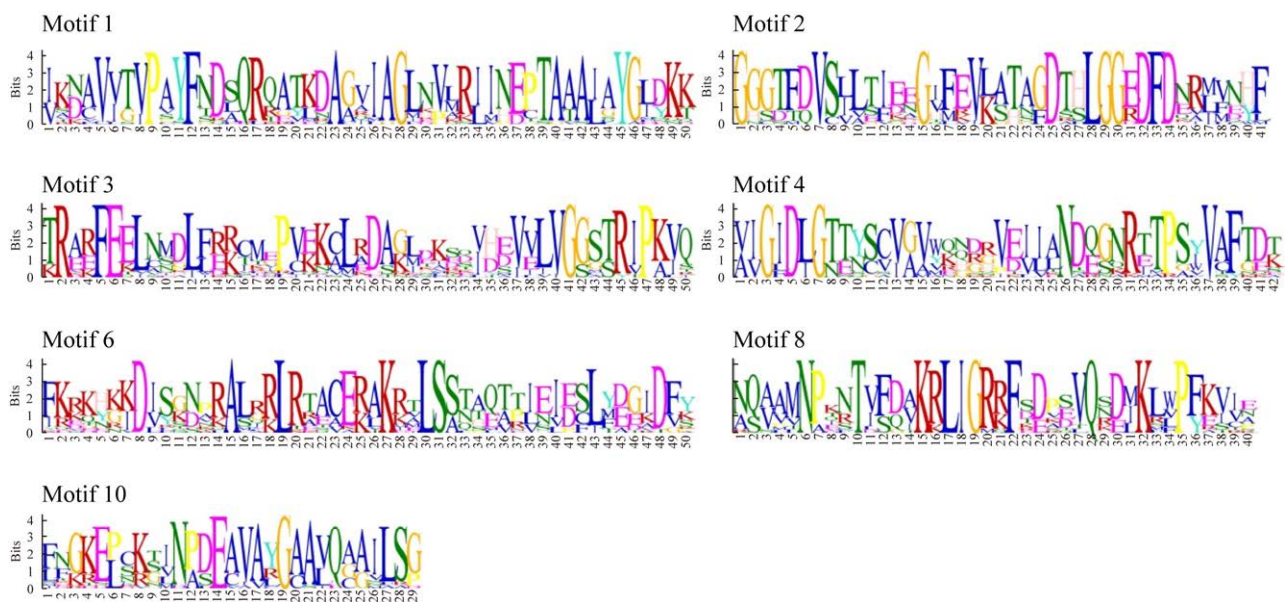


图 7 利用 CDD 比对的荔枝 *HSP70* 家族成员的 7 个 motif

Figure 7 Seven motifs of *LcHSP70* family members were compared by the CDD.

域(nucleotide binding domain, NBD), 是 *HSP70* 基因家族的典型结构域。

2.5 荔枝 *HSP70* 家族成员的二级结构及启动子顺式作用元件分析

LcHSP70 蛋白二级结构的预测结果显示, 18 个 *LcHSP70* 蛋白的二级结构均存在 α -螺旋(alpha helix)、 β -折叠(beta turn)和无规则卷曲(random coil)现象(表 3)。其中, α -螺旋和无规则卷曲所占比例分别为 33.63%–48.42%和 28.70%–41.25%, 是 *LcHSP70* 蛋白结构的主要组成部分; β -折叠所占比例最小, 为 2.70%–7.93%。

LcHSP70s 启动子顺式作用元件的预测结果显示(图 8), 18 个 *LcHSP70s* 启动子上游 2 000 bp 序列的顺式作用元件主要分为植物生长发育响应、激素响应和逆境响应共 3 种类型的元件。其中, 植物生长发育响应元件在 *LcHSP70s* 中预测到 4 种, 所有的 *LcHSP70s* 均存在数量不

表 3 荔枝 *HSP70* 家族成员的二级结构组成
Table 3 Secondary structure of *LcHSP70* family members

Protein	Alpha helix (%)	Extended strand (%)	Beta turn (%)	Random coil (%)
LcHSP70-1	33.63	22.24	5.78	38.35
LcHSP70-2	41.44	18.20	5.96	34.40
LcHSP70-3	45.74	17.79	7.77	28.70
LcHSP70-4	43.50	18.14	6.26	32.10
LcHSP70-5	46.29	14.43	2.86	36.41
LcHSP70-6	46.68	14.43	3.12	35.76
LcHSP70-7	42.13	18.06	7.87	31.94
LcHSP70-8	41.45	18.18	6.78	33.59
LcHSP70-9	42.07	13.98	2.70	41.25
LcHSP70-10	39.27	21.75	6.36	32.63
LcHSP70-11	45.01	19.50	6.16	29.33
LcHSP70-12	45.92	17.98	6.65	29.46
LcHSP70-13	46.80	14.77	2.88	35.56
LcHSP70-14	42.38	20.67	7.93	29.02
LcHSP70-15	48.42	16.02	5.99	29.58
LcHSP70-16	42.15	18.15	6.46	33.23
LcHSP70-17	42.59	18.21	7.41	31.79
LcHSP70-18	46.53	14.11	4.46	34.90

一的光响应元件(AE-box, G-Box, GATA-motif, Box 4, ATCT-motif, Sp1, TCT-motif, 3-AF1 binding site, ACE, TCCC-motif, I-box, GT1-motif, MRE), 与玉米醇溶蛋白代谢(O₂-site)相关的元件数量为 14 个, 与分生组织(CAT-box)相关的元件数量为 5 个, 参与昼夜(circadian)控制的元件数量为 4 个; 激素响应元件在 *LcHSP70s* 中预测到 5 种, 分布最广的茉莉酸甲酯响应元件(TGACG-motif, CGTCA-motif)数量最多(54 个), 其次是脱落酸响应元件(abscisic acid response element, ABRE), 数量为 43 个, 而生长素响应元件(TGA-element, AuxRR-core)、赤霉素响应元件(GARE-motif, P-box)和水杨酸响应元件(salicylic acid response element, TCA-element)的数量为 6–14 个; 逆境响应元件中, 参与厌氧诱导(anaerobic induction, ARE)的元件数量为 47 个, 其次是参与非生物胁迫(MBS, LTR, GC-motif)的元件数量为 19 个, 参与应激反应(TC-rich repeats)的元件数量最少, 仅为 3 个。这些结果表明, *LcHSP70s* 在荔枝生长发育、激素诱导和逆境胁迫的过程中可能发挥重要作用。

2.6 荔枝 *HSP70* 家族成员的组织特异性表达

为研究 *LcHSP70s* 的潜在功能, 基于转录组数据库对 *LcHSP70s* 在荔枝不同组织(根、叶、雄花、雌花、子房、果柄、果皮、假种皮和种子)中的 FPKM 值进行分析。结果显示(图 9), *LcHSP70s* 在荔枝不同组织中存在不同程度的表达。其中, *LcHSP70* 家族在假种皮和种子中优势表达的基因数量最多, 均达到 13 个, 聚类在 I 亚族的 *LcHSP70-16* 相对表达量最高; 在根、雄花和果皮中优势表达的基因均有 12 个, 相对表达量最高的分别为 *LcHSP70-14*、*LcHSP70-14* 和 *LcHSP70-17*, 各属于 II 和 I 亚族; 在叶、雌花、子房和果柄中优势表达的基因数量最少, 均仅有 11 个, 相对表达量最高的均为 *LcHSP70-17*。

Growth and development response element	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	2	3	1	0	2	0	0	0	14	AE-box	
	0	4	5	0	0	0	1	0	1	6	3	6	7	5	1	8	3	8	58	G-box	
	0	1	0	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	8	GATA-motif	
	0	1	3	5	2	3	6	5	2	0	1	1	2	2	4	1	2	3	43	Box 4	
	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0	1	0	7	ATCT-motif	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	Sp1	
	0	0	0	1	0	1	1	0	2	2	0	0	1	2	1	0	0	1	12	TCT-motif	
	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	2	0	2	2	14	O ₂ -site	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3-AF1 binding site	
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	ACE	
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	5	CAT-box	
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	4	Circadian	
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	TCCC-motif	
	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	5	I-box	
	0	0	0	0	0	0	4	0	0	3	2	2	0	0	0	1	1	0	13	GT1-motif	
	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	MRE	
	Hormone response element	0	3	3	0	1	1	0	0	1	3	3	5	4	5	1	6	2	5	43	ABRE
		0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	3	2	1	0	0	12	TGA-element
0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	1	0	1	6	TCA-element	
1		3	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	3	2	0	2	7	3	27	TGACG-motif	
1		3	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	3	2	0	2	7	3	27	CGTCA-motif	
0		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	AuxRR-core	
2		0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	5	GARE-motif	
0		0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	1	0	1	0	0	0	0	7	P-box	
Adversity response element	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	6	MBS		
	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	TC-rich repeats		
	5	3	3	3	2	2	2	1	4	2	2	0	6	2	3	2	2	3	47	ARE	
	1	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	11	LTR	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	GC-motif	
	<i>LcHSP70-1</i>	<i>LcHSP70-2</i>	<i>LcHSP70-3</i>	<i>LcHSP70-4</i>	<i>LcHSP70-5</i>	<i>LcHSP70-6</i>	<i>LcHSP70-7</i>	<i>LcHSP70-8</i>	<i>LcHSP70-9</i>	<i>LcHSP70-10</i>	<i>LcHSP70-11</i>	<i>LcHSP70-12</i>	<i>LcHSP70-13</i>	<i>LcHSP70-14</i>	<i>LcHSP70-15</i>	<i>LcHSP70-16</i>	<i>LcHSP70-17</i>	<i>LcHSP70-18</i>	Total		

图 8 荔枝 *HSP70* 家族成员的启动子顺式作用元件

Figure 8 *Cis*-acting elements in promoters of *LcHSP70* family members.

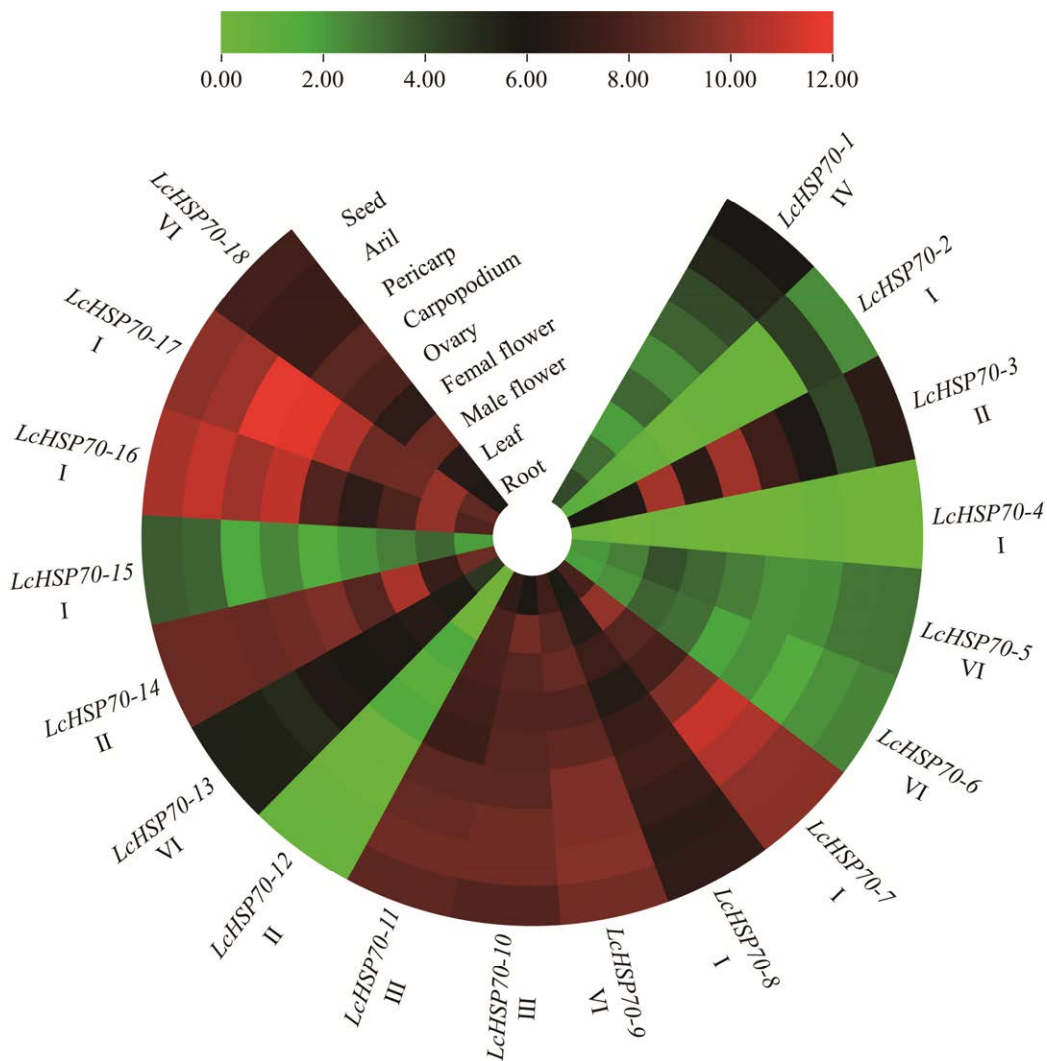


图9 荔枝 *HSP70* 家族成员在 9 个组织的表达谱 不同的罗马数字代表不同的亚族

Figure 9 Expression profiles of *LcHSP70* family members in 9 tissues. Different Roman numerals represent different groups.

该结果说明 *LcHSP70s* 广泛参与荔枝的生长发育,尤其 *LcHSP70-14*、*LcHSP70-16* 和 *LcHSP70-17* 可能发挥重要的生物学作用。

2.7 荔枝 *HSP70* 家族成员在低温、高温、干旱及盐胁迫下的表达模式分析

基因启动子中的顺式作用元件可以为基因的表达模式及其功能研究提供线索^[20-22],根据 *LcHSP70s* 系统进化分析和启动子顺式作用元件预测的结果,从 5 亚族中随机筛选出 6 个

LcHSP70s, 利用 qRT-PCR 技术检测该 6 个基因在低温、高温、干旱和盐胁迫处理下的相对表达量是否存在显著差异。结果显示(图 10),在低温胁迫下,6 个 *LcHSP70s* 的相对表达量随着处理时间的延长整体上呈现“先升高-后降低-再升高”的变化趋势,在处理 6 h 或 24 h 后相对表达量达到峰值,上调 3.06–13.19 倍;在高温胁迫下,6 个 *LcHSP70s* 的相对表达量呈现“先升高-后降低”的变化趋势,6 个基因都快速响应高

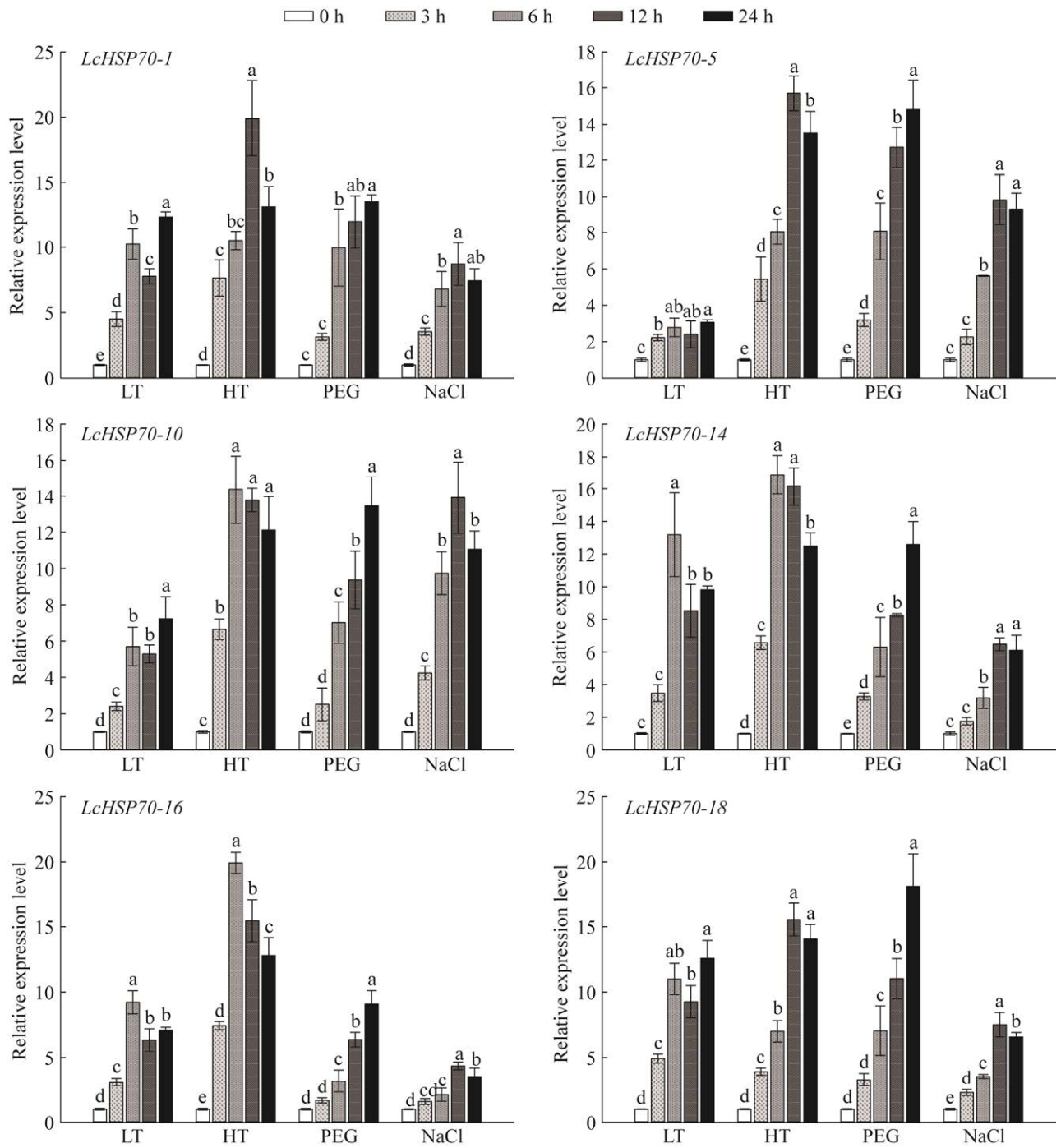


图 10 荔枝 *HSP70* 家族成员在不同非生物胁迫处理下的相对表达量 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上显著差异; LT: $(4.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 低温处理; HT: $(38.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 高温处理; PEG: PEG 6000 溶液处理, 模拟干旱环境; NaCl: 400 mmol/L NaCl 溶液处理, 模拟盐胁迫环境

Figure 10 Relative expression of *LcHSP70* family members under different abiotic stresses treatments. Different small letters indicate significant differences at the 0.05 level; LT: Low temperature; HT: High temperature; PEG: 20% PEG solution, simulating arid environment; NaCl: 400 mmol/L NaCl solution, simulating the salt stress environment.

温胁迫, 在处理 6 h 或 12 h 后相对表达量达到峰值, 上调 14.34–19.90 倍, 而在峰值后均又有不同程度的下调; 在干旱胁迫下, 6 个 *LcHSP70s* 的相对表达量持续上调, 均在处理 24 h 达到峰值, 上调 9.08–18.07 倍; 在盐胁迫下, 6 个 *LcHSP70s* 的相对表达量同样具有“先升高-后降低”的变化趋势, 全部在处理 12 h 达到峰值, 上调 4.37–13.92 倍, 随后在处理 12–24 h 后均有不同程度的下调。这些结果表明, 这 6 个 *LcHSP70s* 对低温、高温、干旱及盐胁迫都具有不同程度的响应, 与其启动子顺式作用元件分析的结果基本一致。

3 讨论与结论

HSP70 基因家族作为热激蛋白家族中的重要成员, 广泛参与植物的生长发育和逆境应答^[23]。荔枝中 *HSP70* 基因家族的鉴定和分析将为其抗逆性研究提供理论基础。本研究从荔枝基因组中鉴定到了 18 个 *LcHSP70s*, 其数量与拟南芥 (18 个)^[7]、南瓜 (*Cucurbita moschata*) (21 个)^[24] 和玉米 (*Zea mays*) (22 个)^[25] 相近, 但明显少于水稻 (32 个)^[7]、甘蓝 (*Brassica oleracea*) (52 个)^[26] 和大豆 (61 个)^[8] 中 *HSP70* 基因的数量, 这可能是由于物种基因组的古多倍化演化、*HSP70* 基因的进化多样性等原因造成的。18 个 *LcHSP70* 蛋白的氨基酸数、等电点及相对分子质量都存在较大差异, 这应该与其功能多样性有关。亚细胞定位预测结果表明, *LcHSP70* 家族成员主要定位在细胞质和内质网中, 这与小麦 (*Triticum aestivum*)^[27] 的研究结果类似, 可见 *LcHSP70s* 主要在细胞质和内质网中行使其功能。基因结构分析显示, *LcHSP70s* 的内含子数量介于 0–9 个之间, 外显子数量为 1–10 个, 与大麦 (*Hordeum vulgare*)^[28]、葡萄 (*Vitis vinifera*)^[29] 等的结构相似, 表明 *HSP70* 家族成员的基因结构在不同物

种中具有保守性。

系统进化树有助于分析基因间的进化关系, 聚类关系密切的基因通常具有相似的结构和功能^[30]。本研究根据系统进化关系将荔枝、拟南芥与水稻 *HSP70* 基因家族分为 6 个亚族, 但荔枝和拟南芥只存在于其中的 5 个亚族, 一些水稻 *HSP70* 基因 (*LOC_Os05g51360.1*、*LOC_Os06g10990.1* 和 *LOC_Os12g05760.1*) 单独划为一个新的亚族 (V), 说明荔枝与同属双子叶植物的拟南芥间的亲缘关系比与单子叶植物水稻更为亲近, 也暗示了 V 亚族可能形成于单子叶植物和双子叶植物分化之后。结合系统进化分析发现, 聚类在同一亚族的 *LcHSP70s* 具有相似的基因结构, 如 I 亚族成员除 *LcHSP70-2* 和 *LcHSP70-4* 外均含有 1 个内含子, VI 亚族成员除 *LcHSP70-18* 外均含有 8 个内含子, 个别基因 (*LcHSP70-2*、*LcHSP70-4* 和 *LcHSP70-18*) 内含子-外显子结构的变异可能是基因在进化过程中内含子的丢失或增加造成的^[31]。

同一物种不同 *HSP70* 基因间及不同物种 *HSP70* 基因间在不同组织器官的表达具有较大差异。如大豆中, *Glyma13g29580* 在幼叶、花、豆荚 (1 cm)、豆荚壳和根 5 种组织中的表达水平较高, 而在种子和根瘤中低表达^[8]; 马铃薯中, *StHSP70-10* 和 *StHSP70-14* 在根和块茎的相对表达量显著高于匍匐茎、雄蕊、叶柄、花以及萼片中^[10]; 铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 中, *DenHSP70-1* 在花和叶中优势表达, 而 *DenHSP70-3* 仅在根中高表达^[32]。本研究对荔枝不同组织的基因表达谱分析发现, *LcHSP70s* 同样具有明显的组织表达特异性, 如 *LcHSP70-1* 在根、果皮、假种皮和种子中高表达, 而在叶、雄花、雌花、子房和果柄中的相对表达量较低; *LcHSP70-7* 在果柄中的相对表达量显著高于根、叶、雄花、雌花、子房、果皮、假种皮和

种子中; *LcHSP70-13* 在雄花、雌花、子房和果柄中优势表达, 而在根、叶、果皮、假种皮和种子中低表达。

基因的表达受启动子顺式作用元件的调控^[33]。研究表明, 植物遭受非生物胁迫时, 脱落酸(abscisic acid, ABA)作为植物逆境胁迫抗性的中枢调节因子, 是植物能够应对不同逆境的必需介质^[34-35]。脱落酸响应元件(ABRE)接受脱落酸分子信号, 从而调控相关基因的表达以增强植物对低温、高温、干旱、盐害等胁迫的抗性^[36-37]。茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)在介导植物对逆境胁迫的防御和调节反应中起积极作用^[38]。MYB 结合位点(MBS)也可以增强植物对干旱胁迫的抗性^[39]。本研究在 *LcHSP70s* 的启动子区域中预测到多种与逆境胁迫相关的顺式作用元件, 其中脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件和 MYB 结合位点可能会使 *LcHSP70s* 在应对低温、高温、干旱及盐害的胁迫过程中发挥重要作用。为进一步验证, 对结合 *LcHSP70s* 系统进化分析和启动子顺式作用元件预测的结果选取的 6 个 *LcHSP70s* 进行了 qRT-PCR 分析, 发现 6 个 *LcHSP70s* 均能快速响应高温胁迫, 但在处理 12 h 或 24 h 后出现不同程度的下调表达, 与小麦^[40]和花楸树(*Sorbus pohuashanensis*)^[37] *HSP70* 基因在高温胁迫下的表达模式相似。此外, 在低温、干旱和盐胁迫下, 6 个 *LcHSP70s* 的相对表达量显著上调, Liu 等^[10]也发现马铃薯 *HSP70* 基因会响应低温、干旱和盐胁迫, 与本研究的分析结果一致。综上结果表明, *LcHSP70s* 在应对低温、高温、干旱及盐胁迫 4 种逆境中发挥着重要的调控作用, 但 *LcHSP70s* 在荔枝生长于逆境胁迫应答中的具体功能机制还需进一步研究。本研究结果为进一步研究荔枝 *HSP70* 基因家族的生物学功能提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] ZHU JK. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.
- [2] ZHANG HM, ZHU JH, GONG ZZ, ZHU JK. Abiotic stress responses in plants[J]. Nature Reviews Genetics, 2022, 23(2): 104-119.
- [3] REHMAN A, ATIF RM, QAYYUM A, DU XM, HINZE L, AZHAR MT. Genome-wide identification and characterization of *HSP70* gene family in four species of cotton[J]. Genomics, 2020, 112(6): 4442-4453.
- [4] YER EN, BALOGLU MC, ZIPLAR UT, AYAN S, UNVER T. Drought-responsive *Hsp70* gene analysis in *Populus* at genome-wide level[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(2): 483-500.
- [5] PANZADE KP, KALE SS, CHAVAN NR, HATZADE B. Genome-wide analysis of *Hsp70* and *Hsp100* gene families in *Ziziphus jujuba*[J]. Cell Stress and Chaperones, 2021, 26(2): 341-353.
- [6] JASROTIA RS, JAISWAL S, YADAV PK, RAZA M, IQUEBAL MA, RAI A, KUMAR D. Genome-wide analysis of HSP70 family protein in *Vigna radiata* and coexpression analysis under abiotic and biotic stress[J]. Journal of Computational Biology, 2020, 27(5): 738-754.
- [7] JUNG KH, GHO HJ, NGUYEN MX, KIM SR, AN G. Genome-wide expression analysis of *HSP70* family genes in rice and identification of a cytosolic *HSP70* gene highly induced under heat stress[J]. Functional & Integrative Genomics, 2013, 13(3): 391-402.
- [8] ZHANG L, ZHAO HL, DONG QL, ZHANG YY, WANG YM, LI HY, XING GJ, LI QY, DONG YS. Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of *HSP70* gene family in soybean (*Glycine max* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 773-787.
- [9] GUO M, LIU JH, MA X, ZHAI YF, GONG ZH, LU MH. Genome-wide analysis of the *Hsp70* family genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional identification of *CaHsp70-2* involvement in heat stress[J]. Plant Science, 2016, 252: 246-256.
- [10] LIU J, PANG X, CHENG Y, YIN YH, ZHANG Q, SU WB, HU B, GUO QW, HA S, ZHANG JP, WAN HJ. The *Hsp70* gene family in *Solanum tuberosum*: genome-wide identification, phylogeny, and expression patterns[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 16628.
- [11] JUNGKUNZ I, LINK K, VOGEL F, VOLL LM, SONNEWALD S, SONNEWALD U. AtHsp70-15-

- deficient *Arabidopsis* plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(6): 983-995.
- [12] SARKAR NK, KUNDNANI P, GROVER A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*)[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2013, 18(4): 427-437.
- [13] 胡冰. ABA 调控荔枝果皮叶绿素降解和花色苷生物合成的分子机理研究[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2018.
- HU B. Study on the molecular mechanism of ABA in regulating chlorophyll degradation and anthocyanin biosynthesis in pericarp of *Litchi chinensis*[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [14] 温珍熹. 荔枝果实脱落相关 NAC 转录因子的筛选及功能分析[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2019.
- WEN ZX. Screening and function analysis of litchi NAC transcription factors involved in fruit abscission[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [15] 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 HQ, WU JG, PAN XB. Key climatic factors affecting the distribution of litchi in China[J]. *Journal of Fruit Science*, 2016, 33(4): 436-443 (in Chinese).
- [16] HU GB, FENG JT, XIANG X, WANG JB, SALOJÄRVI J, LIU CM, WU ZX, ZHANG JS, LIANG XM, JIANG ZD, LIU W, OU LX, LI JW, FAN GY, MAI YX, CHEN CJ, ZHANG XT, ZHENG JK, ZHANG YQ, PENG HX, 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(1): 73-83.
- [17] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [18] SUN JH, CAO LL, LI HL, WANG G, WANG SJ, LI F, ZOU XX, WANG JB. Early responses given distinct tactics to infection of *Peronophythora litchii* in susceptible and resistant litchi cultivar[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2810.
- [19] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. 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.
- [20] SOLTANI BM, EHLTING J, HAMBERGER B, DOUGLAS CJ. Multiple *cis*-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of *Arabidopsis thaliana* 4CL gene family members[J]. *Planta*, 2006, 224(5): 1226-1238.
- [21] WALTHER D, BRUNNEMANN R, SELBIG J. The regulatory code for transcriptional response diversity and its relation to genome structural properties in *A. thaliana*[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(2): e11.
- [22] ABDULLAH M, CHENG X, CAO YP, SU XQ, MANZOOR MA, GAO JS, CAI YP, LIN Y. Zinc finger-homeodomain transcriptional factors (ZHDs) in upland cotton (*Gossypium hirsutum*): genome-wide identification and expression analysis in fiber development[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 357.
- [23] SONG ZP, PAN FL, LOU XP, WANG DB, YANG C, ZHANG BQ, ZHANG HY. Genome-wide identification and characterization of *Hsp70* gene family in *Nicotiana tabacum*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(2): 1941-1954.
- [24] DAVOUDI M, CHEN JF, LOU QF. Genome-wide identification and expression analysis of heat shock protein 70 (*HSP70*) gene family in pumpkin (*Cucurbita moschata*) rootstock under drought stress suggested the potential role of these chaperones in stress tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1918-1933.
- [25] JIANG LY, HU WJ, QIAN YX, REN QY, ZHANG J. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the *Hsf* and *Hsp70* gene families in maize[J]. *Gene*, 2021, 770: 145348.
- [26] SU HN, XING MM, LIU X, FANG ZY, YANG LM, ZHUANG M, ZHANG YY, WANG Y, LV HH. Genome-wide analysis of *HSP70* family genes in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) reveals their involvement in floral development[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 369-382.
- [27] LAI DL, YAN J, FAN Y, LI Y, RUAN JJ, WANG JZ, FAN Y, CHENG XB, CHENG JP. Genome-wide identification and phylogenetic relationships of the *Hsp70* gene family of *Aegilops tauschii*, wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and bread wheat (*Triticum aestivum*)[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(6): 301-316.

- [28] CHAUDHARY R, BARANWAL VK, KUMAR R, SIRCAR D, CHAUHAN H. Genome-wide identification and expression analysis of *Hsp70*, *Hsp90*, and *Hsp100* heat shock protein genes in barley under stress conditions and reproductive development[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2019, 19(6): 1007-1022.
- [29] LIU XN, CHEN HY, LI SC, WANG LJ. Genome-wide identification of the *Hsp70* gene family in grape and their expression profile during abiotic stress[J]. *Horticulturae*, 2022, 8(8): 743.
- [30] 马维峰, 李艳梅, 马宗桓, 陈佰鸿, 毛娟. 苹果 *POD* 家族基因的鉴定与 *MdPOD15* 的功能分析[J]. *园艺学报*, 2022, 49(6): 1181-1199.
- MA WF, LI YM, MA ZH, CHEN BH, MAO J. Identification of apple *POD* gene family and functional analysis of *MdPOD15* gene[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49(6): 1181-1199 (in Chinese).
- [31] MA J, WANG QL, SUN RR, XIE FL, JONES DC, ZHANG BH. Genome-wide identification and expression analysis of TCP transcription factors in *Gossypium raimondii*[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6645.
- [32] WANG HM, DONG ZQ, CHEN JB, WANG M, DING YT, XUE QY, LIU W, NIU ZT, DING XY. Genome-wide identification and expression analysis of the *Hsp20*, *Hsp70* and *Hsp90* gene family in *Dendrobium officinale*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 979801.
- [33] GARLOS MH, FINER JJ. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements[J]. *Plant Science*, 2014, 217/218: 109-119.
- [34] SAH SK, REDDY KR, LI JX. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 571.
- [35] 李可心, 王颖, 姚明东, 肖文海. 脱落酸生物合成研究进展[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2190-2203.
- LI KX, WANG Y, YAO MD, XIAO WH. Advances in abscisic acid biosynthesis[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2190-2203 (in Chinese).
- [36] 田介云. 花椒幼苗低温胁迫下生理和分子响应机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2022.
- TIAN JY. Physiological and molecular response mechanism of *Zanthoxylum bungeanum* seedlings under low temperature stress[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2022 (in Chinese).
- [37] 李玉言, 张泽人, 邸泽鑫, 戚相玉, 张炎, 王聪, 鲁仪增, 郑健. 花椒树 *HSP70* 基因家族鉴定及其应答非生物胁迫表达分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(9): 1973-1984.
- LI YY, ZHANG ZR, DI ZX, QI XY, ZHANG Y, WANG C, LU YZ, ZHENG J. Genome-wide investigation of heat shock protein 70 gene family in *Sorbus pohuashanensis* and their expression analysis in response to abiotic stresses[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(9): 1973-1984 (in Chinese).
- [38] CHEN HY, HSIEH EJ, CHENG MC, CHEN CY, HWANG SY, LIN TP. 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.
- [39] ZHANG L, SONG ZQ, LI FF, LI XX, JI HK, YANG SS. 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): 566.
- [40] 刘阳. 普通小麦热激蛋白 70 基因家族分析及 *TaHsp70-47* 的克隆[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
- LIU Y. Genome-wide analysis of *Hsp70* gene family and cloning of *TaHsp70-47* gene in wheat[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)