

马 艳, 苟秉调, 赵淑芳, 等. 辣椒 *CaTPS11* 基因克隆及非生物胁迫下的表达[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(6): 1060-1069.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.06.013

辣椒 *CaTPS11* 基因克隆及非生物胁迫下的表达

马 艳, 苟秉调, 赵淑芳, 魏 敏, 段盼盼, 匡小妍, 张 涛, 魏兵强
(甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 本研究以强丰 101 辣椒品种为材料, 分析辣椒 *CaTPS11* 基因编码蛋白质的理化性质、蛋白质氨基酸序列及组织特异性表达, 利用荧光定量 PCR 技术分析 *CaTPS11* 基因在低温、激素处理过程中的表达量变化。结果表明, *CaTPS11* 基因全长 2 805 bp, 编码 921 个氨基酸。与辣椒基因组数据库参考序列比对, *CaTPS11* 基因存在 5 个单碱基差异和 2 处内含子保留剪切, 启动子区存在植物激素、低温、光等多种响应元件。CaTPS11 蛋白相对分子量为 1.033×10^5 , 理论等电点 8.33; 无跨膜结构和信号肽, 具有 TPS 蛋白家族的典型结构域。亚细胞定位分析结果表明 CaTPS11 蛋白定位于细胞质和叶绿体中。CaTPS11 蛋白氨基酸序列与龙葵、马铃薯 TPS 蛋白氨基酸序列同源关系最近且进化高度保守。CaTPS11 基因在成熟果胎座中的表达量最高, 为成熟果果肉的 26 倍。IAA 处理抑制 *CaTPS11* 基因的表达, 低温胁迫、ABA、GA、MeJA 处理均诱导该基因的表达。MeJA 处理 6 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因表达量达到最大, 约为对照的 9 倍。CaTPS11 基因存在时空表达差异, 推测该基因通过内含子保留的可变剪切模式和 MeJA 信号通路正向响应非生物胁迫的方式提高自身表达, 以应对逆境胁迫。

关键词: 辣椒; *CaTPS11* 基因; 非生物胁迫; 基因表达

中图分类号: S641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)06-1060-10

Cloning of *CaTPS11* gene and expression under abiotic stress in pepper

MA Yan, GOU Bingtiao, ZHAO Shufang, WEI Min, DUAN Panpan, KUANG Xiaoyan, ZHANG Tao, WEI Bingqiang

(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In this study, the physicochemical properties of the protein encoded by *CaTPS11* gene, amino acid sequence and tissue-specific expression were analyzed by using Qiangfeng 101 pepper as the material. The expression of *CaTPS11* gene in low temperature and hormone treatments was analyzed by real-time quantitative PCR. The results showed that *CaTPS11* gene was 2 805 bp in length and encoded 921 amino acids. Compared with the reference sequence of pepper genome database, the *CaTPS11* gene had five single-base differences and two intron-retained splits, and many response elements such as plant hormone, low temperature and light were found in the promoter region. The relative molecular weight of CaTPS11 protein was 1.033×10^5 , with theoretical isoelectric point of 8.33. CaTPS11 protein had no transmembrane structure and signal peptide, and it had the typical domain of TPS protein family. Subcellular localization analysis indicated that CaTPS11 protein was localized in

cytoplasm and chloroplast. The amino acid sequence of CaTPS11 protein was closely related to the amino acid sequence of TPS protein of *Solanum nigrum* L. and potato, and the evolution was highly conserved. The expression level of *CaTPS11* gene in mature fruit placenta was the highest, and was 26 times higher than that in mature fruit pulp. IAA treatment inhibited the expression of *CaTPS11* gene, while

收稿日期: 2023-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760572); 甘肃省重点研发计划项目 (21YF5NA091); 兰州市人才创新项目 (2021-RC-65); 甘肃农业大学青年导师扶持项目 (GAU-QDFC-2020-07)

作者简介: 马 艳 (1998-), 女, 甘肃临夏人, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜遗传与分子育种。(E-mail) MaYann1586@163.com

通讯作者: 魏兵强, (E-mail) bqwei@gsau.edu.cn

cold stress treatment, ABA treatment, GA treatment and MeJA treatment induced the expression of *CaTPS11* gene. The expression level of *CaTPS11* gene in pepper treated with MeJA for 6 h was nine times higher than that in the control. The *CaTPS11* gene had spatial and temporal expression differences. It was inferred that *CaTPS11* gene could enhance its expression in response to abiotic stress by means of variable splicing mode of intron retention and positive response of MeJA signal pathway.

Key words: pepper; *CaTPS11* gene; abiotic stress; gene expression

辣椒 (*Capsicum annuum* L.), 茄科辣椒属, 一年生或有限多年生草本植物, 为世界性的蔬菜或观赏植物。中国作为世界上辣椒第一生产国和消费国, 近年辣椒总种植面积已达 2.13×10^6 hm² 左右, 约占世界辣椒总种植面积的 40%, 在世界和中国蔬菜产业中均占据重要地位^[1]。辣椒在其生长发育过程中易受到非生物胁迫的影响, 有研究表明, 盐、碱胁迫使得辣椒的发芽相关指标降低, 且胚芽和胚根的生长与盐碱胁迫呈明显负相关^[2-3], 高温或低温胁迫危害植物生长发育, 导致作物品质降低、产量下降^[4], 因此需要培育抗逆能力较强的辣椒品种。

海藻糖-6-磷酸合酶 (*TPS*) 是海藻糖 (Trehalose) 和海藻糖-6-磷酸 (Trehalose-6-phosphate, T6P) 合成途径中的关键酶, 可响应非生物胁迫、增加植物抗逆性。在不同生物体内, 葡萄糖、麦芽糖和淀粉均以底物的形式存在, 通过与海藻糖合成有关的酶作用转化形成海藻糖 (*OtsA-OtsB* 途径/*TPS-TPP* 途径)^[5]。高等植物体以葡萄糖 (Glucose) 为底物, 首先二磷酸尿苷-葡萄糖 (Uridine-5'-diphosphate glucose, UDP-G) 和葡萄糖-6-磷酸 (Glucose-6-phosphate, G6P) 在 *TPS* 催化下生成 T6P, 然后 T6P 在海藻糖-6-磷酸酯酶 (*TPP*) 的作用下脱磷酸, 最终生成海藻糖^[6-7]。

海藻糖是非还原性双糖^[8], 具有特殊对称结构, 是天然双糖中最稳定的, 既能在适宜条件下参与植物生长发育过程, 也能在逆境下稳定生物大分子的结构和功能^[9-11]。带有羟基的海藻糖在脱水条件下与膜和生物大分子形成氢键, 可以替代维持空间结构时所必需的水分子, 因此海藻糖可以提高胡萝卜、烟草等细胞的抗冻能力^[12]; 淀粉合成关键酶 ADP-葡聚糖焦磷酸化酶 (*AGPase*) 的活性、淀粉中碳的重新分配均受海藻糖代谢调控^[13]。海藻糖在植物体碳代谢、生长发育、光合作用及逆境胁迫过程中发挥着重要作用^[14-15], T6P 在植物体胚胎形成、淀粉合成和光合作用调节等代谢和发育阶段起核心作用^[16-17], 与此同时海藻糖和 T6P 还都参与植物体信号传导过程^[17-18]。

综上所述, 海藻糖、T6P 均参与生物体抗逆和生

长发育过程, 因此作为海藻糖和 T6P 合成途径中的关键酶 *TPS* 在植物体抗逆与生长发育过程中也发挥重要作用。研究表明, *TPS* 基因的表达能明显提高作物对胁迫的适应性。大肠杆菌海藻糖-6-磷酸合成酶基因复合体 (*OtsBA*) 导入甜菜和马铃薯中, 获得了 *TPS* 基因高表达且抗寒性明显增加的植株^[19]; 转大肠杆菌海藻糖-6-磷酸合酶基因 (*OtsA*) 的烟草能在 NaCl (2%) 培养基和干旱环境中生长, 海藻糖磷酸合酶基因的转入和表达提高了植株耐盐性和抗旱性^[20-21]。变性的 *TPS1/TPP* 同源基因能在土豆、烟草、向日葵等植物体内产生海藻糖, 且使一些原来对低温敏感植株的突变体能在 38.6 °C 的高温下存活^[22]。拟南芥 *AtTPS11* 基因的表达能增强拟南芥对绿桃蚜虫 (Green peach aphid, GPA) 的防御, 在 *AtTPS11* 基因敲除的突变体上绿桃蚜虫数量增加且叶片所含海藻糖减少^[23]。*AtTPS1* 基因功能丧失还会影响植物体糖代谢和 ABA 的生物合成, 导致胚胎发育延缓, 植物体正常生长发育被扰乱^[24-25]。

随着生物信息学的发展和辣椒基因组测序的完成, 辣椒育种和研究工作变得十分便利。甘肃农业大学园艺学院分子育种课题组 2016 年在辣椒全基因组中共鉴定出 11 个辣椒 *TPS* 基因^[26], 依次命名为 *CaTPS1~CaTPS11*。目前, *CaTPS11* 的功能尚未明确, 制约了 *CaTPS* 基因家族在辣椒抗逆育种中的应用。本研究拟明确 *CaTPS11* 基因在不同组织、外源激素处理及低温胁迫时的表达特性, 从一定程度上揭示该基因应对非生物胁迫的调控机制, 为研究 *CaTPS* 基因功能、抗逆育种、转基因新品种选育等方面提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为辣椒品种强丰 101, 由甘肃农业大学园艺学院分子育种学实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 辣椒苗准备 挑取大小均一、籽粒饱满的种子, 用纱布包好系上标签, 于 55 °C 的热水中温汤浸

种 30 min,再用 20%的磷酸三钠消毒 20 min,流水冲洗干净后放入 28 ℃ 人工气候箱中催芽。营养土和蛭石 1:1(体积比)配置成育苗基质,发芽种子一部分播种于装有育苗基质的营养钵(7 cm×7 cm)中,置于人工气候箱中生长,用于后续组织特异性、低温胁迫处理试验。另一部分于 Hoagland 营养液中在人工气候箱中生长,用于后续激素处理试验。人工气候箱参数设置,白天温度为 28 ℃,时长 16 h,光照度为 20 000 lx;夜晚温度为 23 ℃,时长 8 h。

1.2.2 材料处理 低温处理:待辣椒幼苗长至六叶一心时,将其置于人工气候箱中模拟低温环境,进行低温胁迫处理。人工气候箱参数设置,白天温度为 15 ℃,时长 16 h,光照度为 20 000 lx;夜晚温度为 10 ℃,时长 8 h。

激素处理:待辣椒幼苗长至六叶一心时,向营养液中分别加入终浓度为 150 mg/L 的脱落酸(Absciscic acid,ABA)、终浓度为 200 mg/L 的赤霉素(Gibberellic acid,GA₃)、终浓度为 0.02 mg/L 茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate,MeJA)、终浓度为 30 mg/L 的生长素(Indole acetic acid,IAA),对照组仅用营养液处理。人工气候

箱参数设置,白天温度为 28 ℃,时长 16 h,光照度为 20 000 lx;夜晚温度为 23 ℃,时长 8 h。

分别在低温和激素处理后的第 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 采集对应处理材料的新叶,迅速置于液氮中冷冻并于 -80 ℃ 超低温冰箱保存。

组织特异性表达:以用基质培养且不做任何处理的辣椒植株为材料,采集其根、茎、叶、花、幼果果实、商品果果实、成熟果果实、幼果胎座、商品果胎座和成熟果胎座,迅速置于液氮中冷冻并于 -80 ℃ 超低温冰箱保存。

1.2.3 辣椒总 RNA 提取、cDNA 第一链合成 辣椒总 RNA 提取使用 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司产品]。cDNA 第一链合成使用 TaKaRa cDNA 合成试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司产品]。

1.2.4 基因引物设计与合成 根据分子育种课题组 *CaTPS11* 基因家族成员信息中得到的 *CaTPS11* (*Capana07g000086*) 的基因参考序列,使用 Primer Premier 5 设计引物(表 1),交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物信息

Table 1 The information of primers

引物名称	引物序列(5'→3')	用途	片段大小(bp)
<i>Actin</i> -F	CCCGGAAGAGCACCTGTGTC	内参基因	758
<i>Actin</i> -R	ATGCTGCTGGGAGCCAACG		
<i>TPS11</i> -F	ATGTTGTCAAGATCTTGTTCATCTGC	基因扩增	2 902
<i>TPS11</i> -R	CTATACAAAGGATGTAGGACTCTTATCTATGGA		
<i>qTPS11</i> -F	TCCAGGCAGAGCAGCACTAATTTG	荧光定量 PCR	68
<i>qTPS11</i> -R	ACCACTAAGCGACGGAGAGCAG		

1.2.5 *CaTPS11* cDNA 全长克隆 以 cDNA 为模板,用 *CaTPS11* 基因引物 *TPS11*-F、*TPS11*-R 进行 PCR 的扩增。PCR 反应体系(25.0 μl):2×Taq PCR Master Mix 12.5 μl, ddH₂O 9.5 μl, cDNA 1.0 μl, *TPS11*-F 和 *TPS11*-R 各 1.0 μl;PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 35 s,72 ℃ 延伸 1 min,设置 35 个循环。

回收的 PCR 反应产物与 pMD™18-T 载体[宝生物工程(大连)有限公司产品]连接,转化 Trans1-T1 大肠杆菌感受态细胞[北京全式金(北京)生物公司产品],菌液涂布于含有氨苄青霉素(100 mg/ml)的 LB 固态平板上,倒置于 37 ℃ 培养箱过

夜,挑单菌落 PCR 验证后选取阳性克隆摇菌提取质粒送擎科生物有限公司(西安)测序验证,得到目的片段序列。

1.2.6 生物信息学分析 使用 Expasy (<https://www.expasy.org/>) 分析蛋白质理化性质;使用 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 进行跨膜组织预测分析;使用 SignalP 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>) 进行信号肽分析;利用 NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行蛋白质磷酸化位点预测;利用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 进行亚细胞定位预测;使

用 SMART (<https://smart.embl.de/>) 进行蛋白质结构域分析;使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构;使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质三维空间构象;使用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件的预测;使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blastp 对氨基酸序列进行同源检索;利用 DNAMAN 8 软件对氨基酸序列进行多序列比对,采用邻近法 (Neighbor-joining method, NJ) 在 MEGA 5.1 中构建系统发育树。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 分析 对上述低温、激素处理后的叶片提取总 RNA,反转录成 cDNA。实时荧光定量使用 TaKaRa TB Green Premix *Ex Taq* II [宝生物工程(大连)有限公司产品],PCR 反应体系 (20.0 μ l):10.0 μ l TB Green Premix *Ex Taq* II,0.8 μ l PCR Forward Primer,0.8 μ l PCR Reverse Primer,0.4 μ l ROX Reference Dye,2.0 μ l cDNA,6.0 μ l ddH₂O。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,设置 40 个循环。qRT-PCR 仪器:StepOnePlus(美国应用生物系统公司产品),*Actin* 为对照,样本和内参均设置 3 次重复。

用 Excel 参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *CaTPS11* 基因的相对表达量及绘图。利用 SPSS 24.0 软件进行差异显著性分析。

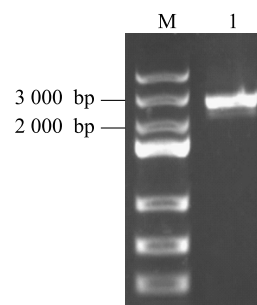
2 结果与分析

2.1 辣椒 *CaTPS11* 基因的克隆

PCR 扩增得到一段长度约为 2 800 bp 的特异性条带 (图 1)。

经测序,*CaTPS11* PCR 产物长 2 805 bp,编码 921 个氨基酸。将克隆测序所得的基因序列与辣椒基因组数据库参考序列进行比对,结果显示在 56 bp、1 179 bp、1 415 bp、1 612 bp、1 710 bp 5 个位点发生单碱基变异,在 1 988 bp 和 2 353 bp 处分别多出一段 91 bp 和 86 bp 的基因片段,相较于参考基因组扩增序列总共多出 177 bp (图 2)。

与辣椒基因组数据库参考序列 *CaTPS-11* 相比,*CaTPS11* 测序结果多出的 2 部分,分别为第 1、第 2 和第 2、第 3 外显子之间的区域 (图 3),与前后 2 个外显子合并成 1 个外显子,属于内含子保留 (In-



M:DL5 000 marker;1:*CaTPS11* 基因的 cDNA PCR 产物。

图 1 辣椒 *CaTPS11* 基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *CaTPS11* gene in pepper

tron retention) 的剪切方式。

参考基因预测所编码蛋白质有 1 个 TPS (Pfam: Glyco-transf-20,位于 59~546 aa) 和 1 个 TPP (Pfam: Trehalose-PPase,位于 595~830 aa) 结构域。克隆基因预测所编码蛋白质有 1 个 TPS (59~546 aa) 和 2 个 TPP (595~667 aa 和 769~876 aa) 结构域 (图 4)。前者和后者的 TPS 结构域一样,TPP 结构域有差异。后者的 TPP 结构域氨基酸序列位于前者 TPP 结构域的两端 (图 5)。

2.2 *CaTPS11* 理化性质及蛋白质结构预测

CaTPS11 基因包含 1 个 1 125 bp 的 5' 非翻译区 (5'-UTR) 和 1 个 252 bp 的 3' 非翻译区 (3'-UTR)。编码的蛋白质中酸性氨基酸 (天冬氨酸+谷氨酸) 残基总数 103 个,碱基氨基酸 (精氨酸+赖氨酸) 残基总数 111 个,预测该蛋白质为碱性蛋白质。该蛋白质分子式: C_{4 623} H_{7 244} N_{1 248} O_{1 332} S₅₅, 不稳定系数 45.83,属于不稳定蛋白 (表 2)。

CaTPS11 蛋白亲水性区域面积大于疏水性面积,说明该蛋白质为亲水性蛋白。*CaTPS11* 蛋白无跨膜结构域,无信号肽,说明该蛋白质为非分泌蛋白质。*CaTPS11* 蛋白有 52 个丝氨酸 (Serine)、13 个苏氨酸 (Threonine) 和 13 个酪氨酸 (Tyrosine) 磷酸化位点。

CaTPS11 蛋白定位于细胞质、叶绿体、细胞核、质膜、细胞壁、细胞骨架的概率分别为 59.591 1%、55.157 5%、28.773 0%、11.509 2%、13.897 9%、11.385 6%。亚细胞定位预测结果表明,*CaTPS11* 蛋白定位于细胞质和叶绿体中。

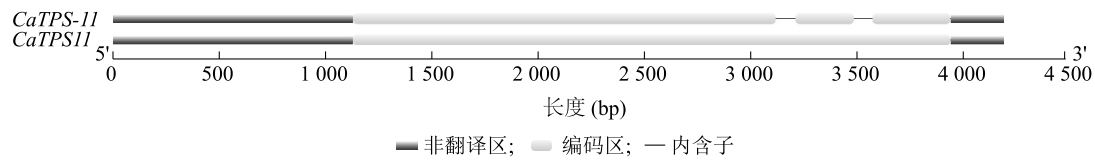
CaTPS11 蛋白二级结构主要是 α -螺旋 (48.53%), 无规则卷曲 (33.55%), 延伸链 (13.68%) 和 β -转角 (4.23%)。*CaTPS11* 蛋白三维空间构象以 α -螺旋为主。

<i>CaTPS-11</i>	ATCTCTCAAGATCTTCTTCAATCTGTTAATCTTCACTCTTCTCTGCTGATCGGGCTCGAATCCAAAGTTCATGAATCTTCAGGGATACACAGATTTTTCATGGAGCAGACGAAAGGAGGATTTGAGTTCCTCTTCT	150
<i>CaTPS11</i>	ATCTCTCAAGATCTTCTTCAATCTGTTAATCTTCACTCTTCTCTGCTGATCGGGCTCGAATCCAAAGTTCATGAATCTTCAGGGATACACAGATTTTTCATGGAGCAGACGAAAGGAGGATTTGAGTTCCTCTTCT	150
<i>CaTPS-11</i>	TCTTCACCTGCTTCAGCAATGGGAGTACAGGATCATTTAGCAATCACTTACCACTCAAGCTTTTAAAGTCAAAAATGCTCTTTTCAATGGGATAAATTTGCTTTTGGATACATTCATTTTTCAGCTTAAAGATGCTTTGCCATCA	300
<i>CaTPS11</i>	TCTTCACCTGCTTCAGCAATGGGAGTACAGGATCATTTAGCAATCACTTACCACTCAAGCTTTTAAAGTCAAAAATGCTCTTTTCAATGGGATAAATTTGCTTTTGGATACATTCATTTTTCAGCTTAAAGATGCTTTGCCATCA	300
<i>CaTPS-11</i>	GATTTGGAGCTCATTTATCTAGGTTCTTTGAAAGCTGATATCGAATTCATTCATCAAGCAAGCTTCCGAACTTCTTCTGGGACAAATTTAGCTCTCTTCCAACTTCTTCTCATTTAGATTTGATCAACATATTACCATGGCTTTTCT	450
<i>CaTPS11</i>	GATTTGGAGCTCATTTATCTAGGTTCTTTGAAAGCTGATATCGAATTCATTCATCAAGCAAGCTTCCGAACTTCTTCTGGGACAAATTTAGCTCTCTTCCAACTTCTTCTCATTTAGATTTGATCAACATATTACCATGGCTTTTCT	450
<i>CaTPS-11</i>	PACCATTTATTTATGCCCTTCTTTTCAATACATGCTGCTTACACCTAGCTCATGCTTAAGATTTGATAGCTTAAATTTGCTTGGCATACCTATCGGGCAATAAATTTTTCGTCATTAAGTTTATCAGCTGATTAATCCAGATCAAGAT	600
<i>CaTPS11</i>	PACCATTTATTTATGCCCTTCTTTTCAATACATGCTGCTTACACCTAGCTCATGCTTAAGATTTGATAGCTTAAATTTGCTTGGCATACCTATCGGGCAATAAATTTTTCGTCATTAAGTTTATCAGCTGATTAATCCAGATCAAGAT	600
<i>CaTPS-11</i>	TATCTTTGATTCAGATTAACACCTCATGCTTTTCCCTACATGCTTCAGCAAAAGCTATAGTACGATAAAAGTGGTTTTTCTTCTATAGCTTCTCCCTGCTTCGAAATTTATCGAATTTGCCGTGTTAGCGATGAGATTTTACG	750
<i>CaTPS11</i>	TATCTTTGATTCAGATTAACACCTCATGCTTTTCCCTACATGCTTCAGCAAAAGCTATAGTACGATAAAAGTGGTTTTTCTTCTATAGCTTCTCCCTGCTTCGAAATTTATCGAATTTGCCGTGTTAGCGATGAGATTTTACG	750
<i>CaTPS-11</i>	GCTTTCTGATTTGATCTTCTTCTGCTTTTCAAGCTTTTCAATATCTTACGCAATTTCTTCTCATCTTCTAGTAGGATCTTGGCTTTGGATATCGCTCCAAAGCGGTTACATTTGCTATTCATTTTCCGTAGACTGCTACTATTATG	900
<i>CaTPS11</i>	GCTTTCTGATTTGATCTTCTTCTGCTTTTCAAGCTTTTCAATATCTTACGCAATTTCTTCTCATCTTCTAGTAGGATCTTGGCTTTGGATATCGCTCCAAAGCGGTTACATTTGCTATTCATTTTCCGTAGACTGCTACTATTATG	900
<i>CaTPS-11</i>	ATCTTCTCTTCTGATTCATCTGCTGCTTCTTCAATATCTTACGCAATTTCTTCTCATCTTCTAGTAGGATCTTGGCTTTGGATATCGCTCCAAAGCGGTTACATTTGCTATTCATTTTCCGTAGACTGCTACTATTATG	1 050
<i>CaTPS11</i>	ATCTTCTCTTCTGATTCATCTGCTGCTTCTTCAATATCTTACGCAATTTCTTCTCATCTTCTAGTAGGATCTTGGCTTTGGATATCGCTCCAAAGCGGTTACATTTGCTATTCATTTTCCGTAGACTGCTACTATTATG	1 050
<i>CaTPS-11</i>	TTPAAGTTTTTACCAATCGGACGCTTTTACAGCAAGCCCGGCTTGACGGCAAGGATCTTATGCTTTCAGATTCAGCAAGCCCGGACAGCTACAGGCAATCATATCAAGAGCTTTCAGCAAGCTT	1 200
<i>CaTPS11</i>	TTPAAGTTTTTACCAATCGGACGCTTTTACAGCAAGCCCGGCTTGACGGCAAGGATCTTATGCTTTCAGATTCAGCAAGCCCGGACAGCTACAGGCAATCATATCAAGAGCTTTCAGCAAGCTT	1 200
<i>CaTPS-11</i>	ATAGCAATATCGGCAACCGGCTATGACCTATTTCTTCTTATTAACGCTCCGCTTCTACCCAGGACAGATTCACACT	1 350
<i>CaTPS11</i>	ATAGCAATATCGGCAACCGGCTATGACCTATTTCTTCTTATTAACGCTCCGCTTCTACCCAGGACAGATTCACACT	1 350
<i>CaTPS-11</i>		1 500
<i>CaTPS11</i>		1 500
<i>CaTPS-11</i>		1 650
<i>CaTPS11</i>		1 650
<i>CaTPS-11</i>		1 800
<i>CaTPS11</i>		1 800
<i>CaTPS-11</i>		1 950
<i>CaTPS11</i>		1 950
<i>CaTPS-11</i>		2 009
<i>CaTPS11</i>		2 100
<i>CaTPS-11</i>		2 159
<i>CaTPS11</i>		2 250
<i>CaTPS-11</i>		2 263
<i>CaTPS11</i>		2 400
<i>CaTPS-11</i>		2 373
<i>CaTPS11</i>		2 550
<i>CaTPS-11</i>		2 523
<i>CaTPS11</i>		2 700
<i>CaTPS-11</i>		2 627
<i>CaTPS11</i>		2 804

CaTPS-11: 辣椒基因组数据库参考序列; *CaTPS11*: 克隆基因序列。

图 2 基因序列比对

Fig.2 Comparison of gene sequences



CaTPS-11: 辣椒基因组数据库参考序列; *CaTPS11*: 克隆基因序列。

图3 *CaTPS11* 基因的可变剪切

Fig.3 Alternative splicing of *CaTPS11* gene

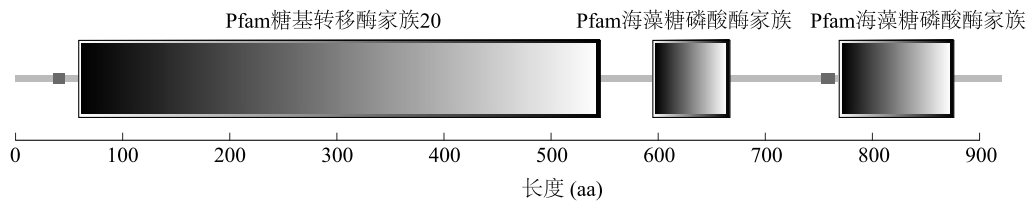


图 4 CaTPS11 蛋白保守结构域预测

Fig.4 Prediction of CaTPS11 protein conserved domain



图 5 氨基酸序列比对

Fig.5 Comparison of amino acids sequences

表 2 *CaTPS11* 基因长度及其编码蛋白质的理化性质

Table 2 The length of *CaTPS11* gene and physicochemical properties of its encoded protein

项目	理化性质(长度)
基因长度(bp)	4 359
CDS 长度 (bp)	2 805
氨基酸(aa)	921
相对分子量	$1.033\ 9 \times 10^5$
理论等电点	8.33
不稳定指数	45.83
亲水性平均系数	-0.161
脂溶指数	89.30
亚细胞定位	细胞质、叶绿体

2.3 *CaTPS11* 启动子顺式作用元件分析

CaTPS11 基因启动子区含有 14 种顺式作用元件,可以分为光响应元件、激素响应元件、应激响应元件以及生长发育相关元件 4 大类。光响应元件主要包括 GT1-motif、LAMP-element、GA-motif、I-box、ATCT-motif 以及 ATCT-motif ;激素响应元件包括茉莉酸甲酯响应元件 (TGACG-motif、CGTCA-motif)、赤霉素响应元件 (TGA-element) 和生长素响应元件 (TGA-element);应激响应元件包括干旱诱导有关的 MYB 结合位点 (MBS)、参与低温反应的顺式作用元件 (LTR)、厌氧诱导所必需的顺式调节元件 (ARE) 和与缺氧特异性诱导有关的增强子样元件 (GC-motif) 等。顺式作用元件分析结果表明, *CaTPS11* 基因可能

参与辣椒的生长发育调控、光响应、激素响应。值得注意的是, MeJA 响应元件广泛存在于 *CaTPS11* 中, *CaTPS11* 基因的表达可能受到 MeJA 信号的调控。

2.4 *CaTPS11* 的进化树

辣椒 *CaTPS11* 的氨基酸序列与龙葵 (*Solanum pennellii*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、烟草 (*Nicotiana attenuata*)、三裂叶薯 (*Ipomoea triloba*) 和牵牛 (*Ipomoea nil*) 的氨基酸序列同源性高达 81.8%、

81.6%、77.2%、68.7% 和 68.5%。同源性分析结果表明, *CaTPS11* 在不同物种间高度保守的同时也存在一定差异。

将已报道的烟草、龙葵和马铃薯、芝麻、紫苏等 16 个物种进行系统发育分析。结果表明, 各物种间 *CaTPS11* 的氨基酸序列的长度和结构都非常保守, 相较于其他 14 个物种, 辣椒与龙葵、马铃薯的同源性较近 (图 6)。

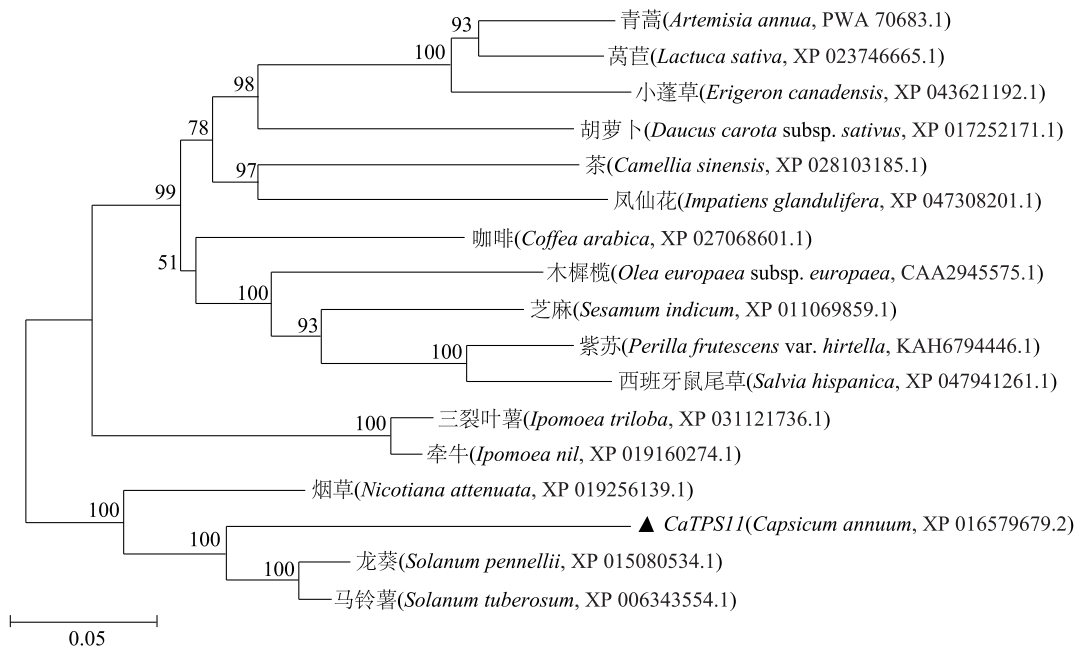


图 6 *CaTPS11* 系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of *CaTPS11*

2.5 *CaTPS11* 基因的表达模式

2.5.1 组织特异性 *CaTPS11* 基因在辣椒组织中均有表达 (图 7), 在幼果、商品果、成熟果的胎座中总表达量是果肉中总表达量的 23 倍。其中 *CaTPS11* 基因在成熟果胎座中的表达量极显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 是成熟果果肉中表达量的 26 倍。该基因的表达可能调控果实成熟。

2.5.2 低温胁迫下的表达模式 低温胁迫处理, 辣椒 *CaTPS11* 基因被诱导表达。低温胁迫 3 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因表达量达到最大值, 显著高于对照 ($P < 0.05$), 表达量约为对照的 8.5 倍。低温胁迫 6 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因表达量达显著低于低温胁迫 3 h ($P < 0.05$), 6~72 h 其表达量迅速下降 (图 8)。可知, 低温胁迫时, *CaTPS11* 的表达量迅速达到峰值后快速下降, 说明 *CaTPS11* 基因是 1 个逆境胁迫快速

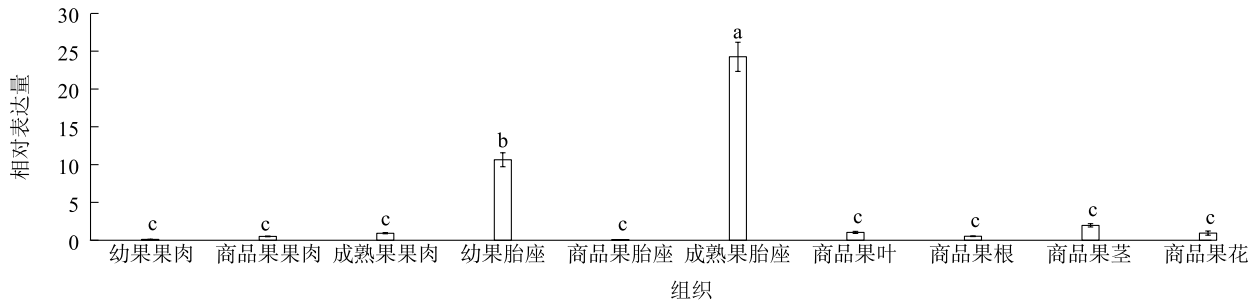
响应的基因。

2.5.3 激素处理下的表达模式 辣椒 *CaTPS11* 基因的表达量随着 IAA 处理时间的增长呈先上升后下降趋势。IAA 处理 6 h、12 h、24 h, *CaTPS11* 基因的表达量与对照无显著差异 ($P > 0.05$), 其余处理时间 *CaTPS11* 基因的表达量均显著低于对照 ($P < 0.05$)。ABA 处理, 辣椒 *CaTPS11* 基因的表达量呈波浪形变化趋势。ABA 处理 1 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因表达量与对照相比无显著差异 ($P > 0.05$), ABA 处理 3 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因表达量达到最大值, 显著高于对照 ($P < 0.05$), 约为对照的 2.2 倍, 随后其表达量下降。GA 处理 1 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因的表达与对照相比无显著差异 ($P > 0.05$), GA 处理 3 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因的表达量达到最大值, 显著高于对照 ($P < 0.05$), 约为对照的 4 倍, 随后其表达量下

降。MeJA 处理 1~3 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因的表达量缓慢增加, MeJA 处理 6 h, 辣椒 *CaTPS11* 基因表达量达到最大值, 显著高于对照 ($P < 0.05$), 约为对照的 9 倍, 随后其表达量迅速下降。

所有处理中, 以 MeJA 处理 6 h 辣椒 *CaTPS11* 基因

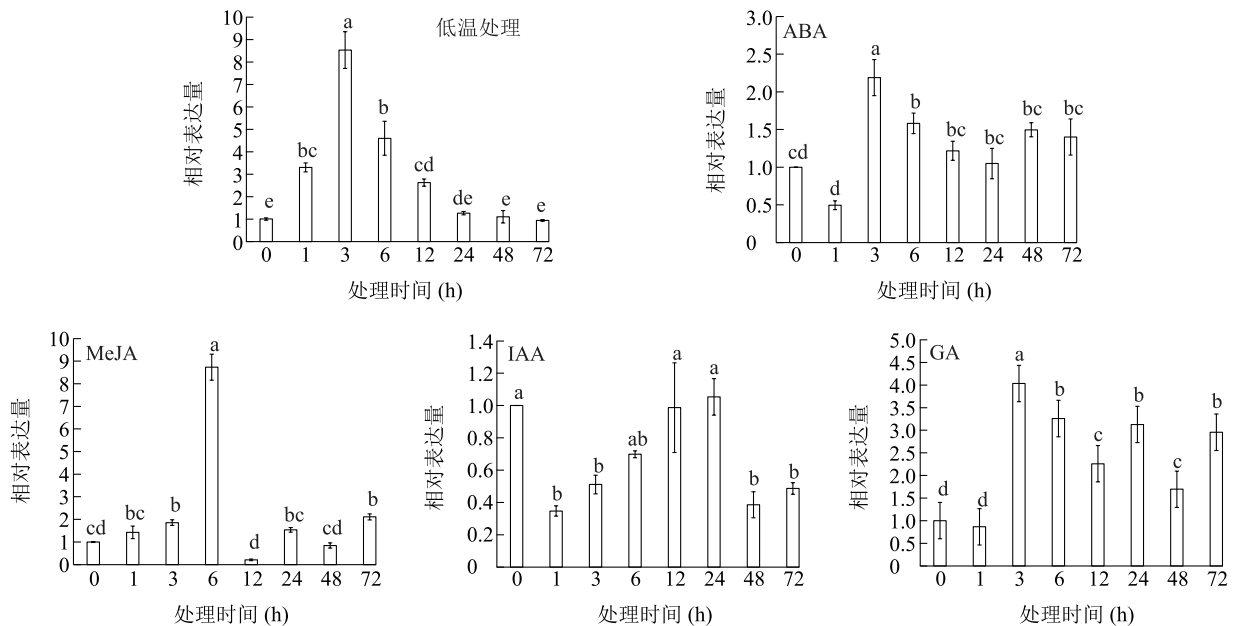
表达量最高。MeJA 信号通路可能通过调控 *CaTPS11* 基因的表达来响应低温胁迫; IAA 处理会抑制 *CaTPS11* 的表达, 可能是 IAA 负向调控该基因的表达。IAA 处理 1 h, *CaTPS11* 基因的表达被抑制了, 说明 *CaTPS11* 基因对 IAA 的响应并不是即时、直接的。



不同小写字母表示 *CaTPS11* 基因表达量在辣椒不同组织间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 *CaTPS11* 基因在辣椒不同组织的相对表达量

Fig.7 Relative expression of *CaTPS11* gene in different tissues of pepper



不同小写字母表示 *CaTPS11* 基因表达量在不同处理时长差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 *CaTPS11* 基因在不同非生物胁迫下的相对表达量

Fig.8 Relative expression of *CaTPS11* gene under different abiotic stresses

3 讨论

辣椒在其生长发育过程中总是遭受着各种非生物胁迫的影响, 为了更好应对各种胁迫, 植物体自身进化出了一套完整的调控响应网络机制^[27]。TPS 是海藻糖和 T6P 合成过程中的关键酶, 在植物生长发育、抗逆胁迫和海藻糖代谢过程中发挥重要的作

用。随着对 TPS 基因家族的研究, 发现该基因家族成员参与非生物胁迫调控。海藻糖磷酸合酶基因的转入, 可以提高植物体抗寒、耐盐、抗旱能力^[19-21]。

克隆序列与参考序列相比, 存在 5 处单碱基突变和两处内含子保留剪切。内含子保留剪切位置在参考序列中编码 TPS 结构域之后, 因此克隆基因预测蛋白的 TPS 结构域没有改变, 而在原本参考序列

编码 TPP 结构域位置,2 个内含子通过内含子保留剪切的方式变成了克隆基因的 CDS 序列,形成的氨基酸插入参考序列 TPP 结构域序列中,使得原本 TPP 结构域位置的氨基酸序列变长,破坏了原本的 TPS 结构域氨基酸的排列位置,使得在内含子保留剪切发生的区域出现了 2 个 TPP 结构域,最终克隆基因预测蛋白质拥 2 个 TPP 结构域。有研究结果表明^[28-29],拟南芥和水稻在高温、干旱胁迫下,一些非生物胁迫调控因子基因如热激转录因子 A2 基因 *HSFA2* 等都会经历可变剪切,以增强植物对胁迫的耐受性,推测 *CaTPS11* 基因可变剪切的出现增强了辣椒对非生物胁迫的抵抗能力。

CaTPS11 蛋白不存在信号肽,为非分泌蛋白质,在植物体内与其他具有信号肽的蛋白质亚基结合,在细胞核内装配好后才运送到细胞的各个部位。*CaTPS11* 蛋白的氨基酸序列虽与拟南芥、黄瓜、甘蔗^[30-31]等其他物种的 TPS 不同,但其所拥有的 2 个结构域(TPS、TPP)和大多数作物是一样的。辣椒与龙葵、马铃薯都属于一年生的草本双子叶茄科植物,且辣椒与龙葵和马铃薯有较高的同源性,说明 *CaTPS11* 蛋白的进化关系是密切且稳定的。*CaTPS11* 基因在成熟果胎座中表达量显著高于其他组织($P<0.05$),而木薯 *MeTPS1* 基因、黄梁木 *NcTPS11a/b* 基因、辣椒 *CaTPS8* 基因、茶树 *CsTPS26* 基因、橡胶树 *HbTPS7* 基因分别在叶片、根、花、茎、种子中的表达量最高^[32-36],说明不同物种的 TPS 基因在不同组织中的表达具有时空特异性,这与本研究结果一致。

TPS 基因表达在植物体生长发育、激素响应、信号传导等方面发挥重要作用。*AtTPS11* 基因在拟南芥绿桃蚜虫防御中起重要作用^[23]。*MeJA*、*SA* 处理使得橡胶树 *HbTPS1*、*HbTPS2* 基因表达显著上调^[37]。茶树 48 个 TPS 基因中,*CsTPS3* 等 5 个基因在 *MeJA* 处理下表达量显著增加^[35]。*StTPS5* 基因、*CaTPS8* 基因在马铃薯、辣椒 ABA 信号通路中起关键作用。外源 *MeJA* 可以促进次生代谢物的形成^[37],而高等植物体内的海藻糖是以应激代谢物的形式存在的^[38],说明 *MeJA* 可以促进海藻糖的形成,同时 TPS 又是海藻糖形成过程中的关键酶,暗示 *MeJA* 信号通路与 *CaTPS11* 基因表达密切相关。本研究结果表明,*CaTPS11* 基因可以响应激素胁迫,*IAA* 抑制 *CaTPS11* 基因的表达,*ABA*、*GA*、*MeJA* 均诱导 *CaTPS11* 基因的表达,*MeJA* 处理 6 h 辣椒

CaTPS11 基因表达量最高。*CaTPS11* 基因启动子区存在 *MeJA*、低温、干旱等响应元件,辣椒 *CaTPS11* 基因可能主要是通过 *MeJA* 信号通路来响应低温等非生物胁迫。虽然 *CaTPS11* 基因存在 *IAA* 响应元件,但 *IAA* 胁迫处理不但没有诱导 *CaTPS11* 基因表达量升高反而抑制了表达,暗示 *IAA* 信号通路在 *CaTPS11* 基因表达和非生物胁迫中起负调控作用,这与在黄瓜 TPS 基因家族中的研究结果一致^[30]。

综上所述,*CaTPS11* 蛋白在物种间高度保守;*CaTPS11* 基因存在可变剪切位点,表达具有时空特异性,在成熟果胎座中表达量最高。*CaTPS11* 基因对 *MeJA*、低温胁迫处理敏感,启动子区广泛存在 *MeJA* 响应元件,推测该基因可能通过 *MeJA* 信号通路途径正向响应低温等非生物胁迫。*CaTPS11* 基因克隆过程中会发生内含子保留剪切,这种特殊剪切可以提高该物种对胁迫的抗性,从而提高了辣椒抗逆相关性状。根据以上特性,可在 *CaTPS11* 基因的激素调控响应、可变剪切等方面深入研究,以明确辣椒逆境胁迫的响应机制,提高植物抗逆性,促进遗传育种与农业产业发展。

参考文献:

- [1] 胡晶晶. 辣椒:年逾 700 亿产值,稳坐中国最大蔬菜产业宝座! [J]. 营销界,2021,24(23):72-79.
- [2] 郭春蕊,王广印,原让花. NaCl 胁迫对辣椒种子发芽特性的影响[J]. 河南农业科学,2010,39(3):86-89.
- [3] 宋旭丽,候喜林,胡春梅,等. NaCl 胁迫对超大甜辣椒种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 西北植物学报,2011,31(3):569-575.
- [4] 胡华冉,杜磊,张芮豪,等. 辣椒适应非生物胁迫的研究进展[J]. 生物技术通报,2022,38(12):58-72.
- [5] LIN M F, JIA R H, LI J C, et al. Evolution and expression patterns of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) [J]. Planta, 2018, 248(4): 999-1015.
- [6] VANDESTEENE L, RAMON M, ROY K L, et al. A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-Like proteins in *Arabidopsis* [J]. 分子植物(英文版),2010, 3(2):406-419.
- [7] AVONCE N, MENDOZA-VARGAS A, MORETT E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis [J]. BMC Evolutionary Biology, 2006, 6:109.
- [8] WEI J, FU F L, ZHANG S Z, et al. Cloning and characterization of functional trehalose-6-phosphate synthase gene in *Maize* [J]. Journal of Plant Biology, 2010, 53(2):134-141.
- [9] CROWE L M, REID D S, CROWE J H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? [J]. Biophysical Journal, 1996, 71

- (4):2087-2093.
- [10] LERBRET A, BORDAT P, AFFOUARD F, et al. Influence of homologous disaccharides on the hydrogen-bond network of water: complementary Raman scattering experiments and molecular dynamics simulations [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340 (5): 881-887.
- [11] HACKEL C, ZINKEVICH T, BELTON P, et al. The trehalose coating effect on the internal protein dynamics [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2012, 14(8): 2727-2734.
- [12] ITURRIAGA G, SUÁREZ R, NOVA-FRANCO B, et al. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(9): 3793-3810.
- [13] 韦 航, 蒙健宗, 邓 军. 海藻糖在植物抗逆中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9355-9356, 9435.
- [14] BHANDAL I S, HAUTMANN R M, WIDHOLM M. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells [J]. Plant Physiology, 1985, 78(2): 430-432.
- [15] FRITZIUS T, AESCHBACHER R, WIEMKEN A, et al. Induction of *ApL3* expression by trehalose complements the starch-deficient Arabidopsis mutant *adg2-1* lacking *ApLI*, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 883-889.
- [16] GODDIJN O J M, KEES-VAN D. Trehalose metabolism in plants [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(8): 315-319.
- [17] ABDULLAH A, KYO J J, YONGGYUN K. Regulation of hemolymph trehalose titers by insulin signaling in the legume pod borer, *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. Peptides, 2018, 106: 28-36.
- [18] PAUL M J, PRIMAVESI L F, JHURREEA D, et al. Trehalose metabolism and signaling [J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59(1): 417-441.
- [19] GE L F, CHAO D Y, SHI M, et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes [J]. Planta, 2008, 228(1): 191-201.
- [20] 戴秀玉, 王忆琴, 杨 波, 等. 大肠杆菌海藻糖合成酶基因对提高烟草抗逆性能的研究 [J]. 微生物学报, 2001, 49(4): 427-431.
- [21] DONG H L, RYU H, HAN H B, et al. Transgenic tobacco plants harboring the trehalose phosphate synthase *TPS* gene of *Escherichia coli* increased tolerance to drought stress [J]. Research Journal of Biotechnology, 2012(5): 579-587.
- [22] VOGEL G, AESCHBACHER R A, MÜLLER J, et al. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *ts2* mutant [J]. Plant Journal, 1998, 1(3): 673-683.
- [23] SINGH V, LOUIS J, AYRE B G, et al. *TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11*-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae* [J]. The Plant Journal (for Cell and Molecular Biology), 2011, 67(1): 94-104.
- [24] GÓMEZ L D, GILDAY A, FEIL R, et al. *AtTPS1*-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells [J]. The Plant Journal (for Cell and Molecular Biology), 2010, 64(1): 1-13.
- [25] SCHLUEPMANN H, BERKE L, SANCHEZ-PEREZ G F. Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(9): 3379-3390.
- [26] 魏兵强, 王兰兰, 张 茹, 等. 辣椒 *TPS* 家族成员的鉴定与 *CaTPS1* 的表达分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1509-1512.
- [27] 康益晨, 秦舒浩, 张俊莲, 等. 基于 miRNA-mRNA 关联分析的马铃薯碱性胁迫应答机制研究 [C]. 中国作物学会马铃薯专业委员会. 马铃薯产业与种业创新 (2022). 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 2022: 279-280.
- [28] MATSUKURA S, MIZOI J, YOSHIDA T, et al. Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2010, 283(2): 185-196.
- [29] CHENG Q, ZHOU Y, LIU Z, et al. An alternatively spliced heat shock transcription factor, *OsHSFA2d1*, functions in the heat stress-induced unfolded protein response in rice [J]. Plant Biology, 2015, 17(2): 419-429.
- [30] DAN Y, NIU Y, WANG C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. PeerJ, 2021, 9: e11398.
- [31] HU X, WU Z D, LUO Z Y, et al. Genome-wide analysis of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) gene family and expression profiling of *ScTPS* genes in sugarcane [J]. Agronomy, 2020, 10(7): 969-983.
- [32] 丁泽红, 付莉莉, 吴春来, 等. 木薯 *MeTPS1* 基因克隆、表达及生物信息学分析 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 28-33.
- [33] 张丽素, 高佳钰, 龙健梅, 等. 黄梁木海藻糖-6-磷酸合酶 *TPS* 基因家族鉴定与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 38(12): 58-72.
- [34] 赵淑芳, 苟秉调, 魏 敏, 等. 辣椒 *CaTPS8* 基因克隆与表达分析 [J]. 西北农业学报, 2022, 31(12): 1568-1578.
- [35] 高 婷, 郑玉成, 王鹏杰, 等. 茶树 *TPS* 基因家族的鉴定及表达 [J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(6): 1485-1495.
- [36] 周斌辉. 橡胶树 6-磷酸海藻糖合成酶家族基因的克隆及功能研究 [D]. 海南: 海南大学, 2017.
- [37] HUANG K F, WEN C H, LEE Y R, et al. Cloning and characterization of terpene synthase genes from Taiwan cherry [J]. Tree Genetics & Genomes, 2019, 15(4): 51.
- [38] 林 荆, 付凤玲, 蒋 伟, 等. 垫状卷柏海藻糖-6-磷酸合酶基因的克隆及功能分析 [J]. 遗传, 2010, 32(5): 498-504.

(责任编辑: 成纾寒)