

郑佳秋,王薇薇,梅 燚,等. 辣椒 DREB 转录因子鉴定及其在涝害胁迫下的表达分析[J].江苏农业学报,2023,39(1):148-159.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.018

辣椒 DREB 转录因子鉴定及其在涝害胁迫下的表达分析

郑佳秋¹, 王薇薇¹, 梅 燚¹, 吴永成¹, 万红建², 潘宝贵³, 尤 春⁴, 刘 哲¹,
沈 峰¹, 冯汝超¹

(1.江苏沿海地区农业科学研究所,江苏 盐城 224002; 2.浙江省农业科学院,浙江 杭州 310021; 3.江苏省农业科学院,江苏 南京 210014; 4.盐城市蔬菜技术指导站,江苏 盐城 224000)

摘要: 基于辣椒全基因组序列,对辣椒脱水响应元件结合因子(DREB)基因家族进行鉴定、系统分析、染色体定位,并对涝害胁迫下其表达特性进行研究。在辣椒基因组中鉴定出 40 个 *CaDREB* 基因,分布在 12 条染色体上,编码108~452 个氨基酸。系统进化树分析结果表明,辣椒 *DREB* 基因分为 3 大类。胁迫数据分析结果表明,在涝害胁迫下,*CaDREB* 家族中的一些基因表达发生变化。

关键词: 辣椒; DREB; 基因结构; 涝害胁迫; 表达分析

中图分类号: S641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)01-0148-12

Identification of DREB transcription factor in pepper and expression analysis of *DREB* gene under waterlogging stresses

ZHENG Jia-qiu¹, WANG Wei-wei¹, MEI Yi¹, WU Yong-cheng¹, WAN Hong-jian², PAN Bao-gui³,
YOU Chun⁴, LIU Zhe¹, SHEN Feng¹, FENG Ru-chao¹

(1. *Institute of Agricultural Sciences in Coastal Area of Jiangsu Province, Yancheng* 224002, China; 2. *Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou* 310021, China; 3. *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing* 210014, China; 4. *Yancheng Vegetable Technical Guidance Station, Yancheng* 224002, China)

Abstract: Based on the whole genome sequence of pepper, identification, phylogenetic analysis and chromosomal location were done for dehydration responsive element-binding factor (DREB) gene family of pepper, and its expression characteristics was studied under waterlogging stress conditions. The results showed that, 40 *CaDREB* genes were identified and were distributed on 12 chromosomes, encoding 108-452 amino acids. Analysis of phylogenetic tree showed that, *CaDREB* genes from pepper were grouped into three classes. Stress data analysis showed that, the expression of some members of the *CaDREB* gene family altered under waterlogging stress conditions.

Key words: pepper; DREB; gene structure; waterlogging stress; expression analysis

收稿日期:2022-04-20

基金项目:江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201715);江苏省自然科学基金项目(BK20211113)

作者简介:郑佳秋(1982-),女,辽宁法库人,硕士,副研究员,主要从事辣椒育种及抗逆方面的研究。(E-mail) nky8236@163.com

通讯作者:万红建, (E-mail) wanhongjian@sina.com

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属于茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*),原产于中南美洲热带亚热带

地区,在中国有着悠久的栽培历史,年种植面积约 $2.13 \times 10^6 \text{ hm}^2$,是中国种植面积最大的蔬菜作物之一。其漫长悠久的栽培史预示着辣椒具有较强的耐受性,能够适应各种气候环境的变化^[1-2]。然而,辣椒属于旱生浅根性植物,再生能力差,极易受到水涝胁迫危害,淹水数小时便会成片死亡,经济损失严重^[3],挖掘辣椒抗逆性候选基因已是当前辣椒抗逆育种的重要基础工作。有研究表明,脱水响应元件结合因子(DREB)在植物应答非生物胁迫抗性调控中具有重要作用^[4-6]。在水稻、马铃属和花生等作物中均有 DREB 基因家族的报道,但还没有全面了解辣椒属中 DREB 基因的结构和功能。

植物特有的 DREB 基因是 AP2/ERF 基因家族的一个分支,家族中每个成员都包含一个 AP2 结构域,在应对非生物胁迫中具有重要作用^[7]。根据 AP2 结构域的数量和不同的保守域,AP2/ERF 基因家族分为 ERF、DREB、AP2、RAV 和 Soloist^[8]。ERF 和 DREB 都含有 1 个 AP2 结构域,它们的区别在于 AP2 结构域上氨基酸第 14 和 19 位点,ERF 亚家族中是丙氨酸(A)和天冬氨酸(D),而 DREB 亚家族中则为缬氨酸(V)和谷氨酸(E)^[9]。DREB 最早在耐盐和盐敏感的拟南芥植株中被发现,定名为 DREB1/DRBF-1^[10]。目前已经在拟南芥、稻属^[8]、小麦属^[11-12]、玉米^[13-14]、大豆^[15]、高粱^[16]、辣椒^[17]、花生^[18]和油菜^[19]等作物上鉴定出 DREB 基因,其中拟南芥中鉴定出 56 个 DREB 基因,数量最多。DREB 特异结合的顺式作用元件 DRE 核心序列是 5'-TACCGACAT-3',在拟南芥和水稻中 DRE 结合的 DREB1A 基序是 5'-ACCGAC-3'或者 5'-GCCGAC-3',物种间具有保守性,这有助于通过基因工程提高植物的耐受性^[20]。DREB 基因除了 DRE 元件结合位点外还有几个保守基序,如 N 端的核定位信号(NLS)、丝氨酸/苏氨酸的富集区。DREB1 中 NLS 在 N 端一直都是保守的,如“PKRPAGRTKFKRETRHP”,在 C 端 LWSY 区域是保守的。

DREB 三个亚族中 DREB1 的结构、功能和分子机制的研究较全面,但 DREB2 和 DREB3 的研究较少。有研究表明冷胁迫可以诱导 DREB1 基因,而 DREB2 基因则与盐、干旱和热胁迫相关^[21-22],但需要翻译后修饰和磷酸化来激发 DREB2 基因活性。AtDREB1A、OsDREB1A 和 OsDREB1B 响应冷胁迫,而 OsDREB2A 与干旱和高盐胁迫相关^[23-24]。研究

发现冷应激和干旱可诱导小麦 TaDREB1、WCBF2 和 WDREB2 表达,WDREB2 同时响应盐胁迫。大豆中鉴定的 DREB 基因大多与干旱和盐胁迫相关。干旱和盐胁迫可快速诱导辣椒中 CaDREB-LP1 表达。DREB 不仅表现为胁迫特异性,还表现出组织表达特异性,如盐胁迫下 AhDREB1 在根中大量表达,但在茎和叶片中表达较弱^[25]。非生物胁迫下 GmDREBa 和 GmDREBb 在叶片中表达量较高,而 GmDREBc 则在根部大量表达^[26]。DREB 调控植物响应非生物胁迫的分子机制分为 2 种,第一种是 DREB 基因激活对应激产生特异反应的基因,直接调控它们的表达水平,第二种是 DREB 基因调控其他的 TFs 进一步诱导它们自己的靶基因产生应激。因此 DREB 能够同时诱导多个胁迫敏感基因,调控植物应对非生物胁迫^[27]。

辣椒富含维生素 C 和辣椒素,营养价值丰富^[28],辣椒在全球各地广泛种植,种植面积和消费量已使其成为世界第三大蔬菜。研究辣椒抗逆育种栽培,有利于提高辣椒产量和品质。DREB 基因可以不依赖于 ABA 途径而发挥作用,因此在提高植物非生物胁迫耐力上具有重要作用。本研究基于辣椒全基因组序列,鉴定辣椒中 DREB 基因家族,分析系统发育关系及不同组织和涝害胁迫下的表达模式,系统地分析辣椒中 DREB 结构和功能,了解 DREB 基因在辣椒中的进化模式,为进一步探索其功能、创制抗逆新种质资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 CaDREB 基因家族的鉴定

从数据库中(www.uniprot.org)下载拟南芥、稻属、番茄、马铃薯的 DREB 蛋白序列,用蛋白质家族数据库(<http://pfam.xfam.org>)鉴定已下载的 DREB 蛋白质序列中的 AP2 结构域序列,用这些结构域进一步鉴定辣椒基因组中的候选 DREB 蛋白。通过 BLAST 在辣椒的基因组(<http://peppersequence.genomics.cn/page/species/index.jsp>)中找到中国栽培辣椒遵辣-1。利用 hmmer3 在 EMBL-EBI(<http://pfam.xfam.org>)上发现候选 DREB 中保留了 1 个重要的 AP2 结构域,根据辣椒注释库(<http://peppersequence.genomics.cn/page/species/index.jsp>)进行注释。

1.2 *CaDREB* 基因家族的多序列比对、系统发育树分析和染色体定位

外显子-内含子结构模式图由 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 绘制。通过 ClustalX 软件对遵辣-1 基因组和拟南芥、水稻中鉴定的 DREB/ERF 进行氨基酸序列比对,再用 MEGA 6.0 软件采用邻接法(NJ),校验参数 Bootstrap 重复 1 000 次,构建系统进化树^[29],依据已知的拟南芥中 DREB 的分组将辣椒中的 DREB 进行分类。结合辣椒基因组数据库中获得的辣椒 *DREB* 基因位置信息,利用 Mapmark 3.0 进行染色体定位,在线 (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/index/locus>) 分析这些基因的串联重复和片段重复特征。比对“遵辣-1”辣椒基因组中的所有基因(参数:E 值为 1×10^{-5}),利用 MCSanX 系统参数分析整个基因组中的串联重复和片段重复特征^[30]。

1.3 试验材料和 RT-PCR 分析

耐涝辣椒材料涮椒 (*Capsicum chinense* Jacq.) 和涝敏感辣椒栽培种 0453 (*Capsicum annuum* L.) 种子由江苏沿海地区农业科学研究所蔬菜花卉研究室提供。辣椒种子用 55 ℃ 温水处理 20 min 后,放在 28 ℃ 水中浸泡 6 h,取出种子用湿纱布包好,置于 30 ℃ 黑暗光照培养箱中进行催芽,每天用自来水冲洗 1 次,大约 4 d 种子露白,播于穴盘中育苗,放在塑料大棚中进行生长,培养条件为昼温 20~28 ℃、夜温 10~18 ℃。于六叶一心期进行涝胁迫处理,水层高于土层表面 2 cm 左右,于试验开始时及开始后第 2 d、4 d、6 d、10 d 分别对辣椒根、茎、叶取样,通过荧光定量法分析 *DREB* 基因在辣椒组织中的表达情况。

采用 RNA 提取试剂盒 (ISINOGENE/R1002L),参考说明书分别提取辣椒根、茎、叶的总 RNA。参照逆转录试剂盒 (Applied Biological Materials Inc/G492) 说明书合成 cDNA。*CaDREB* 基因特异引物由 Prime5 软件设计。

采用实时定量 PCR 检测 *CaDREB* 基因在涝胁迫下的时空表达,用 qPCR 试剂盒 (品牌及型号: Applied Biological Materials Inc/MasterMix-S),在荧光定量 PCR 仪 (品牌及型号: Thermo Fisher/7300 Plus Read-Time PCR System) 上检测基因的表达量。总反应体系为 10 μ l: 5.00 μ l EvaGreen 2 \times qPCR

Master Mix 混合液, 1.00 μ l Template DNA, 0.25 μ l 上游引物 (10 μ mol/L), 0.25 μ l 下游引物 (10 μ mol/L), 3.50 μ l Nuclease-free H₂O。PCR 条件为: 95 ℃ 变性 10 min; 之后每一步 95 ℃ 变性 15 s, 63 ℃ 退火延伸 30 s, 40 次循环。每次在延伸阶段读取荧光值。循环结束后制作溶解曲线。基因表达水平的计算参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[31]。

2 结果与分析

2.1 *CaDREB* 基因的鉴定

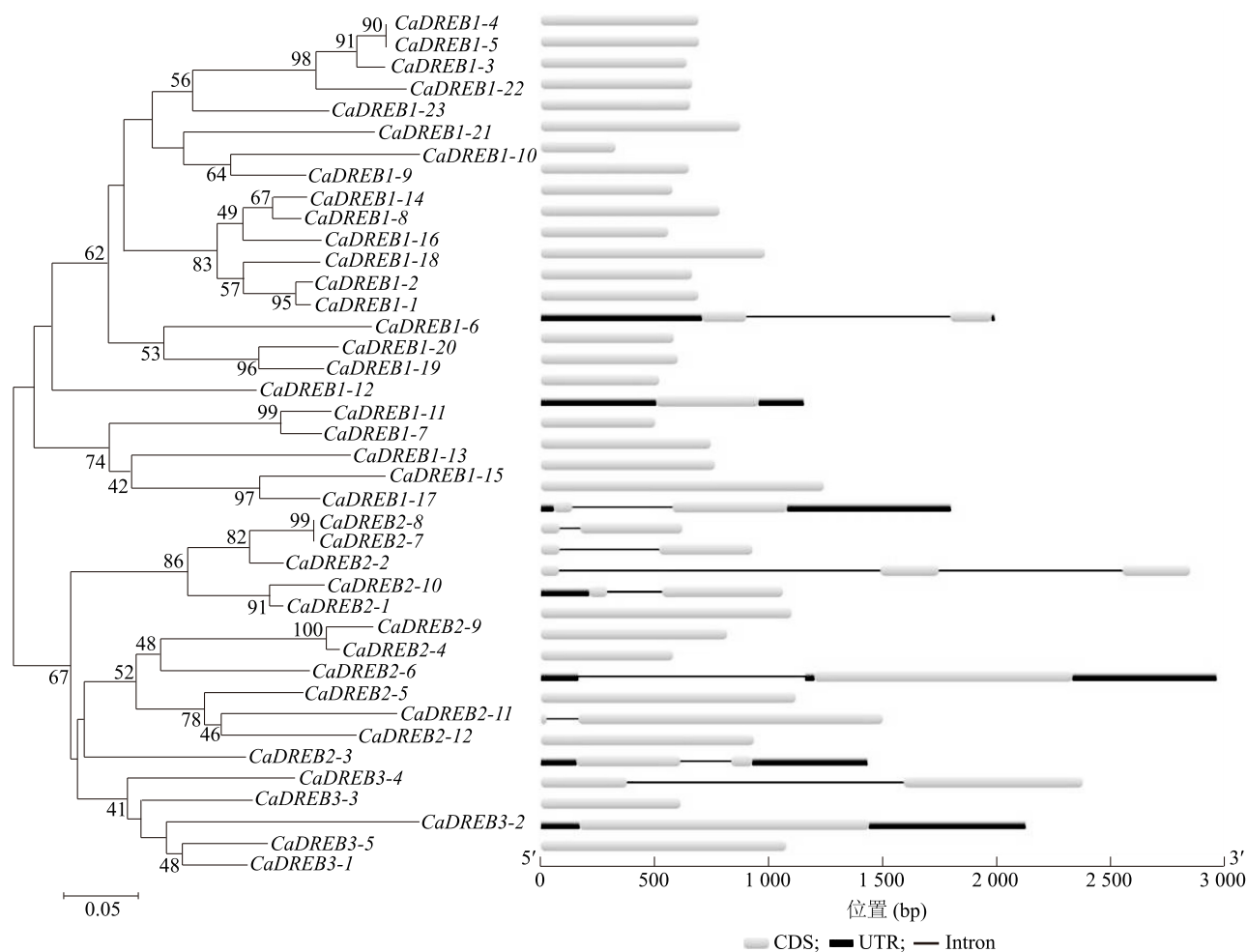
从通用蛋白质资源库 (Uniprot) 中下载 42 个已知 DREB 蛋白,其中 15 个来自拟南芥,16 个来自稻属,4 个来自番茄,7 个来自马铃薯。用这 42 个 DREB 蛋白中的 AP2 结构域通过 BLAST 鉴别出 136 个辣椒蛋白质含有 AP2 结构域,这 136 个蛋白质包含 116 个 DREB/ERF 蛋白, 17 个 AP2 蛋白, 1 个 RAV 蛋白, 1 个包含 3 个 AP 结构域的蛋白质, 1 个包含 2 个 AP2 结构域和 1 个 RRM_DME 域的蛋白质。利用 hmmer3 在 EMBL-EBI 中发现 116 个 *DREB/ERF* 基因编码蛋白质中每个蛋白质都包含一个典型的 AP2 结构域。基于多序列比较和系统发育分析,从上述基因群中分离出 40 个辣椒 *DREB* (*CaDREB*), 针对这一家族开展研究。*CaDREB* 基因编码的蛋白质有 108~452 个氨基酸,其中 *CaDREB2-12* 编码的蛋白质最长,有 452 个氨基酸, *CaDREB1-10* 编码的蛋白质最短,有 108 个氨基酸 (表 1)。

2.2 *CaDREB* 基因的结构分析

通过分析 *CaDREB* 基因结构进化情况,发现 *CaDREB* 基因内含子较少。组 I 中除了 *CaDREB1-6* 有一个比较长的和一个短的内含子外其他基因都没有内含子。组 II 中一个分支上的 5 个基因 (*CaDREB2-8*、*CaDREB2-7*、*CaDREB2-2*、*CaDREB2-10*、*CaDREB2-1*) 都有内含子,其他分支上,除 *CaDREB2-5* 和 *CaDREB2-12* 外其他基因都没有内含子,表明在辣椒 *DEREB* 基因家族演变过程中分支上共同经历了内含子增加事件。在组 III 中除了 *CaDREB3-4* 有一个相对短的内含子, *CaDREB3-3* 有一个相对长的内含子,其他基因没有内含子,表明辣椒中 *DREB* 基因家族在演变过程中经历了数个内含子损益的事件 (图 1)。

表 1 *CaDREB* 基因结构和生物学信息Table 1 Structure and biological information of *CaDREB* genes

分组	辣椒 <i>DREB</i> 基因	基因身份 识别码	染色体定位	碱基序列 (bp)	氨基酸序列 (aa)	基因组 (bp)
I	<i>CaDREB1-1</i>	Capana01g000589	1	690	229	690
	<i>CaDREB1-2</i>	Capana01g000591	1	663	219	663
	<i>CaDREB1-3</i>	Capana01g004444	1	639	212	639
	<i>CaDREB1-4</i>	Capana01g004446	1	690	229	690
	<i>CaDREB1-5</i>	Capana01g004447	1	693	330	693
	<i>CaDREB1-6</i>	Capana01g004449	1	1 270	125	1 270
	<i>CaDREB1-7</i>	Capana02g003060	2	501	166	501
	<i>CaDREB1-8</i>	Capana03g000268	3	783	260	783
	<i>CaDREB1-9</i>	Capana03g002388	3	648	215	648
	<i>CaDREB1-10</i>	Capana03g002392	3	327	108	327
	<i>CaDREB1-11</i>	Capana04g000577	4	450	149	450
	<i>CaDREB1-12</i>	Capana04g001803	4	519	172	519
	<i>CaDREB1-13</i>	Capana04g002109	4	744	247	744
	<i>CaDREB1-14</i>	Capana06g001264	6	576	191	576
	<i>CaDREB1-15</i>	Capana06g001845	6	762	253	762
	<i>CaDREB1-16</i>	Capana08g000576	8	558	185	558
	<i>CaDREB1-17</i>	Capana09g000142	9	1 239	412	1 239
	<i>CaDREB1-18</i>	Capana09g000250	9	981	326	981
	<i>CaDREB1-19</i>	Capana09g002352	9	600	199	600
	<i>CaDREB1-20</i>	Capana10g001958	10	582	193	582
	<i>CaDREB1-21</i>	Capana11g000561	11	873	290	873
	<i>CaDREB1-22</i>	Capana12g001159	12	663	220	663
	<i>CaDREB1-23</i>	Capana00g004363	00	654	217	654
II	<i>CaDREB2-1</i>	Capana03g000438	3	849	202	849
	<i>CaDREB2-2</i>	Capana03g000500	3	927	163	927
	<i>CaDREB2-3</i>	Capana03g002643	3	933	310	933
	<i>CaDREB2-4</i>	Capana04g000283	4	816	271	816
	<i>CaDREB2-5</i>	Capana05g002063	5	1 131	376	1 131
	<i>CaDREB2-6</i>	Capana05g002386	5	579	192	579
	<i>CaDREB2-7</i>	Capana06g001119	6	620	176	620
	<i>CaDREB2-8</i>	Capana06g001444	6	1 023	194	1 023
	<i>CaDREB2-9</i>	Capana07g000340	7	1 098	365	1 098
	<i>CaDREB2-10</i>	Capana09g000023	9	2 842	210	2 842
	<i>CaDREB2-11</i>	Capana09g001297	9	1 116	371	1 116
	<i>CaDREB2-12</i>	Capana00g004634	00	1 497	452	1 497
III	<i>CaDREB3-1</i>	Capana04g001107	4	1 074	357	1 074
	<i>CaDREB3-2</i>	Capana09g000917	9	612	203	612
	<i>CaDREB3-3</i>	Capana00g001882	00	2 372	386	2 372
	<i>CaDREB3-4</i>	Capana00g003399	00	771	182	771
	<i>CaDREB3-5</i>	Capana00g004561	00	1 269	422	1 269



UTR:非编码区;CDS:编码序列;Intron:内含子。

图1 *CaDREB* 基因内含子和外显子结构特征

Fig.1 Structure characteristics of exons and introns of *CaDREB* genes

2.3 *CaDREB* 基因的系统发育树和保守序列分析

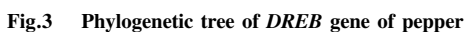
为了解 *CaDREB* 基因的序列特征,采用 ClustalX 和 DNAMAN 6.0 软件对辣椒 40 个 *CaDREB* 基因的 AP2 结构域进行多重序列比对(图 2)。DREB 蛋白质 AP2 第 14 位保守结构域是缬氨酸,第 19 位是谷氨酸^[8]。本研究发现辣椒 3 个 *CaDREB* 亚组中只有 *CaDREB3* 中的第 14 位是保守的缬氨酸(V),*CaDREB1* 和 *CaDREB2* 在组内相对保守,分别是赖氨酸(K)和色氨酸(W)。第 19 位氨基酸在各组内部是相对保守的;*CaDREB1* 中是异亮氨酸(I),*CaDREB32* 中是精氨酸(R),*CaDREB3* 中是亮氨酸(L)。依据 *DREB* 在拟南芥和水稻中的分类,辣椒中 40 个 *DREB* 基因分成 3 类:23 个 *CaDREB1* 基因,12 个 *CaDREB2* 基因和 5 个 *CaDREB3* 基因(图 3)。

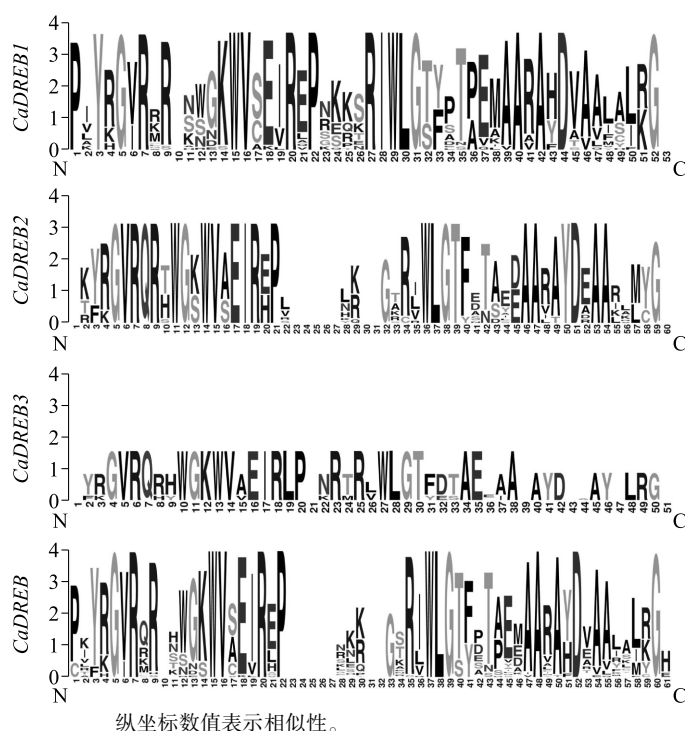
40 个 *DREB* 基因的保守基序是 YRG、WLG 和 RAYD,这些结构在 *CaDREB1* 和 *CaDREB2* 中是保守的,而 RADY 未出现在 *CaDREB3* 中,*CaDREB1*、*CaDREB2* 和 *CaDREB3* 的每一组都有一个唯一的序列结构(图 4)。

2.4 *CaDREB* 基因家族的染色体定位和串联重复分析

40 个 *DREB* 基因中,35 个 *DREB* 基因不均匀地分散在辣椒的 12 条染色体上,另外 5 个基因不能定位在任何一条染色体上。这些基因倾向聚集在染色体 1、3、4、6 和 9 上,每条染色体上的基因数量大约在 4~6 个,在染色体 2、7、8、10、11 和 12 上每条染色体上定位 1 个基因。*CaDREB3* 中只有 *CaDREB3-1* 和 *CaDREB3-2* 基因定位在有注释的染色体上(图 5)。

Fig.2 Multiple sequence alignment of AP2 domains in *CaDREB* genes





纵坐标数值表示相似性。

图 4 *CaDREB* 基因保守基序分析

Fig.4 Conserved motif analysis of *CaDREB* genes

一些 *DREB* 基因趋向聚集在一些染色体上,已形成 3 个聚集群。这些聚集群不均匀地分散在整个基因组中,集中在 3 条染色体上,每一个聚集群中大约有 3~4 个基因,最大的聚集群在 1 号染色体上,包含 *CaDREB1-3*、*CaDREB1-4*、*CaDREB1-5* 和 *CaDREB1-6*。本研究未发现在辣椒基因组中有片段重组。

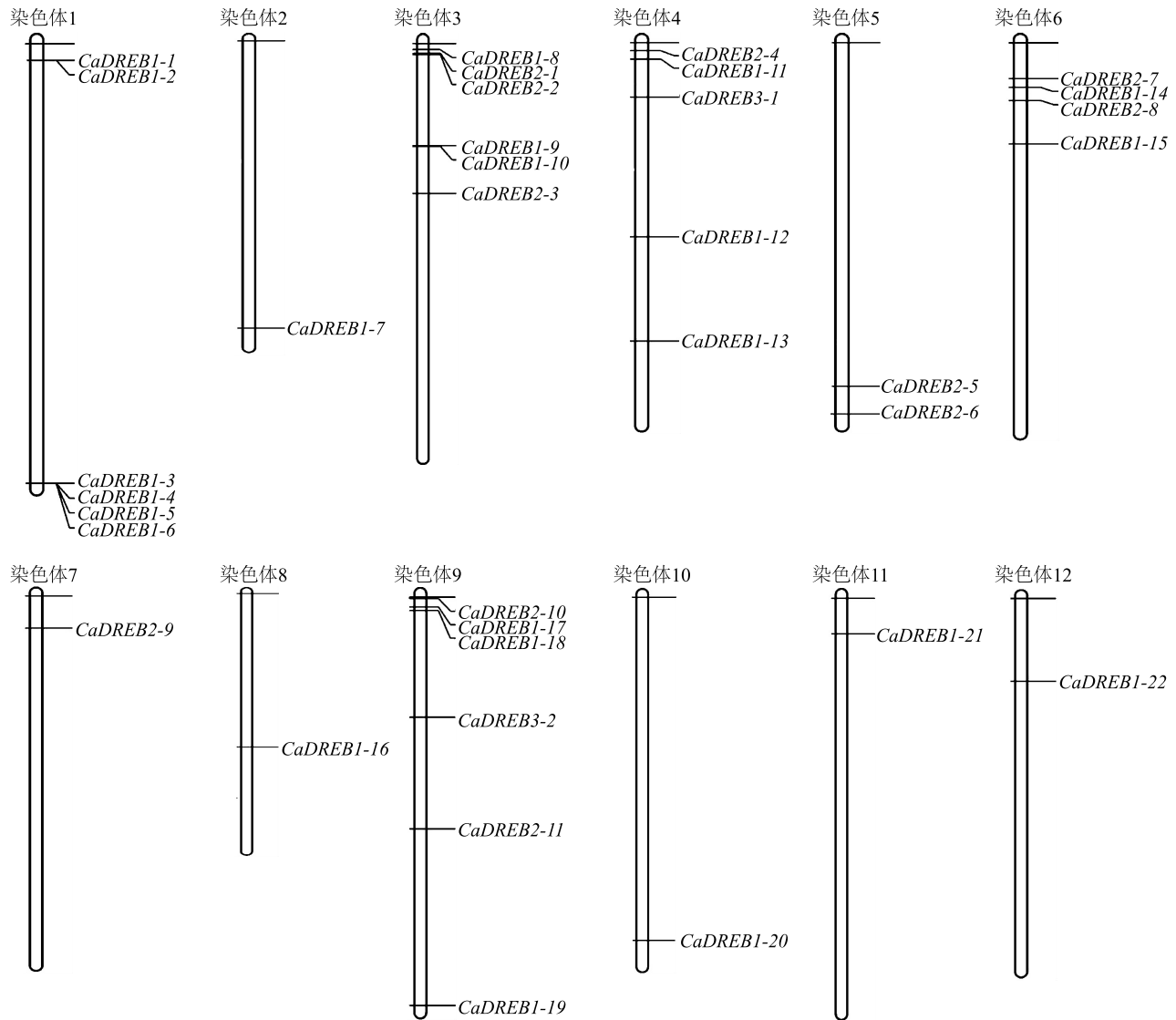
2.5 *CaDREB* 基因在不同组织中的表达分析

用 RNA-seq 数据库分析高等植物基因的不同表达水平非常便利^[32]。本研究从遵辣-1 RNA 序列数据库中分析 40 个 *DREB* 基因在辣椒蕾、花、根、茎和叶中的表达水平。其中 *CaDREB3-2*、*CaDREB1-10*、*CaDREB2-9* 和 *CaDREB2-3* 基因在任何组织中都没有表达,其余 36 个 *CaDREB* 基因表达量因基因和组织的不同而变化(图 6),表现出组织特异性。大多数第 1 类 *DREB* 基因集中在茎中高量表达,如基因 *CaDREB1-6*、*CaDREB1-9*、*CaDREB1-19*、*CaDREB1-20*、*CaDREB1-13*、*CaDREB1-3* 和 *CaDREB1-18* 只在茎中表达,表现茎的表达特异性。*CaDREB2-4*、*CaDREB2-5* 和 *CaDREB1-8* 在叶片中高量表达,在其他组织中的表达量很弱。*CaDREB1-16*、*CaDREB1-14*、*CaDREB2-11*、*CaDREB3-3* 和 *CaDREB3-5* 表现为

根表达特异性。*CaDREB1-17*、*CaDREB1-23*、*CaDREB2-1* 和 *CaDREB2-10* 在蕾中表达量最高,*CaDREB1-1* 和 *CaDREB3-4* 在花中表达量最高,而第 3 类 *DREB* 基因中只有 *CaDREB3-4* 在花和蕾中表达量均较高,推测它们与作物的生殖生长相关性较大。

2.6 *CaDREB* 基因的表达模式分析

为研究 *CaDREB* 基因在涝害胁迫下的响应情况,将耐涝材料浏椒和涝敏感栽培种 0453 在六叶一心期时进行涝胁迫处理,水层高于土层表面 2 cm 左右,于试验开始时及开始后第 2 d、4 d、6 d、10 d 分别对根、茎、叶用荧光定量方法分析 *DREB* 在辣椒组织中的表达情况。从图 7 中看出,在涝胁迫下随处理时间延长,第 I 类的 *CaDREB1-4* 和 *CaDREB1-5* 基因在辣椒叶片、茎和根部表达量逐渐上升,但在耐涝材料浏椒和涝敏感材料 0453 中表达量没有明显差异,而 *CaDREB1-18* 在涝胁迫第 2 d 时在辣椒茎和根部表达量快速上调随后下降,第 6 d 时表达量再次上调,第 10 d 时在耐涝材料浏椒茎和根部表达量明显高于栽培椒 0453。第 II 类的 *CaDREB2* 基因表达量在不同组织和不同处理时间中整体均较低,而 *CaDREB2-8* 表现出组织表达特异性,在叶片和茎部表达量较低,但在耐涝材料浏椒根部表达量呈上

图5 *CaDREB* 基因在染色体上的位置Fig.5 Chromosomal locations of *CaDREB* genes

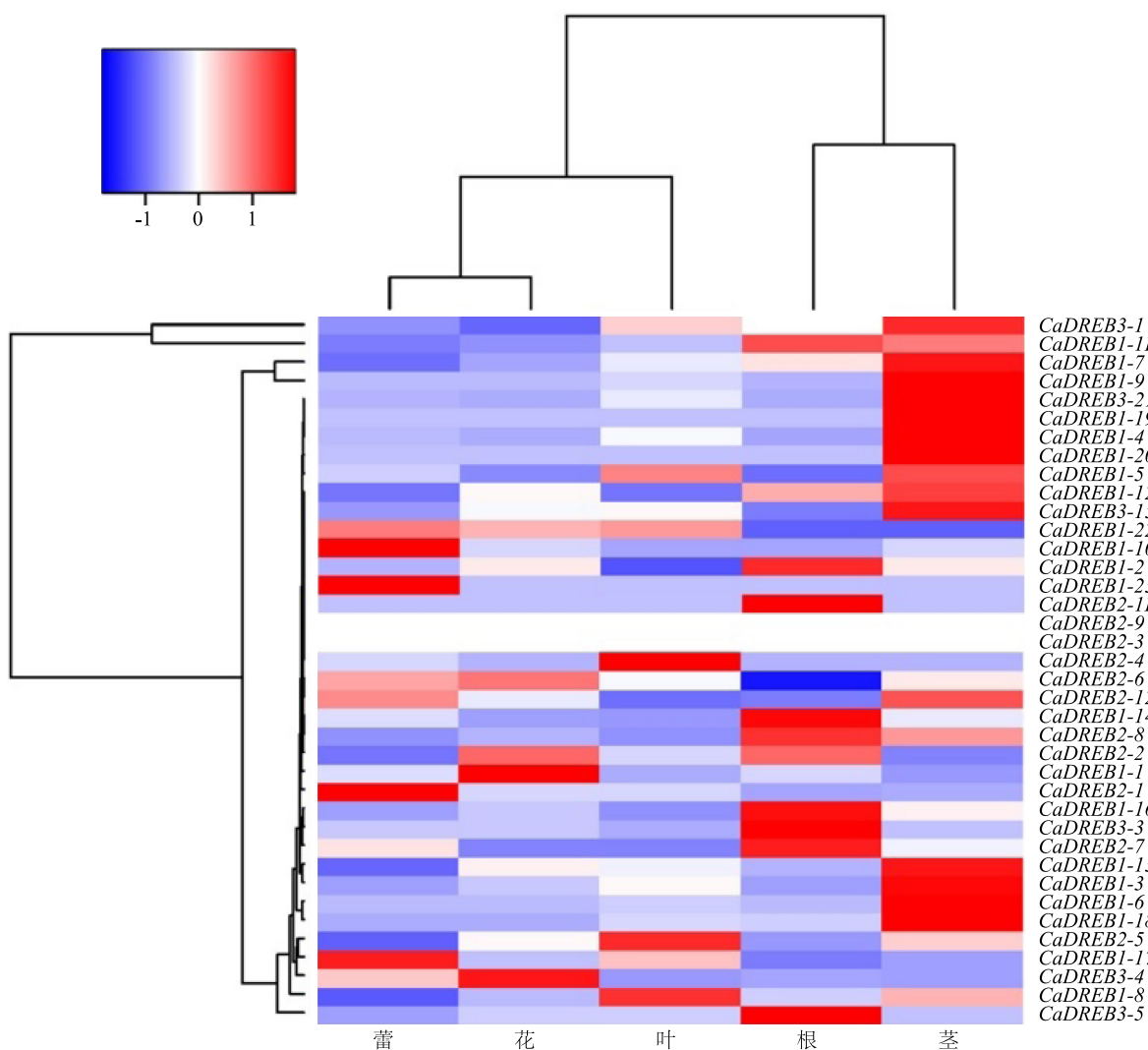
升趋势,在胁迫第2 d 表达量达到最高峰,胁迫期间在根部的表达量均表现出耐涝材料涮椒高于栽培椒0453,与盐胁迫下转基因烟草中 *AhDREB1* 的表达量相一致^[25]。第Ⅲ类的 *CaDREB3-5* 基因表达量在耐涝材料涮椒茎和根部随处理时间的延长上调,在胁迫第10 d 时表达量明显高于涝敏感材料0453,推测 *CaDREB1-18*、*CaDREB2-8* 和 *CaDREB3-5* 这3个基因与植物耐涝性相关(图7)。

3 讨论

植物在逆境胁迫下,通过激活对应激产生特异性反应的基因来响应逆境^[33-40],这些基因有直接编

码重要抗逆性蛋白质的功能基因,也有编码调节蛋白的基因,在调节蛋白的基因中转录因子占比很大。许多植物通过转录因子启动基因的表达,主要受顺式元件和反式因子的调控。DREB 类转录因子在植物应答逆境时能接受逆境信号并启动逆境应答基因的表达^[26]。本研究基于辣椒全基因组序列,鉴定出 *DREB* 基因并探讨了其染色体定位、结构特性、系统进化树、结构域、非生物胁迫下的表达情况。

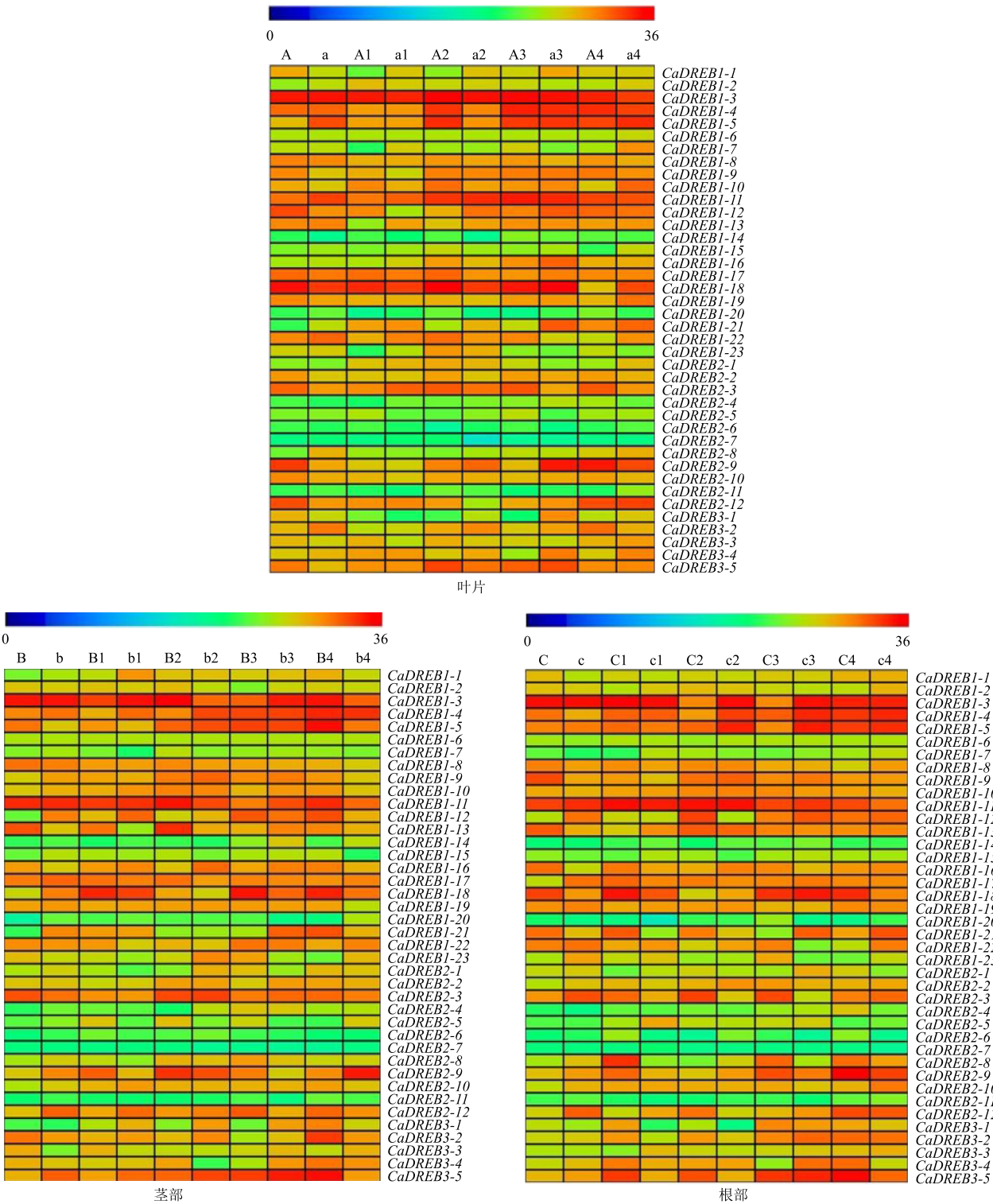
本研究在辣椒中鉴定出40个 *CaDREB* 基因,依据拟南芥和水稻中 *DREB* 的分类方法,将这40个 *DREB* 基因分成3大类: *CaDREB1* (23个)、*CaDREB2* (12个)和 *CaDREB3* (5个)。关于拟南芥的

图 6 *CaDREB* 基因在不同组织中的表达情况Fig.6 Expression pattern of *CaDREB* genes in different tissues

研究发现,DREB 亚组的第 14 位氨基酸残基都为缬氨酸(V),但第 19 位氨基酸残基不都为谷氨酸(E)^[41]。本研究在多序列比对中发现,在 AP2 结构域氨基酸第 14 位上只有 CaDREB3 中是保守的缬氨酸(V),而 CaDREB1 是赖氨酸(K),CaDREB2 是色氨酸(W),第 19 位氨基酸在各组内部是相对保守的,可见该位点的保守性并不是绝对的,且其在不同物种中的保守性也有些差异。40 个 *DREB* 基因的保守基序包含 YRG、WLG 和 RAYD,但 RAYD 没有出现在 *CaDREB3* 中。40 个 *DREB* 只中有 35 个 *DREB* 基因不均匀地分散在辣椒的 12 条染色体上,聚集趋向发生在 *CaDREB1* 和 *CaDREB2* 2 个亚组,最大的聚集群在 1 号染色体上,包含 *CaDREB1* 的 4 个基因,未发现重组片段。Kong 等^[42]研究认为,在

多基因家族进化中内含子和外显子结构起主要作用。本研究的内含子和外显子结构分析揭示了 *CaDREB* 基因含有少量的内含子,最多有 1~2 个内含子,这与菠萝^[43]和大麦^[44]中的报道相一致。Jeffares 等^[45]提出,能快速响应各种胁迫的基因内含子数量较少,*CaDREB* 家族的这种基因结构推测将有助于辣椒在应对胁迫时能快速激活基因响应应激。

本研究发现,大多数的 *CaDREB1* 基因集中在茎中高量表达,如基因 *CaDREB1-6*、*CaDREB1-19* 只在茎中表达,而 *CaDREB3* 基因中只有 *CaDREB3-4* 在花和蕾中表达,且在花中高量表达,表现出组织表达特异性,这与在大豆中的研究结果相一致^[26]。部分 *CaDREB* 基因能够被不同组织器官(叶、茎和根)差异性调节,表明它们参与了不同非生物胁迫响应



A~A4 和 a~a4 分别表示涮椒和栽培椒 0453 在涝渍胁迫下 0 d、2 d、4 d、6 d、10 d *CaDREB* 基因在叶片相对表达量;B~B4 和 b~b4 分别表示涮椒和栽培椒 0453 在涝渍胁迫下 0 d、2 d、4 d、6 d、10 d *CaDREB* 基因在茎部相对表达量;C~C4 和 c~c4 分别表示涮椒和栽培椒 0453 在涝渍胁迫下 0 d、2 d、4 d、6 d、10 d *CaDREB* 基因在根部相对表达量。

图 7 利用 qRT-PCR 分析 *CaDREB* 基因在涝渍处理下的表达量
Fig.7 Expression level analysis of *CaDREB* genes under waterlogging treatments by qRT-PCR

和植物激素通路。通过荧光定量 PCR 研究发现,在涝胁迫下 *CaDREB* 基因在不同组织和不同处理时间中表现出差异表达,其中第 2 类 *CaDREB* 基因在涝胁迫处理期间,在叶片、茎和根部的整体表达量均较低,而 *CaDREB1-18*、*CaDREB2-8* 和 *CaDREB3-5* 基因表达量在耐涝材料涮椒茎和根部随处理时间的延长明显上调且高于涝敏感栽培椒 0453,推测这 3 个基因与植物耐涝性相关,需要进一步验证这些基因在植物非生物胁迫中的功能。

本研究基于辣椒全基因组数据库鉴定出 40 个 *CaDREB* 转录因子基因,分布在 12 条染色体上,参考拟南芥将系统进化树分为 3 类,各亚组内氨基酸序列相对保守。序列分析结果显示 *CaDREB* 基因内含子较少(1~2 个)。*CaDREB* 基因表达具有组织特异性,涝胁迫下的表达模式分析结果表明,有 3 个基因在耐涝材料涮椒的茎部和根部表达量均明显上调。这些信息将为深入探究 *CaDREB* 基因在辣椒上的功能提供基础。

参考文献:

- [1] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants [J]. *Critical Reviews in Plant Science*, 2005, 24(1): 23-58.
- [2] TAKASHI H, KAZUO S. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61: 1041-1052.
- [3] 邹学校. 辣椒遗传育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 33-38.
- [4] AGARWAL P, AGARWAL P, REDDY M, et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(12): 1263-1274.
- [5] HUSSAIN S S, KAYANI M A, AMJAD M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought tolerance in plants [J]. *Biotechnology Progress*, 2011, 27(2): 297-306.
- [6] LATA C, PRASAD M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(14): 4731-4748.
- [7] JOFUKU K, DEN B, MONTAGU M. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(9): 1211-1225.
- [8] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [9] SHARMA M, KUMAR R, SOLANKE A, et al. Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 284(6): 455-475.
- [10] STOKINGER E, GILMOUR S, THOMAS M. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(3): 1035-1040.
- [11] MILLER A, GALIBA G., DUBCOVSKY J. A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-Am2* in *Triticum monococcum* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 275(2): 193-203.
- [12] ZHUANG J, CHEN J, YAO Q, et al. Discovery and expression profile analysis of AP2/ERF family genes from *Triticum aestivum* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(2): 745-753.
- [13] QIN F, SAKUMA Y, LI J, et al. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(8): 1042-1052.
- [14] QIN F, KAKIMOTO M, SAKUMA Y, et al. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. [J]. *The Plant Journal*, 2007, 50(1): 54-69.
- [15] ZHANG G, CHEN M, CHEN M, et al. Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(15): 4095-4107.
- [16] YAN H W, HONG L, ZHOU Y Q. A genome-wide analysis of the ERF gene family in sorghum [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(2): 2038-2055.
- [17] HONG J P, KIM W T. Isolation and functional characterization of the *Ca-DREBLP1* gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang) [J]. *Planta*, 2005, 220(6): 875-888.
- [18] MEI Z, WEI L, BI Y, et al. Isolation and identification of PN-DREB1: a new DREB transcription factor from peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(11): 1973-1980.
- [19] SAVITCH L, ALLARD G, MOTOAIK S, et al. The effect of over-expression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(9): 1525-1539.
- [20] YAMAGUCHI K, SHINOZAKI K. Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold stress-responsive promoters [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 88-94.
- [21] SAKUMA Y, MARUYAMA K, OSAKABE Y, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(5): 1292-1309.
- [22] YOH S, KYONOSHIN M, FENG Q, et al. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor *DREB2A* in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 2006, 103(49): 18822-18827.

- [23] DUBOUZET J, SAKUMA Y, ITO U, et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-, and cold-responsive gene expression[J]. The Plant Journal, 2003, 33(4): 751-763.
- [24] 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.
- [25] 沈义国, 闫冬青, 张万科, 等. 山菠菜 EREBp/AP2 类 DNA 结合蛋白基因的克隆及其耐逆性研究[J]. 植物学报, 2003, 45(1): 82-87.
- [26] 李雪平. 大豆 DREB 类转录因子基因的克隆及功能研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [27] ZHU J. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Reviews in Plant Biology, 2002, 53: 247-273.
- [28] BOSLAND P W, VOTAVA E J. PEPPERS: Vegetable and spice *Capsicums*[J]. Crops Prod Sci Hort, 2012, 12: 1-11.
- [29] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [30] WANG Y, TANG H, DEBARRY D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [31] PFAFFI M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29: 2002-2007.
- [32] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009(10): 57-63.
- [33] 穆榕博, 张桦, 周亮第, 等. 梭梭 HaNAC12 转录因子抗逆功能验证[J]. 南方农业学报, 2022, 53(6): 1654-1665.
- [34] 杨青青, 赵永强, 刘灿玉, 等. 大蒜 *AsPEX7* 基因的克隆与非生物胁迫响应分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(6): 24-31.
- [35] 常丽丽, 彭存智, 王丹, 等. 盐芥叶片应答盐胁迫的蛋白质组学分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(1): 49-64.
- [36] 蔡元保, 杨祥燕, 李季东, 等. 澳洲坚果 *MiSTPP6* 基因克隆及低温胁迫下表达分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(12): 3205-3211.
- [37] 董勤勇, 张圆圆, 魏景芳, 等. MYB 转录因子在水稻抗逆基因工程中的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(2): 525-530.
- [38] 顾鹏鹏, 马鑫磊, 姚锐, 等. 谷子 *HSP90* 基因家族鉴定及干旱胁迫下表达分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(6): 45-52.
- [39] 程斌, 张创娟, 杨乐, 等. 绿豆乙醇脱氢酶基因生物信息学分析及其在镉胁迫下的表达特性变化[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(2): 10-21.
- [40] 段俊枝, 李莹, 冯丽丽, 等. MYB 转录因子在水稻抗逆基因工程中的应用进展[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(21): 46-53.
- [41] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression[J]. Biochem Bioph Res Co, 2002, 290(3): 998-1009.
- [42] KONG W, ZHONG H, DENG X, et al. Evolutionary analysis of *GH3* genes in six *Oryza* species/subspecies and their expression under salinity stress in *Oryza sativa* ssp. *japonica*[J]. Plants, 2019, 8(2): 30.
- [43] CHAI M N, CHENG H, YAN M K, et al. Identification and expression analysis of the DREB transcription factor family in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.)[J]. Peer J, 2020, 8: e9006.
- [44] GUO B, WEI Y, XU R, et al. Genome-wide analysis of AP2/ERF gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161322.
- [45] JEFFARES D C, PENKETT C J, BÄHLER J. Rapidly regulated genes are intron poor[J]. Trends in Genet, 2008, 24(8): 375-378.

(责任编辑:张震林)