

刘芳, 段盼盼, 魏敏, 等. 辣椒 *CUL* 家族基因的鉴定与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(6): 1275-1285.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.06.002

## 辣椒 *CUL* 家族基因的鉴定与表达分析

刘芳, 段盼盼, 魏敏, 匡小妍, 马艳, 张涛, 马玉虎, 魏兵强  
(甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** *CUL* 家族成员在植物体内发挥着重要作用, 但关于辣椒 *CUL* 基因家族的全基因组鉴定及其在非生物胁迫下的表达模式分析报道较少。本研究对辣椒 *CUL* 基因家族进行了全基因组鉴定和表达分析。结果表明, 共有 12 个 *CaCUL* 家族基因被系统鉴定, 编码序列 (CDS) 全长为 777~2 952 bp, 非均匀地分布在 6 条染色体上, 系统进化树将 *CUL* 基因分为 4 个亚家族。保守结构域分析结果表明, 所有 *CUL* 蛋白均含有 Cullin 结构域, 除此之外, 有 8 个成员含有 Cullin-Nedd8 结构域, *CaCUL1.6* 蛋白含有 NB-ARC 结构域。亚细胞定位预测发现 *CaCUL* 均定位于细胞质、细胞核。*CaCUL* 基因的启动子中有多种与激素和胁迫响应等相关的顺式作用元件。基因表达模式分析结果表明, 在不同生长阶段的不同组织中 *CUL* 参与了辣椒植株的生长和发育; 在非生物胁迫中, 大部分 *CUL* 基因都具有应激反应。本研究为进一步解析 *CaCUL* 家族基因在辣椒生长发育和非生物胁迫应答中的作用机理奠定了基础。

**关键词:** 辣椒; *CUL*; 基因家族; 生物信息学; 表达分析

**中图分类号:** S641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)06-1275-11

## Identification and expression analysis of *CUL* gene family in pepper

LIU Fang, DUAN Pan-pan, WEI Min, KUANG Xiao-yan, MA Yan, ZHANG Tao, MA Yu-hu, WEI Bing-qiang  
(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** *CUL* family members play an important role in plants, but there are few reports on the whole genome identification of *CUL* gene family and its expression pattern analysis under abiotic stress in pepper. In this study, the whole genome of *CUL* gene family in pepper was identified and its expression was analyzed. The results showed that, a total of 12 *CaCUL* family genes were systematically identified, and the total length of coding sequence (CDS) was 777-2 952 bp, which distributed on six chromosomes unevenly. *CUL* genes were divided into four subfamilies by phylogenetic tree. Analysis of the conserved domain showed that, all *CUL* genes contained Cullin domain. In addition, eight members contained Cullin-Nedd8 domain, and *CaCUL1.6* contained NB-ARC domain. Prediction of subcellular localization showed that, *CaCUL* were located in cytoplasm and nucleus. There are many cis-acting elements related to hormones and stress response in the promoter of *CaCUL* gene. Results of gene expression pattern showed that, *CUL* participated in the growth and development of pepper plants in different tissues at different growth stages. In abiotic stresses, most *CUL* genes showed stress response. This study can lay foundation for further analysis of the mechanism of *CaCUL* family genes in pepper growth and abiotic stress response.

**Key words:** pepper; *CUL*; gene family; bioinformatics; expression analysis

收稿日期: 2022-11-01

基金项目: 兰州市人才项目 (2021-RC-65); 甘肃省重点研发项目 (21YF5NA091)

作者简介: 刘芳 (1995-), 女, 甘肃陇南人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究。(E-mail) fliu2821@163.com

通讯作者: 魏兵强, (E-mail) bqwei@gsau.edu.cn

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 在世界范围内被广泛种植, 在种植的早期, 主要用于调味和作为药用植物。如今, 辣椒被鲜食或加工成蔬菜和香料。辣椒也被视

为观赏植物,其提取物被用于各种医药产品和化妆品中<sup>[1]</sup>。辣椒对逆境胁迫反应敏感,具有喜温不耐热的特性。干旱、低温、高盐等胁迫会严重影响辣椒的生长发育和代谢调控,进而导致辣椒产量与品质的下降<sup>[2]</sup>。缺水、干旱和高盐等非生物胁迫因素会对植物生产力产生破坏性影响,因为它们会导致蛋白质变性,并损害叶绿体<sup>[3]</sup>。研究发现,辣椒在营养生长阶段,更容易受到干旱胁迫带来的危害<sup>[4]</sup>;在盐胁迫下,辣椒的多项生理指标都受到负调节作用<sup>[5]</sup>;低温弱光可抑制辣椒幼苗的生长和光合特性<sup>[6]</sup>。植物在受到这些逆境胁迫时会产生防御机制,例如:植物受到干旱胁迫会形成坚硬的叶子,不会因萎蔫而受到永久性损害,气孔变小和数量的减少也是干旱条件下植物生存的另一适应<sup>[7]</sup>。外源脱落酸(ABA)能够显著提高超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性及其基因表达水平,进而增强辣椒对低温诱导氧化胁迫的抵抗力<sup>[8]</sup>。富含水飞蓟素的蜂蜜作为一种天然的多生物刺激剂,可以通过重塑抗氧化防御系统和提高植物生产力来减轻辣椒植物的盐胁迫效应<sup>[9]</sup>。在辣椒的生长发育过程中经常遭到干旱、盐碱和低温等胁迫,导致辣椒的品质下降、产量降低<sup>[10]</sup>,所以对辣椒响应逆境胁迫中的功能方面的研究很有必要。

CUL 蛋白是一种分子支架,在涉及泛素的细胞蛋白质的翻译后修饰中起着关键作用。在真核生物中,CUL 蛋白(特别是 Cullin-4)因其在介导蛋白质泛素化中的作用而闻名,与形成 E3 连接酶或 Cullin RING 连接酶(CRL)的复合物的多种细胞成分结合<sup>[11]</sup>。CUL 基因参与水稻植株的生长和发育,在胁迫响应中也起着重要作用,植物中 CUL 基因的突变会导致植物表型受干扰<sup>[12-13]</sup>。前人研究发现,CUL 家族是一类在进化上非常保守的蛋白质家族,酵母中 CDC53 是最早被发现的 CUL 蛋白<sup>[14]</sup>。目前在酵母中发现 3 个 CUL 基因,线虫有 6 个 CUL 基因(CUL1~CUL6)<sup>[15]</sup>,果蝇中有 5 种 CUL 基因(CUL1~CUL5)<sup>[16]</sup>。人类基因组中共发现 9 个 CUL 基因,分别为 Cullin1、Cullin2、Cullin3、Cullin4A、Cullin4B、Cullin5、Cullin7 以及 Cullin 类似基因(PARC、APC2)<sup>[16]</sup>。CUL 基因在植物中也广泛存在,目前已在水稻中鉴定了 13 个 CUL 基因<sup>[11]</sup>;在拟南芥中发现 5 个 CUL 基因<sup>[16]</sup>;从矮牵牛雄蕊中共鉴定出 8 个 CUL 基因,其中 5 个为 Cullin1 类型,2 个为 Cullin3

类型,1 个为 Cullin4 类型<sup>[17]</sup>。CUL 家族基因参与植物生长发育、细胞周期调控、花粉的自交不亲和性以及植物的免疫反应等过程,在植物的整个生命过程中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。对辣椒中 CUL 基因的研究尚未见报道。本研究对辣椒 CUL 基因家族进行生物信息学以及表达模式分析,将帮助我们全面了解 CUL 基因家族的生物学功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 辣椒 CUL 基因家族成员的鉴定

根据已报道的文献获得了水稻 CUL 家族的基因账号(ID)<sup>[11]</sup>。首先,从水稻基因组数据库(<http://rice.uga.edu/>)中下载水稻的 CUL 蛋白序列。然后,使用隐马尔可夫模型(HMM)在线工具(HMMER v3.3.2, <http://hmmer.janelia.org/>)初步获得辣椒的 CUL 蛋白。根据水稻的 CUL 蛋白序列,通过茄科植物基因组数据库(sol genomics network)中的辣椒品种遵辣 1 号基因组数据库进行 BLASTP 搜索<sup>[19]</sup>。使用 Pfam 蛋白家族数据库(Pfam: Home page([xfam.org](http://xfam.org)))<sup>[20]</sup>和 SMART[SMART: Main page([embl.heidelberg.de](http://embl.heidelberg.de))]<sup>[21]</sup>在线工具验证辣椒的 CUL 候选基因。为了进一步了解 CUL 蛋白物理和化学性质,我们使用 ProtParam(ExPASy Compute pI/Mw 工具)<sup>[22]</sup>预测辣椒 CUL 蛋白的等电点(pI)和相对分子质量(Mw)。利用 Euk-mPLoc 2.0 服务器([sjtu.edu.cn](http://sjtu.edu.cn))预测亚细胞定位<sup>[23]</sup>。

### 1.2 系统发育树的构建和分析

对辣椒、拟南芥、番茄和马铃薯 CUL 蛋白序列使用 ClustaW 进行多序列比对。系统发育树使用 MEGA-X 中的最大似然法(Maximum likelihood)构建。在系统发育树中,将参数设置为:bootstraps 重复次数 1 000,其余设置选择默认选项。然后通过 Evolview (<https://evolgenius.info/evolview-v2>)<sup>[24]</sup>显示结果。

### 1.3 染色体定位、基因结构、保守基序和启动子顺式作用元件分析

利用 Mapchart 2.2 对辣椒染色体上 CUL 基因的物理位置进行定位,绘制物理位置图。使用在线工具 GSDS 2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)显示基因结构。通过在线软件(<http://meme-suite.org/index.html>)预测 CaCUL 的保守基序<sup>[25]</sup>。使用 TBtools 提取 CaCUL 基因起始密码子上游 2 000 bp 的区域。

然后,通过 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库预测每个 *CaCUL* 启动子中的顺式作用元件。

#### 1.4 共线性分析

我们使用 MCScanX 分析辣椒和拟南芥 *CUL* 基因的共线性,用 Circos 软件 (<http://circos.ca/software/download/circos/>) 展示 *CUL* 基因的共线性关系图。

#### 1.5 材料及 *CUL* 家族基因的表达谱分析

通过 PepperHub (<http://pepperhub.hzau.edu.cn/>) 数据库下载辣椒 *CUL* 基因的不同组织及不同发育阶段、激素和非生物胁迫的转录组数据,获得基因表达量<sup>[26]</sup>,最后使用 TBtools 绘制表达量热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒 *CUL* 基因成员的鉴定与分析

在辣椒基因组中共鉴定出 12 个 *CUL* 基因,并根

据与拟南芥 *CUL* 基因的序列相似性对 12 个基因进行了命名(表 1)。*CaCUL* 的编码序列(CDS)长度为 777~2 952 bp。*CaCUL* 蛋白由 258~983 个氨基酸组成,相对分子质量大小为 29 553 240~114 416 790。*CUL* 蛋白家族成员的等电点为 5.28~8.65;*CaCUL4.3* 的等电点最高(8.65),*CaCUL1.5* 的等电点最低(5.28)。*CaCUL* 的不稳定性指数均大于 40.00,其蛋白质相对不稳定。此外,其蛋白质亲水性平均系数(*GRAVY*)范围为 -0.507(*CaCUL3A.2*)~-0.094(*CaCUL1.7*),表明它们是亲水性蛋白质(*GRAVY*<0)。亚细胞定位结果表明,所有 *CUL* 都被预测位于细胞质和细胞核。*CaCUL4.2* 具有双重定位(细胞质和细胞核),*CaCUL3A.1*、*CaCUL4.1*、*CaCUL4.3*、*CaCUL3A.2*、*CaCUL1.5*、*CaCUL1.7* 蛋白均位于细胞质。*CaCUL1.1*、*CaCUL1.2*、*CaCUL1.3*、*CaCUL1.4*、*CaCUL1.6* 均位于细胞核。

表 1 辣椒 *CaCUL* 基因家族编码的蛋白质理化性质

Table 1 Physicochemical properties of proteins encoded by *CaCUL* gene family in pepper

基因名	基因编号	染色体	CDS 长度 (bp)	编码的蛋白质					
				氨基酸 (aa)	相对分子 质量	等电点	不稳定 指数	亲水性 平均系数	亚细胞定位
<i>CaCUL3A.1</i>	Capana01g002122	染色体 1	2 205	734	85 265 980	7.87	48.17	-0.500	细胞质
<i>CaCUL1.1</i>	Capana01g003171	染色体 1	2 229	742	86 437 330	7.00	41.51	-0.456	细胞核
<i>CaCUL4.1</i>	Capana02g000253	染色体 2	1 569	522	60 642 950	7.10	40.98	-0.423	细胞质
<i>CaCUL4.2</i>	Capana02g000255	染色体 2	813	270	30 170 670	8.46	58.97	-0.331	细胞核、细胞质
<i>CaCUL4.3</i>	Capana02g001459	染色体 2	2 583	860	98 874 990	8.65	46.04	-0.405	细胞质
<i>CaCUL3A.2</i>	Capana02g003376	染色体 2	2 202	733	85 385 180	8.26	47.78	-0.507	细胞质
<i>CaCUL1.2</i>	Capana03g003582	染色体 3	2 214	737	85 768 970	8.13	40.83	-0.409	细胞核
<i>CaCUL1.3</i>	Capana06g000016	染色体 6	2 223	740	86 218 100	6.64	40.93	-0.458	细胞核
<i>CaCUL1.4</i>	Capana06g003065	染色体 6	2 028	675	78 185 110	7.22	43.28	-0.383	细胞核
<i>CaCUL1.5</i>	Capana06g003066	染色体 6	855	284	32 261 840	5.28	43.89	-0.492	细胞质
<i>CaCUL1.6</i>	Capana11g002239	染色体 11	2 952	983	114 416 790	5.56	43.03	-0.261	细胞核
<i>CaCUL1.7</i>	Capana00g001338	染色体 0	777	258	29 553 240	5.43	50.86	-0.094	细胞质

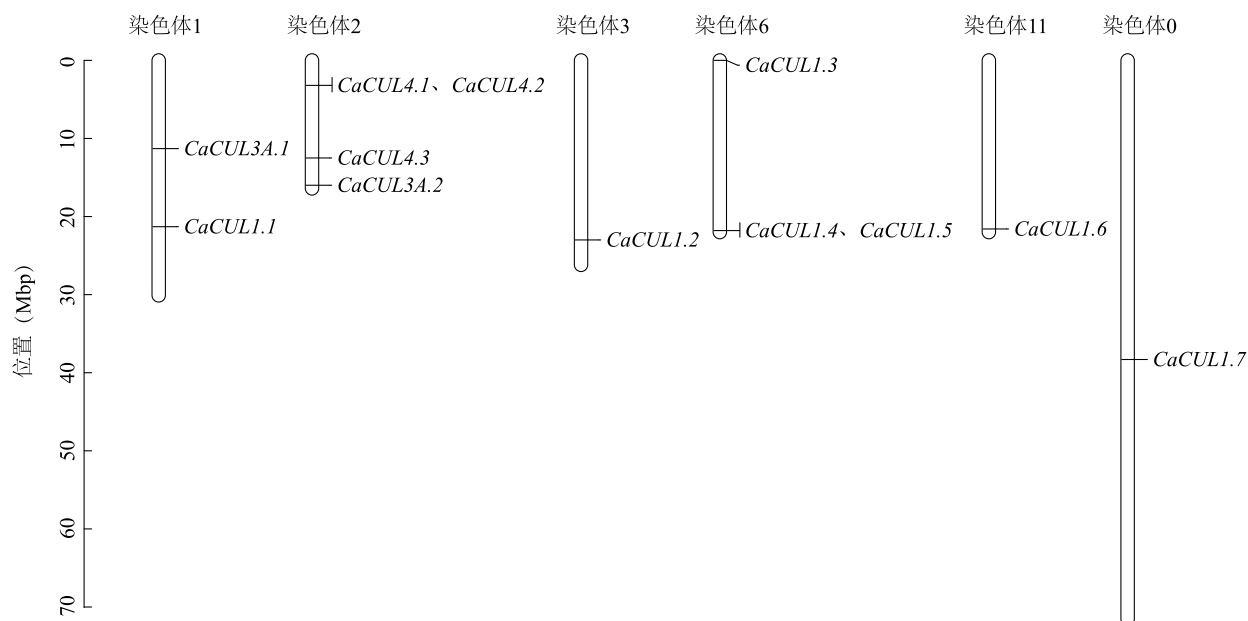
CDS: 编码序列。

### 2.2 辣椒 *CUL* 基因家族的染色体位置和系统发育树分析

辣椒 *CUL* 基因随机且不均匀地分布在 1 号、2 号、3 号、6 号、11 号、0 号染色体上(图 1)。第 2 条染色体上有 4 个基因,分布密度较高;第 6 条染色体上有 3 个基因,其余每条染色体上只有 1~2 个基因。

为了更好地理解辣椒和其他植物物种之间的进化关系,在 5 个拟南芥 *CUL* 基因、12 个辣椒 *CUL* 基因、16

个马铃薯 *CUL* 基因和 18 个番茄 *CUL* 基因编码的蛋白质之间构建了一个系统发育树(图 2)。系统发育树分支显示,*CaCUL* 基因家族共分为 4 个亚家族,其中第 1 亚族只有 *CaCUL1.2* 和 *CaCUL1.6* 2 个基因;第 2 亚族有 4 个基因,占 *CaCUL* 基因家族总数的 33.3%;第 3 亚族无 *CUL* 基因;第 4 亚族有 6 个基因,在 *CaCUL* 基因家族中占比最大,为 50.0%。系统发育树进化距离表明,辣椒与双子叶植物番茄的亲缘关系最近。

图1 辣椒 *CUL* 基因家族在染色体上的分布Fig.1 Chromosome distribution of the *CUL* gene family of pepper

### 2.3 辣椒 *CUL* 基因家族的基因结构和保守基序及其编码的蛋白质结构域分析

外显子/内含子模式分析结果(图3)表明,所有 *CaCUL* 基因的编码序列都包含内含子, *CaCUL* 基因的内含子数量在1到18个之间, *CaCUL1.1*、*CaCUL1.2*、*CaCUL1.3* 具有的内含子数目最多。 *CaCUL3A.1*、*CaCUL3A.2* 仅有1个内含子。辣椒 *CUL* 基因序列中共鉴定出10个保守基序(图4A), motif 1、motif 4 分布得最多。 *CaCUL3A.1*、*CaCUL3A.2*、*CaCUL1.1*、*CaCUL1.2*、*CaCUL1.3* 含所有保守基序, motif 10 在 *CaCUL4.3* 中缺失, motif 8 在 *CaCUL1.4* 中缺失,而 *CaCUL4.2* 只有 motif 4。保守结构域分析结果(图4B)表明,所有 *CaCUL* 蛋白均含有 Cullin 结构域,但有4个成员(*CaCUL1.5*、*CaCUL1.6*、*CaCUL1.7* 和 *CaCUL4.2*)缺少 Cullin-Nedd8 结构域,而且只有 *CaCUL1.6* 有 NB-ARC 结构域。

### 2.4 辣椒 *CUL* 基因家族的启动子顺式作用元件分析

在本研究中,为了分析 *CaCUL* 启动子内的顺式作用元件,从 TBtools 中检索了每个 *CaCUL* 基因起始密码子(ATG)上游的2 000 bp 序列。顺式作用元件借助 PlantCARE 数据库预测。使用 Microsoft Office Excel 软件处理数据,然后构建表格和图表。结果表明,有9个顺式作用元件主要对低温和非生物胁迫作出反应(图5)。植物响应低温、激素信号的

顺式元件普遍存在于 *CaCUL* 的启动子区域。这些顺式作用元件包括脱落酸反应元件、茉莉酸甲酯反应元件、水杨酸反应元件、生长素反应元件和赤霉素反应元件,表明这些激素可能调节 *CaCUL* 的表达。值得注意的是,厌氧诱导响应元件广泛存在于 *CaCUL1.2* 中,提示 *CaCUL1.2* 可能受到厌氧诱导信号的调控;茉莉酸甲酯响应元件在 *CaCUL4.1* 中广泛存在, *CaCUL4.1* 可能受到茉莉酸甲酯信号的调控。分析结果表明, *CaCUL* 可能参与辣椒的生长发育调控,以及在响应低温和非生物胁迫等方面发挥重要作用。

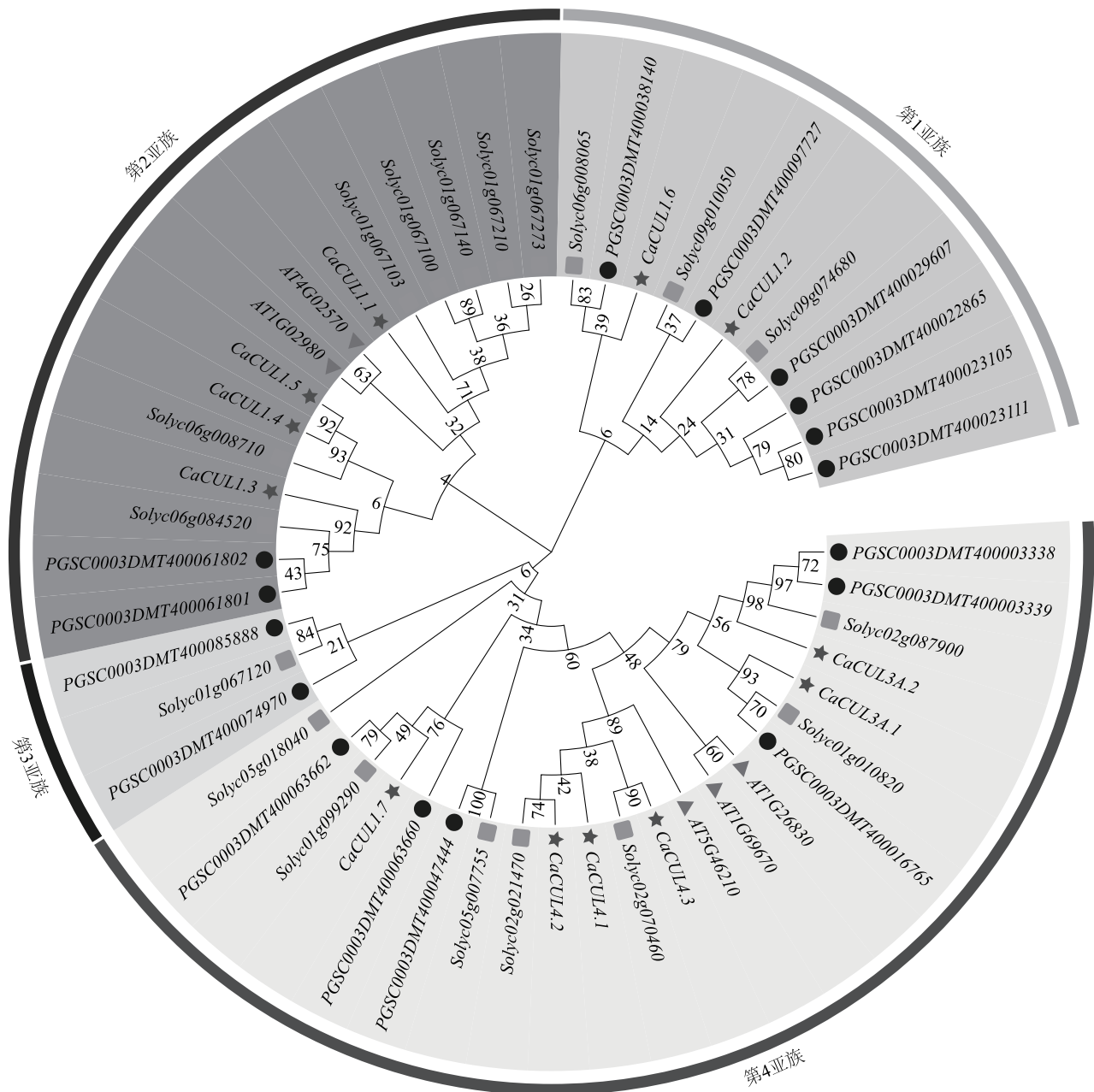
### 2.5 辣椒 *CUL* 基因家族的共线性分析

本研究构建了辣椒与拟南芥的共线图,以进一步推测 *CUL* 家族的系统发育机制。在辣椒 *CUL* 基因内,存在1对共线基因对(*CaCUL1.2* 和 *CaCUL1.3*)(图6A)。在辣椒与拟南芥 *CUL* 基因间,存在5个共线基因对。共有4个 *CaCUL* 基因与4个拟南芥 *CUL* 基因表现出共线性关系,其中 *CaCUL1.2* 与 *AT1G02980*, *CaCUL1.2* 和 *AT4G02570* 共线, *CaCUL1.4* 与 *AT1G02980* 共线, *CaCUL4.3* 与 *AT5G46210*; *CaCUL3A.2* 与 *AT1G69670* 共线(图6B)。

### 2.6 *CaCUL* 基因的表达模式分析

#### 2.6.1 *CaCUL* 基因在不同组织中的表达模式分析

辣椒 *CUL* 基因在不同生长阶段、不同组织中存在明显的表达差异(图7), *CaCUL1.3* 的相对表达量整



五角星、正方形、圆形和三角形分别代表辣椒、番茄、马铃薯和拟南芥,数字表示进化距离。

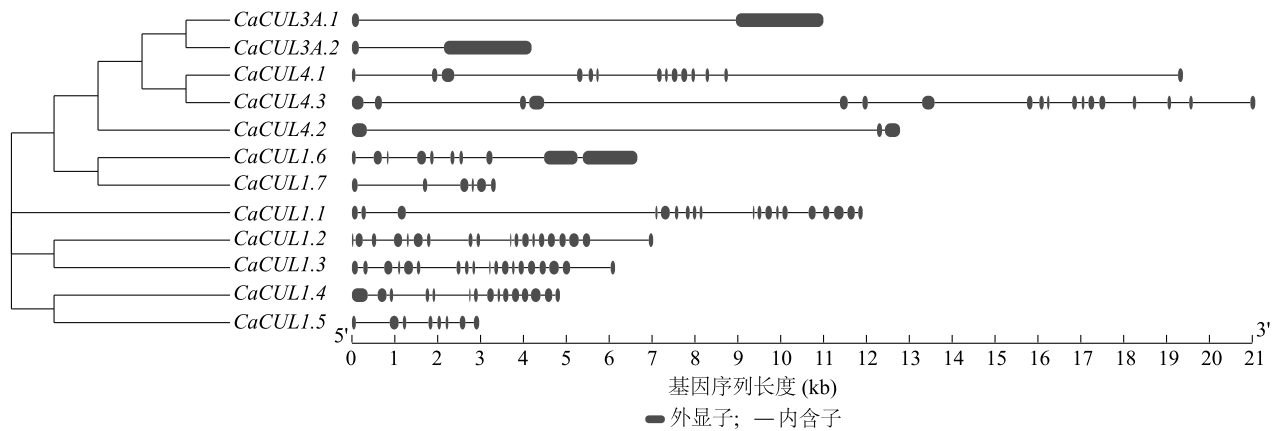
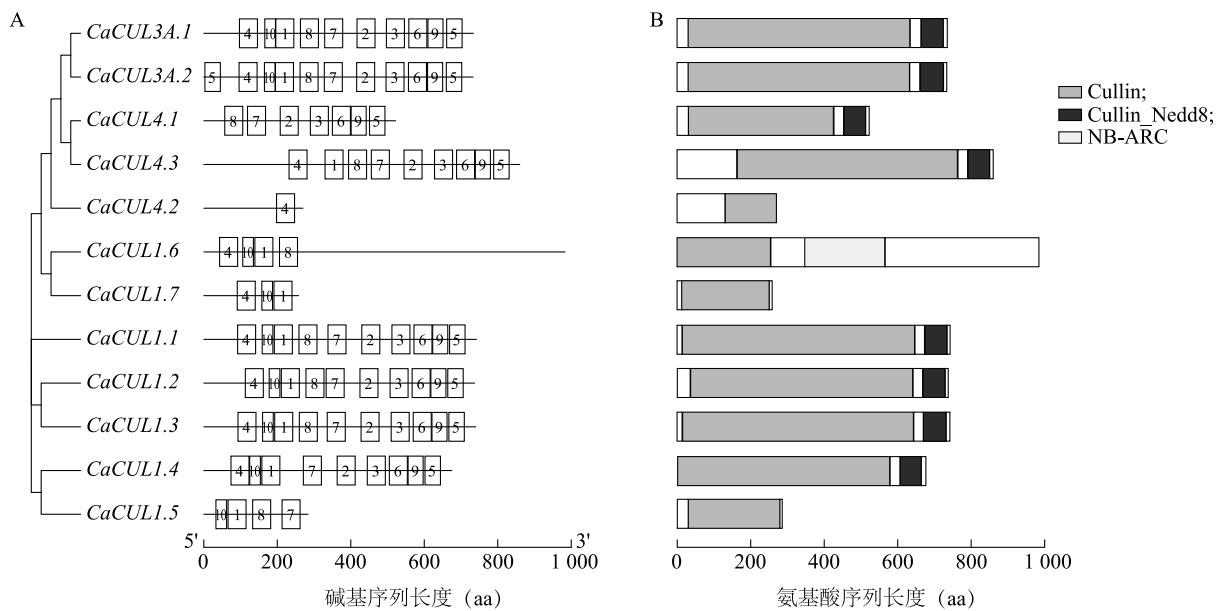
图2 *CaCUL* 基因家族进化树分析

Fig.2 Evolutionary analysis of *CaCUL* gene family

体较高,在成熟的根、授粉后 55 d 的胎座、授粉后 60 d 的种子中高表达,且在成熟的根中的相对表达量约为幼叶的 6 倍,表明 *CaCUL1.3* 可能参与了根的发育。相反,*CaCUL1.6* 在所测组织中相对表达量较低。此外,*CaCUL1.5* 在 F5~F7 阶段都有表达,在 F7 (花蕾大小为 1.20 cm) 中的相对表达量最高,而在其他组织中几乎不表达,这一结果进一步表明,*Ca-*

*CUL1.5* 可能与花的发育有关。*CaCUL1.1* 在授粉后 50 d、55 d、60 d 的果皮和授粉后 55 d 的胎座中的相对表达量略高于其他组织。而 *CaCUL1.4* 基因在这些组织中的相对表达量很低甚至不表达,由此推测 *CaCUL1.4* 基因在辣椒这些组织中不具有组织表达特异性。

2.6.2 *CaCUL* 基因在低温、NaCl 处理下的表达模式

图 3 辣椒 *CUL* 基因家族基因结构分析Fig.3 Gene structure analysis of *CUL* gene family of pepper

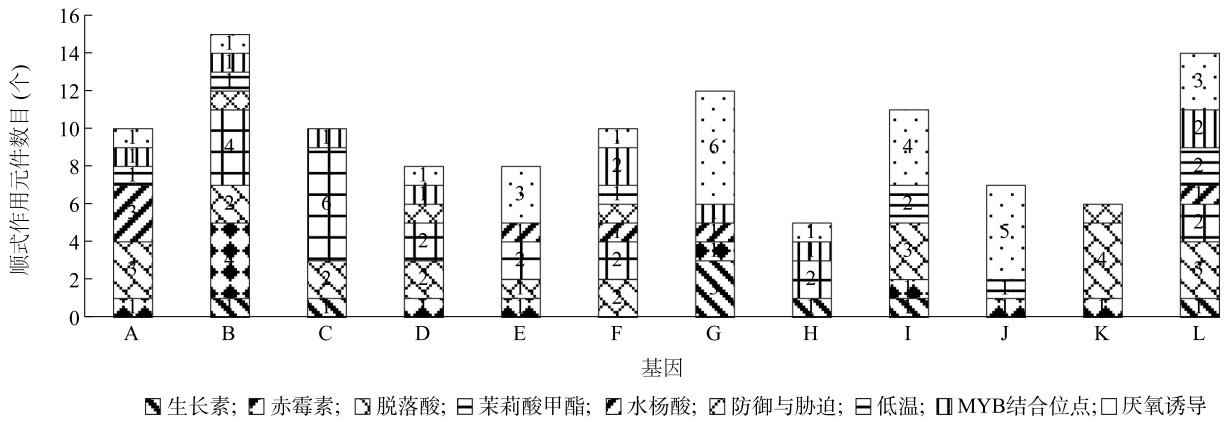
A 图中方框中的数字表示 motif 序号。

图 4 辣椒 *CULs* 基因保守基序 (A) 及其编码蛋白质保守结构域 (B) 示意Fig.4 Schematic diagram of conserved motifs (A) and conserved domains (B) of *CULs* gene in pepper

分析 由图 8 可知, 低温处理后 *CaCUL1.1*、*CaCUL1.3*、*CaCUL1.6*、*CaCUL4.2* 在叶片中表达量下调, 表达受到抑制; 与对照相比, *CaCUL1.1*、*CaCUL1.2*、*CaCUL1.6*、*CaCUL4.2* 和 *CaCUL4.3* 在根中上调表达。在经过低温处理 1.5 h 后, *CaCUL1.3* 基因在辣椒根中的表达量显著上调, 达到峰值, 其表达量在处理 12.0 h 后又下降, 但与对照差距不大。低温处理后 *CaCUL1.3* 基因在辣椒叶片中的表达量呈现持续下降趋势。低温处理后 *CaCUL1.1* 在辣椒根中的表达量上调, 在处理 12.0 h 后下降。*CaCUL1.4* 和 *CaCUL1.5* 基因在低温处理后没有显著变化, 说明这 2

个基因不参与低温调控机制, 对低温胁迫没有应答反应。

在 NaCl 处理下, 辣椒 *CUL* 基因家族在不同时间点的根和叶片中表达量存在差异 (图 9)。大部分基因在根中上调表达, 其中, *CaCUL1.3* 在根中上调表达最显著, 在处理 1.0 h 时达到最大值, 约为对照的 1.5 倍, 而在辣椒叶片中的表达水平在处理后下调。在 NaCl 处理下 *CaCUL3A.2*、*CaCUL4.1*、*CaCUL1.1* 和 *CaCUL1.2* 基因在辣椒根中的表达量整体上随着处理时间的延长逐渐上调。经 NaCl 处理后, *CaCUL1.3*、*CaCUL3A.1*、*CaCUL1.1*、*CaCUL1.6*、*CaC-*



A: *CaCUL3A.1*; B: *CaCUL1.1*; C: *CaCUL4.1*; D: *CaCUL4.2*; E: *CaCUL4.3*; F: *CaCUL3A.2*; G: *CaCUL1.2*; H: *CaCUL1.3*; I: *CaCUL1.4*; J: *CaCUL1.5*; K: *CaCUL1.6*; L: *CaCUL1.7*。

图5 辣椒 *CUL* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig.5 Analysis of cis-acting elements of *CUL* gene promoter in pepper

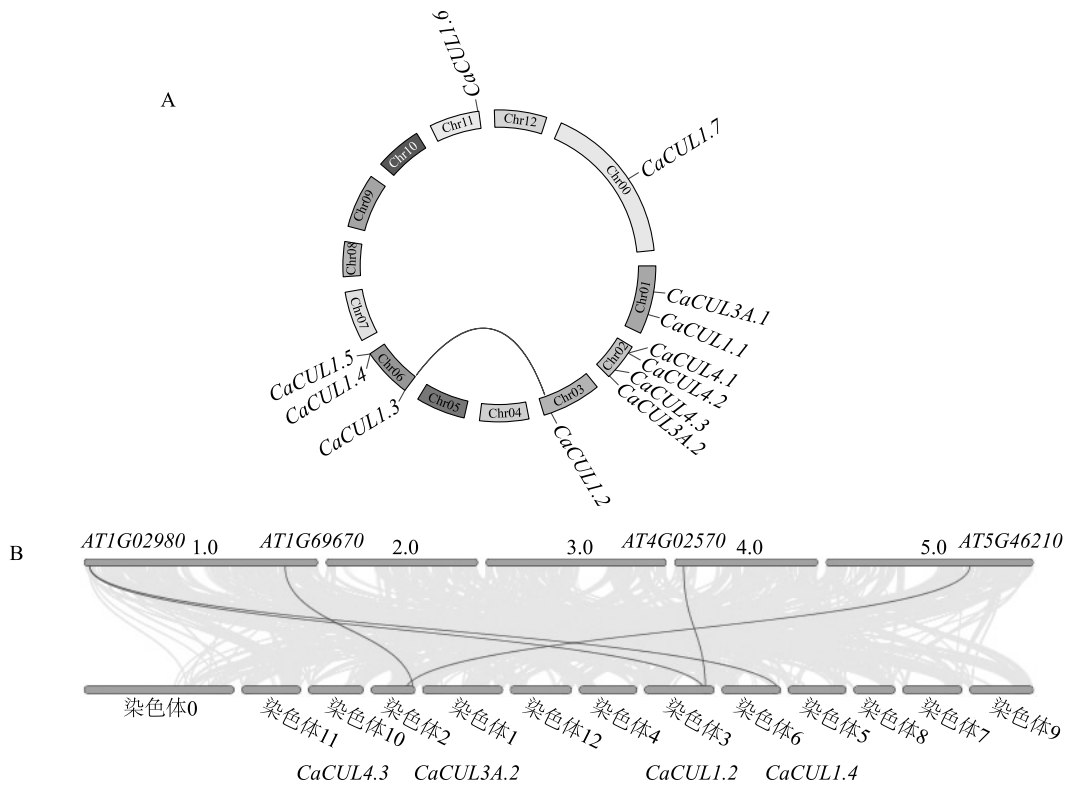


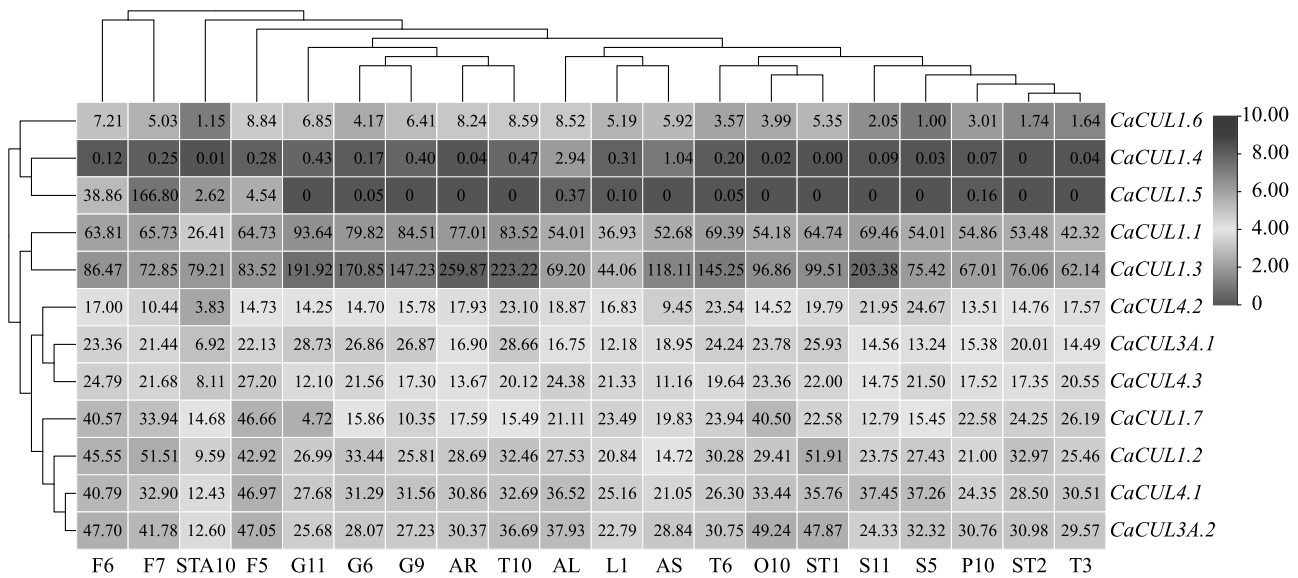
图6 *CUL* 基因共线性分析

Fig.6 Collinearity analysis of *CUL* gene

*UL4.2*、*CaCUL1.7* 和 *CaCUL1.2* 基因在叶片中的表达量整体上都显著下调,而在根中正好相反,说明这 7 个基因受盐胁迫处理后在叶片和根中行使了不同的功能。经 NaCl 处理后, *CaCUL1.4* 和 *CaCUL1.5* 基因在 2 种组织中表达量无明显变化,表明这 2 个基因在叶片和根中对盐胁迫没有应答反应。

### 3 讨论

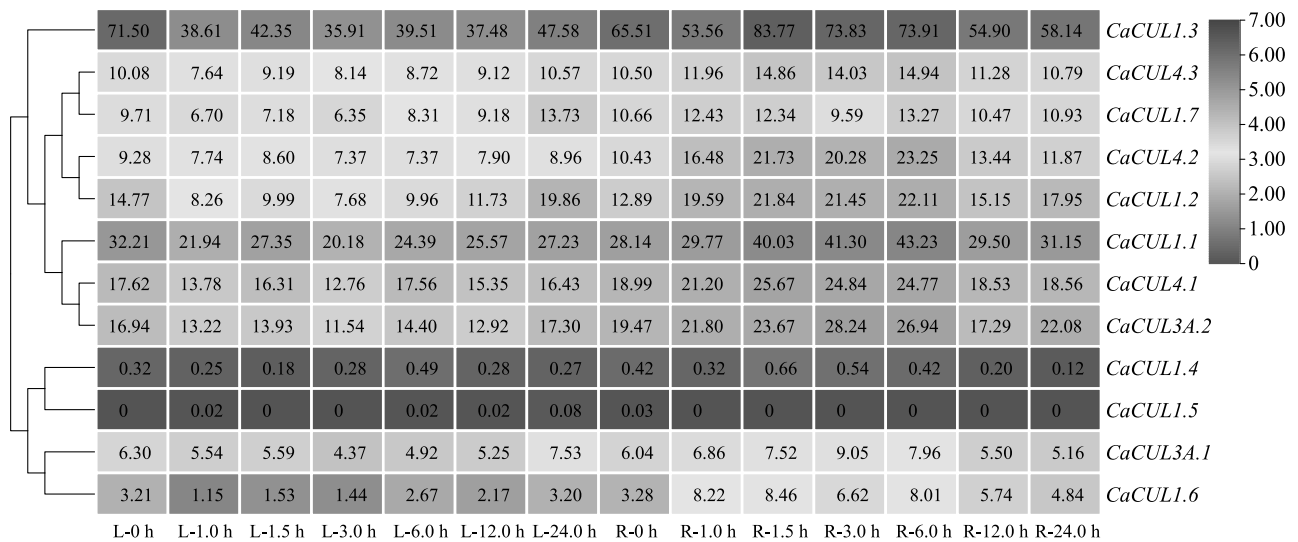
本研究在辣椒基因组中共鉴定了 12 个 *CUL* 基因,分别分布在 1 号、2 号、3 号、6 号、11 号、0 号染色体上。据报道,在水稻中鉴定了 13 个 *CUL* 基因<sup>[11]</sup>,在拟南芥中发现 5 个<sup>[16]</sup>,在矮牵牛雄蕊中共



L1: 幼叶; AL: 成熟的叶; AR: 成熟的根; AS: 成熟的茎; F5: 花蕾大小为 0.80 cm 的花; F6: 花蕾大小为 1.00 cm 的花; F7: 花蕾大小为 1.20 cm 的花; P10: 花瓣; O10: 子房; STA10: 花药; G6: 授粉后 35 d 的果皮; G9: 授粉后 50 d 的果皮; G11: 授粉后 60 d 的果皮; ST1: 授粉后 10 d 的胎座和种子; ST2: 授粉后 20 d 的胎座和种子; S5: 授粉后 30 d 的种子; S11: 授粉后 60 d 的种子; T3: 授粉后 20 d 的胎座; T6: 授粉后 35 d 的胎座; T10: 授粉后 55 d 的胎座。图中数据表示相对表达量。

图 7 *CUL* 基因在辣椒不同组织中的表达模式

Fig.7 Expression pattern of *CUL* gene in different tissues of pepper



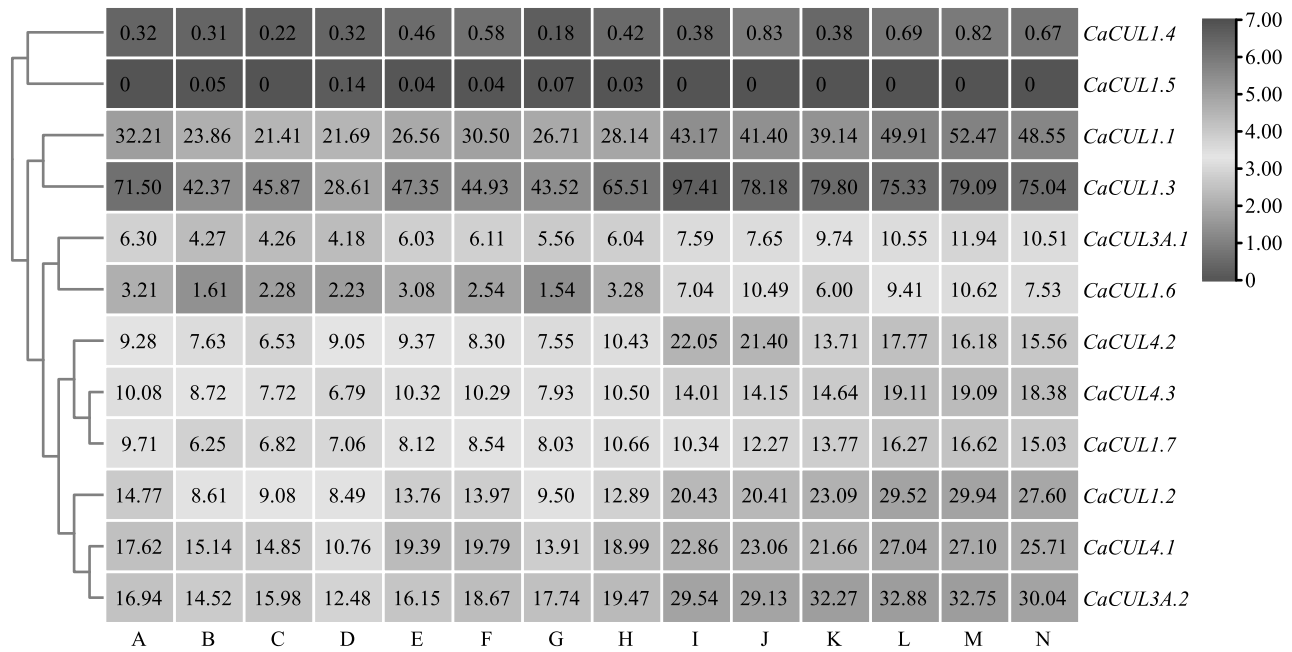
L: 叶; R: 根。图中数据表示相对表达量。

图 8 辣椒 *CaCUL* 基因在低温处理下的表达水平

Fig.8 Expression level of *CaCUL* gene under low-temperature treatment

鉴定出 8 个 *CUL* 基因<sup>[17]</sup>, 在扁桃中发现有 15 个 *Ps-dCUL* 成员<sup>[27]</sup>。亚细胞定位分析结果表明, 所有 *CUL* 都被预测位于细胞质和细胞核中。前人研究结果表明, *AtCUL1* 蛋白主要定位在细胞核中, 但也有少量定位在细胞质中<sup>[11]</sup>; 小麦中发现有 25 个

*CUL* 蛋白位于细胞核中, 2 个位于细胞质中, 12 个具有双重定位 (细胞核和细胞质)<sup>[18]</sup>, 故推测 *CUL* 蛋白家族主要在细胞质和细胞核中发挥作用。系统发育树分析结果显示, 辣椒 *CUL* 基因和番茄 *CUL* 基因之间同源性很高, 进化关系很近, 这可能是由于辣



L: 叶; R: 根。A: NaCl-L-0 h; B: NaCl-L-1.0 h; C: NaCl-L-1.5 h; D: NaCl-L-3.0 h; E: NaCl-L-6.0 h; F: NaCl-L-12.0 h; G: NaCl-L-24.0 h; H: NaCl-R-0 h; I: NaCl-R-1.0 h; J: NaCl-R-1.5 h; K: NaCl-R-3.0 h; L: NaCl-R-6.0 h; M: NaCl-R-12.0 h; N: NaCl-R-24.0 h。图中数据为相对表达量。

图9 辣椒 *CaCUL* 基因在 NaCl 处理下的表达水平

Fig.9 Expression level of *CaCUL* gene in pepper under NaCl treatment

椒和番茄都属于双子叶茄科植物,本研究结果与马铃薯 *CUL1* 和番茄的亲缘关系最为密切,这是因为它们都属于茄科植物<sup>[28]</sup>。本研究预测到辣椒 *CUL* 基因家族共有 10 个保守基序,在各 *CUL* 基因中都有分布,属于高保守基序;研究发现不同亚族之间保守基序的相似性与亚族间的系谱进化密切相关,辣椒 *CUL* 基因家族除了个别基因之间的基序分布和数量存在差异外,各亚族保守基序大部分相同,表明辣椒 *CUL* 基因家族在进化过程中具有高度保守性。保守结构域分析结果表明, *CaCUL* 蛋白含有 Cullin、Cullin-Nedd8、NB-ARC 3 种结构域,且高度保守,这与扁桃的 *CUL* 家族,马铃薯 *CUL1* 的相关研究结果相似<sup>[27-28]</sup>。Hori 等<sup>[29]</sup> 研究发现, Nedd8 结构域与 *CUL* 的连接激活了它们的 E3 连接酶介导的泛素化活性。根据辣椒中 3 个 *CUL* 基因缺失 Nedd8 结构域推测这些蛋白质不介导 E3 连接酶活性。

顺式作用元件参与调控植物体内各种生物过程中基因的表达,在植物生长发育及其对非生物或生物应激反应、激素响应等方面发挥重要作用<sup>[30-34]</sup>。水稻等作物中 *CUL* 家族成员上游 2 000 bp 启动子序列中存在着大量的激素等胁迫响应元件,且 *CUL* 的差异表达与分布在其启动子区域的多个应激和信

号响应元件的存在相关<sup>[11]</sup>;在扁桃 *PsdCUL* 启动子序列上也发现激素类和抗逆类等胁迫响应元件<sup>[27]</sup>,这与本研究结果相一致。*CaCUL* 启动子区含有多顺式作用元件,研究结果表明, *CaCUL* 可能受激素和胁迫调控,且在植物生长、发育及抗逆等方面发挥重要作用。另外发现,辣椒 *CUL* 和拟南芥 *CUL* 之间存在共线性关系,这将有助于推测 *CaCUL* 基因功能。在辣椒 *CUL* 基因中发现 1 对片段复制基因。基因家族成员的扩增主要依赖于基因复制<sup>[35]</sup>,在扁桃 *PsdCUL* 基因中发现,具有 2 对片段复制基因, *PsdCUL* 家族成员在进化上发生复制扩增现象<sup>[27]</sup>。这与本研究结果相似,表明 *CaCUL* 家族成员在进化上可能也发生了复制扩增现象。

对辣椒 *CUL* 基因家族成员的组织表达模式进行分析,结果发现 *CUL* 基因表达模式具有差异。这表明它们在辣椒的生长发育过程中可能起着不同的作用。对 *CaCUL* 基因组织特异性表达分析发现, *CaCUL1.3* 在成熟的根中表达量最高,其次是授粉后 55 d 的胎座、授粉后 60 d 的种子和果皮以及授粉后 35 d 的果皮,有研究发现水稻 *OsCUL1* 基因在种子中高表达<sup>[36]</sup>,以上结果表明 *CUL* 可能与辣椒根和种子的生长发育密切相关,这还需要进一步研究

来证实。此外, *CaCUL1.5* 在 F7(花蕾大小为 1.20 cm) 中的表达量最高, 而在其他组织中几乎不表达。这一结果进一步表明, *CaCUL1.5* 可能在花的发育过程中扮演重要的调控作用。 *CaCUL* 基因家族成员具有一定的组织特异性, 说明其在辣椒不同器官组织中发挥特定的作用。

在不同植物中相同基因具有多种调控机理, 且在应对低温和盐分等非生物胁迫时的表达也表现出差异性。辣椒大部分 *CUL* 基因响应低温应答。据报道, *OsCUL1-3* 受到冷胁迫诱导表达水平特异性上调<sup>[36]</sup>, 这与本结果相似。 *CaCUL1.3* 基因在经过低温处理 1.5 h 后在辣椒根中的表达量显著上调, 达到峰值。 *CaCUL1.4* 和 *CaCUL1.5* 基因在低温处理后表达量没有显著变化, 这说明这 2 个基因不参与低温调控机制。 NaCl 处理后, 辣椒大部分 *CUL* 基因在根中表达量上调, 在叶片中部分 *CUL* 基因表达量下调, 表达受到抑制。尤其是 *CaCUL1.3* 在 NaCl 处理 1.0 h 时在根中表达量达到最大值, 但随着处理时间的延长, 表达量整体呈下降趋势; *CaCUL1.3* 在低温和盐胁迫下在辣椒根中的表达量都具有显著上调趋势, 表明 *CaCUL1.3* 可能是提高辣椒耐低温和耐盐能力的一个潜在基因。 *CaCUL* 家族基因受到低温、盐处理的诱导表达水平发生变化, 说明 *CUL* 可能参与调节植物适应不良环境的过程, 在应对不同胁迫时其表达模式的复杂程度也不同。据报道 *OsCUL1* 基因受到各种非生物胁迫(盐、热和干旱)上调表达<sup>[36]</sup>。本研究发现, *CUL* 在胁迫处理下的差异表达与它们的启动子区域中存在各种顺式元件一致, 进一步表明它们除了非生物胁迫反应外, 还参与生长和发育, 这与水稻 *CUL* 家族的相关研究结果相似<sup>[11]</sup>。

## 4 结 论

本研究鉴定了 12 个辣椒 *CUL* 基因家族成员, 并分析了它们的系统发育关系、基因结构、保守基序、结构域以及顺式作用元件。结果表明, *CaCUL* 基因家族在进化过程中高度保守。顺式元件的分析结果表明, *CaCUL* 基因有多种低温、激素和应激反应元件。共线性分析结果表明, 辣椒和拟南芥的 *CaCUL* 基因家族之间有 5 对共线性基因对, *CaCUL* 基因之间有 1 对片段重复基因对。表达量数据分析结果表明, *CaCUL1.3* 在辣椒根中表达量最高, *CaC-*

*UL1.5* 在 F7(花蕾大小为 1.20 cm) 中的表达量最高。辣椒大部分 *CUL* 基因对低温及盐胁迫有应答反应, 低温处理下 *CaCUL1.1*、*CaCUL1.3*、*CaCUL1.6*、*CaCUL4.2* 在叶片中表达受到抑制, 表达量下调; *CaCUL1.3* 基因在经过低温和盐胁迫处理后在辣椒根中上调表达。上述结果证明, *CaCUL* 基因在辣椒生长、发育及应对非生物胁迫中发挥着重要的作用。

## 参考文献:

- [1] CHHAPEKAR S, KEHIE M, RAMCHIARY N. Advances in molecular breeding of capsicum species[M]. New Delhi: Daya Publishing House, 2016: 233-274.
- [2] 张 帆. 辣椒 *Aux/IAA* 基因家族的鉴定与表达分析[D]. 长沙: 湖南大学, 2019.
- [3] REGUERA M, PELEG Z, BLUMWALD E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2012, 1819(2): 186-194.
- [4] GURUNG T, TECHAWONGSTIEN S, SURIHARN B, et al. Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in capsicum spp.[J]. Hort Science, 2011, 46(12): 1576-1581.
- [5] KAOUDER Z, MARIEM B F, FARDAOUS M, et al. Impact of salt stress (NaCl) on growth, chlorophyll content and fluorescence of Tunisian cultivars of chili pepper (*Capsicum frutescens* L.)[J]. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2012, 8(4): 236-252.
- [6] 胡晨曦, 李子恒, 张云虹, 等. 低温弱光对不同品种辣椒幼苗生长和光合特性的影响[J]. 福建农业学报, 2022, 37(5): 617-625.
- [7] BASU S, RAMEGOWDA V, KUMAR A, et al. Plant adaptation to drought stress[J]. F1000Research, 2016, 5: 1-10.
- [8] 郭卫丽. 辣椒对低温胁迫的响应与其低温抗性相关基因的克隆和功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [9] ABOU-SREEA A I B, AZZAM C R, AL-TAWEEEL S K, et al. Natural biostimulant attenuates salinity stress effects in chili pepper by remodeling antioxidant, ion, and phytohormone balances, and augments gene expression[J]. Plants, 2021, 10(11): 2316.
- [10] 马 潇. 辣椒 CaCIPKs 对干旱和低温胁迫的响应及其调控机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [11] MOIN M, BAKSHI A, MADHAV M S, et al. Comprehensive expression profiling reveals the possible involvement of Cullins in developmental and stress regulation in rice[J]. Environmental and Experimental Botany, 2019, 160: 101-111.
- [12] SHEN W H, PARMENTIER Y, HELLMANN H, et al. Null mutation of *AtCUL1* causes arrest in early embryogenesis in *Arabidopsis*[J]. Molecular Biology of the Cell, 2002, 13(6): 1916-1928.
- [13] REN C, PAN J, PENG W, et al. Point mutations in *Arabidopsis Cullin1* reveal its essential role in jasmonate response[J]. The

- Plant Journal, 2005, 42(4): 514-524.
- [14] PATTON E E, WILLEMS A R, SA D, et al. Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast[J]. Genes & Development, 1998, 12(5): 692-705.
- [15] KIPREOS E T, LANDER L E, WING J P, et al. cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family[J]. Cell, 1996, 85(6): 829-839.
- [16] SARIKAS A, HARTMANN T, PAN Z Q. The cullin protein family[J]. Genome Biology, 2011, 12(4): 1-12.
- [17] KUBO K, TSUKAHARA M, FUJII S, et al. Cullin1-P is an essential component of non-self recognition system in self-incompatibility in *Petunia*[J]. Plant and Cell Physiology, 2016, 57(11): 2403-2416.
- [18] 赵梦伊,魏春茹,范润侨,等. Cullin 家族通过 UPS 途径响应小麦生长发育及非生物胁迫进程[J]. 分子植物育种, 2021, 20(21): 1-17.
- [19] MUELLER L A, SOLOW T H, TAYLOR N, et al. The SOL genomics network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond[J]. Plant Physiology, 2005, 138(3): 1310-1317.
- [20] EL-GEHALI S, MISTRY J, BATEMAN A, et al. The Pfam protein families database in 2019[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(1): 427-432.
- [21] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(1): 302-305.
- [22] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[J]. Humana Press, 2005: 571-607.
- [23] CHOU K C, SHEN H B. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e9931.
- [24] ZHANG H X, CAO N, DONG C J, et al. Genome-wide identification and expression of *ARF* gene family during adventitious root development in hot pepper *Capsicum annuum* [J]. Horticultural Plant Journal, 2017, 3(4): 151-164.
- [25] WEI R M, XIE L L, OUYANG X, et al. Identification and expression analysis of *ARF* gene family in pepper[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2017, 37(6): 1047-1058.
- [26] LIU F, YU H, DENG Y, et al. PepperHub, an informatics hub for the chili pepper research community [J]. Molecular Plant, 2017, 10(8): 1129-1132.
- [27] 杨佳惠,张冬冬,曾 斌,等. 扁桃 *PsdCUL1* 基因克隆表达鉴定及其 *CUL* 基因家族分析[J/OL]. 分子植物育种, 2022; 1-23. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220304.1133.006.html>.
- [28] PANG P X, SHI L, WANG X J, et al. Cloning and expression analysis of the *StCUL1* gene in potato[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2019, 28(4): 460-469.
- [29] HORI T, OSAKA F, CHIBA T, et al. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8[J]. Oncogene, 1999, 18(48): 6829-6834.
- [30] 宋 刚,方志刚,王玉龙,等. 柳枝稷 *BiP* 基因的鉴定、表达分析和抗逆境功能[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(4): 889-899.
- [31] 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.
- [32] HAN X M, CHEN Q X, YANG Q, et al. Genome-wide analysis of superoxide dismutase genes in *Larix kaempferi* [J]. Gene, 2019, 686: 29-36.
- [33] 丁祥青,胡敏杰,向 双,等. 秋茄 *WRKY* 基因家族的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(14): 50-60.
- [34] 沈 丹,杨 莉,胡 威,等. 柑橘胁迫响应基因 *WRKY47* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 129-138.
- [35] JOUFFREY V, LEONARD A S, AHNERT S E. Gene duplication and subsequent diversification strongly affect phenotypic evolvability and robustness[J]. Royal Society Open Science, 2021, 8(6): 201636.
- [36] KIM S H, WOO O G, JANG H, et al. Characterization and comparative expression analysis of *CUL1* genes in rice[J]. Genes & Genomics, 2018, 40(3): 233-241.

(责任编辑:陈海霞)