

引用格式:

梁心仪, 汤冰倩, 张新昊, 邹学校, 刘峰. 辣椒SEP亚家族基因鉴定及CaSEP3表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(4): 15–24.

LIANG X Y, TANG B Q, ZHANG X H, ZOU X X, LIU F. Identification of SEP subfamily and expression analysis of *CaSEP3* in pepper[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(4): 15–24.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



辣椒SEP亚家族基因鉴定及CaSEP3表达分析

梁心仪¹, 汤冰倩², 张新昊², 邹学校^{1,2,3,4}, 刘峰^{1,2,3,4*}

(1. 湖南大学生物学院隆平分院, 湖南长沙 410125; 2. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128; 3. 园艺作物种质创新与新品种选育教育部工程研究中心, 湖南长沙 410128; 4. 蔬菜生物学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

摘要: 利用ST-8樟树港辣椒全基因组鉴定得到6个SEPALLATA(SEP)亚家族蛋白编码基因, 对其理化性质、染色体定位、编码蛋白保守基序和保守结构域进行分析; 将辣椒SEP基因与拟南芥、番茄、水稻和玉米的SEP基因共同构建系统进化树; 探究CaSEP3的组织表达水平及编码蛋白的亚细胞定位。结果表明: 辣椒SEP基因分布于5条染色体上, 编码蛋白都含有MADS结构域(MADS_MEF2_like)和K结构域(K-box); 辣椒SEP基因可分为2类, 即SEP3和SEPI/2/4, 这与番茄和拟南芥SEP基因的进化树类似。辣椒CaSEP3是拟南芥AtSEP3的同源蛋白, 定位于细胞核中, CaSEP3在花蕾、胎座和果皮中高表达, 推测其参与辣椒花器官和肉质果实的发育。常见激素和非生物胁迫处理后(0~24 h), 脱落酸(ABA)、H₂O₂、NaCl可使CaSEP3表达量上调, 其余处理下CaSEP3在叶片和根部的表达量变化不明显。

关键词: 辣椒; 花发育; SEPALLATA亚家族; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S641.3; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)04-0015-10

Identification of SEP subfamily and expression analysis of *CaSEP3* in pepper

LIANG Xinyi¹, TANG Bingqian², ZHANG Xinhao², ZOU Xuexiao^{1,2,3,4}, LIU Feng^{1,2,3,4*}

(1. Longping Branch, College of Biology, Hunan University, Changsha, Hunan 410125, China; 2. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 3. ERC for Germplasm Innovation and New Variety Breeding of Horticultural Crops, Changsha, Hunan 410128, China; 4. Key Laboratory for Vegetable Biology of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Six coding genes of SEPALLATA(SEP) subfamily members were identified through genome-wide analysis of the ST-8 Zhangshugang pepper. The physicochemical properties, chromosome localization, encoded protein conserved motifs and conserved structures of the subfamily members were analyzed. The phylogenetic tree was constructed with the SEP genes of pepper, *Arabidopsis*, tomato, rice and maize. Furthermore, tissue expression level of *CaSEP3* and subcellular localization of encoded protein were explored. The results showed that SEP genes of pepper were distributed on five chromosomes, with all their encoded protein contained MADS domain(MADS_MEF2_like) and K-box domain. SEP genes could be divided into two branches: SEP3 and SEPI/2/4, which was similar to the evolutionary development of tomato and *Arabidopsis*. CaSEP3 was a homologous protein of AtSEP3, which was localized in the nucleus. *CaSEP3*

收稿日期: 2024-11-12

修回日期: 2025-04-08

基金项目: 特色蔬菜产业技术体系项目(CARS-24-A-15)

作者简介: 梁心仪(1999—), 女, 广东韶关人, 硕士, 主要从事辣椒分子育种研究, xybrave4892@126.com; *通信作者, 刘峰, 博士, 研究员, 主要从事辣椒种质资源重要性状功能基因挖掘及新种质创制研究, liufengrich@126.com

was highly expressed in flower buds, placenta and pericarp, which was speculated to be involved in development of flower and fleshy fruit in pepper. After common hormone and abiotic stress treatments(0~24 h), the expression of *CaSEP3* was up-regulated by ABA, H₂O₂ and NaCl, while the expression of *CaSEP3* in leaves and roots did not change significantly under other treatments.

Keywords: pepper; floral development; SEPALLATA subfamily; bioinformatics; expression analysis

花发育是植物进化和发育过程中的重要事件,其背后的分子调控机制是花发育研究领域的核心问题^[1]。双子叶植物开花基因的种类和网络结构丰富多样,学者们针对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的花发育调控网络进行了研究^[1-3],花发育模型不断被补充和修正,从“ABC模型”逐步发展成更完整的“ABCDE模型”^[4]。A、B、C、D、E类基因的编码产物都是转录因子,其编码蛋白可形成不同的四聚体,这些蛋白聚合体与DNA结合并调控各种下游基因的表达,影响花器官各部位的发育^[5-6]。

除了A类基因*AP2*(*APETALA2*)外,“ABCDE模型”的各类基因编码MADS-box转录因子^[7]。MADS-box基因在控制植物发育的过程中起着重要作用,参与调节花器官形成和果实成熟^[8-11]。MADS-box基因家族的II型基因包括动物和真菌的MEF2样基因和植物的MIKC型基因,通常以聚合物的形式与DNA结合并发挥调节作用^[5,12]。MIKC型转录因子具有保守的基因结构,典型的结构域包含MADS结构域(MADS domain)、I结构域(I-domain)、K结构域(K-box domain)和C端结构域(C-terminal domain)^[12]。

SEPALLATA(SEP)蛋白作为E类MADS-box转录因子,通过与B、C、D类基因相互作用,调控花瓣、雄蕊和心皮的发育,是MADS四聚体发挥作用的重要介质^[13-14]。*SEP*基因在进化过程中产生了2个分支,分别为*AGL2/3/4*(*SEP1/2/4*)和*AGL9*(*SEP3*)^[15]。拟南芥中有4个*SEP*基因,即*AtSEP1*、*AtSEP2*、*AtSEP3*和*AtSEP4*。研究表明,这些基因发生突变会影响花器官的形成。例如,*sep1-3*三重突变体的花瓣、雄蕊和心皮转化为萼片,*sep1-4*四重突变体的花器官转变为叶状器官^[16-18]。*SEP*亚家族功能多样,其中,*SEP3*基因在植物生长和发育中起着关键作用。例如,*AtSEP3*与*AtTCP4*协同作用,抑制高温诱导的胚珠心皮化^[19]; *AtSEP3*与转

录因子SEEDSTICK(STK)共同调节拟南芥种子的油脂积累,油脂含量随*AtSEP3*表达量的上升而降低^[20]。此外,番茄(*Solanum lycopersicum*)中的SITM5是*AtSEP3*的同源蛋白,*TM5*沉默转基因株系的2、3、4轮花器官转变为萼片状器官^[21]。

辣椒(*Capsicum annuum*)是茄科辣椒属植物,在我国广泛栽培与种植,其果实和副产品在人们生产生活中得到广泛应用^[22]。本研究以ST-8樟树港辣椒全基因组数据为研究材料,通过生物信息学方法鉴定得到6个辣椒*SEP*基因,然后分析这些基因的基本信息、染色体定位、基因结构、编码蛋白保守基序及结构域,并将辣椒*SEP*基因与拟南芥、番茄等物种的*SEP*基因共同构建系统进化树;克隆得到*CaSEP3*基因,分析*CaSEP3*蛋白的亚细胞定位;利用qRT-PCR检测该基因在花蕾期不同器官中的相对表达量,分析*CaSEP3*在花蕾不同发育时期、花器官不同部位、果实不同部位及植物激素、常见逆境处理后的表达量,为进一步研究*CaSEP3*基因如何参与调控辣椒各器官的发育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为ST-8樟树港辣椒,2023年春季种植于湖南农业大学园艺学院人工气候培养室,培养条件为(27±2) °C (16 h光照), (18±2) °C (8 h黑暗),相对湿度为65%。

1.2 辣椒*SEP*基因的鉴定

从ST-8樟树港辣椒基因组数据库(<http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/pepper/search>)、拟南芥基因组数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)、茄科基因组数据库(<https://solgenomics.net/>)、粳稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)和NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中鉴定并获得辣椒、番茄、拟南

芥、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)的SEP亚家族蛋白序列。与此同时,将辣椒SEP基因序列与拟南芥基因组数据库进行比对,得到拟南芥中同源性最高的SEP基因及其完整序列信息。利用在线工具ExPASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析辣椒SEP亚家族蛋白的相对分子质量、等电点和氨基酸序列长度等理化性质信息。

从ST-8樟树港辣椒基因组数据库中提取SEP基因的染色体定位数据和完整基因序列信息,分别将数据提交到在线工具mg2c(http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)和GSDS 2.0(<https://gsds.gao-lab.org/>),绘制染色体定位图和基因结构可视化图谱。

1.3 辣椒SEP基因的系统进化分析

将鉴定得到的辣椒、番茄、拟南芥、水稻和玉米SEP基因序列输入MEGA 11.0软件,选择Clustal W程序进行多序列比对,采用邻接法(NJ),选择Bootstrap值为1 000次,构建系统发育进化树。

1.4 辣椒SEP蛋白的结构分析

将辣椒SEP蛋白信息分别提交到在线工具MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme/>)与CD-Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>),获得编码蛋白的保守基序及保守结构域预测结果。将预测结果输入TBtools软件,进行可视化处理。

1.5 *CaSEP3* 基因克隆

在樟树港辣椒基因组数据库中检索获得辣椒*CaSEP3*基因的编码序列(CDS),设计扩增引物对*CaSEP3*-kz-F/R(表1)。以樟树港辣椒花朵cDNA为模板进行PCR扩增。利用1%琼脂糖凝胶电泳纯化扩增产物并回收目的条带,将其连接至Blunt基因克隆载体,转化至大肠埃希菌感受态细胞DH5 α 。次日选取大肠埃希菌单克隆进行菌液PCR,将阳性克隆送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

表1 引物序列

Table 1 List of PCR primers

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
<i>CaSEP3</i> -kz-F	ATGGGAAGGGGTAGGGTT	扩增
<i>CaSEP3</i> -kz-R	TCAAGGCAACCAGCCAG	扩增
<i>CaSEP3</i> -qRT-F	ATCCACACGAGAAGCACTGG	定量
<i>CaSEP3</i> -qRT-R	TCTGTGATCGCTGTAGTGCC	定量
<i>CaUBI3</i> -F	TGTCCATCTGCTCTCTGTTG	内参
<i>CaUBI3</i> -R	CACCCCAAGCACAATAAGAC	内参
<i>CaSEP3</i> -eGFP-F	CAAATCGACTCTAGAAAGCTTATGGGAAGGGGTAGG	亚细胞定位
<i>CaSEP3</i> -eGFP-R	GCCCTTGCTCACCATGGTACCAGCAACCAGCCAG	亚细胞定位

1.6 *CaSEP3* 蛋白亚细胞定位

构建35S::*CaSEP3*::sGFP重组质粒,将35S::sGFP空载体和重组质粒分别转化至农杆菌感受态GV3101,将菌液涂布于YEP(Kan + Rif)固体培养基上,于28 °C暗培养2 d。挑取农杆菌单菌落进行菌液PCR,保存含有目的质粒的农杆菌(菌液与50%甘油的体积比为1 : 1)。取100 μ l农杆菌液至20 mL YEP(Kan + Rif)液体培养基中,于28 °C振荡培养过夜,使吸光度(OD₆₀₀)为1.0~1.5,离心收集菌体(5 000 r·min⁻¹, 5 min),弃上清。配制100 mL农杆菌悬浮液(含有200 μ mol·L⁻¹乙酰丁香酮、10 mmol·L⁻¹ MES、10 mmol·L⁻¹ MgSO₄),重悬菌液至OD₆₀₀为0.8~1.0,然后在26 °C黑暗环境中静置2~3 h。用一次性无菌注射器将重悬液注射至红核烟草叶片下

表皮,移回温室中黑暗处理24 h,继续生长3 d,用激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国)观察荧光蛋白的亚细胞定位。

1.7 *CaSEP3* 基因表达分析

于樟树港辣椒的花蕾期(出现4~7个花蕾)取花蕾、根、茎、叶,将所取样品迅速放入液氮中冷冻,利用Easstep® Super总RNA提取试剂盒(普洛麦格(北京)生物技术有限公司)提取总RNA,用Evo M-MLV反转录试剂盒(杭州艾科瑞生物技术有限公司)反转录得到第一链cDNA。在NCBI的Blast Primer工具中设计实时荧光定量试验引物*CaSEP3*-qRT-F/R(表1),使用*CaUBI3*作为内参基因,qRT-PCR实验的反应体系和扩增程序参见SYBR premix Ex Taq试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)说明

书。从辣椒基因组信息数据库Pepper Hub(<http://pepperhub.hzau.edu.cn/pegnm/>)中获取花蕾发育不同时期、花器官不同部位、果实不同部位、植物激素(脱落酸、赤霉素、生长素、茉莉酸、水杨酸)及非生物胁迫(低温、过氧化氢、高温、甘露醇、氯化钠)处理后的*CaSEP3*转录组数据,利用GraphPad Prism 10.1.2绘制柱状图和热图。

2 结果与分析

2.1 辣椒SEP基因基本信息

从樟树港辣椒基因组数据库中筛选得到6个

表2 辣椒SEP蛋白编码基因的基本信息

基因名称	基因组登录号	氨基酸序列长度/aa	编码区序列长度/bp	蛋白相对分子质量/kDa	等电点	拟南芥同源基因		<i>E</i>
						登录号	名称	
<i>CaSEP1</i>	Caz05g10030	179	540	20.73	9.46	AT5G15800	<i>SEP1</i>	2×10^{-82}
<i>CaSEP2</i>	Caz02g28830	233	702	26.81	7.65	AT3G02310	<i>SEP2</i>	4×10^{-91}
<i>CaSEP3</i>	Caz11g10400	241	726	27.57	8.82	AT1G24260	<i>SEP3</i>	1×10^{-117}
<i>CaSEP4</i>	Caz09g19480	240	723	27.62	7.78	AT2G03710	<i>SEP4</i>	9×10^{-88}
<i>CaSEP5</i>	Caz11g18780	243	732	27.95	7.06	AT5G15800	<i>SEP1</i>	9×10^{-91}
<i>CaSEP6</i>	Caz03g08290	245	738	28.22	8.94	AT2G03710	<i>SEP4</i>	3×10^{-87}

注:*E*是指在随机情况下,其他序列与拟南芥SEP基因的相似度大于当前比对结果的可能性;*E*越低,比对结果越可靠。

2.2 辣椒SEP基因的染色体定位

由图1可见:辣椒的6个SEP基因分布在2、3、5、9、11号染色体上。其中,11号染色体上分布着2个SEP基因,为*CaSEP3*和*CaSEP5*;其余染色体上仅分布1个辣椒SEP基因。*CaSEP2*、*CaSEP4*、*CaSEP5*和*CaSEP6*都分布在染色体的端部,其中,*CaSEP2*在2号染色体170 Mb处,*CaSEP4*在9号染色体264 Mb处,*CaSEP5*在11号染色体256 Mb处,*CaSEP6*则位于3号染色体15 Mb处。*CaSEP1*和*CaSEP3*均分布于染色体的中部,分别位于5号染色体81 Mb处和11号染色体132 Mb处。

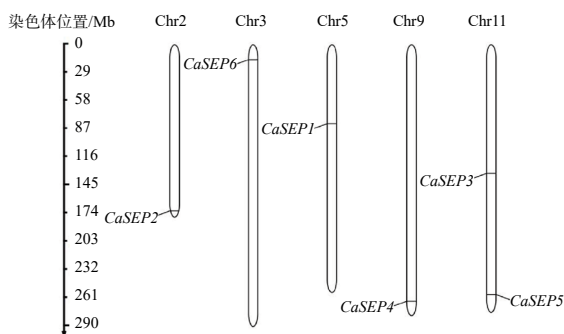


图1 辣椒SEP基因的染色体定位

Fig.1 Chromosomal mapping of SEP genes in pepper

SEP基因,按照其与拟南芥SEP基因的同源情况及*E*进行排列和命名。从表2可见,6个基因的编码区序列长度存在差异,*CaSEP1*的编码区序列长度最小,为540 bp,而*CaSEP6*的最大,为738 bp。辣椒SEP蛋白的理化性质也存在差异。*CaSEP1*~*CaSEP6*蛋白的氨基酸序列长度为179~245 aa,相对分子质量为20.73~28.22 kDa,等电点为7.06~9.46。将6个辣椒SEP基因序列与拟南芥基因组数据库进行比对,获得拟南芥中与辣椒SEP基因同源性最高的基因。

2.3 辣椒SEP基因的系统进化分析结果

拟南芥SEP基因家族的4个成员可划分为2个分支,分别为*SEP1/2/4*和*SEP3*^[12, 15, 23]。为了从系统发育的角度更好地理解辣椒SEP基因与模式植物中同源基因的进化关系,采用邻接法(NJ)构建辣椒、拟南芥、番茄、水稻和玉米的SEP基因的系统发育树,见图2。参照拟南芥SEP基因的分类情况,将系统发育树划分为*SEP1/2/4*和*SEP3*分支。*SEP3*分支含有1个辣椒SEP基因(*CaSEP3*),*SEP1/2/4*分支含有5个基因(*CaSEP1*、*CaSEP2*、*CaSEP4*、*CaSEP5*、*CaSEP6*)。进化树*SEP3*分支含有3对直系同源基因即*CaSEP3/SITM5*、*ZmMADS8/OsMADS8*、*ZmMADS6/OsMADS7*; *SEP1/2/4*分支含有5对直系同源基因*CaSEP2/SITM29*、*CaSEP1/SICMB1*、*CaSEP6/SIMADS1*、*ZmMADS1/OsMADS1*、*ZmMADS5/OsMADS5*。此外,在拟南芥和辣椒中各有1对旁系同源基因,分别为*AtSEP1/AtSEP2*和*CaSEP4/CaSEP5*。

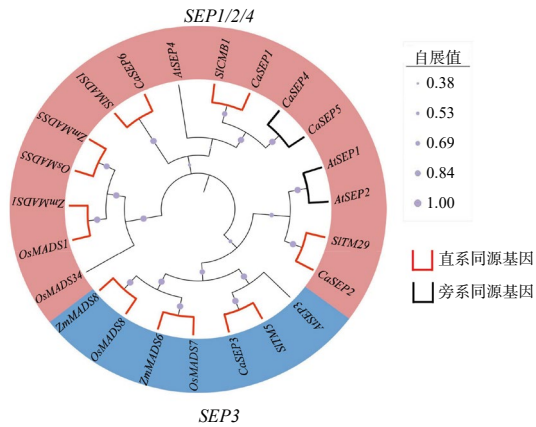


图2 辣椒(Ca)与拟南芥(*At*)、番茄(*Sl*)、水稻(*Os*)、玉米(*Zm*)的SEP基因同源进化关系分析结果

Fig.2 Evolutionary relationship analysis results of SEP genes in pepper, *Arabidopsis*, tomato, rice and maize

2.4 辣椒SEP基因的结构

由图3可见，辣椒6个SEP基因都含有内含子。此外，6个基因的编码区(CDS)数量差异较小，*CaSEP1*和*CaSEP2*含有7个编码区，*CaSEP3*、*CaSEP4*、*CaSEP5*和*CaSEP6*含有8个编码区。除了*CaSEP1*和*CaSEP4*外，其余辣椒SEP基因的5'端与3'端都含有非翻译区(UTR)。 *CaSEP1*~*CaSEP6*基因的结构存在差异，且CDS在基因内的分布位置各不相同；与*CaSEP1*、*CaSEP2*、*CaSEP4*、*CaSEP5*、*CaSEP6*这5个基因相比，*CaSEP3*内含子较长。

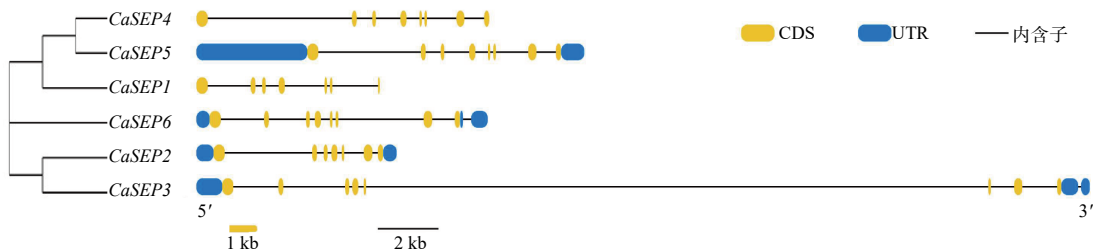


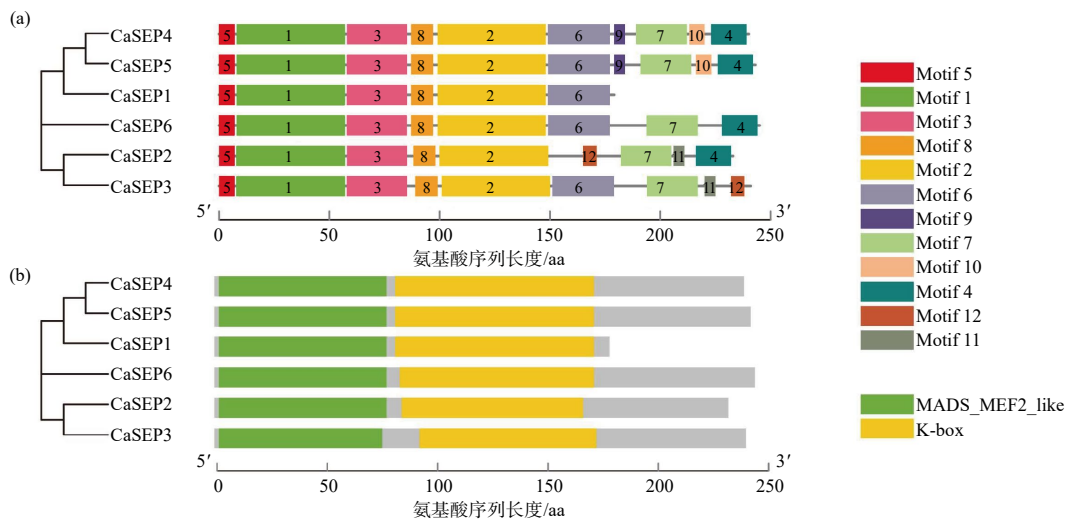
图3 辣椒SEP基因的结构

Fig.3 The gene structure of SEP genes in pepper

2.5 辣椒SEP亚家族蛋白保守基序及结构域预测

辣椒SEP亚家族蛋白的保守基序(Motif)预测结果如图4(a)所示，可见6个SEP蛋白在1~150 aa区间所含保守基序完全一致，在151~250 aa区间存在差

异，保守基序数量及分布位置的差异可能预示着蛋白的不同功能。由图4(a)还可知，*CaSEP1*所含的保守基序最少，为6个；而*CaSEP4*和*CaSEP5*含有的保守基序数量最多，为10个。辣椒SEP亚家族



(a) 辣椒SEP亚家族蛋白保守基序预测；(b) 辣椒SEP亚家族蛋白保守结构域预测

图4 辣椒 SEP亚家族蛋白保守基序及保守结构域分析

Fig.4 Analysis of conserved motifs and conserved domains of SEP subfamily proteins in pepper

蛋白进化树及保守基序预测结果表明,位于同一分支的编码蛋白具有相似的保守基序。例如,CaSEP4和CaSEP5含有10个类型相同的保守基序,且基序分布顺序一致;CaSEP2和CaSEP3在151~250 aa区间的保守基序数量相同,仅有一个基序的类型不同,CaSEP2含有Motif4,CaSEP3含有Motif6。由图4(b)可见,辣椒SEP亚家族蛋白的氨基酸序列具有相似性,都含有MADS-box家族典型的MADS结构域(MADS_MEF2_like)和K结构域(K-box)。2个保守结构域位于1~175 aa,该区间内6个编码蛋白的保守基序相似性高,除了CaSEP2外,其余编码蛋白都依次含有Motif5、Motif1、Motif3、Motif8、Motif2和Motif6。

2.6 CaSEP3的生物信息学分析结果及亚细胞定位结果

在拟南芥中,花器官发育由MADS四聚体决定,而*AtSEP3*作为四聚体形成及发挥作用的重要

介质,在花器官形成过程中起着关键作用^[13]。辣椒CaSEP3为*AtSEP3*的同源蛋白,其亲水性平均系数(GRAVY)为-0.730,可判断其为亲水性蛋白;其不稳定性系数为44.13,属于不稳定蛋白。

以樟树港辣椒花朵cDNA为模板,扩增*CaSEP3*基因,构建35S-GFP-*CaSEP3*融合载体。将携带对照载体(35S::sGFP)和融合载体(35S::*CaSEP3*::sGFP)的农杆菌分别注射至红核烟草下表皮细胞,3 d后剪取叶片制作样品,置于激光共聚焦显微镜下观察*CaSEP3*基因的瞬时表达情况。结果显示(图5),GFP对照组在细胞膜及细胞核中具有绿色荧光信号,细胞核发出红色荧光,将白光通道与2种荧光通道融合后,叶表皮细胞形态清晰可见,细胞核呈黄色。GFP-*CaSEP3*的绿色荧光信号与细胞核自发红色荧光信号重叠,通道融合图中可见黄色信号。亚细胞定位试验结果表明CaSEP3定位于细胞核。

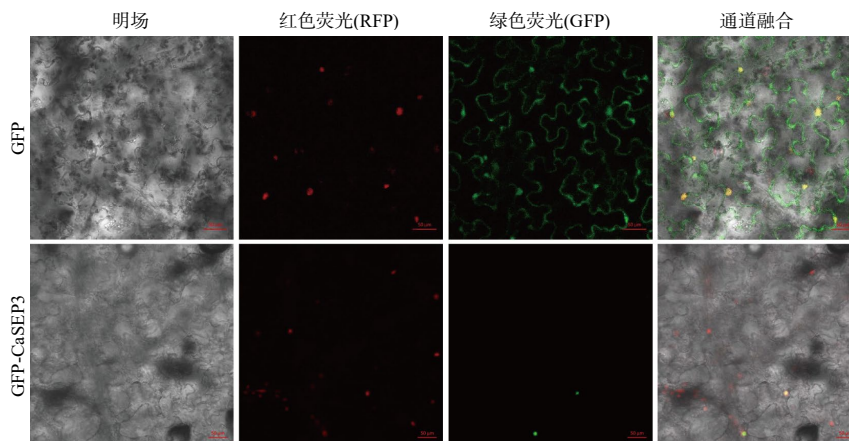


图5 辣椒CaSEP3蛋白的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of CaSEP3 in pepper

2.7 CaSEP3 基因的表达

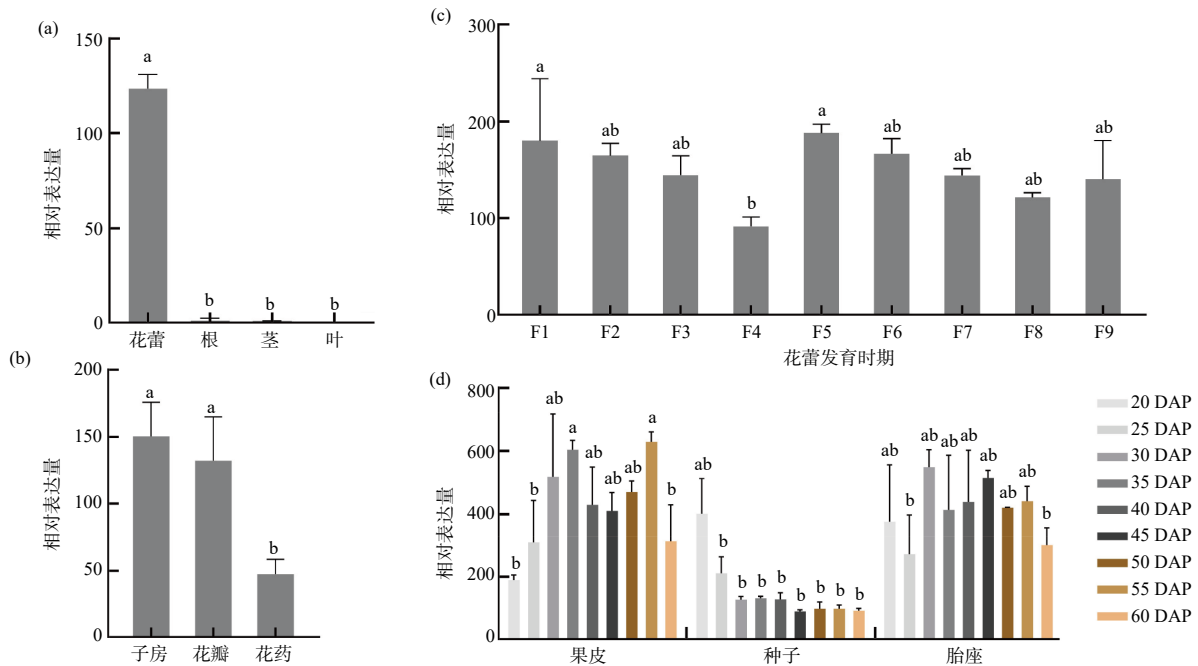
以花蕾期樟树港辣椒的不同器官为材料,采用实时荧光定量试验检测*CaSEP3*基因的表达情况(以相对表达量表征,后续简称表达量)。结果表明,*CaSEP3*在花蕾中的表达量最高,在叶中的表达量最低,且花蕾中的表达量显著高于根、茎、叶的,见图6(a)。辣椒花蕾的生长发育过程可划分为9个时期(F1~F9)^[5],为进一步探究*CaSEP3*在花发育过程中的表达情况,从辣椒组学生物信息平台Pepper Hub中收集*CaSEP3*在F1~F9时期以及花器官不同部位的表达量,见图6(b)。由图6(b)可知,

*CaSEP3*基因在F1~F9时期中均有表达,伴随着花的发育,基因表达量出现先下降后上升然后再下降后上升的趋势。其中,*CaSEP3*在F5时期的表达量最高,F4时期的表达量最低,F1和F5时期的表达量都显著高于F4时期的。花器官不同部位中*CaSEP3*的表达量分析结果表明,*CaSEP3*在子房、花瓣和花药中均有表达,子房和花瓣中*CaSEP3*的表达量显著高于花药的,分别为花药的3.2倍和2.8倍,见图6(c)。

由图6(d)可见,*CaSEP3*在辣椒的种子、果皮和胎座中均有表达,其中,种子内的表达量最

小。授粉后(DAP) 20~60 d, 果皮中*CaSEP3*的表达量持续波动, 在30 DAP和50 DAP达到高峰; 种子中*CaSEP3*的表达量持续下降, 20 DAP的表达量显

著高于其他时期的; 胎座中*CaSEP3*的表达量在30 DAP时达到高峰, 25 DAP和60 DAP时的表达量显著低于其他时期的。



不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

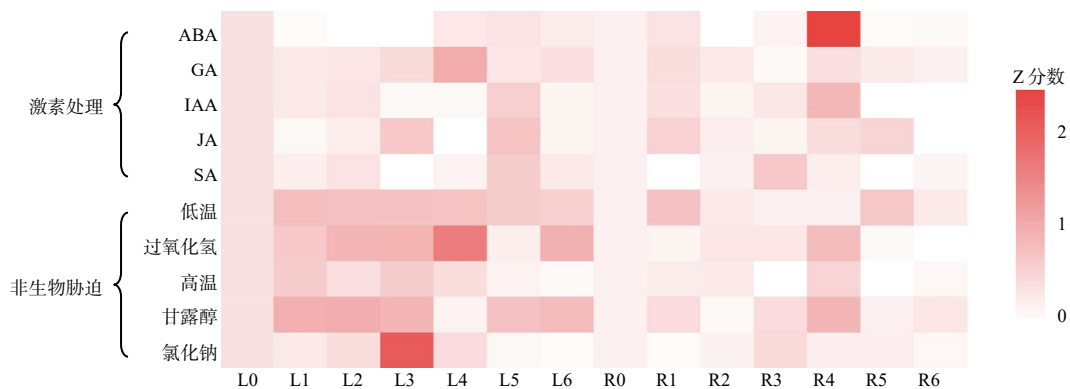
(a) 在花蕾期不同器官中的相对表达量; (b) 在花蕾发育各时期的相对表达量; (c) 在花器官不同部位的相对表达量; (d) 在果实不同部位的相对表达量

图6 辣椒*CaSEP3*在花器官和果实中的表达

Fig.6 Expression of *CaSEP3* in flower and fruit of pepper

激素在植物体器官发育、开花、结实及衰老等方面独立或协同调控各类网络基因的表达, 在植物生长过程中起关键作用^[24-25]。从Pepper Hub中收集脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)、生长素(IAA)、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)处理辣椒后*CaSEP3*的表达数据, 结果见图7。由图7可知, 在5种激素处理

后的6个时间点, *CaSEP3*在辣椒叶片、根部的表达量低, 基因表达量仅在少数时间点出现上调。脱落酸处理后6 h时*CaSEP3*在根部的表达量达到最大值; 随着处理时间的增加, *CaSEP3*在叶片中的表达量呈现先下降后上升的趋势。赤霉素处理后, *CaSEP3*在叶片中的表达量于处理后6 h时出现轻微



L0、L1、L2、L3、L4、L5、L6分别为处理0、1.0、1.5、3.0、6.0、12.0、24.0 h的叶片; R0、R1、R2、R3、R4、R5、R6分别为处理0、1.0、1.5、3.0、6.0、12.0、24.0 h的根。

图7 辣椒*CaSEP3*在激素处理及非生物胁迫下的表达

Fig.7 Expression of *CaSEP3* under hormonal treatment and abiotic stress in pepper

上调。生长素、茉莉酸和水杨酸处理后24 h内, *CaSEP3*的表达量低, 在叶片中呈现先下降后上升再下降的趋势, 根部的表达量在处理3 h或6 h时出现轻微上调。

由图7还可见, Pepper Hub中高温、低温、过氧化氢、甘露醇和氯化钠这5种非生物胁迫处理下(0~24 h), *CaSEP3*在辣椒叶片的表达量出现了轻微上调, 在根部的变化没有明显规律。过氧化氢处理后, *CaSEP3*在叶片的表达量先上升后下降再上升, 叶片和根部的表达量都在6 h时达到最大值。*CaSEP3*对低温胁迫无明显响应, 而高温胁迫下*CaSEP3*在叶片的表达量呈现下降趋势, 处理6 h时根部的表达量达到最大值。甘露醇处理后, *CaSEP3*在叶片的表达量出现了2次轻微上调, 处理6 h时根部的表达量达到最大值。盐胁迫下*CaSEP3*在叶片的表达量于3 h时达到峰值, 而其在根部的变化不明显。

3 结论与讨论

*SEPALLATA (SEP)*基因参与植物多种器官的发育, 在花和种子中高表达^[12, 26-27]。由于*SEP*基因在花器官形成过程中发挥重要作用, 该基因家族在许多观赏植物中被鉴定出来, 如亨利兜兰(*Paphiopedilum henryanum*)^[28]、莲花(*Nelumbo nucifera*)^[29]、万寿菊(*Tagetes erecta*)^[30]和梅花(*Prunus mume*)^[31]等。本研究从樟树港辣椒基因组中鉴定得到6个*SEP*基因, 其编码的蛋白含有相同的保守结构域, 但保守基序的类型和数量存在差异, 这些特点可能预示着辣椒*SEP*基因共同参与辣椒特定器官的发育, 但功能有所不同。*SEP*亚家族作为MADS-box转录因子的一个分支, 其氨基酸序列具有一定的保守性; 拟南芥、番茄、水稻和玉米的*SEP*基因系统发育树划分为*SEP3*和*SEP1/2/4*分支。*CaSEP1*、*CaSEP2*、*CaSEP3*和*CaSEP6*都含有1个番茄直系同源基因, 可能与二者同属茄科有关。

*SEP3*基因在MADS四聚体形成时承担桥梁作用, 其转录本在花发育过程中积累, 调控各轮花器官的分化与发育^[32]。本研究中, qRT-PCR定量实验结果表明, *CaSEP3*在花蕾中的表达量显著高于根、茎、叶的。分析转录组数据(收集自Pepper Hub)后发现, *CaSEP3*在子房、花瓣、花药以及花

蕾发育F1~F9时期均有表达。其中, 子房和花瓣中的表达量显著高于花药的, 花蕾发育过程中*CaSEP3*的表达量呈现先下降后上升然后再下降后上升的趋势。总而言之, *CaSEP3*在花蕾发育过程中持续表达, 而且在生殖器官的表达量显著高于营养器官的。前人研究表明, 抑制*AtSEP3*的表达会导致花中产生多层萼片或叶状结构, 花序分生组织无限生长^[16]。*CaSEP3*是*AtSEP3*的同源蛋白, 推测其在辣椒花蕾发育过程中影响花序分生组织活性, 调控花器官各部位的发育方向。此外, *SEP*基因影响子房的发育与果实成熟^[33-34]。拟南芥的果实为荚果, 而辣椒具有肉质果实, 本研究发现*CaSEP3*在种子、果皮和胎座中均有表达, 因此, *CaSEP3*可能参与调控辣椒果实的生长。

激素在植物的生长发育过程中发挥重要作用, 赤霉素、细胞分裂素和生长素等激素都参与调节花器官的形成^[35]。植物激素在调控花器官发育时并非独立发挥作用, 2种或多种激素通过复杂的相互作用参与花序分生组织的分化及花器官各部位的形成^[36]。在拟南芥中, *AtSEP3*整合生长素、赤霉素和油菜素甾醇途径, 靶向调控激素合成或运输途径的相关基因, 从而影响花器官特征基因的转录^[37]。在本研究中, ABA处理后(0~24 h), *CaSEP3*的表达量上升, 而GA、IAA、JA和SA处理后, *CaSEP3*的表达量低且未见明显变化, 推测*CaSEP3*可能在24 h后响应激素调节, 位于相关信号通路的下游。

MADS-box转录因子参与调节植物的生殖及营养器官发育, 在非生物胁迫响应中也发挥着关键作用^[38]。例如, 番茄*SIMBPI1*基因正调控植株耐盐性, 过表达该基因能维持番茄在盐胁迫下的水分及叶绿素含量^[39]。学者们在辣椒中也发现了一个正调控低温、盐及渗透胁迫的MADS-box转录因子, 其表达受脱落酸和水杨酸诱导^[40]。在本研究中, *CaSEP3*对低温、高温等非生物胁迫无响应, 而过氧化氢和氯化钠溶液处理后, *CaSEP3*在叶片中的表达量出现轻微上调, 推测*CaSEP3*不直接参与非生物胁迫响应, 可能在后期影响花、果实等器官的发育。

参考文献:

- [1] Ó'MAOILÉIDIGH D S, GRACIET E, WELLMER F.

- Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development[J]. *New Phytologist*, 2014, 201(1): 16–30.
- [2] LOHMANN J U, WEIGEL D. Building beauty: the genetic control of floral patterning[J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(2): 135–142.
- [3] PELAZ S, TAPIA-LÓPEZ R, ALVAREZ-BUYLLA E R, et al. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*[J]. *Current Biology*, 2001, 11(3): 182–184.
- [4] THEIßEN G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(1): 75–85.
- [5] TANG B Q, YANG H P, ZHANG X H, et al. A global view of transcriptome dynamics during flower development in *Capsicum annuum* L.[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2023, 9(5): 999–1012.
- [6] KRIZEK B A, FLETCHER J C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide[J]. *Nature Reviews. Genetics*, 2005, 6(9): 688–698.
- [7] CAUSIER B, SCHWARZ-SOMMER Z, DAVIES B. Floral organ identity: 20 years of ABCs[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(1): 73–79.
- [8] SMACZNIAK C, IMMINK R G H, ANGENENT G C, et al. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies[J]. *Development*, 2012, 139(17): 3081–3098.
- [9] LILJEGREN S J, DITTA G S, ESHED Y, et al. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2000, 404(6779): 766–770.
- [10] GUO X H, CHEN G P, NAEEM M, et al. The MADS-box gene *SIMBP11* regulates plant architecture and affects reproductive development in tomato plants[J]. *Plant Science*, 2017, 258: 90–101.
- [11] 杨光彬, 王瑾, 陈恺琳, 等. 辣椒MADS-box基因家族的鉴定及表达分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(5): 558–566.
- [12] 刘泓畅, 马恩慧, 王翠玲, 等. 玉米MADS-box基因家族的鉴定及表达模式分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2024, 50(6): 10–21.
- [13] IMMINK R G H, TONACO I A N, DE FOLTER S, et al. *SEPALLATA3*: the ‘glue’ for MADS box transcription factor complex formation[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(2): R24.
- [14] PU Z Q, XU Z Q. Functions of the E-class floral homeotic genes in several common dicotyledons[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022, 41(2): 524–534.
- [15] ZAHN L M, KONG H Z, LEEBENS-MACK J H, et al. The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes: a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history[J]. *Genetics*, 2005, 169(4): 2209–2223.
- [16] PELAZ S, DITTA G S, BAUMANN E, et al. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes[J]. *Nature*, 2000, 405(6783): 200–203.
- [17] SHITSUKAWA N, TAHIRA C, KASSAI K I, et al. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(6): 1723–1737.
- [18] DITTA G, PINYOPICH A, ROBLES P, et al. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity[J]. *Current Biology*, 2004, 14(21): 1935–1940.
- [19] LAN J Q, WANG N, WANG Y T, et al. *Arabidopsis* TCP4 transcription factor inhibits high temperature-induced homeotic conversion of ovules[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5673.
- [20] HE S C, MIN Y C, LIU Z J, et al. Antagonistic MADS-box transcription factors *SEEDSTICK* and *SEPALLATA3* form a transcriptional regulatory network that regulates seed oil accumulation[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(1): 121–142.
- [21] LILAC P N U E L I D H. The *TM5* MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(2): 175–186.
- [22] 邹学校, 朱凡. 辣椒传入中国的途径与传播路径[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 46(6): 629–640.
- [23] THEIßEN G, KIM J T, SAEDLER H. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 43(5): 484–516.
- [24] YANG D L, YANG Y N, HE Z H. Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(3): 675–685.
- [25] 杨博智, 周书栋, 杨莉颖, 等. 辣椒矮秆突变体的表型及其对外源激素的响应[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2017, 43(5): 518–523.
- [26] MA Y Q, PU Z Q, TAN X M, et al. *SEPALLATA*-like genes of *Isatis indigotica* can affect the architecture of the inflorescences and the development of the floral organs[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13034.

- [27] ZHANG S L, YAO J, WANG L, et al. Role of grapevine *SEPALLATA*-related MADS-box gene *VvMADS39* in flower and ovule development[J]. *The Plant Journal*, 2022, 111(6): 1565–1579.
- [28] CHENG H, XIE X L, REN M Z, et al. Characterization of three *SEPALLATA*-like MADS-box genes associated with floral development in *Paphiopedilum henryanum* (Orchidaceae)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 916081.
- [29] LIN Z Y, CAO D D, DAMARIS R N, et al. Genome-wide identification of MADS-box gene family in sacred Lotus (*Nelumbo nucifera*) identifies a *SEPALLATA* homolog gene involved in floral development[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 497.
- [30] ZHANG C L, WEI L D, YU X M, et al. Functional conservation and divergence of *SEPALLATA*-like genes in the development of two-type florets in marigold[J]. *Plant Science*, 2021, 309: 110938.
- [31] ZHOU Y Z, XU Z D, YONG X, et al. SEP-class genes in *Prunus mume* and their likely role in floral organ development[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 10.
- [32] IMMINK R G H, KAUFMANN K, ANGENENT G C. The ‘ABC’ of MADS domain protein behaviour and interactions[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(1): 87–93.
- [33] AMPOMAH-DWAMENA C, MORRIS B A, SUTHERLAND P, et al. Down-regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(2): 605–617.
- [34] DONG T T, CHEN G P, TIAN S B, et al. A non-climacteric fruit gene CaMADS-RIN regulates fruit ripening and ethylene biosynthesis in climacteric fruit[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95559.
- [35] CHANDLER J W. The hormonal regulation of flower development[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2011, 30(2): 242–254.
- [36] ZÚÑIGA-MAYO V M, DURÁN-MEDINA Y, MARSCH-MARTÍNEZ N, et al. Hormones and flower development in *Arabidopsis*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2686: 111–127.
- [37] KAUFMANN K, MUIÑO J M, JAUREGUI R, et al. Target genes of the MADS transcription factor *SEPALLATA3* integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower[J]. *PLoS Biology*, 2009, 7(4): e1000090.
- [38] DONG X M, DENG H, MA W X, et al. Genome-wide identification of the MADS-box transcription factor family in autotetraploid cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) and expression analysis under abiotic stress[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 603.
- [39] GUO X H, CHEN G P, CUI B L, et al. *Solanum lycopersicum* agamous-like MADS-box protein AGL15-like gene, *SIMBP11*, confers salt stress tolerance[J]. *Molecular Breeding*, 2016, 36(9): 125.
- [40] CHEN R G, MA J H, LUO D, et al. CaMADS, a MADS-box transcription factor from pepper, plays an important role in the response to cold, salt, and osmotic stress[J]. *Plant Science*, 2019, 280: 164–174.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 张承平