

· 园艺 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240067



主持人: 朱国鹏

一年生辣椒 *CaMYB44* 基因功能的初步解析

吴书桦^{1,2#}, 刘建成^{1,2}, 宁佳慧^{1,2}, 汪志伟^{1,2*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南省热带园艺作物品质调控重点实验室, 海南 海口 570228 中国;

2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国)

摘要: MYB(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)转录因子家族在植物应对环境胁迫中发挥重要作用。一年生辣椒(*Capsicum annuum*)是辣椒属种植范围最广的一个栽培种。通过分析前期研究得到的转录组数据, 聚焦 *CaMYB44* 转录因子, 并对其基因启动子顺式作用元件、蛋白结构、进化关系、亚细胞定位以及低温响应等进行生物信息学分析与初步实验验证。*CaMYB44* 基因开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)长度为 981 bp, 编码氨基酸为 326 aa, 不稳定的亲水性蛋白。经预测, *CaMYB44* 蛋白上无信号肽以及跨膜结构域为非分泌蛋白, 属于 R2R3 型 MYB。系统发育树分析结果显示, *CaMYB44* 基因与 *SmMYB73*、*NtMYB44-like*、*StMYB44-like* 和 *SlMYB44* 同源性较高, 其次为 *AtMYB70*、*OsMYB77*。顺式作用元件分析结果显示, *CaMYB44* 基因启动子区包含 1 个低温响应元件以及多个脱落酸和光响应元件。亚细胞定位结果表明 *CaMYB44* 定位于细胞核。实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)结果显示, *CaMYB44* 的表达量在 4 °C 低温胁迫 24 h 后下调, 与其他低温胁迫负调控因子在处理下的表达趋势相似。研究结果为进一步解析一年生辣椒中耐低温胁迫转录因子提供了基础数据。

关键词: 一年生辣椒; *CaMYB44*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S641.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)03-0442-09

吴书桦, 刘建成, 宁佳慧, 等. 一年生辣椒 *CaMYB44* 基因功能的初步解析 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(3):

442-450. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240067

据考证, 辣椒有着六千多年的栽培史^[1], 于四百多年前被传入中国^[2], 其从观赏植物开始发展至今, 已在人们的饮食生活中占据重要地位, 并在医用、工业等方面也被广泛应用。辣椒五大栽培种之一的一年生辣椒(*Capsicum annuum*)有着最长的栽培历史, 是分化最多、栽培最广的一个种^[3]。然而低温限制了植物的地理分布, 并显著降低作物产量^[4]。在低温胁迫下, 植物膜平衡被打破, 细胞膜透性提高, 钙离子从外界进入细胞质, 导致内部代谢失衡, 活性氧自由基大量累积, 叶绿体等结构遭破坏^[5-7]。辣椒适宜栽培温度 15~34 °C, 对低温敏感, 在低温胁迫下, 辣椒生长发育缓慢, 种子萌发时间延长, 种子发芽率下降, 茎径、叶片

增速减缓并降低产量和质量等^[8-10]。已有研究发现 MYB(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)作为植物中一大转录因子家族, 对植株在低温环境下的耐受能力有着重要的调控作用^[11-13]。但目前对于提高辣椒耐低温胁迫能力的研究大多通过外源物的施加, 在 MYB 转录因子调控辣椒耐低温能力方面的研究较少^[14-16]。故根据团队前期比较组学结果, 本研究从响应胁迫的 MYB 转录因子中, 克隆出 *CaMYB44* 基因, 并通过生物信息学分析, 运用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术, 检测低温胁迫前后辣椒叶片中 *CaMYB44* 表

收稿日期: 2024-04-17

修回日期: 2024-06-27

基金项目: 海南省科技专项基金项目(ZDYF2023XDNY028); 海南大学南繁与高效热带农业协同创新中心项目(XTCX2022NYB03)

*第一作者: 吴书桦(1999—), 女, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 21210902000015@hainanu.edu.cn

*通信作者: 汪志伟(1978—), 男, 教授。研究方向: 蔬菜分子生物学及种质创新。E-mail: wangzhiwei@hainanu.edu.cn

达情况,为后续进一步探索该转录因子调控功能提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验材料为本团队保存的辣椒种质 HNUCA54,该种质在强日照下,植株出现生长停滞、新叶枯死等现象,大田栽培期间,对肥害、缺素敏感性高,植株萎焉,叶片发黄,较其他种质表现出更低的耐受性。植株种植于海南大学实验基地 1 号大棚(20°3'38"N,110°19'8"E)。亚细胞定位所用材料为本氏烟草,种植于海南大学园艺学院植物培养室,光周期 16 h/8 h。RNA 提取所采用材料为辣椒植株嫩叶片,用液氮研磨后,使用诺唯赞 RNA 提取试剂盒(编号 RC411-01),进行 RNA 提取,存于-80℃。用诺唯赞 cDNA 反转录试剂盒(编号 R312-02),反转录 RNA,并将所得 cDNA 于-20℃存储备用。

1.2 *CaMYB44* 的克隆 结合团队先前保存的辣椒转录组数据^[17],参考一年生辣椒基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/4072/>)^[18],根据目标基因 ID 号(XM_016713322.2),下载相应序列信息。利用 Primer5.0 软件设计基因全长克隆引物: *CaMYB44*-F, 5'-ATGGCGGCGAGGAAAGAT-3', *CaMYB44*-R, 5'-TCACTCAATTTTGCTGATTCC-3'。以 HNUCA54 叶片 cDNA 为模板,使用 2×Phanta®Max Master Mix 酶 PCR 扩增序列全长,凝胶电泳后切取正确条带,用诺唯赞的产物纯化试剂盒(编号 DC301-01)回收 PCR 产物,连接 TA 克隆载体,转化感受态大肠杆菌 DH5α。挑取单菌落进行菌液 PCR 检测,将条带正确且明亮的菌株送海南楠山生物技术有限公司进行测序分析。

1.3 *CaMYB44* 的生物信息学分析 使用 ProtParam 软件进行蛋白理化性质分析,使用 SignalP、SOPMA、PONDR、TMHMM、Swiss-model 等在线网页分析蛋白结构特征。使用 DNAMAN、TBtools、Notepad 和 MEGAX 等软件用于多序列比对、蛋白质翻译以及系统发育树构建等数据分析工作。

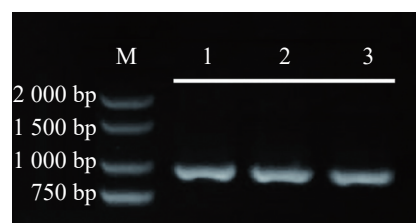
1.4 *CaMYB44* 蛋白的亚细胞定位 使用 cNLS Mapper 在线网页对 *CaMYB44* 蛋白预测其定位结果,并实验验证。从 pCambia1300 载体选取酶切位点(*Sal*I 和 *Kpn*I)结合基因序列设计同源臂引物: *CaMYB44*-F, 5'-gttgatacatatgccctgcacATG

GCGGCGAGGAAAGAT-3', *CaMYB44*-R, 5'-gctcacatggatccggtaccCTCAATTTTGCTGATTCC-3'。利用同源重组技术构建 pCambia1300-*CaMYB44*-GFP 荧光表达载体,经转化感受态大肠杆菌 DH5α,并测序正确后,转入感受态农杆菌 GV3101 中,用注射针头侵染已生长 5 周的烟草叶片背面,放置于 24℃ 黑暗环境 2~3 d,利用激光扫描共聚焦显微镜观察植物叶片背面荧光情况。

1.5 实时荧光定量反转录 PCR 使用软件 Primer5.0 从目标基因序列中选取 200 bp 左右特异片段设计引物: *CaMYB44*-qF, 5'-TTCGGGTCTGGA TCTCCCTC-3'; *CaMYB44*-qR, 5'-GTCGGGTACAG ATGGAGCAG-3'。内参基因(登录号 AY486137.1)引物: *Actin*-qF, 5'-G-CTGGAGGTGTATTTTGGT-3'; *Actin*-qR, 5'-ATTTC-TGGTACGAGCGGAT-3'。采集辣椒植株在 4℃ 处理前,以及 4℃ 处理 24、48、72 h 后的叶片,每个时期设置 3 个生物学重复。提取各时期叶片 RNA 反转录为 cDNA,并以各时期 cDNA 为模板,设置 3 个技术性重复,进行 RT-qPCR 检测,本研究选用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析实验数据。

2 结果与分析

2.1 *CaMYB44* 基因的克隆 根据基因 ID,从 NCBI 官网(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_016713322.2/)下载目标基因 CDS 序列(981 bp),设计引物对 *CaMYB44*-F 和 *CaMYB44*-R,反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)后,琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),回收目的条带,利用 TA 载体进行克隆,转化大肠杆菌,阳性单克隆序列测序结果分析,HNUCA54 中的 *CaMYB44* cDNA 与 NCBI 中参考序列信息一致(图 2),提示 *CaMYB44* 基因种内保守性强。



M: DL2000; 1~3: *CaMYB44*。

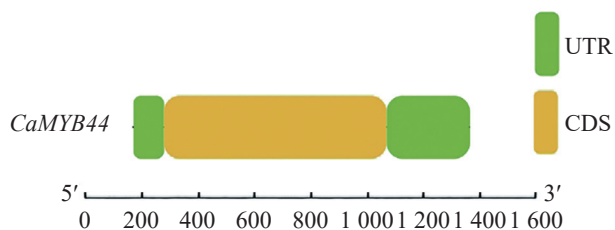
图 1 辣椒 *CaMYB44* 基因全长的 PCR 扩增图
Fig. 1 The PCR amplification of the full length of *CaMYB44* gene in pepper

MYB44_序列	ATGGCGCGGAGGAAAGATTTCGGATCGGATCAAAGTCCATGGAGCCCGAAGAAGATGAGCTGTTACAGTCGTTAGTGGAAAAACACGGGCGAGGAAT	99
MYB44_克隆测序序列	ATGGCGCGGAGGAAAGATTTCGGATCGGATCAAAGTCCATGGAGCCCGAAGAAGATGAGCTGTTACAGTCGTTAGTGGAAAAACACGGGCGAGGAAT	99
Consensus	atggcgcgagggaagatttggatcggaatcaaaagtcctatggagcccggaagaagatgagctgttacagtcgttagtggaaaaacacgggcgaggaaat	
MYB44_序列	TGGACTTTGATAAGCAATTCGGTTCGGGTCGATCCGGAATAATCGTGCAGGCTCCGATGGTGTAAACAGCTTTCACCACAAGTGGAGCAGCGTGCCTTC	198
MYB44_克隆测序序列	TGGACTTTGATAAGCAATTCGGTTCGGGTCGATCCGGAATAATCGTGCAGGCTCCGATGGTGTAAACAGCTTTCACCACAAGTGGAGCAGCGTGCCTTC	198
Consensus	tggactttgatagaacaaatcggttcgggtcgatccggaaataatcggtgcaggctccgatgggtgttaaacagctttaccacaaagtggagcaccgtgccttc	
MYB44_序列	ACACCTGAAGAAAGATGAAACGATTATTCGGGCTCATGCGAAGTTTGGTAACAATGGCGGACGATAGCCCGTTTGTATCGGGTCGGACTGATAACCGG	297
MYB44_克隆测序序列	ACACCTGAAGAAAGATGAAACGATTATTCGGGCTCATGCGAAGTTTGGTAACAATGGCGGACGATAGCCCGTTTGTATCGGGTCGGACTGATAACCGG	297
Consensus	acacctgaagaagatgaaacgattatcgggctcatgcgaagtttggtaacaaatggcgacgatagcccgtttgtatcggttcggactgataacggc	
MYB44_序列	ATTAGAACCATTGGAATTTCTACTCTTAAACGTAAGTGTCTTCTATGCTCTGAAGATTTAAGCTTTGATAATCTCTCAACCACCTTTGAAAAGATCGGCT	396
MYB44_克隆测序序列	ATTAGAACCATTGGAATTTCTACTCTTAAACGTAAGTGTCTTCTATGCTCTGAAGATTTAAGCTTTGATAATCTCTCAACCACCTTTGAAAAGATCGGCT	396
Consensus	attagaaccatttggaatttctactctttaaactgaagtgtcttctatgctctgaagatttaagctttgataatctctcaaccacctttgaaaagatcggt	
MYB44_序列	AGTGTTCGGCCGAGTATGATGAATCCGGCTAGTCTCTTGGATCCGACTTGAGTGATTCGGGCTTTTCGGGTCGGGTCGGGTCGGATCTCCCTCAA	495
MYB44_克隆测序序列	AGTGTTCGGCCGAGTATGATGAATCCGGCTAGTCTCTTGGATCCGACTTGAGTGATTCGGGCTTTTCGGGTCGGGTCGGGTCGGATCTCCCTCAA	495
Consensus	agtgttggcccgagtatgatgaatccggctagtccttctggatccgacttgagtgttcgggcttttcgggttcgggttcgggttcggatctccctcaa	
MYB44_序列	CCTCTTGTGTTATCGTCTGTTCCTCGTACCGGCTGATTTTCCCTCTCCCTCTACTCTGCTCCATCTGTACCCGACCCGCCACTTCTCTATCCCTT	594
MYB44_克隆测序序列	CCTCTTGTGTTATCGTCTGTTCCTCGTACCGGCTGATTTTCCCTCTCCCTCTACTCTGCTCCATCTGTACCCGACCCGCCACTTCTCTATCCCTT	594
Consensus	cctcttgttattatcgctgttccctcgtagtcctcgtagtccttctgtagtccttctgtagtccttctgtagtccttctgtagtccttctgtagtcctt	
MYB44_序列	TCTCTACCCGGCTCAGTATCCGTACCCGGATCCGGATCATTTGAAAAGCCAAGACAGTCCCTCAAAACACCACCCTACCACCACCCAGCCTCCTCT	693
MYB44_克隆测序序列	TCTCTACCCGGCTCAGTATCCGTACCCGGATCCGGATCATTTGAAAAGCCAAGACAGTCCCTCAAAACACCACCCTACCACCACCCAGCCTCCTCT	693
Consensus	tctctaccggctcagtatccgtaccggatccggatcatttgaaaagccaagacagtcctcaaaacaccaccctaccaccacccagcctcctct	
MYB44_序列	TTTGGCGCGGTTGAAAAGCCAATTCACCACCTGTACCGGTACTTCTCTTACCCGCGCTTTTCATGGCCAGGTCCTCAAAACCCAGCAACAAAGTTAC	792
MYB44_克隆测序序列	TTTGGCGCGGTTGAAAAGCCAATTCACCACCTGTACCGGTACTTCTCTTACCCGCGCTTTTCATGGCCAGGTCCTCAAAACCCAGCAACAAAGTTAC	792
Consensus	tttggcgcggttgaaaagccaattccaccacctgtaccggtagtccttcttaccgctgctttcatggccaggtcctcaaaacccagcaacaaagttac	
MYB44_序列	GAATTTTGTGACCAAAAATCAGGAGAAAAGCAGTTTATTTAGCCACAGAGTTTGTGAGTTCTGCAAGCTATGATAAGAAAGGAAGTGAAGAGTTACATC	891
MYB44_克隆测序序列	GAATTTTGTGACCAAAAATCAGGAGAAAAGCAGTTTATTTAGCCACAGAGTTTGTGAGTTCTGCAAGCTATGATAAGAAAGGAAGTGAAGAGTTACATC	891
Consensus	gaattttgtgacaaaaatcaggagaaaagcagtttatttagccacagagtttgtgagttctgcaagctatgataagaaagggaagtgaagagttacatc	
MYB44_序列	TCTGGGTTTGAAAAAATGGTTTCTGCTGCAAACTGATGCAATTAAGGAATGCAGTAATTAAGCGTATTGGAATCAGCAAAATTCAGTGA	981
MYB44_克隆测序序列	TCTGGGTTTGAAAAAATGGTTTCTGCTGCAAACTGATGCAATTAAGGAATGCAGTAATTAAGCGTATTGGAATCAGCAAAATTCAGTGA	981
Consensus	tctgggtttgaaaaaattggttctgctgcaaaactgatgcaatlaaggaatgcagtaattaagcgatttggaaatcagcaaaattcagtgga	

图2 *CaMYB44* CDS 序列与克隆测序序列比对图Fig. 2 Sequence alignment diagram of *CaMYB44* CDS sequence and sequence of clone sequencing

2.2 *CaMYB44* 基因的特征分析

2.2.1 *CaMYB44* 基因序列分析 在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中下载 *CaMYB44* 参考序列注释信息, cDNA 和基因组序列比对表明, *CaMYB44* 基因无内含子, 且由图 3 可看出基因组序列 1~134 bp 为 5'-UTR 区, 1 116~1 482 bp 为 3'-UTR 区, 共编码 326 个氨基酸(图 4)。使用 ProtParam 软件分析其蛋白的理化性质, 碱性氨基酸残基数多于酸性氨基酸残基数, 为碱性蛋白质; 不稳定系数大于 40, 为不稳定蛋白; 总平均亲水性小于 0 为亲水蛋白(表 1)。

图3 *CaMYB44* 基因结构图Fig. 3 Gene structure of *CaMYB44*

2.2.2 *CaMYB44* 蛋白结构分析 经 SignalP 在线预测, *CaMYB44* 蛋白序列内不含信号肽, 通

过跨膜区分析(TMhMM)对氨基酸序列进行预测, 可见其编码蛋白无跨膜结构, 故 *CaMYB44* 非膜蛋白以及分泌蛋白。使用 SOPMA 在线网页分析 *CaMYB44* 蛋白二级结构, 发现其结构以无规则卷曲为主, 占 59.82%, 剩下 α -螺旋、 β -折叠、延伸链分别占 22.39%、4.60%、13.19%(图 5-A)。PONDR 软件预测的无规则卷曲占比为 59.82%。使用 Swiss-model 在线网页预测其三级结构, 其三级结构图与二级结构的预测相一致(图 5-B)。使用 SMART 在线网页进行保守结构域分析, 可知 *CaMYB44* 转录因子属 R2R3 型 MYB(图 5-C)。

2.3 *CaMYB44* 进化关系分析 使用 TBtools 软件将 *CaMYB44* 氨基酸序列与水稻、番茄、土豆、拟南芥、茄子、烟草和其他辣椒栽培种等基因组进行 blast 比对。从中选出同源性较好的基因, 将其蛋白质序列与 *CaMYB44* 一起制作系统发育树(图 6)。由系统发育树结果可得 *CaMYB44* 与番茄、马铃薯等茄科作物的 *MYB44*、*MYB44-like* 同源关系较近, 处于同一分支, 其次与拟南芥 *MYB70* 以及水稻的 *MYB77* 等同源关系也较好。

2.4 *CaMYB44* 基因的启动子分析 用 TBtools 软件提取 *CaMYB44* 基因上游 2 000 bp 序列, 上传

1 ATGCGCGCGAGGAAAAGATTCGGATCGGATCAAAGGTCCATGGAGCCCCGAAGAAGATGAG
1 M A A R K D S D R I K G P W S P E E D E
61 CTGTTACAGTCGTTAGTGGAAAAACACGGGCCGAGGAATTGGACTTTGATAAGCAAATCG
21 L L Q S L V E K H G P R N W T L I S K S
121 GTTCCGGTTCGATCCGGAAAAATCGTGCAGGCTCCGATGGTGTAAACCAGCTTTCACCACAA
41 V P G R S G K S C R L R W C N Q L S P Q
181 GTGGAGCACCGTGCCTTCACACCTGAAGAAGATGAAACGATTATTCGGGCTCATGCGAAG
61 V E H R A F T P E E D E T I I R A H A K
241 TTTGGTAACAAATGGGCGACGATAGCCCGTTTGTATCGGGTCGGACTGATAACGCGATT
81 F G N K W A T I A R L L S G R T D N A I
301 AAGAACCATTGGAATTCTACTCTTAAACGTAAGTGTCTTCTATGTCTGAAGATTTAAGC
101 K N H W N S T L K R K C P S M S E D L S
361 TTTGATAATCCTCAACCACCTTTGAAAAGATCGGCTAGTGTGGCCCGAGTATGATGAAT
121 F D N P Q P P L K R S A S V G P S M M N
421 CCGGGTAGTCTTCTGGATCCGACTTGAGTGATTTCGGGTCTTCCGGTTCGGGTTCGGGT
141 P G S P S G S D L S D S G L S G S G S G
481 CTGGATCTCCCTCAACCTCTTGTATTATCGTCTGTTCCCGTACCGGCTGTATTTCCCT
161 L D L P Q P L V Y R P V P R T G C I F P
541 CTCCCTCCTACTCTGCTCCATCTGTACCCGACCCGCCACTTCTCTATCCCTTTCTCTA
181 L P P T P A P S V P D P P T S L S L S L
601 CCCGGCTCAGTATCCGTACCCGGATCCGGATCATTTGAAAAGCCAAGACAGTCCCCTCAA
201 P G S V S V P G S G S F E K P R Q S P Q
661 ACACCACCACTACCACCACCGCAGCCTCCTCCTTTGCGGCGGTTGAAAAGCCAATTCCA
221 T P P L P P P Q P P P F A A V E K P I P
721 CCACCTGTACCGTACTTTCTTACCCCGCCTTTCATGGCCAGGTCCCTCAAACCCAG
241 P P V P V L S S T P P F M A Q V P Q T Q
781 CAACAAAGTTACGAATTTTGTGCACCAAAATCAGGAGAAAAGCAGTTTTTTAGCCAGAG
261 Q Q S Y E F C A P K S G E K Q F F S P E
841 TTTTGTGTCAGTTCTGCAAGCTATGATAAGAAAGGAAGTGAAGAGTTACATGTCTGGGTTT
281 F L S V L Q A M I R K E V K S Y M S G F
901 GAAAAAATGGTTTCTGCTGCAAACTGATGCAATAAGGAATGCAGTAATTAAAGCGTATT
301 E K N G F C L Q T D A I R N A V I K R I
961 GGAATCAGCAAAATTGAGTGA
321 G I S K I E *

图 4 *CaMYB44* 基因编码序列及其氨基酸序列
Fig. 4 Coding sequence of *CaMYB44* gene and its amino acid sequence

表 1 *CaMYB44* 蛋白理化性质预测

Tab. 1 Physicochemical properties prediction of *CaMYB44* protein

指标 Index	CaMYB44	指标 Index	CaMYB44
分子式	C ₁₅₇₇ H ₂₄₉₁ N ₄₃₉ O ₄₆₉ S ₁₃	碱性氨基酸残基总数/aa	38
Molecular formula		Total number of basic amino acid residues/aa	
相对分子质量		半衰期/h	30
Relative molecular mass	35 521.57	Half-life period/h	
氨基酸数目/aa	326	不稳定系数	
Number of amino acids/aa		Instability coefficient	68.35
理论PI值		脂肪系数	
Isoelectric point	9.31	Aliphatic index	66.10
酸性氨基酸残基总数/aa	29	总平均亲水性	
Total number of acidic amino acid residues/aa		Total average hydrophobic index	

PlantCARE 在线网页, 预测基因启动子顺式作用元件(表 2)。结果显示, *CaMYB44* 启动子区域含有 22 个参与光响应的元件 22 个, 参与脱落酸响应的元件 8 个, 参与低温响应的 LTR 元件 1 个。

2.5 *CaMYB44* 的亚细胞定位 使用 cNLS Mapper 在线网页对 *CaMYB44* 蛋白进行预测, 发现其存在

核定位信号, 预测该蛋白定位于核中。将 *CaMYB44* 序列用同源重组的方式, 构建荧光表达载体 pCambia1300-MYB44-GFP, 侵染烟草叶片, 激光共聚焦显微镜检测荧光信号, 观察发现 *CaMYB44* 蛋白定位在细胞核, 进一步提示 *CaMYB44* 在细胞核发挥作用(图 7)。

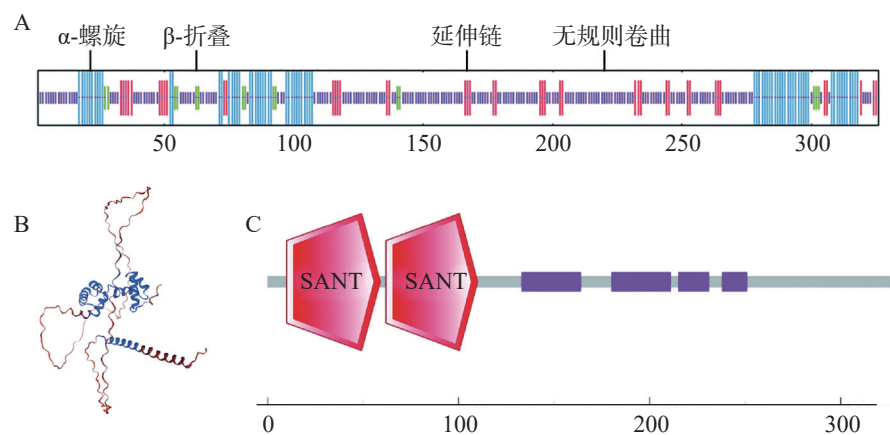


图 5 CaMYB44 蛋白结构及保守结构域预测

Fig. 5 Protein structure and conserved domain prediction of CaMYB44

A.蛋白质二级结构; B.蛋白质三级结构; C.保守结构域。

A. Protein secondary structure; B. Protein tertiary structure; C. Conserved domain.

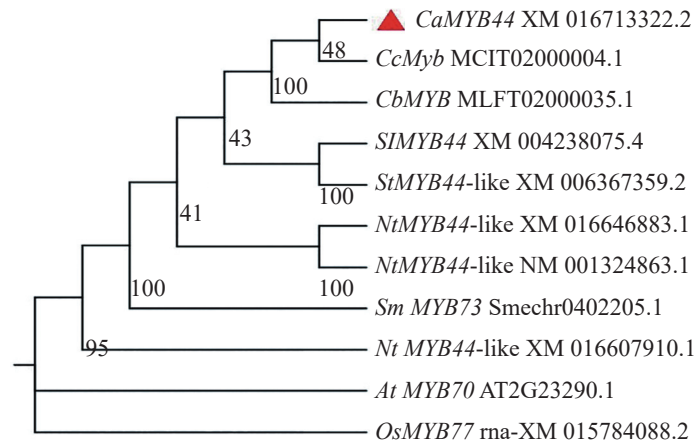


图 6 辣椒 CaMYB44 与其他物种 MYB 转录因子的进化关系

Fig. 6 Evolutionary relationship between CaMYB44 and other MYB transcription factors in pepper

表 2 CaMYB44 启动子顺式作用元件预测

Tab. 2 Prediction of cis-acting elements of CaMYB44 promoter

顺式作用元件 Cis-acting element	序列 Sequence	功能 Function	数量 Quantity
LTR	CCGAAA	参与低温响应 Participate in low temperature response	1
CGTCA-motif	CGTCA	参与茉莉酸甲酯响应 Involved in the response of methyl jasmonate	3
ABRE	ACGTG/CACGTG/GCCGCGTGGC/ CGTACGTGCA/AACCCGG	参与脱落酸响应 Involvement in abscisic acid response	8
TGACG-motif	TGACG	参与茉莉酸甲酯响应 Involved in the response of methyl jasmonate	3
Box 4	ATTAAT	参与光响应的保守DNA模块的一部分 Part of a conserved DNA module involved in light response	5
G-box	TACGTG/CACGTC/CACGAC/CACGTG/ GCCACGTGGA/CACGTT	参与光响应 Participate in light response	7
TCT-motif	TCTTAC	光响应模块的一部分 Part of the light response module	1
TGA-element	AACGAC	参与生长素响应 Involvement in auxin response	1
TCA-element	CCATCTTTTT	参与水杨酸响应 Involved in salicylic acid response	1

续表 2 Tab. 2 Continued

顺式作用元件 Cis-acting element	序列 Sequence	功能 Function	数量 Quantity
AE-box	AGAAACAA	光响应模块的一部分 Part of the Light Response Module	1
ATCT-motif	AATCTAATCC	参与光响应的保守DNA模块的一部分 Part of a conserved DNA module involved in light response	1
MBS	CAACTG	参与干旱诱导的MYB结合位点 MYB binding sites involved in drought induction	1
GATA-motif	GATAGGG/GATAGGA	光响应模块的一部分 Part of the light response module	1
GT1-motif	GGTTAA	参与光响应 Participate in light response	1
ACE	CTAACGTATT	参与光响应的顺式作用元件 cis-acting elements involved in light response	1
ATC-motif	TGCTATCCA	参与光响应的保守DNA模块的一部分 Part of a conserved DNA module involved in light response	1
Box II	CCACGTGGC	光响应元件的一部分 Part of the optical response element	2
MRE	AACCTAA	参与光响应的MYB结合位点 MYB binding sites involved in light response	1

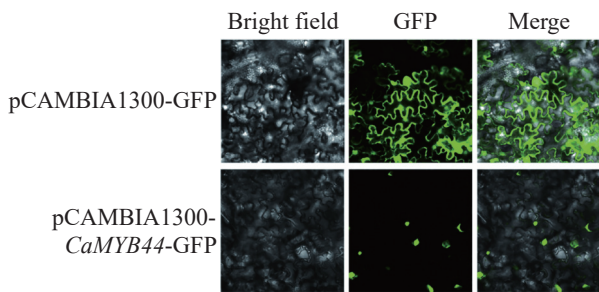


图 7 *CaMYB44* 基因的亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localization of *CaMYB44* gene

2.6 *CaMYB44* 在不同时期的基因表达分析 对 4 ℃ 处理 0、24、48、72 h 的辣椒植株叶片 cDNA 进行 RT-qPCR 分析。可见 *CaMYB44* 在 4 ℃ 低温胁迫处理 24 h 后, 在辣椒叶片中的表达量急剧下调, 后随着处理时间的增加, 表达量呈缓慢上升的趋势(图 8)。

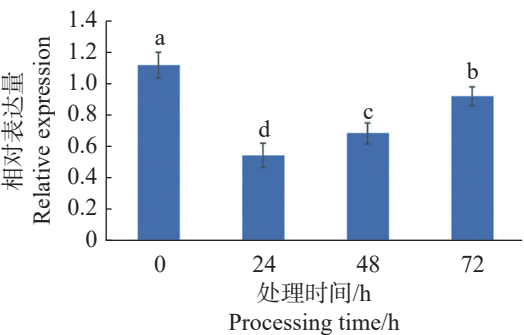


图 8 *CaMYB44* 基因在低温处理下的表达变化

Fig. 8 The expression changes of *CaMYB44* gene under low temperature treatment

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

3 讨论

一年生辣椒在中国栽培广泛, 具有极高的食用价值, 而低温限制了其种植时段和区域, 影响产量和质量。MYB 作为在众多植物中广泛存在的转录因子, 参与植物各种生理、生化过程, 其中包括对逆境胁迫等基因的调控表达。本研究以本团队前期比较组学结果中响应外环境胁迫的大量 MYB 转录因子为基础, 从中克隆了 *CaMYB44* 基因, 其 CDS 序列与 NCBI 所得序列信息一致。通过生物信息学分析, *CaMYB44* 属不稳定亲水性蛋白, 且无信号肽与跨膜结构, 故为非分泌蛋白。经预测发现, *CaMYB44* 蛋白无规则卷曲占 59.82%, 占比较高, 无规则卷曲是蛋白质的柔性连接区域, 允许蛋白质进行必要的动态变化, 并与其他蛋白质、核酸和小分子结合, 调节蛋白功能、控制核膜稳态等, 在细胞功能和调控中发挥重要作用^[19-20]。亚细胞定位结果显示, *CaMYB44* 定位于细胞核中, 在细胞核发挥作用。

通过系统发育树分析 *CaMYB44* 与茄科物种 *MYB44*、*MYB44-like* 存在较高的同源关系, 与拟南芥 *MYB70* 及水稻 *MYB77* 也存在较好的同源关系。有研究发现, 在葡萄中过表达 *MYB44* 基因会使其植株表现出更严重的低温胁迫损伤^[21]。Persak 等^[22] 通过酵母双杂实验, 发现拟南芥应激诱导的 *MYB44* 基因表达与丝裂原活化蛋白激酶进化枝 MPK3 相互作用, 启动对多种非生物和生

物胁迫的适应反应。AtMYB70 与 AtMYB44 共处于 S22 亚族, 在调控功能上可能相类似, Kagale 等^[23]也在转录组分析后推测 AtMYB70 通过负调控参与发育、激素和应激信号转导通路的基因, 在多种生物学功能中发挥关键作用。故本研究团队推测 CaMYB44 转录因子可能同样在辣椒抵抗低温胁迫过程中发挥调控作用。

根据对 CaMYB44 基因启动子预测结果, LTR 元件赋予低温反应基因的低温诱导活性, 冬性甘蓝型油菜冷诱导基因 BN115 低温响应元件 LTRE 的核心五聚体突变, 使得启动子低温调节的丧失^[24]。经预测 CaMYB44 基因启动子区含有 LTR 基序 CCGAAA, 故推测该基因可能对低温胁迫环境产生响应。

从表 2 可见 CaMYB44 基因启动子区域除含 LTR 元件外还含有多个响应脱落酸(ABA)和光的元件。ABA 可刺激植物适应胁迫环境, 使其在生理、分子和发育进程等方面发生改变^[25]。在大豆中, 过表达受 ABA 诱导的 GmZFI 转基因拟南芥, 在低温环境中, 有更好的耐受性^[26]。光照根据时长、亮度以及光质等多方面调控影响着植物的生长发育, 同时影响植物在不同温度环境下的适应性, 合适的光照刺激可提高植株对于低温胁迫的抗性^[27]。低红光与远红光的光信号能够通过影响生物钟机制, 提升拟南芥中 CBF 基因表达水平, 这种由光质驱动的 CBF 表达增强, 有效增强了植物的耐低温能力^[28]。故可推测 CaMYB44 基因也可能受脱落酸或光照等途径诱导响应低温胁迫环境。

MYB44 已在多个物种中被验证为植株低温胁迫响应的调控因子, 例如在苹果愈伤组织中过表达 MdMYB44 基因, 会使其低温耐受性显著降低^[29]; 在黄瓜中, CsMYB44 可通过转录激活 PAs 基因, 减轻黄瓜果实冻害^[30]。本研究中 RT-qPCR 结果显示, CaMYB44 在 4 °C 低温胁迫处理 24 h 后, 表达显著下调, 在 48 h 处理后又逐渐上调。与葡萄 VaMYB44 基因及红枣 ZjCBL1 基因在低温胁迫下的表达趋势相类似, 低温处理后基因表达先下调后恢复原表达水平^[21, 31]。故本研究团队推测 CaMYB44 基因可能在辣椒抵抗低温胁迫中发挥负调控作用。

参考文献:

- [1] 邹学校, 朱凡. 辣椒的起源、进化与栽培历史[J]. 园艺学报, 2022, 49(6): 1371 – 1381.
- [2] 邹学校, 马艳青, 戴雄泽, 等. 辣椒在中国的传播与产业发展[J]. 园艺学报, 2020, 47(9): 1715 – 1726.
- [3] 李涛, 徐小万, 李颖, 等. 一年生辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 与中华辣椒 (*Capsicum chinense* Jacquin) DNA 甲基化多样性分析[J]. 分子植物育种, 2014, 12(2): 306 – 315.
- [4] RIHAN H Z, AL-ISSAWI M, FULLER M P. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance[J]. *Journal of Plant Interactions*, 2017, 12(1): 143 – 157.
- [5] Steponkus P L, Webb M S. Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants[M]//Water and Life: Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular, and Molecular Levels. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992: 338–362.
- [6] ZHANG S, JIANG H, PENG S M, et al. Sex-related differences in morphological, physiological, and ultrastructural responses of *Populus cathayana* to chilling[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(2): 675 – 686.
- [7] ROHDE P, HINCHA D K, HEYER A G. Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia - 0 and C24) that show differences in non - acclimated and acclimated freezing tolerance[J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(5): 790 – 799.
- [8] LIU Z B, SONG J S, MIAO W, et al. Comprehensive proteome and lysine acetylome analysis reveals the widespread involvement of acetylation in cold resistance of pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 730489.
- [9] 邓惠如, 张素勤, 耿广东. 辣椒逆境响应基因研究现状及前景[J/OL]. 分子植物育种, (2023-11-09)[2024-04-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231108.1149.002.html>.
- [10] 朱晨曦, 马艳青, 张竹青. 我国辣椒耐低温弱光的研究概况[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(15): 6581 – 6583.
- [11] YAO C Y, LI X G, LI Y M, et al. Overexpression of a *Malus baccata* MYB transcription factor gene MbMYB4 increases cold and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1794.
- [12] MA X, YU Y N, JIA J H, et al. The pepper MYB transcription factor CaMYB306 accelerates fruit coloration and negatively regulates cold resistance[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 295: 110892.
- [13] DONG J, CAO L, ZHANG X Y, et al. An R2R3-MYB transcription factor RmMYB108 responds to chilling stress of *Rosa multiflora* and conferred cold tolerance of *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 696919.
- [14] SONG X P, ZHU L, WANG D, et al. Molecular regulatory mechanism of exogenous hydrogen sulfide in alleviating low-temperature stress in pepper seedlings[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023,

- 24(22): 16337.
- [15] LI N H, PU K G, DING D X, et al. Foliar spraying of glycine betaine alleviated growth inhibition, photoinhibition, and oxidative stress in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under low temperatures combined with low light[J]. *Plants*, 2023, 12(13): 2563.
- [16] ALTAF M A, SHU H Y, HAO Y Y, et al. Melatonin affects the photosynthetic performance of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under cold stress[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(12): 2414.
- [17] ZHOU Y, MUMTAZ M A, ZHANG Y H, et al. Response of anthocyanin accumulation in pepper (*Capsicum annuum*) fruit to light days[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8357.
- [18] HULSE-KEMP A M, MAHESHWARI S, STOFFEL K, et al. Reference quality assembly of the 3.5-Gb genome of *Capsicum annuum* from a single linked-read library [J]. *Horticulture Research*, 2018, 5(1): 4.
- [19] HAUSMANN S, GEISER J, ALLEN G E, et al. Intrinsically disordered regions regulate RhlE RNA helicase functions in bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(13): 7809 – 7824.
- [20] HIRANO Y, SATO T, MIURA A, et al. Disordered region of nuclear membrane protein Bqt4 recruits phosphatidic acid to the nuclear envelope to maintain its structural integrity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(7): 107430.
- [21] ZHANG H J, HU Y F, GU B, et al. VaMYB44 transcription factor from Chinese wild *Vitis amurensis* negatively regulates cold tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *V. vinifera*[J]. *Plant Cell Reports*, 2022, 41(8): 1673 – 1691.
- [22] PERSAK H, PITZSCHKE A. Tight interconnection and multi-level control of *Arabidopsis MYB44* in MAPK cascade signalling[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57547.
- [23] KAGALE S, LINKS M G, ROZWADOWSKI K. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(3): 1109 – 1134.
- [24] JIANG C, IU B, SINGH J. Requirement of a CCGAC *cis*-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30(3): 679 – 684.
- [25] TON J, FLORS V, MAUCH-MANI B. The multifaceted role of ABA in disease resistance[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(6): 310 – 317.
- [26] YU G H, JIANG L L, MA X F, et al. A soybean C2H2-type zinc finger gene *GmZFI* enhanced cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109399.
- [27] JIANG B C, SHI Y T, PENG Y, et al. Cold-induced CBF-PIF3 interaction enhances freezing tolerance by stabilizing the phyB thermosensor in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(6): 894 – 906.
- [28] FRANKLIN K A, WHITELAM G C. Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(11): 1410 – 1413.
- [29] WU R G, WANG Y, WU T, et al. Functional characterisation of *MdMYB44* as a negative regulator in the response to cold and salt stress in apple calli[J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2018, 93(4): 347 – 355.
- [30] MADEBO M P, BOKHARY S U F, YOU W L, et al. Melatonin improves cold storage tolerance in cucumber via CsMYB44-mediated transcriptional activation of the polyamine biosynthesis gene family[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2024, 213: 112937.
- [31] QI C F, WANG Q F, NIU Y H, et al. Characteristics of *ZjCIPKs* and *ZjbHLH74-ZjCIPK5* regulated cold tolerance in jujube[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 264: 130429.

Analysis of the function of the *CaMYB44* gene in *Capsicum annuum*

WU Shuhua^{1,2#}, LIU Jiancheng^{1,2}, NING JiaHui^{1,2}, WANG Zhiwei^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Quality Regulation of Tropical Horticultural Crops of Hainan Province, School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Sanya Nanfan Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: The MYB transcription factor family plays an important role in plant response to environmental stress. *Capsicum annuum* is the most widely cultivated species in the genus *Capsicum*. The transcriptome data obtained by our group were analyzed, based on which MYB44 transcription factor was selected for bioinformatics analysis of the cis-acting elements of the promoter, protein structure, evolutionary relationship. A preliminary experimental research was then conducted on subcellular localization and low temperature response. The open reading frame (ORF) of *CaMYB44* gene is 981 bp in length, encoding an unstable hydrophilic protein with an amino acid of 326 aa. It is predicted that CaMYB44 protein has no signal peptide and transmembrane domain, is a non-secretory protein, and belongs to R2R3 MYB. Phylogenetic tree analysis showed that it had high homology with *SmMYB73*, *NtMYB44-like*, *StMYB44-like* and *SIMYB44*, followed by *AtMYB70* and *OsMYB77*. Cis-acting element analysis showed that the promoter region contained a low temperature response element and multiple abscisic acid and light response elements. Subcellular localization results showed that CaMYB44 was localized in the nucleus. The RT-qPCR showed that the expression of *CaMYB44* was down-regulated after 24 h of low temperature stress at 4 °C, which was similar to the expression trend of other negative regulatory factors under low temperature stress. This paper provides basic data for further analysis of low temperature tolerance transcription factors in *C. annuum*.

Keywords: *Capsicum annuum*; *CaMYB44*; gene cloning; expression analysis

(责任编辑:叶 静)