

引用格式: 刘燕飞, 段伟科, 唐凯, 等. 辣椒 GST 基因家族鉴定及进化与表达分析[J]. 西北植物学报, 2025, 45(1): 0000-0000. [LIU Y F, DUAN W K, TANG K, *et al.* Identification of the GST gene family in peppers and its evolution and expression analysis[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2025, 45(1): 0000-0000.] DOI:10.7606/j.issn.1000-4025.20240511

辣椒 GST 基因家族鉴定及进化与表达分析

刘燕飞, 段伟科, 唐凯, 夏玲, 张林青, 黄志楠

(淮阴工学院 生命科学与食品工程学院, 江苏淮安 223003)

摘要 【目的】谷胱甘肽 S-转移酶(GST)在植物生长发育过程和抵抗非生物胁迫中扮演重要角色, 探究辣椒 *CaGSTs* 的基本特性和表达模式, 将为深入研究辣椒 *CaGST* 基因功能及蔬菜抗逆分子育种提供理论依据和基因资源。【方法】利用生物信息学方法鉴定辣椒 GST 基因家族, 分析其染色体定位、基因结构、理化性质、进化关系和在不同组织、不同果实发育阶段中的表达特征等, 利用 RT-qPCR 技术分析其在不同非生物胁迫下的表达模式。【结果】在辣椒‘CM334’基因组中共鉴定到 72 个辣椒 GST 成员, 随机分布在 10 条染色体上, 其中 9 号染色体上分布最多; 可分为 10 个亚家族, 组间基因结构差异显著, 串联复制是该基因家族扩张的主要原因; *CaGST* 的表达具有组织特异性, 其中 *CaGSTZ1* 在果皮和胎座发育后期高表达; 非生物胁迫下, *GaGSTU14*、*CaMGST1*、*CaTCHQD1* 和 *CaGSTF3* 分别对低温、高温、盐和干旱有显著响应。【结论】*CaGSTZ1* 在果实 PCR 发育阶段起重要作用, *CaGSTU14*、*CaGSTF3* 基因可能是辣椒抵抗高温、低温的关键基因。

关键词 辣椒; GST; 系统进化; 表达分析; 非生物胁迫

中图分类号 Q786; S641.3 **文献标志码** A

Identification of the GST gene family in peppers and its evolution and expression analysis

LIU Yanfei, DUAN Weike, TANG Kai, XIA Ling, ZHANG Linqing, HUANG Zhinan
(College of Life Sciences and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an, Jiangsu 223003, China)

Abstract [Objective] The glutathione S-transferase (GST) play a critical role in plant growth and development as well as in abiotic stress. Exploring the characteristics and expression of *CaGSTs* will provide genetic resources and references for in-depth study of *CaGST* function and molecular breeding of stress resistant peppers. [Methods] The GST gene family was analyzed with the bioinformatics methods, and the protein properties, gene structure, chromosome localization, and evolutionary relationship were analyzed. Transcriptome data were utilized to examine the expression characteristics of GST genes in tissues and fruits during varying developmental stages. The expression profiles under various abiotic stresses were analyzed using RT-qPCR. [Results] 72 GST members were identified in the genome of ‘CM334’ pepper, which were randomly distributed on 10 chromosomes, with the highest distribution on chromosome 9. Ev-

收稿日期: 2024-09-13; 修改稿收到日期: 2024-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31902021)

作者简介: 刘燕飞(1996—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: 1621677150@qq.com

通信作者: 黄志楠, 博士, 副教授, 主要从事蔬菜遗传育种与基因组学研究。E-mail: HuangZN926@163.com

olutionary analysis showed that CaGSTs were categorized into 10 subfamilies with significant differences in gene structure, and tandem duplication caused the expansion of the CaGST gene family. Expression analysis showed that CaGSTs were tissue specific, in which CaGSTZ1 was highly expressed in the late stage of pericarp and placenta development. Under abiotic stress, GaGSTU14, CaMGST1, CaTCHQD1, and CaGSTF3 responded significantly to low temperature, high temperature, salt, and drought, respectively. [Conclusion] CaGSTZ1 plays an important role in fruit development in peppers. CaGSTU14 and CaGSTF3 genes may be the key determinants in resisting high and low temperatures in peppers.

Key words pepper; GST; phylogenetic evolution; expression analysis; abiotic stress

辣椒(*Capsicum annuum*)是1年生或多年生草本植物,是重要的药食同源蔬菜,在中国具有重要经济地位。在辣椒生长周期中,常因非生物胁迫造成作物整体品质与最终产量受损,造成不良后果^[1]。因此,开发果型好、产量高、抗逆性好的辣椒品种非常迫切。研究表明,谷胱甘肽S-转移酶广泛参与植物的各种生理代谢活动,在植物面对逆境胁迫时扮演重要的调控角色^[2]。GST基因家族是一个古老的催化和结合蛋白超家族,由多个基因编码,广泛存在于原核生物和真核生物中,通过催化GSH与底物结合,降解内源或异源有毒物质,进而保护细胞^[3]。根据氨基酸序列相似性和基因结构,植物GST家族可分为Phi(F)、Tau(U)、Lambda(L)、Theta(T)、Zeta(Z)、EF1By(elongation factor 1By)、DHAR(dehydroascorbate reductase)、TCHQD(tetrachlorohydroquinone dehalogenase)8类,其中L族、DHAR族、U族和F族为植物特有^[4]。与其他亚族相比,F族和U族是植物中最丰富的2个类别,在外源代谢中起重要作用^[5]。

前人研究表明,植物GST主要有以下功能:(1)参与植物生长发育过程,例如在梨(*Pyrus pyrifolia*)中,PpGST1与PpGST2参与调控果实的发育,并响应SA和IAA激素调控^[6],无花果(*Ficus carica* L.)FcGSTU30、38、40在雄花和果皮中都高度表达,推测参与果实发育调控^[7];(2)参与植物非生物胁迫,如过表达番茄(*Solanum lycopersicum*)LeGSTU2的转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植物对盐和干旱胁迫抗性增加^[8],干旱胁迫诱导小麦(*Triticum aestivum*)TaGSTU1B和TaGSTF6基因的表达^[9],棉花(*Gossypium hirsutum*)GST基因可以受盐胁迫诱导或抑制^[10],过表达水稻(*Oryza sativa*)OsGSTU4的转基因拟南芥可以提高对盐度和氧化应激的耐受性^[11];(3)跨膜

运输定位,如葡萄(*Vitis vinifera*)VviGST1和VviGST4具有运输花青素从细胞质到液泡的功能^[12],BcGSTF6参与不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis*)花青素的转运及积累调控^[13]。

综上所述,国内外对GST基因家族的研究日益增多,但在辣椒中GST家族基因研究较少。本研究采用生物信息学方法对辣椒GST基因进行筛选鉴定,分析其染色体定位、基因结构、理化性质、进化关系和在不同组织、不同果实发育阶段中的表达特征等,为进一步研究辣椒GST基因功能奠定基础,为阐明辣椒适应逆境机制及辣椒分子育种提供理论依据和基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料种植与处理

将辣椒‘先红一号’种子进行消毒(2%次氯酸钠),25℃下催芽2d,在光照培养箱中采用漂浮育苗法培育幼苗。培养液为园试营养液,pH 6.0,昼夜温度25℃/18℃,光照6000 lx。待植株长到5叶1心时,进行逆境处理(CK:正常生长条件;高温处理:42℃;低温处理:10℃;盐胁迫:添加NaCl使营养液NaCl浓度达到200 mmol/L;干旱胁迫:添加PEG 6000使营养液PEG 6000浓度达到20%),分别于处理后0,1,2,4,6,12,24 h采集每株辣椒苗相同位置叶片组织,每个样品取3次生物学重复,用锡箔纸包裹后迅速放入液氮,1 h后储存于-80℃冰箱备用。

1.2 辣椒GST基因序列鉴定

从辣椒基因组网站(https://solgenomics.net/organism/Capsicum_annuum/genome)下载获得辣椒(*C. annuum* cv. CM334)基因组数据。以水稻(*O. sativa*)和拟南芥(*A. thaliana*)GST蛋白序列为种子序列,在辣椒基因组蛋白数据库中使用默认

参数(E 为 $1e^{-10}$) 进行 BLASTp 搜索,然后通过 NCBI 保守域数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析序列,以确定最终成员序列。位点名称、CDS 坐标和转录本长度详细信息从 Pepper 基因组数据库(https://solgenomics.net/organism/Capsicum_annuum/genome)中收集。使用在线工具 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析辣椒 GST 家族成员的氨基酸数目、等电点(pI)和分子量(MW)等理化信息。

1.3 GST 蛋白家族系统进化树构建

在 MEGAX^[14] 软件中用最大似然法对拟南芥、水稻和辣椒品种‘CM334’ GST 蛋白序列构建系统发育树,其他参数默认,自展值(bootstrap)设为 1 000 次。

1.4 辣椒 GST 基因结构、保守结构域分析和染色体分布分析

利用 GSDS 对辣椒 GST 基因组序列和编码序列进行比较,鉴定其外显子-内含子结构及相应位置,并导出结果。通过在线软件 MEME 分析 GST 蛋白保守结构域,默认设置运行,motif 搜寻最大数量设置为 12。鉴定获得的 motif 通过 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)数据库注释。

在辣椒基因组数据库中确定 *CaGST* 基因物理位置,并定位到辣椒‘CM334’的 12 条染色体上,利用 Tbtools^[15] 绘制 *CaGST* 基因染色体分布图。

1.5 辣椒 GST 基因组织差异表达分析及基因共表达网络图构建

利用前人发表的 RNA-seq 数据^[16],通过本地 perl 程序提取相应 GST 基因表达数据,运用 R 软件绘制表达热图。运用皮尔森相关系数(pearson correlation coefficient,PCC)计算 *CaGST* 基因之间共表达关系,并使用软件绘制 *CaGST* 基因之间的共表达网络图。

1.6 非生物胁迫下 *CaGST* 基因表达量测定

基于转录组数据,共筛选 12 个 *CaGST* 基因进行非生物胁迫响应分析。使用 TIANGEN 公司 Simple Total RNA Kit 试剂盒提取各个处理辣椒叶片高质量 RNA,逆转录(TaKaRa 公司试剂盒)获得 cDNA。以辣椒 *Actin* (GenBank Accession:GQ339766.1)

为内参基因,设计 *CaGST* 基因引物。然后按照 SYBR premix Ex Taq 试剂盒说明书进行 RT-qPCR(3 次生物学重复及技术重复)。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算 *CaGST* 基因在不同胁迫处理不同处理时间下的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 辣椒 GST 基因候选序列基本信息分析

在墨西哥地方品种‘CM334’基因组中鉴别得到 72 条 GST 家族基因,依据拟南芥 GST 同源性和染色体位置将其分别命名为 *CaGSTU1-51*、*CaEF1 γ 1*、*CaDHAR1*、*CaDHAR4*、*CaGHR1*、*CaGHR3*、*CaGSTF1-4*、*CaTCHQD1-2*、*CaGSTL1-4*、*CaGSTT1-3*、*CaGSTZ1*、*CaMGST1-2*(表 1)。*CaGST* 基因序列长度从 180 bp(*CaGSTU49*)~1 311 bp(*CaEF1 γ 1*)不等,蛋白分子大小为 59~436 aa,蛋白分子质量最低为 6.68 kD(*CaGSTU49*),最高为 49.37 kD(*CaEF1 γ 1*)。预测等电点(pI)为 4.01~10.22,其中 18 个基因(*CaGSTU3*、*CaGSTU6*、*CaGSTU12*、*CaGSTU31*、*CaGSTU34*、*CaGSTU35*、*CaGSTU48*、*CaGSTU49*、*CaDHAR2*、*CaGHR1*、*CaGSTF3*、*CaTCHQD1*、*CaTCHQD2*、*CaGSTL2*、*CaGSTT1*、*CaGSTT2*、*CaMGST1* 和 *CaMGST2*)等电点大于 7,属于碱性氨基酸,其他 54 个基因等电点均小于 7,属于酸性氨基酸(表 1)。

2.2 辣椒 GST 蛋白系统进化树分析

为进一步明确辣椒 GST 基因家族进化关系,选取拟南芥、水稻、辣椒 GST 蛋白序列构建系统发育树。结果表明,3 类植物的 GST 被分为 10 个亚组,其中拟南芥和水稻 GST 分布在除 MGST 之外的 9 个分支,辣椒‘CM334’ GST 家族分布在 10 个分支中,分别为 Tau 51 个,Lambda 4 个,Zeta 1 个,DHAR 2 个,Theta 3 个,GHR 2 个,TCHQD 2 个,Phi 4 个,MGST 2 个和 EF1 γ 1 个(图 1)。在拟南芥、水稻和辣椒中,Tau 亚组都是最大的分支,分别包含 28 个、49 个和 51 个成员,其次是 Phi 亚组。在辣椒‘CM334’中有 4 个 Phi 序列,明显少于拟南芥中的 13 个和水稻中的 17 个,可能这类基因在分化过程中发生大部分丢失现象,其他分支中物种间基因数目差异不明显。

表 1 辣椒 GST 基因家族成员理化性质分析

Table 1 Analysis of physicochemical properties of the GST gene family in peppers

基因名称 Gene name	基因组登录号 Gene accession No.	编码区 长度/bp CDS length	氨基酸数 Amino acid number	分子量/kD Molecular weight	等电点 pI	染色体位置 Chromosome location
<i>CaGSTU1</i>	CA00g15890	681	226	25.75	5.01	PGAv. 1. 5. scaffold665;1324667..1325769
<i>CaGSTU2</i>	CA00g15900	681	226	25.63	5.79	PGAv. 1. 5. scaffold665;1348497..1349608
<i>CaGSTU3</i>	CA00g15920	828	275	31.42	7.59	PGAv. 1. 5. scaffold665;1352384..1353470
<i>CaGSTU4</i>	CA00g25730	702	233	27.13	5.07	PGAv. 1. 5. scaffold837;772116..773517
<i>CaGSTU5</i>	CA00g25740	342	113	12.84	5.19	PGAv. 1. 5. scaffold837;811784..812125
<i>CaGSTU6</i>	CA00g36700	399	132	15.60	7.27	PGAv. 1. 5. scaffold992;58356..58754
<i>CaGSTU7</i>	CA00g36740	678	225	25.64	6.75	PGAv. 1. 5. scaffold992;102946..103727
<i>CaGSTU8</i>	CA00g57920	423	140	16.45	6.49	PGAv. 1. 5. scaffold1315;388..810
<i>CaGSTU9</i>	CA00g57930	360	119	13.33	4.87	PGAv. 1. 5. scaffold1315;853..1212
<i>CaGSTU10</i>	CA00g63650	666	221	25.09	4.81	PGAv. 1. 5. scaffold1393;356329..358441
<i>CaGSTU11</i>	CA00g63880	261	86	10.05	4.45	PGAv. 1. 5. scaffold1398;454902..455348
<i>CaGSTU12</i>	CA00g79120	651	216	24.41	7.55	PGAv. 1. 5. scaffold1681;77125..78617
<i>CaGSTU13</i>	CA00g94410	762	253	29.10	5.27	PGAv. 1. 5. scaffold2889;8314..10398
<i>CaGSTU14</i>	CA02g04610	678	225	26.00	5.62	chr02:61000625..61001812
<i>CaGSTU15</i>	CA03g02290	675	224	26.40	6.50	chr03:5060407..5061675
<i>CaGSTU16</i>	CA03g02300	666	221	25.80	4.82	chr03:5062436..5064740
<i>CaGSTU17</i>	CA03g04960	678	225	25.66	6.24	chr03:12825778..12827007
<i>CaGSTU18</i>	CA06g00980	657	218	24.96	4.90	chr06:5465802..5466961
<i>CaGSTU19</i>	CA06g15090	759	252	28.97	6.28	chr06:209298462..209299934
<i>CaGSTU20</i>	CA07g14600	660	219	25.48	6.64	chr07:215801911..215832466
<i>CaGSTU21</i>	CA07g14610	663	220	25.55	5.83	chr07:215834040..215835322
<i>CaGSTU22</i>	CA07g14620	306	101	11.62	4.90	chr07:215928014..215928319
<i>CaGSTU23</i>	CA07g14630	324	107	12.15	4.56	chr07:215966275..215966598
<i>CaGSTU24</i>	CA07g14640	354	117	13.72	4.95	chr07:215967805..215968158
<i>CaGSTU25</i>	CA07g14650	339	112	13.01	5.24	chr07:215971919..215972257
<i>CaGSTU26</i>	CA07g14660	669	222	25.69	5.20	chr07:215973976..215975634
<i>CaGSTU27</i>	CA07g14670	426	141	16.28	4.98	chr07:215976587..215977386
<i>CaGSTU28</i>	CA09g02930	675	224	25.75	5.45	chr09:8167695..8168633
<i>CaGSTU29</i>	CA09g02940	666	221	25.20	4.94	chr09:8172447..8173769
<i>CaGSTU30</i>	CA09g02950	660	219	24.87	5.91	chr09:8182294..8183249
<i>CaGSTU31</i>	CA09g03870	330	109	12.95	8.41	chr09:12516039..12516368
<i>CaGSTU32</i>	CA09g05620	675	224	25.68	5.22	chr09:38785106..38786541
<i>CaGSTU33</i>	CA09g05630	678	225	26.06	5.21	chr09:38949198..38950077
<i>CaGSTU34</i>	CA09g05710	282	93	10.84	9.69	chr09:39144205..39144486
<i>CaGSTU35</i>	CA09g05730	372	123	14.18	7.93	chr09:39185392..39185996
<i>CaGSTU36</i>	CA09g05740	462	153	17.41	4.90	chr09:39192112..39192892
<i>CaGSTU37</i>	CA09g05820	675	224	26.29	6.50	chr09:40164291..40166157
<i>CaGSTU38</i>	CA09g05920	675	224	25.74	6.70	chr09:41432502..41433557
<i>CaGSTU39</i>	CA09g05930	663	220	25.47	4.85	chr09:41434492..41435428
<i>CaGSTU40</i>	CA09g07740	663	220	25.35	5.80	chr09:70538529..70539779
<i>CaGSTU41</i>	CA09g12730	669	222	25.75	5.66	chr09:220077915..220080681
<i>CaGSTU42</i>	CA10g01970	828	275	32.13	6.50	chr10:4046008..4047595
<i>CaGSTU43</i>	CA10g01990	669	222	25.74	5.07	chr10:4054088..4055908
<i>CaGSTU44</i>	CA10g02010	672	223	25.47	6.13	chr10:4058914..4060691
<i>CaGSTU45</i>	CA10g14170	666	221	25.12	4.92	chr10:203676915..203679235
<i>CaGSTU46</i>	CA11g05010	363	120	13.81	5.71	chr11:30878670..30879032
<i>CaGSTU47</i>	CA11g05020	927	308	35.63	5.88	chr11:30903191..30904473
<i>CaGSTU48</i>	CA11g05030	690	229	26.21	7.11	chr11:30905747..30906733
<i>CaGSTU49</i>	CA11g05040	180	59	6.68	10.22	chr11:31246061..31246240

续表 1 Continued table 1

基因名称 Gene name	基因组登录号 Gene accession No.	编码区 长度/bp CDS length	氨基酸数 Amino acid number	分子量/kD Molecular weight	等电点 pI	染色体位置 Chromosome location
CaGSTU50	CA11g05050	753	250	28.03	6.34	chr11:31247260..31249645
CaGSTU51	CA12g19360	666	221	25.78	5.39	chr12:226193611..226195117
CaEF1γ1	CA00g04680	1311	436	49.37	5.27	PGAv. 1.5. scaffold546:135710..137940
CaDHAR1	CA00g59780	639	212	23.57	6.23	PGAv. 1.5. scaffold1339:40611..45011
CaDHAR2	CA12g02500	795	264	29.53	7.90	chr12:4542882..4548757
CaGHR1	CA00g21730	1242	413	46.44	8.67	PGAv. 1.5. scaffold771:644087..646152
CaGHR2	CA02g08510	399	132	15.05	4.22	chr02:117775708..117776232
CaGSTF1	CA00g79230	687	228	26.03	6.49	PGAv. 1.5. scaffold1681:196393..197823
CaGSTF2	CA03g07430	642	213	24.19	5.94	chr03:22566929..22568469
CaGSTF3	CA05g14060	750	249	28.16	8.72	chr05:210112048..210114518
CaGSTF4	CA12g17280	672	223	25.38	6.49	chr12:218366360..218368903
CaTCHQD1	CA00g18900	840	279	32.92	9.08	PGAv. 1.5. scaffold716:987071..988285
CaTCHQD2	CA06g09760	795	264	30.72	7.63	chr06:179512104..179513161
CaGSTL1	CA00g87640	708	235	27.06	5.03	PGAv. 1.5. scaffold1928:35997..38475
CaGSTL2	CA05g03560	858	285	33.32	8.39	chr05:9840646..9844509
CaGSTL3	CA09g03360	744	247	28.86	5.89	chr09:9833567..9836387
CaGSTL4	CA10g14660	708	235	27.24	5.44	chr10:208609970..208612578
CaGSTT1	CA00g22220	843	280	31.45	10.14	PGAv. 1.5. scaffold774:104363..107570
CaGSTT2	CA00g22230	576	191	21.38	9.88	PGAv. 1.5. scaffold774:114584..117048
CaGSTT3	CA00g24770	216	71	7.93	4.01	PGAv. 1.5. scaffold792:1138730..1138945
CaGSTZ1	CA00g62560	672	223	25.30	4.81	PGAv. 1.5. scaffold1379:269184..27411
CaMGST1	CA02g18250	435	144	16.39	9.10	chr02:150387857..150389501
CaMGST2	CA04g16160	972	323	36.22	9.33	chr04:205145799..205150482

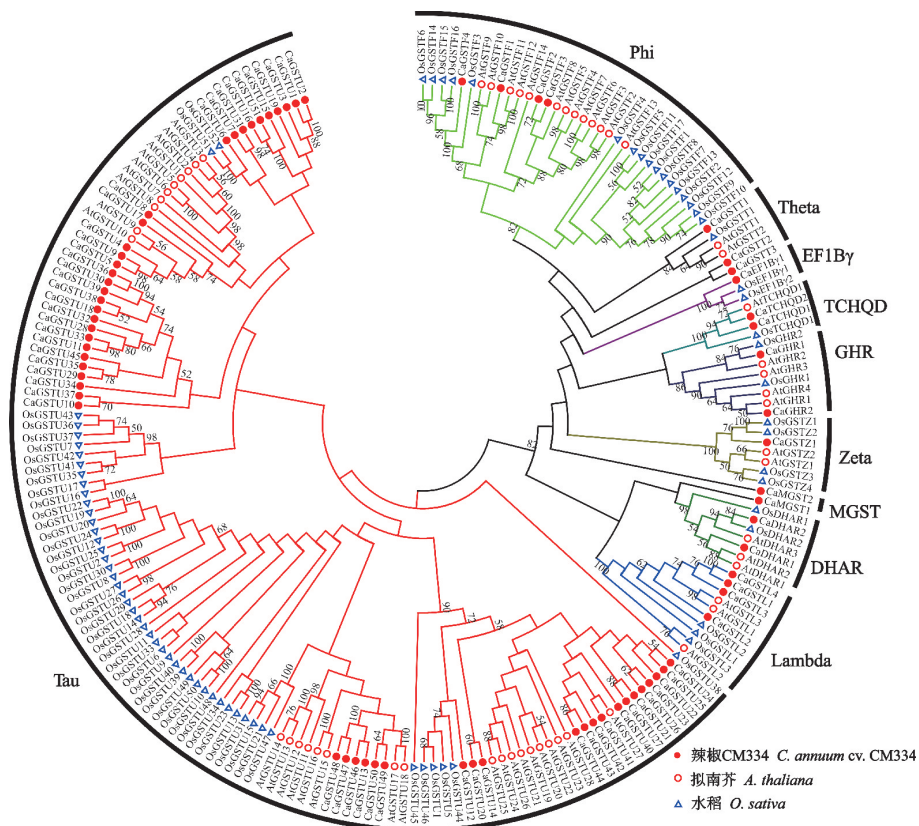


图 1 拟南芥、水稻和辣椒‘CM334’ GST 进化分析

Fig. 1 Evolutionary analysis of GSTs in Arabidopsis, rice, and pepper ‘CM334’

2.3 辣椒 GST 基因家族的基因结构、保守结构域和染色体分布分析

外显子和内含子位置通常可以为物种进化关系提供重要信息^[17],因此,本研究对已鉴定的 72 个辣椒 GST 家族基因结构进行分析。结果表明,相同亚组内的 *CaGST* 基因结构相近,不同亚组间的 *CaGST* 基因结构差异较大,特别是外显子数量。*Zeta* 亚组最多含有 9 个外显子,其次是 *Lambda* 亚

组的 8 个外显子和 *EF1B γ* 亚组的 7 个外显子。*Tau* 亚组外显子数量较少,最多含有 3 个外显子,在 *CaGSTU5*、*CaGSTU6*、*CaGSTU8*、*CaGSTU9*、*CaGSTU22*、*CaGSTU23*、*CaGSTU24*、*CaGSTU25*、*CaGSTU31*、*CaGSTU34*、*CaGSTU46* 和 *CaGSTU49* 的基因结构中只具有 1 个外显子,无内含子。这种内含子-外显子结构异化现象,可能是基因在进化过程中功能发生了分化(图 2)。

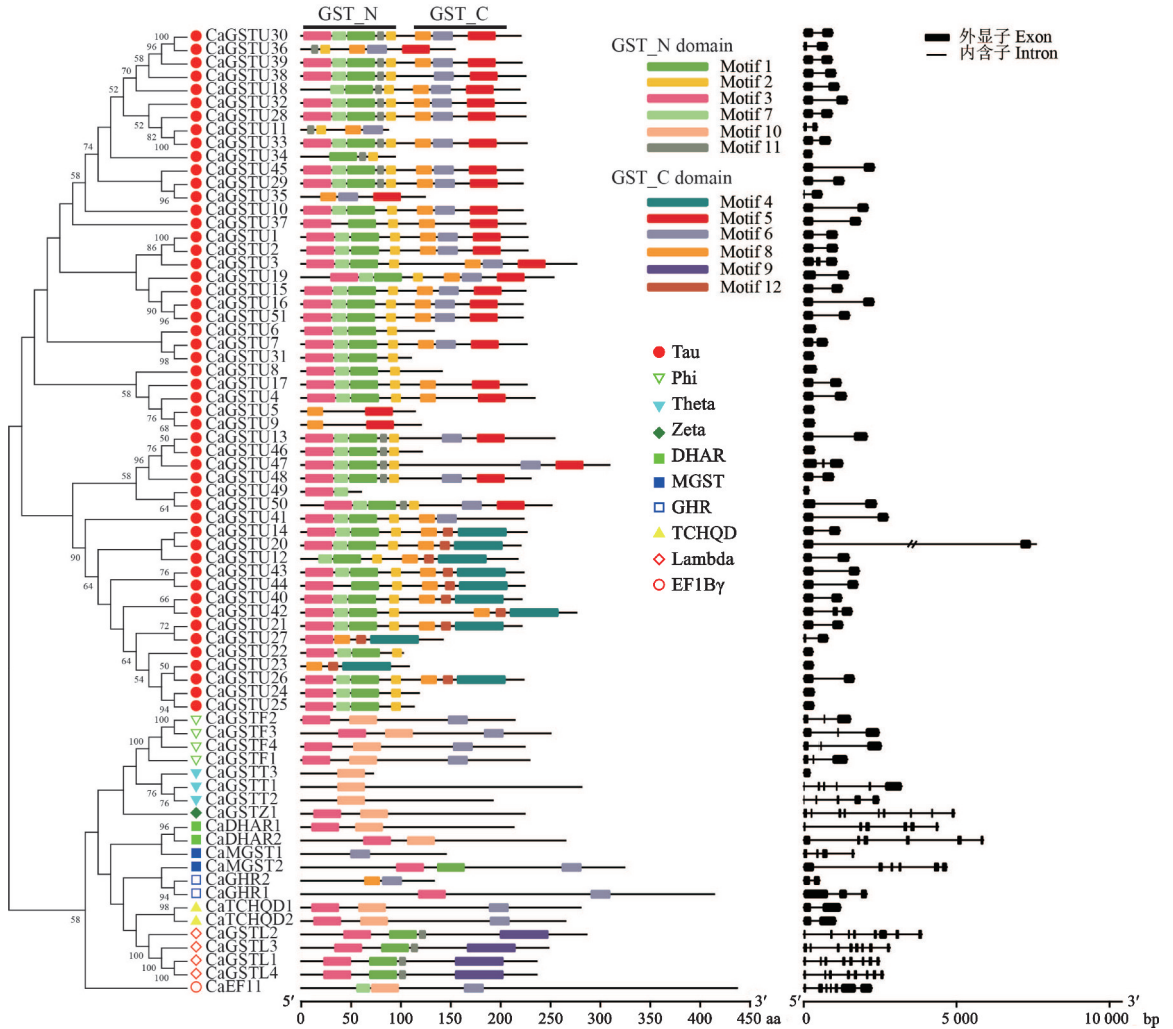


图 2 辣椒 GST 基因结构和保守结构域

Fig. 2 The structure and conserved domains of the GST genes in peppers

结构域基序分析表明,72 个 *CaGST* 蛋白中大多数含有 N 端和 C 端 2 个保守 GST 结构域,少数 *CaGST* 中仅存在 1 个 N 端结构域或 1 个 C 端结构域。其中 GST_N 结构域包含 motif 1、motif 2、motif 3、motif 7、motif 10 和 motif 11,GST_C 结构域包含 motif 4、motif 5、motif 6、motif 8、motif 9 和 motif 12。在 72 个蛋白中,66 个蛋白中含有 motif 3,表明 motif 3 基序是 GST 家族中最保守的 1 段序列。不同亚组

内存在一些特定的基序,如 motif 2、motif 5、motif 8 和 motif 11 主要在 *Tau* 亚组中出现,motif 10 存在于除 *MGST*、*GHR*、*Tau*、*Lambda* 亚组外的 6 个亚组中,它们可能是这些亚组的特异基序(图 2)。

染色体分布结果显示,72 个 *CaGST* 基因中有 23 个基因没有被锚定在染色体上,其余 49 个基因随机分布在除 1 号和 8 号之外的 10 条染色体上(图 3),9 号染色体上分布的基因最多(20.8%)。部分

基因聚类在染色体某一区域,形成多个 GST 基因簇,例如 *CaGSTU20*、*CaGSTU21*、*CaGSTU22*、*CaGSTU23*、*CaGSTU24*、*CaGSTU25*、*CaGSTU26*、*CaGSTU27* 8 个基因位于 7 号染色体末端, *CaGSTU46*、*CaGSTU47*、*CaGSTU48*、*CaGSTU49*、*CaGSTU50* 5 个基因位于 11 号染色体上端, *CaGS-*

TU28、*CaGSTU29*、*CaGSTU30*、*CaGSTL3*、*CaGSTU31*、*CaGSTU32*、*CaGSTU33*、*CaGSTU34*、*CaGSTU35*、*CaGSTU36*、*CaGSTU37*、*CaGSTU38*、*CaGSTU39* 13 个基因位于 9 号染色体上端特定位置,说明此类基因在进化过程中发生了串联复制,这种现象多数发生在 Tau 亚组。

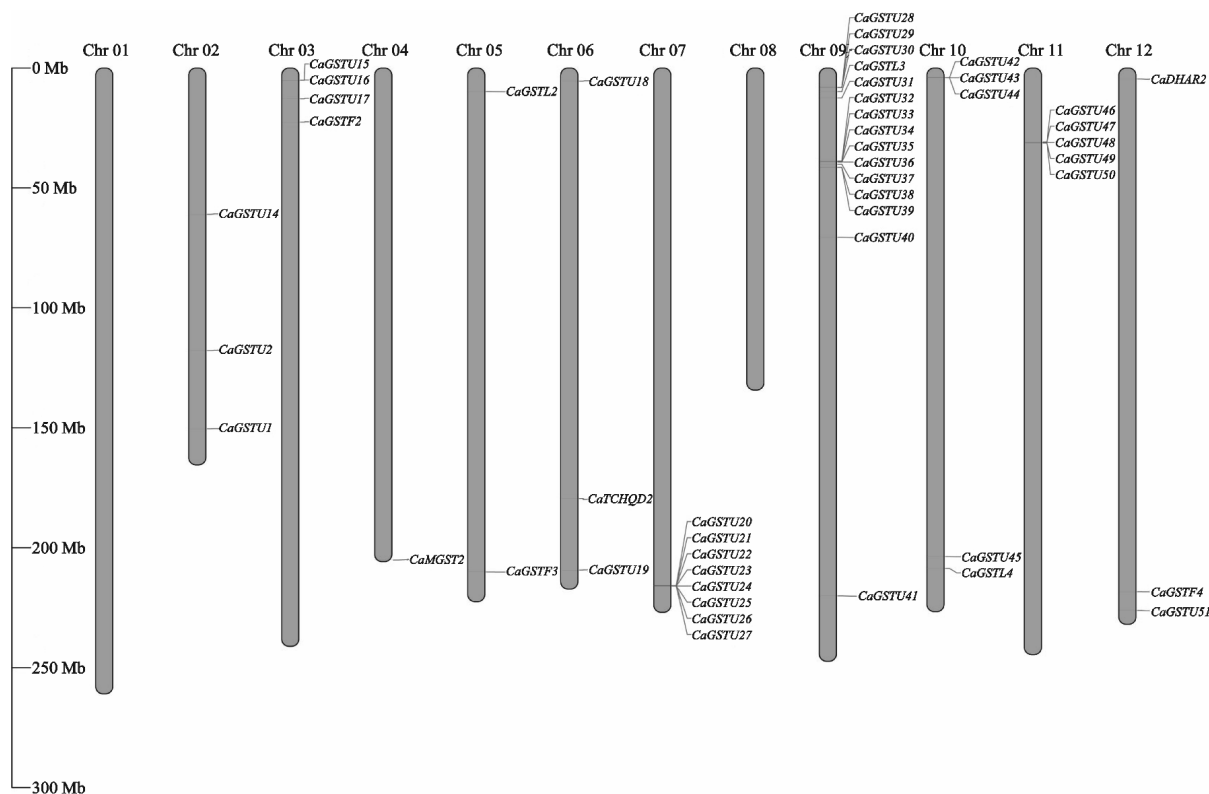


图 3 辣椒 GST 基因染色体分布

Fig. 3 Chromosomal distribution of the GST genes in peppers

2.4 *CaGST* 不同组织表达模式分析

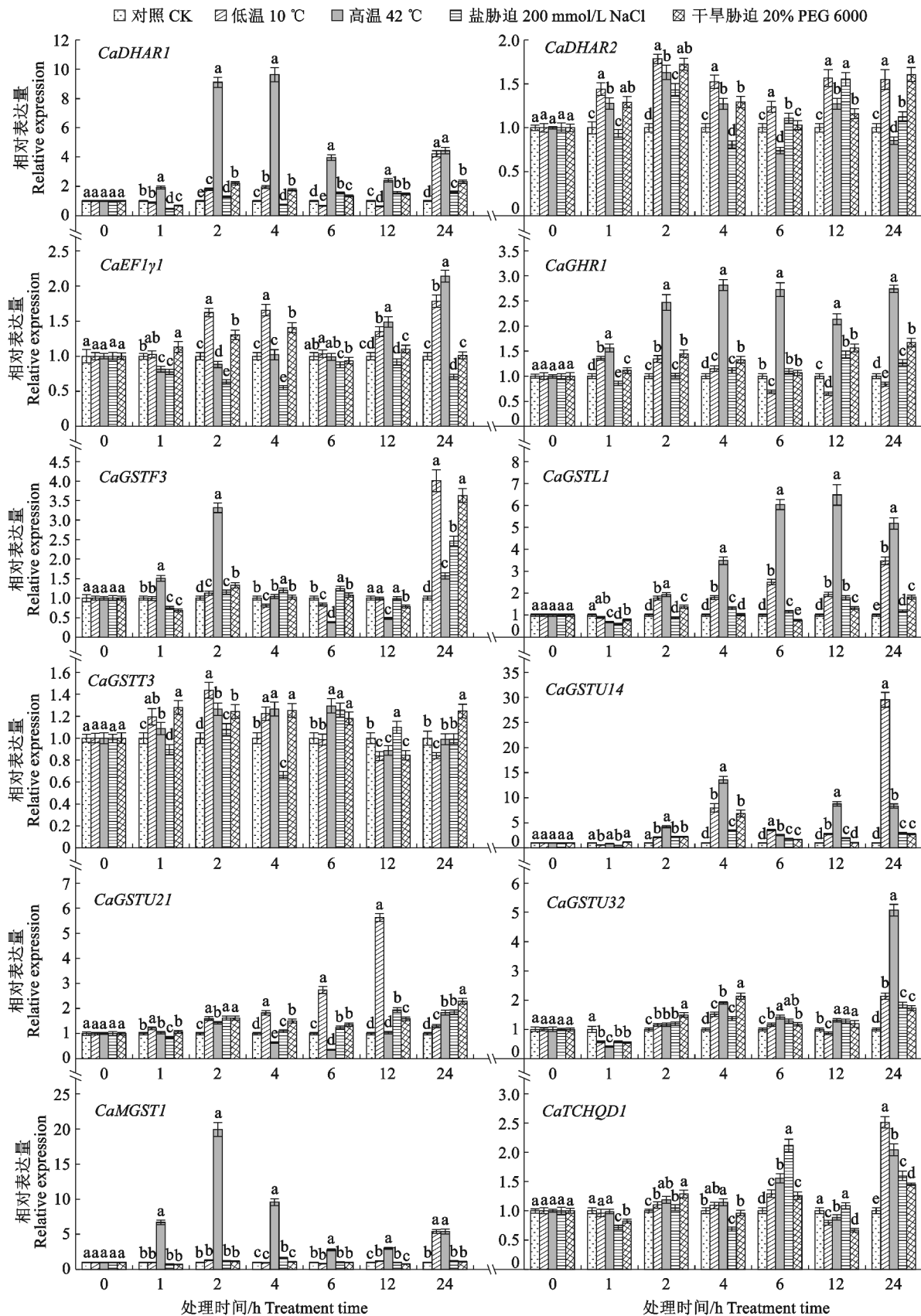
基于 RNA-seq 数据分析所有 *CaGST* 基因在不同组织器官(根、茎、叶、果皮、胎座)中的表达情况。结果表明, *CaGSTs* 基因表达模式可以分为 3 组(图 4):(1)在所有组织和器官及果实发育时期均显示极低的表达水平,如 *CaGSTU25*、*CaGSTF2*、*CaGSTF1*、*CaGSTT3*、*CaGSTU49*、*CaGSTU4* 和 *CaGST36*。(2)在所有器官/组织及果实发育时期均表现出较高的表达水平,如 *CaGSTZ1*、*CaDHAR1* 和 *CaEF11*。(3)在特定的器官/组织或果实发育时期表现较高的表达水平,如 *CaGSTU46* 在根部和胎座中表达水平较高,而在其他组织中表达水平低; *CaGSTU11*、*CaGSTU16* 和 *CaGST51* 只在根部特异性表达; *CaGSTU7* 在茎、叶、果皮和胎座中表达

水平较高,但在根部中表达水平低; *CaGSTU18* 在授粉 6 d 后,在果皮和胎座中有特异性表达,且表达水平较高。

对辣椒 GST 基因进行不同组织和果实发育时期共表达关系分析,共得到 8 个相关性较强网络(图 5)。其中 *CaGSTU26* 与 *CaTCHQD1*、*CaGSTT1*、*CaGSTU42* 与 *CaGSTL1*、*CaGSTL4* 具有较强的负相关性,其余各基因模块间为较强正相关,表明 *CaGST* 协同调控辣椒的生长发育(图 5)。

2.5 *CaGST* 基因在不同非生物胁迫下相对表达分析

利用 RT-qPCR 分析 12 个辣椒 GST 基因在 4 种非生物胁迫(低温、高温、盐和干旱)下的表达模式。在 4 种非生物胁迫下,12 个辣椒 GST 基因表达呈不同程度的上调趋势,部分基因表达下降。



不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

图 6 *CaGST* 在低温、高温、干旱和 NaCl 胁迫下的表达分析

The different lowercase letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level.

Fig. 6 Expression analysis of *CaGSTs* under low temperature, high temperature, drought, and NaCl stress

在低温处理下 *CaDHAR1*、*CaGSTF3*、*CaGSTU14*、*GaGSTU21*、*CaMGST1*、*CaTCHQD1* 等基因表达明显上调,其中 *CaGSTU14* 基因在处理 24 h 后达到峰值,表达量达 30 倍以上,表明其可能参与辣椒抵御冷胁迫过程。在高温处理下,*GaDHAR1*、*CaGHR1*、*GaGSTF3*、*CaGSTL1*、*GaGSTU14*、*CaGSTU32*、*CaMGST1* 等基因表达上调明显,*CaDHAR1*、*CaGSTU14*、*CaMGST1* 3 个基因的表达量分别达 10 倍、10 倍、20 倍,其可能参与辣椒抵御热胁迫过程。在 NaCl 胁迫处理下,除 *CaDHAR2*、*CaGSTF3*、*CaTCHQD1* 基因表达明显上调外,其余基因表达趋势相对平缓。在干旱胁迫处理下 *CaDHAR2*、*CaGSTF3*、*CaGSTU14*、*CaGSTU32* 上调明显,其余基因无明显变化,可能参与辣椒抵御干旱胁迫过程。*CaGSTU14*、*CaGSTF3* 基因在低温和高温处理下强烈响应,其可能对温度变化有明显感知与调控(图 6)。

3 讨论

GST 基因对除草剂的抗性是其基因功能研究中最早和最深入的,但随着现代生物技术和对植物 *GST* 基因的关注,有关生长发育和非生物胁迫方面的研究也陆续被报道^[3,10],更多物种的 *GST* 基因被鉴定和研究,如无花果^[7]、番茄^[18]、姜^[19]。本研究以辣椒‘CM334’基因组为主要对象,共鉴定得到 72 条 *GST* 基因,并分为 10 个亚组: Tau、Lambda、Zeta、DHAR、Theta、GHR、TCHQD、Phi、MGST 和 EF1By,其中 Tau 类基因为 51 个,数目最多。以上分组结果与甘薯^[17]、番茄^[18]中一致,符合植物体基因亚家族分布特征。MGST 亚组在辣椒‘Zunla-1’^[20]和番茄^[18]中均有报道,但在拟南芥和水稻中并未发现,可能为茄科作物独有。本研究表明,辣椒基因家族在染色体上出现多处基因簇,基因簇的形成通常是基因串联复制的结果,基因复制被认为是基因家族进化的主要驱动力,说明串联重复序列对辣椒 *GST* 基因进化和扩增做出了重要贡献。在辣椒中, Tau 亚组不仅是最大的 *GST* 分支,也是染色体基因簇最多,发生串联重复次数最多的亚组,这在甜瓜^[21]中也有同样现象,表明 Tau 可能是辣椒中最早的亚组。

在植物中,不同 *GST* 亚家族间基因内含子数量和长度都有很大不同,例如在番茄和马铃薯中 *GST* 最多包含 9 个内含子,而在花生^[22]和大白菜^[23]中内含子的最大数量为 18 个和 14 个。辣椒

GST 蛋白的分子大小、等电点存在明显差异,不同亚组间内含子数量相差也较大,最多包含 8 个内含子,有 13 个基因不包含内含子,这些差异可能与基因功能多样性相关联^[24]。前人研究表明,内含子在真核生物中的演化可以增强基因表达^[25-26],辣椒 *GST* 基因中内含子-外显子高度异化表明辣椒 *GST* 基因功能发生了分化。

辣椒 *GST* 基因大多数在不同组织、器官和发育阶段都不表达或表达量较低,部分成员则表现出高度组织特异性,如 Tau 亚组中的 *CaGSTU46* 在根部和胎座中表达水平较高,*CaGSTU11*、*CaGSTU16* 和 *CaGST51* 只有在根部特异性表达,*CaGSTU7* 在茎、叶、果皮和胎座中表达水平较高,授粉 6 d 后,*CaGSTU18* 在果皮和胎座有特异性表达;Phi 亚组除 *CaGSTF3* 在果皮后期和胎座前期表达量高之外,其余成员在不同组织和发育阶段不表达或弱表达;Lambda 亚组中 *CaGSTL1* 和 *CaGSTL4* 在根部高表达,*CaGSTL3* 则在胎座中期表达;其他亚组成员如 *CaGSTZ1* 和 *CaEF11* 在不同组织、果皮和胎座发育阶段表达量较高,且后期表达量高于前期,其可能参与辣椒生长发育及花色素积累。在其他作物中, Tau 亚家族不同组织表达模式基本类似,如高粱中的 37 个 Tau *GST* 基因中,9 个基因普遍表达在各组织中,10 个表现出根特异性,2 个仅在叶片中表达^[27];在向日葵已鉴定的 14 个成员中,6 个主要在叶片中表达,4 个在种子中表达,2 个在花和根中表达^[28]。其他亚组的基因如 *NtGSTZ1* 在烟草植株中根的表达量高于叶,茎的表达量最低,*NtGSTF4*、*NtGSTT2* 和 *NtGSTU40* 在根、茎、叶 3 种组织中均展现出较高的表达水平,*NtGSTU40* 尤为显著,其表达模式更倾向于在根部富集^[29]。通过以上结果可以推测,不同 *GST* 可能在同一器官不同发育时期或同一组织中具有特异性调控。

GST 基因家族还可以响应各种非生物胁迫,如干旱、低温、高温、盐等。Chan 等^[30]在大豆中发现盐胁迫能够显著上调 *GSTL1* 表达,过表达 *GmGSTL1* 可明显降低活性氧积累水平;盐和干旱胁迫能够诱导 *AtGSTU19*,过表达 *GSTU19* 可显著增强植株抗氧化酶活性和脯氨酸含量^[31]; *JrGSTT1* 通过保护氧化酶、清除 ROS 和提高几个胁迫相关基因表达,增强核桃抗寒性^[32]。在辣椒中也得到 4 个响应逆境胁迫的代表性基因,如 *GaGSTU14*、*CaMGST1*、*CaTCHQD1* 和 *CaGSTF3*,它们分别对低温、高温、盐和干旱有显著表达,其中 *GaGSTU14*、*CaGSTF3*

同时参与低温胁迫和干旱胁迫,以上结果表明辣椒 GST 基因家族可能在辣椒抗逆过程中也发挥重要作用。

4 结 论

用生物信息学方法在辣椒‘CM334’中共鉴定出 72 条 GST 基因,初步研究了该家族成员的结构

和功能,发现 Tau 可能是辣椒中最早的亚家族, *CaGSTZ1* 在果实发育阶段起重要作用, *CaGSTU14*、*CaGSTF3* 基因可能是辣椒抵抗高温和低温的关键基因。以上结果将为深入研究辣椒 *CaGST* 基因功能和蔬菜抗逆分子育种提供理论依据和基因资源,也为研究辣椒抗逆性提供新思路。

参考文献:

- [1] 胡华冉, 杜磊, 张芮豪, 等. 辣椒适应非生物胁迫的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(12): 58-72.
HU H R, DU L, ZHANG R H, *et al.* Research progress in the adaptation of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) to abiotic stress[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(12): 58-72.
- [2] ABDUL KAYUM M, NATH U K, PARK J I, *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression profiling of glutathione S-transferase (GST) family in pumpkin reveals likely role in cold-stress tolerance[J]. *Genes*, 2018, 9(2): 84.
- [3] HERNÁNDEZ ESTÉVEZ I, RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ M. Plant glutathione S-transferases: An overview[J]. *Plant Gene*, 2020, 23: 100233.
- [4] LIU Y J, HAN X M, REN L L, *et al.* Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(2): 773-786.
- [5] KUMAR S, TRIVEDI P K. Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 751.
- [6] SHI H Y, LI Z H, ZHANG Y X, *et al.* Two pear glutathione S-transferases genes are regulated during fruit development and involved in response to salicylic acid, auxin, and glucose signaling[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89926.
- [7] LIU L B, ZHENG S X, YANG D K, *et al.* Genome-wide in silico identification of glutathione S-transferase (GST) gene family members in fig (*Ficus carica* L.) and expression characteristics during fruit color development[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e14406.
- [8] XU J, XING X J, TIAN Y S, *et al.* Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136960.
- [9] GALLÉ Á, CSISZÁR J, SECENJI M, *et al.* Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(17): 1878-1891.
- [10] DONG Y T, LI C, ZHANG Y, *et al.* Glutathione S-transferase gene family in *Gossypium raimondii* and *G. arboreum*: Comparative genomic study and their expression under salt stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 139.
- [11] SHARMA R, SAHOO A, DEVENDRAN R, *et al.* Over-expression of a rice tau class glutathione S-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92900.
- [12] PÉREZ-DÍAZ R, MADRID-ESPINOZA J, SALINAS-CORNEJO J, *et al.* Differential roles for VviGST1, VviGST3, and VviGST4 in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1166.
- [13] 尹雨钦, 徐欢欢, 唐丽萍, 等. 不结球白菜 GST 基因家族的全基因组鉴定及花青素相关基因 *BcGSTF6* 的功能分析[J]. 中国农业科学, 2024, 57(16): 3234-3249.
YIN Y Q, XU H H, TANG L P, *et al.* Genome-wide identification of GST gene family and functional analysis of the *BcGSTF6* gene related to anthocyanin in pak choi[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2024, 57(16): 3234-3249.
- [14] KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [15] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [16] KIM S, PARK M, YEOM S I, *et al.* Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 270-278.
- [17] DING N, WANG A M, ZHANG X J, *et al.* Identification and analysis of glutathione S-transferase gene family in

- sweet potato reveal divergent GST-mediated networks in aboveground and underground tissues in response to abiotic stresses[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 225.
- [18] ISLAM S, RAHMAN I A, ISLAM T, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *glutathione S-transferase* gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187504.
- [19] 王艳红, 席克勇, 田野, 等. 姜 GST 基因家族成员鉴定与表达分析[J]. *园艺学报*, 2024, 51(8): 1803-1822.
- WANG Y H, XI K Y, TIAN Y, *et al.* Identification and expression pattern analysis of GST in *Zingiber officinale*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, 51(8): 1803-1822.
- [20] ISLAM S, SAJIB S D, JUI Z S, *et al.* Genome-wide identification of *glutathione S-transferase* gene family in pepper, its classification, and expression profiling under different anatomical and environmental conditions [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 9101.
- [21] WANG J R, ZHANG Z D, WU J H, *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression analysis related to autotoxicity of the GST gene family in *Cucumis melo* L. [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 155: 59-69.
- [22] 王通, 迟晓元, 王冕, 等. 花生 GSTs 家族基因的全基因组分析[J]. *花生学报*, 2019, 48(4): 25-34.
- WANG T, CHI X Y, WANG M, *et al.* Comprehensive genome-wide analysis of GSTs gene family in peanut[J]. *Journal of Peanut Science*, 2019, 48(4): 25-34.
- [23] DU J T, REN J, YE X, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the glutathione S-transferase (GST) family under different developmental tissues and abiotic stresses in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)[J]. *PeerJ PrePrints*, 2018, 6: e26629v1.
- [24] ISLAM M S, CHOUDHURY M, MAJLISH A N K, *et al.* Comprehensive genome-wide analysis of *glutathione S-transferase* gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.) and their expression profiling in various anatomical tissues and perturbation conditions[J]. *Gene*, 2018, 639: 149-162.
- [25] EMAMI S, ARUMAINAYAGAM D, KORF I, *et al.* The effects of a stimulating intron on the expression of heterologous genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(5): 555-563.
- [26] SHAUL O. How introns enhance gene expression[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2017, 91: 145-155.
- [27] CHI Y H, CHENG Y S, VANITHA J, *et al.* Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione S-transferase family in *Sorghum* and other higher plants[J]. *DNA Research*, 2011, 18(1): 1-16.
- [28] MA L G, ZHANG Y H, MENG Q L, *et al.* Molecular cloning, identification of GSTs family in sunflower and their regulatory roles in biotic and abiotic stress[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2018, 34(8): 109.
- [29] MO Z J, HUANG Y, PU T, *et al.* Genome-wide identification and characterization of *glutathione S-transferases* (GSTs) and their expression profile under abiotic stresses in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 341.
- [30] CHAN C, LAM H M. A putative lambda class glutathione S-transferase enhances plant survival under salinity stress [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2014, 55(3): 570-579.
- [31] XU J, TIAN Y S, XING X J, *et al.* Over-expression of *AtGSTU19* provides tolerance to salt, drought and methyl viologen stresses in *Arabidopsis*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2016, 156(2): 164-175.
- [32] YANG G Y, XU Z G, PENG S B, *et al.* In planta characterization of a tau class *glutathione S-transferase* gene from *Juglans regia* (JrGSTTau1) involved in chilling tolerance [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(3): 681-692.