

# 栽培型与野生型辣椒 *HAK/KUP/KT* 基因家族的进化分析

司伟娜<sup>1,2</sup>, 孙毅<sup>1,2</sup>, 李晓玉<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学作物抗逆育种与减灾国家地方联合工程实验室, 合肥 230036)

**摘要:** *HAK/KUP/KT* 家族是一类重要的钾转运蛋白家族。利用生物信息学手段对栽培型及墨西哥野生型辣椒全基因组范围内的 *HAK/KUP/KT* 基因成员进行鉴定及分析, 比较两者在数目、复制类型及组织表达模式等方面的差异。发现 2 种辣椒中 *HAK/KUP/KT* 家族成员分别为 24 和 22 个, 且在染色体上呈不均衡分布。基因复制类型分析发现, *HAK/KUP/KT* 家族成员中存在片段重复和串联重复, 且纯化选择是该家族进化的主要动力。组织表达分析显示, 辣椒 *HAK/KUP/KT* 基因间的表达模式存在差异, 暗示辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族成员在功能上的多样性, 并为后续发掘有益的钾转运基因提供了重要的理论依据。

**关键词:** 辣椒基因组; *HAK/KUP/KT* 钾离子转运蛋白家族; 进化分析

中图分类号: S641.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0753-09

## Evolutionary analysis of *HAK/KUP/KT* gene family in cultivated and wild peppers

SI Weina<sup>1,2</sup>, SUN Yi<sup>1,2</sup>, LI Xiaoyu<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. National Engineering Laboratory of Crop Stress Resistance Breeding, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** The *HAK/KUP/KT* gene family members are important potassium transporters. In the present study, bioinformatics methods were utilized to genome-widely identify and analysis *HAK/KUP/KT* gene members in one cultivated and wild peppers (*Capsicum annuum*, *C. annuum*), with copy number comparison, duplication modes estimation and tissue-specific analysis. As a result, 24 and 22 *HAK/KUP/KT* genes were identified in the cultivated (*C. annuum* cv. Zunla-1) and Mexico wild (*C. annuum* var. *glabriusculum*) peppers, respectively, both unevenly distributed in the chromosomes. Duplication modes detection showed that segment and tandem repeat duplication could be found in the *HAK/KUP/KT* family. Furthermore, these duplicated gene pairs suffered purifying selection. Finally, expression profile analysis exhibited that gene expression patterns of *HAK/KUP/KT* members were different in peppers, which strongly implied their functional diversity. The above results may provide an important theoretical basis for exploring the beneficial potassium transfer proteins in peppers.

**Key words:** capsicum genome; *HAK/KUP/KT* potassium transporters family; homologous analysis

钾离子 ( $K^+$ ) 作为植物体内含量最丰富的无机一价阳离子, 可占植物干重 3%~5%。钾离子可维持电荷平衡及硝酸盐和糖的转运, 调控气孔运动、蛋白合成、酶活性、光合作用及细胞伸长等多种植物生理生化过程<sup>[1-4]</sup>。植物主要通过钾离子通道和转运载体完成对钾离子的吸收、转运与分配<sup>[5]</sup>, 涉及到多种吸收及转运机制<sup>[2]</sup>。其中, *KUP/HAK/KT* (High Affinity  $K^+$  transporters) 家族是植物中最早被发现, 且数目最多、功能丰富的钾离子跨膜转运

蛋白家族, 该家族成员在微生物及各类植物物种中广泛存在<sup>[4]</sup>。

植物基因组中, 含有较多的 *HAK/KUP/KT* 家族成员<sup>[4]</sup>。根据 *HAK/KUP/KT* 基因序列同源性, 可将 *HAK/KUP/KT* 家族划分为 4 个不同的亚家族: Cluster I、Cluster II、Cluster III 和 Cluster IV。且研究表明, *HAK/KUP/KT* 家族成员的表达模式存在差异, 具有特异性的功能特性。Cluster I 成员多为典型的高亲和性钾转运体, Cluster II 中 *KUP/HAK/KT*

收稿日期: 2018-07-16

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0300300) 和安徽高校自然科学研究重点项目 (KJ2017A147) 共同资助。

作者简介: 司伟娜, 博士, 讲师。E-mail: Weinas@ahau.edu.cn

\* 通信作者: 李晓玉, 博士, 副教授。E-mail: lixiaoyu@ahau.edu.cn

蛋白则主要为低亲和性钾转运体, Cluster III和 Cluster IV成员则为高亲和性钾转运体<sup>[6]</sup>。

*HAK/KUP/KT* 家族基因在植物的各个组织器官中都有表达, 暗示它们参与植株的多种生理过程<sup>[7]</sup>。部分 *HAK/KUP/KT* 家族成员与植物生长发育相关。拟南芥植株敲除 *AtKT/KUP2(shy3-1)* 基因, 由于细胞变小可产生植株矮化表型<sup>[8]</sup>。水稻 *OsHAK1* 在  $K^+$  饥饿水稻植株中高表达, *OsHAK1* 抑制表达可抑制根和芽的伸长<sup>[9]</sup>。*HAK/KUP/KT* 家族基因的表达也与非生物胁迫相关, 参与植物响应逆境胁迫的生理过程。干旱条件下, *KUP6* 蛋白可被蛋白激酶 *SRK2E/OST1* 磷酸化而活化, 活化的 *KUP6* 蛋白进一步介导信号使气孔关闭, 减少植物在干旱胁迫下水分的持续流失<sup>[10]</sup>。水稻 *OsHAK1* 基因可被盐及低钾胁迫诱导表达, 并通过调节  $K^+$  吸收及  $K^+ / Na^+$  比例提高植物对盐胁迫的能力<sup>[9]</sup>。*HAK/KUP/KT* 家族基因在植物信号传导中也发挥重要作用, 如具有  $K^+$  高亲和力的一些 *HAK/ KT* 转运蛋白, 包括 *AtKUP1*、*AtKUP4* 及 *AtHAK5*。其中拟南芥 *AtHAK5* 在  $K^+$  不足时通过激活乙烯信号途径, 正调控植物体内活性氧的积累。乙烯和活性氧的产生既可刺激主根的生长, 也可反馈调控 *AtHAK5* 和其他高亲和  $K^+$  转运载体基因的表达, 响应低钾环境以增强细胞对  $K^+$  的吸收和植物抗逆性<sup>[11-14]</sup>。

辣椒是一种茄科辣椒属植物, 它的果实因果皮含有辣椒素而有辣味。辣椒的维生素 C 的含量在蔬菜中居第一位, 具有很高的营养价值和药用价值。近年来, 栽培型辣椒遵辣一号 (*C. annuum* cv. Zunla-1) 与墨西哥野生型 Chiltepin (*C. annuum* var. *glabriusculum*) 的全基因组序列已测序完成<sup>[15]</sup>, 这为辣椒重要功能基因的遗传进化分析及功能预测提供了重要数据基础。本研究拟以在植物体中发挥多种重要功能的 *HAK/KUP/KT* 家族成员作为研究对象, 在已测序的栽培型及野生型辣椒全基因组范围, 鉴定获得 *HAK/KUP/KT* 家族基因, 分析它们的染色体定位分部特征、基因结构、进化关系及组织表达模式等, 为深入解析辣椒栽培型与野生型中 *HAK/KUP/KT* 家族成员的作用与功能提供前期理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

栽培型辣椒遵辣一号 (*C. annuum* cv. Zunla-1) 以及墨西哥野生型辣椒 Chiltepin (*C. annuum* var. *glabriusculum*) 全基因组蛋白、蛋白编码区序列及注释文件, 均下载于辣椒基因组信息数据库 ([http://](http://peppersequence.genomics.cn/)

[peppersequence.genomics.cn/](http://peppersequence.genomics.cn/))<sup>[15]</sup>。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 及番茄 (*tomato*) 的全基因组蛋白、蛋白编码区序列及注释文件, 均从 phytozome 网站下载。

### 1.2 栽培型及野生型辣椒基因组, 以及拟南芥和番茄中 *HAK/KUP/KT* 基因的筛选和鉴定

在本地服务器, 利用 Perl 程序 *pfam\_scan.pl* 分别对 4 个基因组中所有蛋白, 利用 *pfam* (<http://pfam.janelia.org/>) 本地数据库进行比对, 选取含有 *K\_trans* (PF02705.15) 结构域的蛋白作为 *HAK/KUP/KT* 家族成员。

### 1.3 *HAK/KUP/KT* 家族基因定位、复制类型分析及选择作用力分析

根据 1.1 中下载得到的基因组注释文件, 提取栽培型及野生辣椒中 *HAK/KUP/KT* 基因在染色体上的位置信息, 使用在线网站 *MapInspect* ([http://www.plantbreeding.wur.nl/uk/software\\_mapinspect.htm](http://www.plantbreeding.wur.nl/uk/software_mapinspect.htm)) 构建栽培型及野生辣椒 *HAK/KUP/KT* 基因的染色体物理定位图谱。

基因复制类型的确定: 片段重复 (segmental duplication) 是根据 *MCSanX*<sup>[16]</sup> 软件获得; 串联重复则定义为在染色体 250 kilobase (kb) 片段内分布的 *HAK/KUP/KT* 基因。大片段重复及串联重复产生的 *HAK/KUP/KT* 分别计算同义突变率 (synonymous substitution ratio, *Ka*)、非同义突变率 (non-synonymous substitution ratio, *Ka*) 以及二者比值。具体方法为: 提取基因对成员的编码区核苷酸序列, 翻译为蛋白序列后利用 *Clustalw2* 排序, 排序后的蛋白序列重新转换为核苷酸序列得到排序后的核苷酸序列。排序的核苷酸序列利用 *DnaSP6* 计算 *Ka*、*Ks* 以及 *Ka/Ks* 的值。

### 1.4 辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族成员的系统进化分析

利用鉴定得到的栽培型及野生辣椒种中 *HAK/KUP/KT* 家族基因的蛋白质序列, 并以拟南芥及番茄中 *HAK/KUP/KT* 成员的蛋白序列作为参照, 构建栽培型及野生辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族成员的系统进化树。首先, 所有蛋白序列用 *MAFFT* 在线网站对序列进行排序 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>), 参数为默认参数; 排好序的序列用 *Trimal* 软件去掉排序质量差的片段, 并利用文献报道的最适于邻接法 (neighbor-joining, NJ) 系统进化树构建的参数: *-strictplus*<sup>[17]</sup>; 最终获得的排好序的蛋白序列利用 *MEGA v7.0* 利用邻接法构建系统进化树, 枝自展值 (bootstrap values) 重复 1 000 次。进化树中不同亚组颜色分类利用 *CoreldrawX7* 完成。

## 1.5 HAK/KUP/KT 家族成员保守序列和基因结构分析

根据 1.1 中下载得到的栽培型及野生型辣椒中基因注释信息, 利用在线工具 GSDS 绘制 HAK/KUP/KT 类型基因的结构图。MEME suit 是可以鉴定出多个蛋白质氨基酸序列共有的保守序列的在线网站。将栽培辣椒遵辣一号及野生型辣椒 Chiltepin 的 HAK/KUP/KT 家族所有成员的氨基酸序列, 在 meme 网站上提交, 使用默认参数设置: motif 数量为 18, motif 长度为 6~50, 获取 XML 格式的结果文件, 使用 TBtools 软件获取 XML 文件中的 motif 结果。

## 1.6 转录组数据分析

下载栽培型辣椒 (*C. annuum* L.Zunla-1) 不同组织的转录组数据<sup>[15]</sup>, 以 RPKM (reads per kilobases

per million reads) 值比较基因在根、茎、叶、花和果实中的表达丰度, 热图的绘制采用 R 语言的 heatmap.2 包。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒 HAK/KUP/KT 家族成员的鉴定

通过 Pfam 蛋白数据进行查询和比对, 根据 K\_trans (PF02705) 结构是否存在, 分别从辣椒栽培型 (*C. annuum* L.Zunla-1) 与野生型 Chiltepin (*C. annuum* var. *glabriusculum*) 全基因中鉴定得到 24 个和 21 个 HAK/KUP/KT 基因, 鉴定得到的基因序列号, 染色体位置和 K\_trans 结构域等相关信息如表 1 和表 2 所示。利用相同的方法, 也从拟南芥及番茄基因组中鉴定得到 HAK/KUP/KT 基因成员, 用于后续进化分析。

表 1 栽培型辣椒基因组 HAK/KUP/KT 家族基因信息

Table 1 Information of HAK/KUP/KT family members in the Cultivated pepper genome.

基因编号	染色体定位	阈值	结构域	结构域范围
Gene accession No.	Chromosome_location	E-value	Domain name	Domain_location
Capana00g000376	237 843 848~237 847 556	7.1E-63	K_trans	104~274
Capana00g001534	402 402 149~402 403 589	4.80E-08	K_trans	172~243
Capana01g003722	240 618 873~240 624 861	1.6E-191	K_trans	2~534
Capana02g000108	16 812 740~16 817 165	3.3E-106	K_trans	2~272
Capana02g000266	34 331 811~34 332 728	3.80E-29	K_trans	395~534
Capana02g000269	34 367 314~34 368 321	1.10E-23	K_trans	2~69
Capana02g001197	114 112 507~114 124 968	8.6E-105	K_trans	1~169
Capana02g003479	161 248 549~161 254 535	1.4E-194	K_trans	2~534
Capana03g001612	30 697 946~30 706 979	2E-158	K_trans	2~534
Capana03g003588	229 947 305~229 957 491	2.1E-124	K_trans	145~534
Capana03g003590	230 093 236~230 095 756	9.7E-63	K_trans	113~275
Capana03g003595	230 372 526~230 376 651	1.4E-92	K_trans	1~272
Capana03g003596	230 378 491~230 383 952	1.2E-197	K_trans	1~534
Capana05g000760	29 310 086~29 318 151	5.7E-191	K_trans	2~534
Capana05g001319	104 856 440~104 871 882	9.3E-102	K_trans	1~272
Capana06g002125	92 257 834~92 265 150	2E-195	K_trans	2~534
Capana07g002023	211 476 404~211 477 881	3.5E-41	K_trans	349~534
Capana08g002024	140 039 921~140 049 723	5E-167	K_trans	1~534
Capana09g000563	22 306 952~22 309 487	2.7E-78	K_trans	274~534
Capana09g000564	22 360 329~22 369 218	1.8E-189	K_trans	1~534
Capana10g000624	32 320 493~3 232 125	2.20E-19	K_trans	242~321
Capana11g001348	160 734 073~160 738 756	2.2E-102	K_trans	1~273
Capana11g001355	160 904 548~160 909 559	2.6E-139	K_trans	130~534
Capana12g000403	8 067 880~8 071 114	2E-84	K_trans	13~274

### 2.2 辣椒 HAK/KUP/KT 家族基因的染色体定位

为了直观地了解 HAK/KUP/KT 家族基因在辣椒染色体上的分布, 分别获得了 24 个栽培型辣椒与 21 个野生型辣椒中 HAK/KUP/KT 基因的染色体物理位置图谱 (图 1)。发现栽培型辣椒与野生型辣

椒 HAK/KUP/KT 基因在染色体上是呈不均匀分布。不论是栽培型还是野生型辣椒, 它们的 4 号染色体上均未发现 HAK/KUP/KT 基因。其他的 11 条染色体上, 2 种辣椒都为 3 号染色体上的 HAK/KUP/KT 基因的数目最多, 栽培型辣椒有 5 个、野生型辣椒

有4个, 1、2、5、6、7、8、9、10、11和12号染色体上的基因数量为1~3个。此外, *HAK/KUP/KT* 基因在染色体上的位置分布不均匀, 多数基因分布在染色体的两端, 而靠近着丝粒部分的基因较少。在栽培型辣椒中, 2、3、9、11号染色体上的基因

形成了4个基因簇, 墨西哥野生型辣椒中2、3和11中的基因形成了3个基因簇。这可能与基因在染色体上的复制有关。所以, 接下来探究了 *HAK/KUP/KT* 家族成员的复制事件。

表2 墨西哥野生型辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族基因信息

Table 2 Information of *HAK/KUP/KT* family members in the wild pepper genome

基因编号 Gene accession No.	染色体定位 Chromosome_location	阈值 E-value	结构域 Domain name	结构域范围 Domain_location
Capang00g003907	674 164 093~674 165 079	2E-77	K_trans	273~534
Capang01g002990	226 033 798~226 049 493	9.3E-102	K_trans	1~272
Capang01g004586	322 082 996~322 092 977	4.7E-168	K_trans	1~534
Capang02g000117	1 7952 353~17 959 652	1.9E-191	K_trans	2~534
Capang02g001043	107 388 329~107 405 761	7.50E-26	K_trans	395~534
Capang02g001118	111 776 754~111 789 188	6.7E-193	K_trans	1~534
Capang02g003203	160 189 201~160 195 060	1.3E-194	K_trans	2~534
Capang03g001558	32 569 562~32 577 508	6.6E-159	K_trans	2~534
Capang03g003488	231 795 494~231 797 559	3.40E-39	K_trans	1~113
Capang03g003490	232 012 623~232 016 681	5.4E-189	K_trans	1~534
Capang03g003496	232 284 317~232 289 105	1.6E-198	K_trans	1~534
Capang05g000647	25 822 731~25 831 353	6.2E-191	K_trans	2~534
Capang06g001948	82 446 466~82 453 782	2E-195	K_trans	2~534
Capang07g000427	25 915 203~25 915 679	4.30E-18	K_trans	34~113
Capang08g000673	33 667 724~33 674 241	1.6E-191	K_trans	2~534
Capang09g000499	20 463 185~20 472 255	1.6E-189	K_trans	1~534
Capang10g000477	28 685 420~28 686 151	1.80E-24	K_trans	236~321
Capang11g001327	173 903 499~173 906 982	3.4E-188	K_trans	1~534
Capang11g001333	174 064 279~174 071 993	7.6E-191	K_trans	2~534
Capang12g000333	7 706 859~7 710 131	7.2E-182	K_trans	2~534
Capang12g002570	196 787 166~196 788 670	2.20E-07	K_trans	173~222

表3 辣椒中 *HAK/KUP/KT* 复制基因对的分子进化速率

Table 3 Estimation of molecular evolutionary rate for selective duplicated *HAK/KUP/KT* gene pairs in peppers

复制基因对 Duplicated gene pairs	非同义突变频率 Ka	同义突变频率 Ks	非同义替换与 同义替换比值 Ka/Ks	复制类型 Duplication type	选择模式 Selection type
Capana02g003479 vs Capana11g001355	0.148 0	2.712 8	0.054 556 178	大片段复制 Segmental	纯化选择 Purifying
Capana03g003588 vs Capana03g003590	0.114 7	0.319 9	0.358 549 547	串联复制 Tadem	纯化选择 Purifying
Capana09g000563 vs Capana09g000564	0.168 3	0.524 7	0.320 754 717	串联复制 Tadem	纯化选择 Purifying
Capana03g003595 vs Capana03g003596	0.198 5	0.820 9	0.241 807 772	串联复制 Tadem	纯化选择 Purifying
Capang11g001333 vs Capang02g003203	0.146 6	2.579 8	0.056 800 000	大片段复制 Segmental	纯化选择 Purifying
Capang03g003488 vs Capang03g003490	0.103 8	0.366 3	0.283 400 000	串联复制 Tadem	纯化选择 Purifying

### 2.3 辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族成员的复制分析

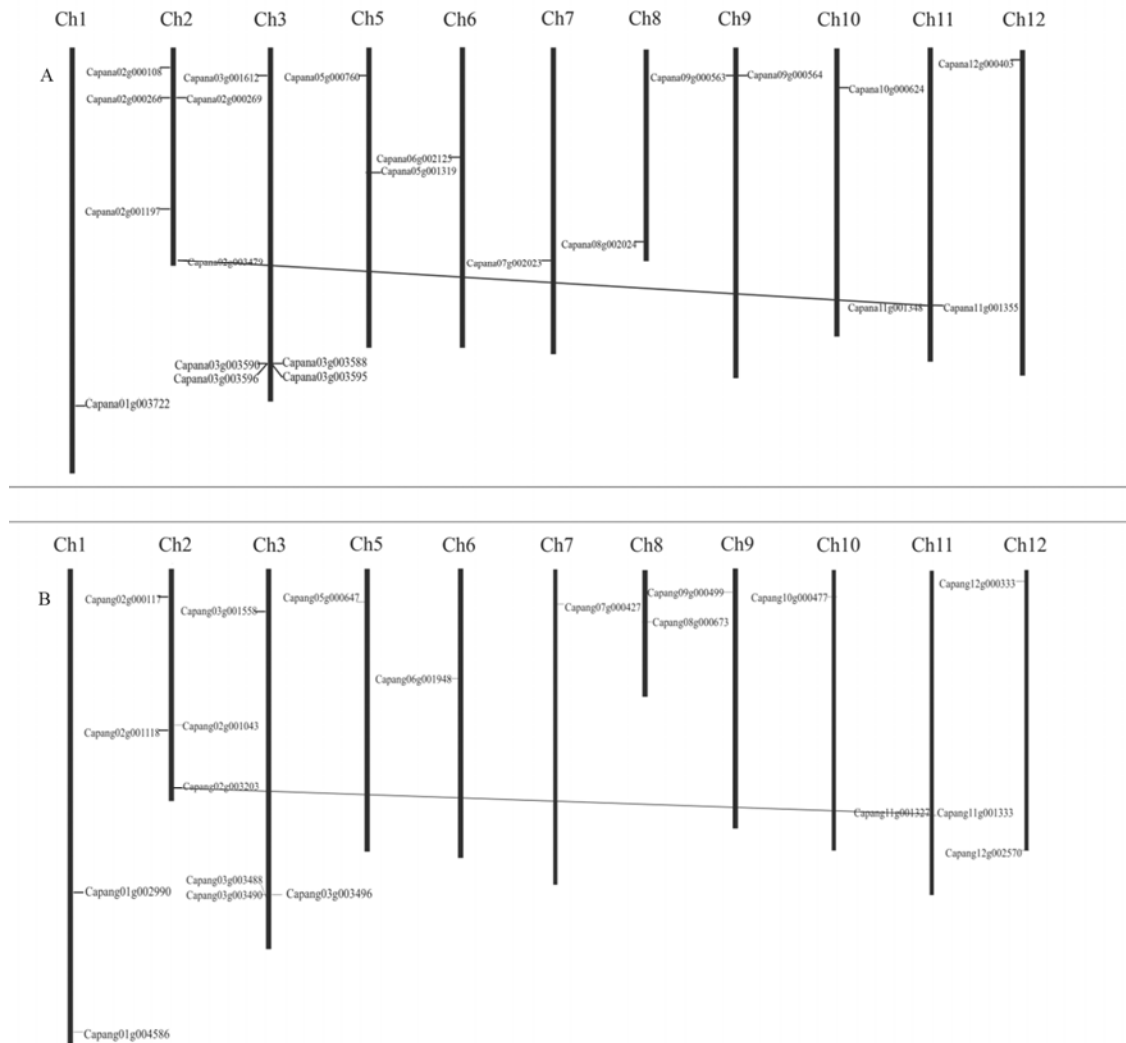
基因重复事件是涉及基因家族扩张的重要事件, 主要包括串联和大片段重复。为了探究栽培型与野生型辣椒中 *HAK/KUP/KT* 家族成员涉及到的

大片段重复事件, 利用了 MCScanX 软件, 并定义分布在 250 kb 范围内的同源基因为串联重复产生的 *HAK/KUP/KT* 基因。最终, 鉴定得到 12 个基因参与基因的复制事件 (表 3)。其中, 位于 2 号染色

体与 11 号染色体上的 2 对基因 *Capana02g003479* 和 *Capana11g001355*、*Capang11g001333* 和 *Capang02g003203* 为大片重复; 另外 4 对基因为串联重复。并且, 栽培型辣椒中有 3 个串联重复基因对, 而野生型辣椒中则仅含有 1 个串联重复基因对; 而两种辣椒种都只分别只含有 1 对大片重复的同源基因。

$Ka/Ks$  是常用遗传进化参数, 通常当  $Ka/Ks < 1$ ,

则认为基因经历纯化选择;  $Ka/Ks > 1$ , 则认为同源基因间经历正选择。本研究也进一步通过对 2 种辣椒中串联重复及大片重复的 *HAK/KUP/KT* 基因间  $Ka$ 、 $Ks$  及  $Ka/Ks$  的计算, 判断这些基因在进化过程所经受的选择作用力。结果表明, 不论是串联重复或大片重复产生的 *HAK/KUP/KT* 基因, 它们的  $Ka/Ks$  值都小于 1, 可以得出结论纯化选择是这些辣椒 *HAK/KUP/KT* 基因进化的主要动力。



A. 栽培型辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族基因在染色体上的分布; B. 野生型辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族基因在染色体上的分布

A. Chromosomal distribution of *HAK/KUP/KT* family members in the cultivated pepper; B. Chromosomal distribution of *HAK/KUP/KT* family members in the wild pepper

图 1 *HAK/KUP/KT* 基因家族成员在栽培型及野生型辣椒基因组的分布

Figure 1 Chromosomal distribution of *HAK/KUP/KT* family members in cultivated and wild peppers

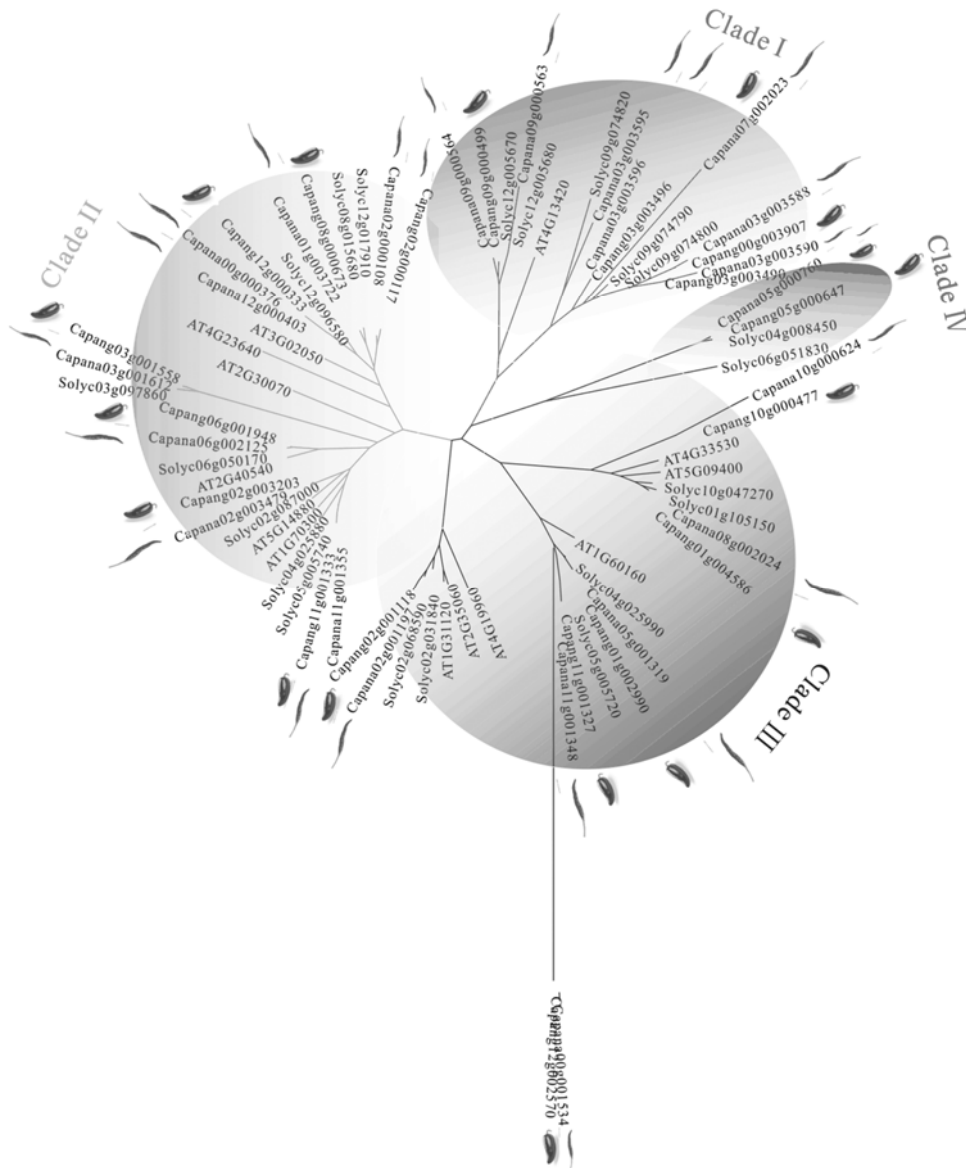
## 2.4 辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族进化树分析

利用 MEGA7.0 软件对本研究鉴定得到的 13 个拟南芥、21 个番茄和 24 个遵辣一号椒栽培型 (*C. annuum* L.Zunla-1) 和 21 个辣椒墨西哥野生型 Chiltepin (*C. annuum* var. *glabriusculum*) *HAK/KUP/KT* 家族基因氨基酸序列构建系统进化树 (图 2)。结果

分析表明: 所有的 79 个 *HAK/KUP/KT* 家族成员根据进化树的拓扑结构, 可以清晰的划分为 4 个亚组: Class I、Class II、Class III 和 Class IV。在这几个亚组中, Class IV 亚组中 *HAK/KUP/KT* 家族的成员数量最少, 且 Class IV 亚组中不包含拟南芥基因。并且可以看到 24 个遵辣一号辣椒栽培型 (*C. annuum*

L.Zunla-1) 和 21 个辣椒墨西哥野生型 Chiltepin (*C.annuum* var. *glabriusculum*) *HAK/KUP/KT* 家族基因在进化树上的位置是大多呈现两两成对分布,

互为同源基因对。这也说明该家族基因成员具有相似性和同源性, 为寻找功能相近基因提供依据。

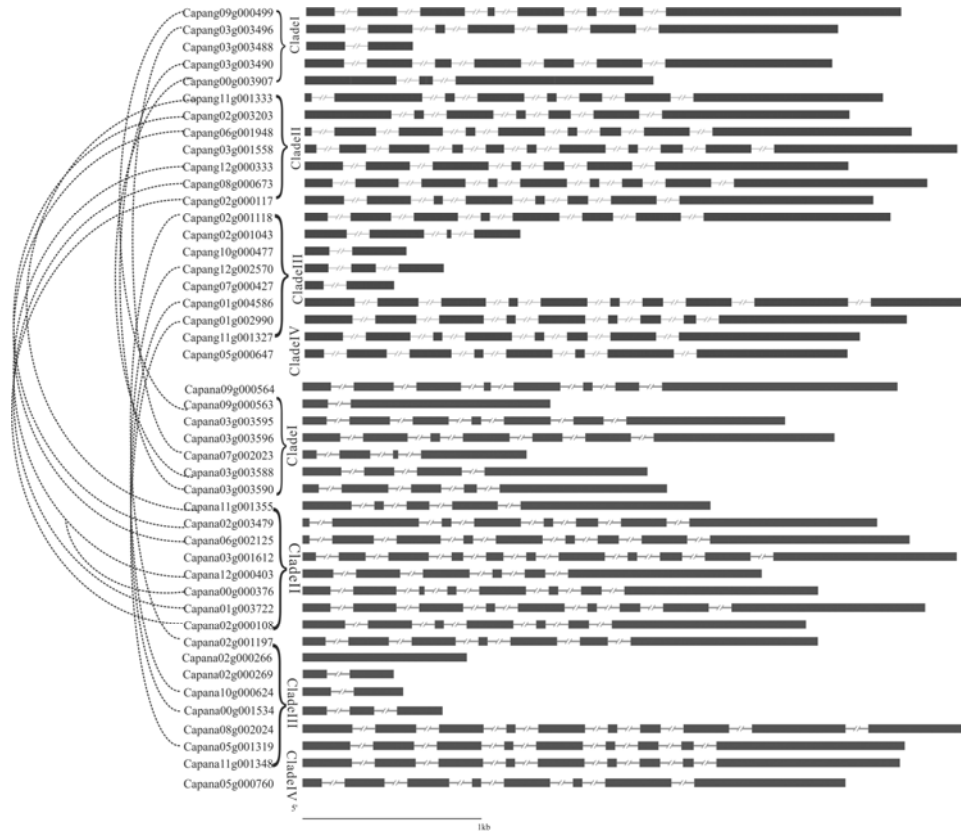


Capana:栽培型辣椒; Capang:野生型辣椒; AT: 拟南芥; Solyc:番茄  
 Capana:Cultivated pepper; Capang:wild pepper; AT: *Arabidopsis*; Solyc:tomato  
 图 2 辣椒遵辣一号及其野生型与番茄拟南芥 *HAK/KUP/KT* 基因的系统进化关系  
 Figure 2 The systematic evolutionary relationship of *HAK/KUP/KT* family in four species

2.5 辣椒 *HAK/KUP/KT* 内含子/外显子结构分析

根据辣椒基因组的注释文件获取注释信息, 利用 GSDS 在线网站绘制 *HAK/KUP/KT* 家族成员的外显子/内含子结构图 (图 3)。发现栽培型及其墨西哥野生型辣椒 *HAK/KUP/KT* 家族的基因结构包含 UTR 区及内含子/外显子区, 其中外显子与内含子区呈交替分布 (图 3)。不同 *HAK/KUP/KT* 亚族成员的内含子长度及位置存在较大差异, 内含子的数量也是相对保守的, 介于 1~10 个之间。其中,

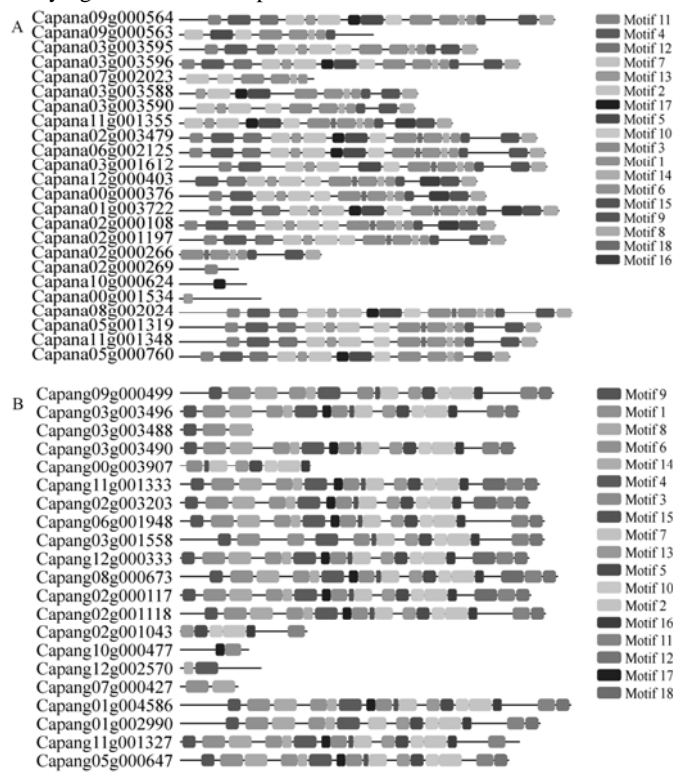
Capana03g001612 与 Capang03g001558 内含子数量最多, 均为 10 个, 且被聚为同一分支, 表明这两个基因的结构较为复杂。在 clade III 亚族中的基因 Capana02g000266 可能为假基因。从图 3 中可明显看出, 进化树上亲缘关系较近的遵辣一号栽培型 (*C.annuum* L.Zunla-1) 及其墨西哥野生型 Chiltepin (*C.annuum* var. *glabriusculum*) 成对基因的基因结构具有类似的分布模式, 这种同一物种内不同品种间基因结构的差异可能与其进化、分化相关。



方块代表外显子；线段代表内含子；Capang: 野生型辣椒；Capana: 栽培型辣椒  
Blue square represents exon; red line represents intron; Capang: the wild pepper; Capana: the cultivated pepper

图 3 辣椒 HAK/KUP/KT 家族成员系统发育关系及内含子-外显子结构

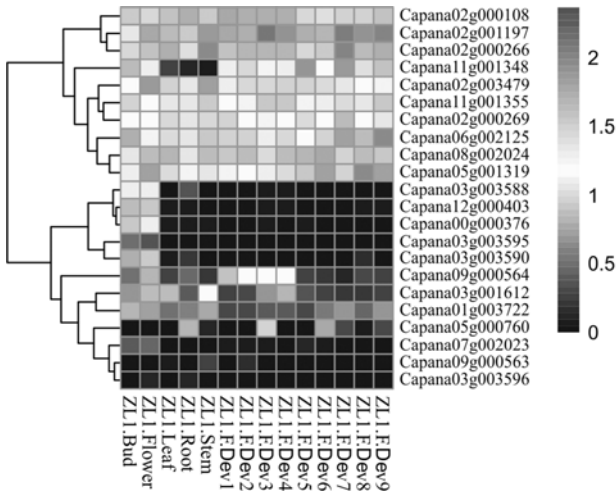
Figure 3 Phylogenetic relationship and intron-exon structure of HAK/KUP/KT family



A.栽培型辣椒；B.野生型辣椒 A.the cultivated pepper; B.the wild pepper

图 4 遵辣一号栽培型辣椒与墨西哥野生型辣椒 HAK/KUP/KT 家族成员保守基序分析

Figure 4 The motif analysis of HAK/KUP/KT family members in the cultivated and wild peppers



ZL1.遵辣1号; Bud.花芽; Flower.花; Leaf: 叶; Stem.茎干; F-Dev1.果实长度0~1 cm; F-Dev2.长度1~3 cm的果实; F-Dev3.长度3~4 cm的果实; F-Dev4.长度4~5 cm的果实; F-Dev5.成熟绿色果实; F-Dev6.破色期果实; F-Dev7.破色期后3 d果实; F-Dev8.破色期后5 d果实; F-Dev9.破色期后7 d果实

ZL-1.Zunla-1; F-Dev1.fruit length of 0-1cm; F-Dev2.fruit length of 1-3cm; F-Dev3.fruit length of 3-4cm; F-Dev4.fruit length of 4-5cm; F-Dev5.mature green fruits; F-Dev6.breaker stage; F-Dev7.3 days after the breaker stage; F-Dev8.5 days after the breaker stage; F-Dev9.7 days after the breaker stage

图5 辣椒 HAK/KUP/KT 基因在不同组织中的表达模式  
Figure 5 The expression pattern of HAK/KUP/KT gene in different tissues

2.6 辣椒 HAK/KUP/KT 基因家族的保守序列分析

利用 MEME 在线工具对遵辣一号栽培型 (*C.annuum* L.Zunla-1) 与墨西哥野生型 Chiltepin (*C.annuum* var. *glabriusculum*) HAK/KUP/KT 基因进行了保守序列分析, 共得到 18 个保守基序。结果显示: HAK/KUP/KT 家族成员基本上都具有类似的基序和排列顺序。图 C 中墨西哥野生型 Chiltepin(*C.annuum* var. *glabriusculum*) 17 个基因同时含有 5 个相同的 motif 分别为 motif13、motif5、motif10、motif2 和 motif16; 图 5 中遵辣一号栽培型辣椒 (*C.annuum* L.Zunla-1) 21 个基因同时含 4 个相同的 motif, 分别为 motif3、motif1、motif14 和 motif6。

2.7 辣椒 HAK/KUP/KT 基因表达模式分析

进化树上, 辣椒栽培型与野生型基因是成对分布的。为了揭示 HAK/KUP/KT 家族基因在不同组织以及果实发育的不同阶段 (Dev1、Dev2、Dev3、Dev4、Dev5、Dev6、Dev7、Dev8 和 Dev9) 的表达模式, 本研究利用遵辣一号栽培型 (*C.annuum* L.Zunla-1) 的 RNA-seq 测序数据, 分析了 HAK/KUP/KT 基因的表达模式 (图 5)。结果显示, 在栽培行辣椒组织中

都高表达的基因大多是 clade II、clade III 亚族成员; clade I、clade IV 亚族除了基因 Capana09g000564 在根、花、芽及果实发育前期高表达, 其他的大多数基因是低表达或不表达的。

3 结论

本研究通过对辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 栽培品种及其墨西哥野生祖先种 Chiltepin 的 HAK/KUP/KT 家族进行生物信息学分析, 共鉴定得到 24 个栽培型辣椒与 21 个野生型辣椒 HAK/KUP/KT 家族成员, 即在 2 种辣椒种具有相似数目的 HAK/KUP/KT 蛋白。在 HAK/KUP/KT 家族成员的定位图谱中值得关注的是, 2 种辣椒中的 2 对基因 Capana08g002024 与 Capang01g004586、Capana05g001319 与 Capang01g002990 序列相似度很高, 初步推断该基因是在栽培驯化的过程中 Capang01g004586 由 1 号染色体转移到了 8 号染色体上变为 Capana08g002024, Capang01g004586 由 1 号染色体转移到了 5 号染色体上变为 Capana05g001319。

系统进化分析结果表明, 辣椒 HAK/KUP/KT 基因可分为 4 个不同的亚枝, 亚族 clade IV 中不包含拟南芥 HAK/KUP/KT 成员, 表明 clade IV 中的成员可能产生于茄科与十字花科分化之后, 为茄科所特有的 HAK/KUP/KT 基因。辣椒栽培型与野生型中独有 clade IV 亚族中存在的 2 个基因是位于 5 号染色体上 Capana05g000760 和 Capang05g000647, 它们可能与茄科一些特有的功能特点相关。辣椒栽培型与野生型间的基因都是成对分布在进化树上的, 大部分 (18 对) 都是直系同源基因对。虽然辣椒基因组大小是模式生物拟南芥基因组的 30 多倍 (3364 Mbp vs. 125 Mbp), 但两种辣椒中 HAK/KUP/KT 家族成员的数量却是拟南芥的 2 倍左右。说明 HAK/KUP/KT 家族成员的数目与基因组大小关系不大, 它在拟南芥与辣椒之间进化上比较保守。HAK/KUP/KT 家族进化上的保守性决定了它们亲缘关系较近的基因具有相同或类似的功能。在先前的研究中, HAK/KUP/KT 转运蛋白在整个植株中都有表达, 包括根、茎、叶。这个家族并不是简单的介导植物钾离子的吸收, 它可能在植物生命活动调控中参与更复杂的调控反应。在拟南芥中 AT2G40540 已被报道参与植物耐旱, 可以将 AT2G40540 的同源基因 Capana06g002125 和 Capang06g001948 作为参与辣椒栽培型与野生型耐旱调控相关的候选基因; 同理, 与基因 AT1G70300



亲缘关系较近的基因 Capang02g003203、Capana02g003479、Capang00g001333 及 Capana11g001355 也可以作为参与辣椒生长素运输相关的候选基因。

HAK/KUP/KT 在拟南芥的根、茎、叶、花及角果中均有表达<sup>[18]</sup>, 而其中某些成员只在特定的组织和发育时期表达。对 2 种辣椒的转录组数据分析, 也得到了类似的结果。在栽培型辣椒组织中都高表达的基因大多是 clade II 和 clade III 亚族的成员; clade I 和 clade IV 亚族除了基因 Capana09g000564 在根、花和果实发育前期中高表达, 其他的大多数基因是低表达或不表达的。这些结果表明, clade II 和 clade III 亚族的基因与辣椒植株正常的生理生化活动联系紧密。Clade III 亚族基因 Capana02g001197 在辣椒果实发育的不同阶段表达量是显著高于其他基因, 这表明该基因可能参与辣椒果实成熟过程中的相关调控过程。

最后, 辣椒栽培型与野生型 HAK/KUP/KT 家族成员中存在 4 对串联重复基因和 2 对大片段重复基因,  $Ka/Ks$  值均小于 1 表明纯化选择是辣椒 HAK/KUP/KT 基因进化的主要动力。根据先前的报道, 在植物进化过程, 不同复制类型保留的同源基因, 可能具有功能冗余、亚功能或者新功能化的作用<sup>[19]</sup>。研究得到的复制基因对, 不仅在系统进化树中具有相近的同源关系和相似的基因结构, 且具有相似的组织表达模式, 这些结果都暗示了这些复制产生基因间的功能冗余。

## 参考文献:

- [1] MA T L, WU W H, WANG Y. Transcriptome analysis of rice root responses to potassium deficiency[J]. BMC Plant Biol, 2012, 12(1):161.
- [2] AHN S J, SHIN R, SCHACHTMAN D P. Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in  $K^+$  uptake[J]. Plant Physiol, 2004, 134(3): 1135-1145.
- [3] PYO Y J, GIERTH M, SCHROEDER J I, et al. High-affinity  $K^+$  transport in *Arabidopsis*: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions[J]. Plant Physiol, 2010, 153(2): 863-875.
- [4] LI W H, XU G H, ALLI A, et al. Plant HAK/KUP/KT  $K^+$  transporters: Function and regulation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 74: 133-141.
- [5] YANG Z F, GAO Q S, SUN C S, et al. Molecular evolution and functional divergence of HAK potassium transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. J Genet Genomics, 2009, 36(3): 161-172.
- [6] GRABOV A. Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family - multiple functions[J]. Ann Bot, 2007, 99(6): 1035-1041.
- [7] ASHLEY M K, GRANT M, GRABOV A. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins[J]. J Exp Bot, 2006, 57(2): 425-436.
- [8] ELUMALAI R P, NAGPAL P, REED J W. A mutation in the *Arabidopsis* KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion[J]. Plant Cell, 2002, 14(1): 119-131.
- [9] CHEN G, HU Q D, LUO L, et al. Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges[J]. Plant Cell Environ, 2015,38(12):2747-2765.
- [10] OSAKABE Y, ARINAGA N, UMEZAWA T, et al. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2013, 25(2): 609-624.
- [11] KIM M J, CIANI S, SCHACHTMAN D P. A peroxidase contributes to ROS production during *Arabidopsis* root response to potassium deficiency[J]. Mol Plant, 2010, 3(2): 420-427.
- [12] JUNG J Y, SHIN R, SCHACHTMAN D P. Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2009,21(2):607-621.
- [13] KIM M J, RUZICKA D, SHIN R, et al. The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.11 modulates plant response to low-potassium conditions[J]. Mol Plant, 2012,5(5):1042-1057.
- [14] HONG J P, TAKESHI Y, KONDOU Y, et al. Identification and characterization of transcription factors regulating *Arabidopsis* HAK5[J]. Plant Cell Physiol, 2013, 54(9): 1478-1490.
- [15] QIN C, YU C S, SHEN Y O, et al. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014,111(14):5135-5140.
- [16] WANG Y, TANG H, DEBARRY J D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(7):e49
- [17] CAPELLA-GUTIERREZ S, SILLA-MARTINEZ J M, GABALDON T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses[J]. Bioinformatics, 2009,25(15):1972-1973.
- [18] 鲁黎明, 杨铁钊. 烟草钾转运体基因 NtHAK1 的克隆及表达模式分析[J]. 核农学报, 2011, 25(3): 469-476.
- [19] WANG Y P, WANG X Y, PATERSON A H. Genome and gene duplications and gene expression divergence: a view from plants[J]. Ann NY Acad Sci, 2012, 1256:1-14.