



牛佳斌,唐凯,夏迎萌,等. 辣椒 *NRT* 基因家族的系统鉴定、进化与表达分析[J]. 南京农业大学学报,2024,47(4):653-664.
NIU Jiabin,TANG Kai,XIA Yingmeng,et al. Identification, evolution and expression analysis of the *NRT* gene family in *Capsicum annuum*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(4):653-664.

辣椒 *NRT* 基因家族的系统鉴定、进化与表达分析

牛佳斌¹,唐凯¹,夏迎萌¹,刘同坤²,孙小川¹,段伟科¹,黄志楠^{1*}

(1.淮阴工学院生命科学与食品工程学院,江苏 淮安 223003;2.南京农业大学作物遗传与种质创新利用全国重点实验室/
农业农村部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室/园艺学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本研究旨在鉴定辣椒硝酸盐转运蛋白(*NRT*)基因家族成员,分析其基本性质、染色体定位、进化关系以及在不同组织、不同果实发育阶段和不同非生物胁迫下的表达特征。[方法]利用生物信息学方法在辣椒‘遵辣1号’基因组中鉴定 *NRT* 基因家族并分析其理化性质、基因结构、染色体定位、共线性、顺式作用元件分布和进化关系等;利用转录组数据分析辣椒 *NRT*(*CaNRT*)基因在不同组织和不同果实发育阶段中的表达特征,并利用 RT-qPCR 技术分析在不同非生物胁迫下的表达模式。[结果]辣椒中共包含 73 个 *CaNRT* 基因,不均匀分布在 10 条染色体上。系统进化分析表明,*CaNRT* 基因可分为 3 个亚家族,同一亚家族具有相似基因结构和保守基序。顺式作用元件分析结果表明 *CaNRT* 可能受光、激素、逆境胁迫等多种因素调控。*CaNRT1* 亚家族成员主要在根、茎、叶中表达量较高,*CaNRT2* 亚家族在任何时期表达量都较低,*CaNRT3* 亚家族存在组织表达差异性,主要在根中高表达。逆境胁迫数据表明,*CaNRT1.18*、*CaNRT3.3*、*CaNRT3.1*、*CaNRT2.1*、*CaNRT1.23* 在低温、高温、干旱、盐和氧化处理下明显响应,所有 *CaNRT* 基因在低温处理时均有不同程度的正向响应。[结论]在辣椒基因组中共鉴定获得 73 个 *CaNRT* 基因,筛选出多个在辣椒生长发育和逆境胁迫中具有重要作用的关键基因。

关键词:辣椒;硝酸盐转运蛋白(*NRT*);系统进化;表达分析;非生物胁迫

中图分类号:S641.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0653-12

Identification, evolution and expression analysis of the *NRT* gene family in *Capsicum annuum*

NIU Jiabin¹,TANG Kai¹,XIA Yingmeng¹,LIU Tongkun²,SUN Xiaochuan¹,
DUAN Weike¹,HUANG Zhinan^{1*}

(1.College of Life Sciences and Food Engineering,Huaiyin Institute of Technology,Huai'an 223003,China;2.National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement and Utilization/Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crop in East China,Ministry of Agriculture and Rural Affairs/College of Horticulture,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract:[Objectives]The study aimed to identify the members of the nitrate transporter protein(*NRT*) gene family in *Capsicum annuum*,and analyze their basic properties, chromosomal location, evolutionary relationships, and expression characteristics across different tissues, developmental stages of fruits, and under various abiotic stresses. [Methods]The *NRT* gene family was analyzed with the bioinformatics methods in genome of ‘Zunla 1’ pepper, and the physical and chemical properties of protein, the gene structure, chromosome localization, collinearity analysis, *cis*-acting elements and evolutionary relationship were determined. Transcriptome data were utilized to examine the expression characteristics of *NRT* genes in various tissues and fruits during varying developmental stages. The expression profiles were also analyzed under variant abiotic stresses using RT-qPCR. [Results]A total of 73 *CaNRT* genes were identified in *C. annuum* and unevenly distributed on 10 chromosomes. The phylogenetic analysis revealed that these genes could be grouped into three subfamilies, with a similar gene structure and conserved motifs. The *cis*-acting element analysis results suggested that *CaNRT* genes might be regulated by various factors, including light, hormones and adversity stress. Members of the *CaNRT1* subfamily exhibited high expression predominantly in roots, stems, and leaves. The *CaNRT2* subfamily displayed low expression at all times, while the *CaNRT3* subfamily showed differential tissue expression and was primarily highly expressed in roots. The abiotic stress data showed that *CaNRT1.18*, *CaNRT3.3*, *CaNRT3.1*, *CaNRT2.1* and *CaNRT1.23* responded more strongly to low temperature, high temperature, drought, salt and oxidative treatments. All *CaNRT* genes exhibited a positive reaction to varying degrees under low-temperature treatment. [Conclusions]73 *CaNRT* genes were identified in the pepper genome, and several key genes were screened which were involved in the regulation of growth and development and response to multiple abiotic stresses.

Keywords:pepper; nitrate transporter protein(*NRT*); phylogenetic evolution; expression analysis; abiotic stress

收稿日期:2023-07-07

基金项目:国家自然科学基金项目(31902021)

*通信作者:黄志楠,副教授,研究方向为园艺作物遗传育种及基因组学,E-mail: HuangZN926@163.com。

氮元素在植物生长发育过程中占有重要地位,是氨基酸、叶绿素、核酸和次生代谢产物的主要组成成分^[1]。硝酸盐转运蛋白(nitrate transporter, NRT)是植物体获取外界氮素的关键因子,在低亲和与高亲和转运系统中负责硝酸盐的吸收^[2-3]。NRT在植物中一般以多基因形式存在。NRT可分为3个亚家族:NRT1、NRT2和NRT3^[4]。其中,NRT1属于肽转运蛋白家族(PTR),也被称为NPF,是硝酸盐转运蛋白最大的亚家族,该亚家族负责转运硝酸盐、激素、葡萄糖苷和二肽^[5]。相较而言,NRT2和NRT3亚家族较小,NRT2亚家族属于硝酸盐-亚硝酸盐转运体家族^[6],该家族属于MFS(major facilitator superfamily)超家族成员,是位于原生质膜上的膜蛋白,具有典型的跨膜转运蛋白结构。NRT3亚家族本身不具备转运能力,只能通过调控NRT2发挥作用,以促进硝酸盐吸收。

研究表明NRT基因不仅在氮素转运中具有重要功能,在植物生长发育和抵抗逆境胁迫过程中也扮演着重要角色。拟南芥*AtNRT1.1*在根和芽中广泛表达,在初生根尖端表皮中表达量最高,在根成熟区表达较弱^[7];Imran等^[8]发现冬小麦NRT基因高表达,可以促进其根系生长;菠萝*AcNRT1.20*和*AcNRT1.26*在胚珠发育过程中起关键作用,*AcNRT1.33*在叶片中表达较高,但在根中未检测到,表明*AcNRT1.33*作用在叶片而不是根中^[9];当水稻*OsNRT2.3a*表达减少时,木质部对硝酸盐负荷受损,植物生长速度变慢^[10],但*OsPTR9*在转基因水稻中的高表达可以促进侧根形成,并提高产量^[11];在杨树中,大部分*PtNRT*基因在叶片、树皮和木材中表达,而在根中表达量较少,在发育中的木质部和伸长区中表达量很少^[12];菠菜NRT基因在根中表达量多于其他组织,表明*SoNRT*在根中起到重要作用^[13]。

在干旱胁迫下,苹果根中*NRT2.4*基因转录水平上升,使硝酸盐转运系统由低亲和转为高亲和,增加植物体硝酸盐含量,提高对干旱胁迫的抵抗能力^[14];毛白杨中*PtoNPF7.3C*和*PtoNPF7.7*启动子与干旱诱导的MYB结合位点相关,表达水平随着干旱胁迫处理时间延长先增加后降低^[15];Fan等^[16]发现水稻在酸胁迫下可提高*NRT2.3*基因表达量从而提升抵抗能力,同时促使水稻根部将吸收转运的硝酸盐送往地上部,从而提高产量;枸橘NRT基因在盐处理后转录水平显著增加^[17];油菜中,除*BnNRT2.1a*外,所有*BnNRT2*基因在干旱胁迫时,基因表达量与正常组相比急剧下降,在浇水后恢复到正常组水平^[18]。

目前,NRT基因家族已经在拟南芥^[19-20]、水稻^[20]、杨树^[12]、菠萝^[9]和马铃薯^[21]等多种作物中鉴定,但在辣椒中研究较少。辣椒是一年或多年生的茄科属植物,具有丰富的种质资源,是中国最具经济价值的蔬菜之一。本研究在辣椒‘遵辣1号’基因组中鉴定NRT基因家族成员,分析其基本性质、染色体定位、进化关系,分析其在不同组织和不同果实发育阶段中及不同非生物胁迫下的表达特征,以期对辣椒NRT基因功能和抗逆性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 辣椒植株处理

供试材料为辣椒‘先红一号’,辣椒种子用2%次氯酸钠溶液预处理杀菌,采用基质悬浮培养,培养条件:光照/黑暗时间为16 h/8 h,相对湿度为60%~70%,昼/夜温度为27℃/18℃。辣椒幼苗长到5叶1心后,选取茁壮、长势一致的植株,进行如下处理:1)盐处理:200 mmol·L⁻¹ NaCl;2)模拟干旱处理:20% PEG6000;3)高温处理:42℃;4)低温:10℃;5)氧化胁迫处理:40 mmol·L⁻¹ H₂O₂。每组处理设定平行对照(正常生长为CK)。在处理0、1、2、4、6、12和24 h取同一位置的叶片组织,每个时间点3个生物学重复。样品包在锡箔纸后液氮速冻,1 h后,置于-80℃冰箱中备用,用于RNA提取。

1.2 辣椒NRT基因家族鉴定、理化性质分析及染色体定位

以中国完成测序的‘遵辣1号’^[22]基因组为主要分析对象,同时选取墨西哥的辣椒品种‘CM334’^[23]以及茄科植物番茄、茄子和马铃薯基因组进行比较分析。从TAIR网站(<https://www.arabidopsis.org/>)获取拟南芥NRT基因家族成员序列,从茄科基因组(<https://solgenomics.net/>)数据库下载‘遵辣1号’‘CM334’、番茄、马铃薯以及茄子基因组文件。为鉴定NRT家族成员,以拟南芥*AtNRT*氨基酸序列作为查询序列,进行BLASTp搜索, $E < 10^{-20}$, identity > 45%。同时利用Hmmer对分别包含PTR2、MSF_1和NAR2结构域的辣椒蛋白序列筛选, $E < 10^{-10}$ 。最后结合BLASTp和Hmmer结果最终确定NRT家族成员。

利用在线工具ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析辣椒NRT家族成员的氨基酸数目、等电点(pI)、相对分子质量等理化信息^[24]。利用在线网站WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)^[25]进行亚细胞定位预测^[26]。根据辣椒基因组数据库注释文件中辣椒*CaNRT*基因位置,将所有候选*CaNRT*基

因映射到辣椒染色体上,并用 TBtools 软件^[27]绘制。

1.3 辣椒 *CaNRT* 基因家族系统进化分析

利用 CLUSTALW 比对分析 *NRT* 氨基酸序列,在 MEGA 7.0 软件中通过最大似然法构建进化树,自展值(Bootstrap)设定为 1 000^[28]。同时,通过 MEGA 7.0 软件计算 *NRT* 基因核苷酸差异^[28]。

1.4 辣椒 *CaNRT* 基因结构和保守基序分析

利用 MEME 在线网站(<https://meme-suite.org/meme/>)^[29]预测 *CaNRT* 蛋白序列保守基序,基序宽度设定为 6~50,基序数量设置为 20,其他参数均设置为默认值。基序结果和注释后的基因结构均用 TBtools 软件进行可视化处理。

应用在线工具 GSDS(gene structure display server)绘制基因结构。外显子和内含子位置信息参考拟南芥和辣椒基因组注释信息 GFF 文件,应用本地 Perl 语言提取位置信息转变为 GSDS 可读 bed 文件。

1.5 *NRT* 基因共线性分析

利用 MCSanX 软件^[30]对拟南芥、辣椒‘遵辣 1 号’、辣椒‘CM334’、番茄、马铃薯和茄子基因组进行共线性分析,随后利用 TBtools 软件进行可视化分析并标注 *NRT* 基因共线性关系。

1.6 辣椒 *CaNRT* 基因顺式作用元件分析

首先在辣椒基因组中提取 *CaNRT* 基因在起始密码子上游 2 000 bp 序列,随后提交至 PlantCARE 网站(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行预测,并用 TBtools 软件进行可视化分析。

1.7 *CaNRT* 基因在不同组织的表达分析

通过 GEO 数据库(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)获得辣椒‘遵辣 1 号’根、茎、叶、花芽、花以及果实发育阶段的转录组注释文件(GSE45037),使用本地 Perl 程序提取相应的 *CaNRT* 基因表达数据,运用 R 软件绘制辣椒 *NRT* 基因家族表达热图。

1.8 辣椒叶片组织 RNA 提取与 RT-qPCR 表达分析

使用 Simple Total RNA Kit(TIANGEN 公司)提取处理过的辣椒叶片组织,得到高质量 RNA,再逆转录(TaKaRa 公司试剂盒)获得 cDNA,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)。以辣椒 *Actin*(GenBank accession:GQ339766.1)为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[31]计算 *NRT* 家族基因在不同胁迫处理下的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 辣椒 *NRT* 基因家族鉴定、理化性质分析及染色体定位

在辣椒‘遵辣 1 号’基因组中共鉴定获得 73 个辣椒 *NRT* 基因家族成员,包括 62 个 *CaNRT1*,8 个 *CaNRT2* 和 3 个 *CaNRT3*,分别命名为 *CaNRT1.1—CaNRT1.62*,*CaNRT2.1—CaNRT2.8*,*CaNRT3.1—CaNRT3.3*(表 1)。辣椒 *CaNRT* 基因编码区长度为 159~611 bp,蛋白相对分子质量为 $(17.9\sim 72.7)\times 10^3$,*CaNRT1* 和 *CaNRT2* 亚家族蛋白分子质量普遍大于 *CaNRT3* 亚家族。*CaNRT* 蛋白等电点为 5.19~9.49,其中 *CaNRT2* 和 *CaNRT3* 亚家族(除 *CaNRT3.3* 外)等电点均在 8.52 以上,为碱性蛋白;亚细胞定位预测显示辣椒 *CaNRT* 蛋白主要集中在质膜和液泡中(表 1)。

表 1 辣椒 *NRT* 基因家族信息及理化性质

Table 1 The information and physicochemical properties of *NRT* gene family in pepper

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	长度/bp Length	编码区长度/bp CDS length	相对分子质量 Relative molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>CaNRT1.1</i>	Capana01g003 355	593	1 782	65 971.15	6.89	plas, vacu
<i>CaNRT1.2</i>	Capana01g004 368	600	1 803	66 527.98	6.06	plas, vacu
<i>CaNRT1.3</i>	Capana01g000 822	598	1 797	66 795.17	6.72	plas, nucl
<i>CaNRT1.4</i>	Capana01g004 403	590	1 773	65 470.69	9.03	plas, vacu
<i>CaNRT1.5</i>	Capana01g000 541	591	1 776	65 310.52	9.14	plas, vacu
<i>CaNRT1.6</i>	Capana01g000 828	573	1 722	63 847.50	5.80	plas, vacu
<i>CaNRT1.7</i>	Capana01g001 481	658	1 977	72 736.77	8.81	plas, vacu
<i>CaNRT1.8</i>	Capana01g001 377	607	1 824	66 948.08	7.03	plas, vacu
<i>CaNRT1.9</i>	Capana01g000 534	566	1 701	63 214.93	8.22	plas, vacu
<i>CaNRT1.10</i>	Capana02g000 342	314	945	34 333.46	7.99	plas, ER

续表1 Table 1 continued

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	长度/bp Length	编码区长度/bp CDS length	相对分子质量 Relative molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>CaNRT1.11</i>	Capana02g000 341	277	834	30 767.17	7.54	vacu, plas
<i>CaNRT1.12</i>	Capana02g001 099	156	471	17 851.39	9.01	chlo, nucl
<i>CaNRT1.13</i>	Capana02g003 451	514	1 545	57 179.77	8.43	plas, ER
<i>CaNRT1.14</i>	Capana02g001 403	304	915	34 442.14	9.10	plas, vacu
<i>CaNRT1.15</i>	Capana03g003 899	608	1 827	67 798.90	9.31	plas, nucl
<i>CaNRT1.16</i>	Capana03g003 895	608	1 827	67 993.22	9.36	plas
<i>CaNRT1.17</i>	Capana03g001 083	590	1 773	65 174.66	7.93	plas, vacu
<i>CaNRT1.18</i>	Capana03g001 064	602	1 809	67 508.50	9.47	plas
<i>CaNRT1.19</i>	Capana03g003 427	467	1 404	52 050.23	9.46	plas, cyto
<i>CaNRT1.20</i>	Capana03g001 063	585	1 758	65 341.43	8.69	plas, vacu
<i>CaNRT1.21</i>	Capana03g001 062	593	1 782	66 235.46	8.97	plas, ER
<i>CaNRT1.22</i>	Capana03g001 532	450	1 353	49 784.32	5.58	plas, vacu
<i>CaNRT1.23</i>	Capana05g001 239	611	1 836	67 649.38	9.31	plas, golg
<i>CaNRT1.24</i>	Capana06g000 371	573	1 722	63 903.12	8.68	plas, ER
<i>CaNRT1.25</i>	Capana06g001 341	581	1 746	65 531.01	8.79	plas
<i>CaNRT1.26</i>	Capana09g001 595	568	1 707	63 741.68	8.71	plas, ER
<i>CaNRT1.27</i>	Capana06g001 688	592	1 779	65 183.44	9.21	plas, vacu
<i>CaNRT1.28</i>	Capana06g000 305	552	1 659	60 909.00	8.31	plas, golg
<i>CaNRT1.29</i>	Capana06g000 488	552	1 659	60 257.24	8.95	plas, ER
<i>CaNRT1.30</i>	Capana06g000 940	543	1 632	60 431.26	8.87	plas, vacu
<i>CaNRT1.31</i>	Capana06g000 306	552	1 659	60 527.58	9.08	plas, ER
<i>CaNRT1.32</i>	Capana06g000 303	540	1 623	59 782.67	7.46	plas, vacu
<i>CaNRT1.33</i>	Capana07g001 324	591	1 776	65 246.72	8.87	plas, ER
<i>CaNRT1.34</i>	Capana07g000 550	584	1 755	65 255.55	8.40	plas, ER
<i>CaNRT1.35</i>	Capana09g001 572	569	1 710	63 631.50	8.17	plas, vacu
<i>CaNRT1.36</i>	Capana09g000 500	593	1 782	65 082.46	8.40	plas, ER
<i>CaNRT1.37</i>	Capana09g000 286	217	654	24 037.90	8.95	chlo, nucl
<i>CaNRT1.38</i>	Capana10g001 051	604	1 815	67 326.27	8.91	plas, vacu
<i>CaNRT1.39</i>	Capana10g001 656	592	1 779	66 180.37	8.44	plas, vacu
<i>CaNRT1.40</i>	Capana10g001 657	545	1 638	61 158.63	9.11	plas, ER
<i>CaNRT1.41</i>	Capana10g001 658	402	1 209	45 198.00	9.08	plas, golg
<i>CaNRT1.42</i>	Capana11g001 593	584	1 755	64 044.74	8.98	plas, vacu
<i>CaNRT1.43</i>	Capana11g001 614	581	1 746	63 756.31	8.92	plas, vacu
<i>CaNRT1.44</i>	Capana11g001 613	324	975	35 132.33	9.44	vacu, plas
<i>CaNRT1.45</i>	Capana11g001 561	606	1 821	67 853.41	8.78	plas, ER
<i>CaNRT1.46</i>	Capana11g000 651	552	1 659	60 921.78	8.81	plas, vacu
<i>CaNRT1.47</i>	Capana11g000 654	526	1 581	58 582.86	8.90	plas, vacu
<i>CaNRT1.48</i>	Capana11g000 653	544	1 635	60 312.41	8.51	plas, vacu
<i>CaNRT1.49</i>	Capana11g001 269	209	630	23 636.87	9.02	plas, vacu
<i>CaNRT1.50</i>	Capana11g001 384	567	1 704	62 421.71	5.19	plas, vacu
<i>CaNRT1.51</i>	Capana12g000 530	300	903	32 657.90	5.49	plas, ER
<i>CaNRT1.52</i>	Capana12g000 520	580	1 743	63 897.66	5.54	plas, ER
<i>CaNRT1.53</i>	Capana12g000 531	584	1 755	64 005.84	5.85	plas, vacu
<i>CaNRT1.54</i>	Capana12g000 532	536	1 611	58 596.39	6.65	plas, ER
<i>CaNRT1.55</i>	Capana00g004 312	597	1 794	66 351.82	8.70	plas, vacu
<i>CaNRT1.56</i>	Capana00g004 875	569	1 710	62 649.31	5.34	plas, vacu
<i>CaNRT1.57</i>	Capana00g003 510	595	1 788	66 925.14	9.02	plas, nucl
<i>CaNRT1.58</i>	Capana00g003 952	567	1 704	62 785.94	5.95	plas, vacu
<i>CaNRT1.59</i>	Capana00g003 980	579	1 740	64 496.87	8.41	plas, vacu
<i>CaNRT1.60</i>	Capana00g003 989	495	1 488	54 833.84	6.19	plas, vacu
<i>CaNRT1.61</i>	Capana00g003 984	557	1 674	61 893.15	6.98	plas, vacu
<i>CaNRT1.62</i>	Capana00g003 982	550	1 653	61 273.20	6.75	plas, vacu
<i>CaNRT2.1</i>	Capana02g000 995	430	1 293	47 016.81	8.65	plas, golg
<i>CaNRT2.2</i>	Capana06g000 537	274	825	29 317.16	8.85	vacu, plas
<i>CaNRT2.3</i>	Capana06g000 538	530	1 593	57 465.82	9.15	plas, ER
<i>CaNRT2.4</i>	Capana06g000 539	530	1 593	57 479.85	9.15	plas, vacu
<i>CaNRT2.5</i>	Capana11g000 043	530	1 593	57 476.04	9.26	vacu, ER
<i>CaNRT2.6</i>	Capana11g000 042	471	1 416	51 591.05	9.21	plas, golg
<i>CaNRT2.7</i>	Capana00g000 645	312	939	34 001.63	9.07	plas, ER
<i>CaNRT2.8</i>	Capana00g002 556	503	1 512	54 536.32	8.68	plas, golg
<i>CaNRT3.1</i>	Capana03g001 237	202	609	22 664.93	8.52	extr, mito
<i>CaNRT3.2</i>	Capana03g001 244	204	615	22 849.11	9.16	vacu, plas
<i>CaNRT3.3</i>	Capana03g001 242	159	480	17 928.35	6.89	extr, ER

注: plas:质膜 Plasma membrane; vacu:液泡 Vacuole; nucl:细胞核 Nucleus; ER:内质网 Endoplasmic reticulum; chlo:叶绿体 Chloroplast; cyto:胞质 Cytoplasm; golg:高尔基体 Golgi apparatus; extr:细胞外基质 Extracellular; mito:线粒体 Mitochondrion.

染色体定位分析表明,63个 *CaNRT* 基因成员随机分布在辣椒10条染色体上,其中3、6和9号染色体上分布的 *NRT* 成员最多,各有11条,5号和7号染色体上只有少量基因分布,只有1条和2条,4号和8号染色体上没有发现 *CaNRT* 基因分布(图1)。*CaNRT* 家族中有多个基因在染色体两端成簇状呈现,对辣椒 *CaNRT* 基因家族复制事件分析发现,有12对基因发生串联复制,推测其可能驱动辣椒 *CaNRT* 基因的扩增。

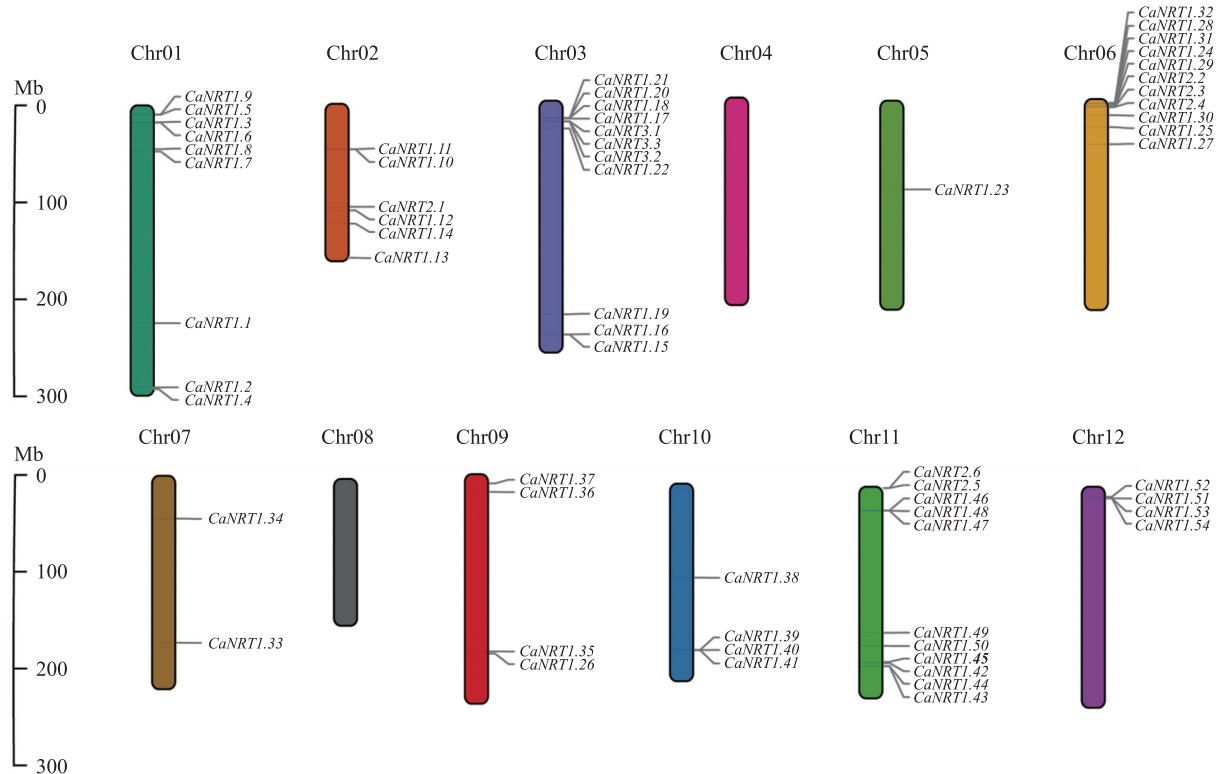


图1 辣椒 *NRT* 基因染色体定位

Fig. 1 Chromosomal mapping of *NRT* gene in pepper

2.2 辣椒 *CaNRT* 家族成员基因结构和保守基序分析

使用 MEME 在线网站分析辣椒 73 个 *NRT* 家族成员的保守基序。结果(图 2)显示:在 *NRT3* 家族中并未发现保守基序,在 *NRT2* 家族中,所有成员都含有 3 个相同基序: motif 15、motif 18 和 motif 19,但这 3 个基序在 *NRT1* 亚家族中并未出现。*NRT1* 家族包含的基序数量最多,且亚家族成员间基序相差不大,部分基因的基序有缺失,如 *CaNRT1.12*、*CaNRT1.37*、*CaNRT1.49*。基因结构方面,辣椒 *NRT1* 亚家族基因长度较长,大多包含 4 个及以上的外显子,而 *NRT2* 和 *NRT3* 亚家族基因长度较短,含有 2~3 个外显子。

2.3 辣椒 *NRT* 基因家族系统进化

为阐明辣椒 *NRT* 基因家族进化关系,选取拟南芥、辣椒‘CM334’、辣椒‘遵辣 1 号’、番茄、马铃薯、茄子的 *NRT* 氨基酸序列(分别包含 60、67、73、74、121 和 66 个氨基酸),采用最大似然法构建系统发育树。结果(图 3-A)表明,所有 *NRT* 基因明显分为 3 个亚家族,其中,*NRT1* 亚家族包含成员最多(410 个),其次是 *NRT2* 亚家族(39 个),*NRT3* 亚家族成员最少(12 个)。3 个亚家族中,*NRT2* 亚家族核苷酸差异最小,说明 *NRT2* 亚家族在物种进化关系中最保守;*NRT3* 亚家族核苷酸差异分布最广,表明在进化过程中 *NRT3* 亚组基因发生明显分化,选择压力更宽松。随后对亚家族间进行两两对比,结果显示,*NRT1* 亚家族和 *NRT3* 亚家族之间核苷酸差异最小,推测这 2 个亚家族之间进化关系更为接近,*NRT2* 和 *NRT3* 亚家族之间进化关系较远(图 3-B)。

2.4 辣椒 *CaNRT* 基因共线性分析

共线性分析(图 4)结果表明,茄科作物间的 *NRT* 同源基因多于辣椒与拟南芥间的 *NRT* 同源基因。茄子、马铃薯、番茄基因组间的 *NRT* 同源基因,部分在辣椒基因组中丢失。而分布在辣椒 2 号、6 号和 7 号染色体上的部分 *NRT* 基因在拟南芥以及其他茄科作物基因组中并未发现同源基因,推测在进化过程中不同物种的 *NRT* 基因可能发生了不同程度的复制、保留和丢失。

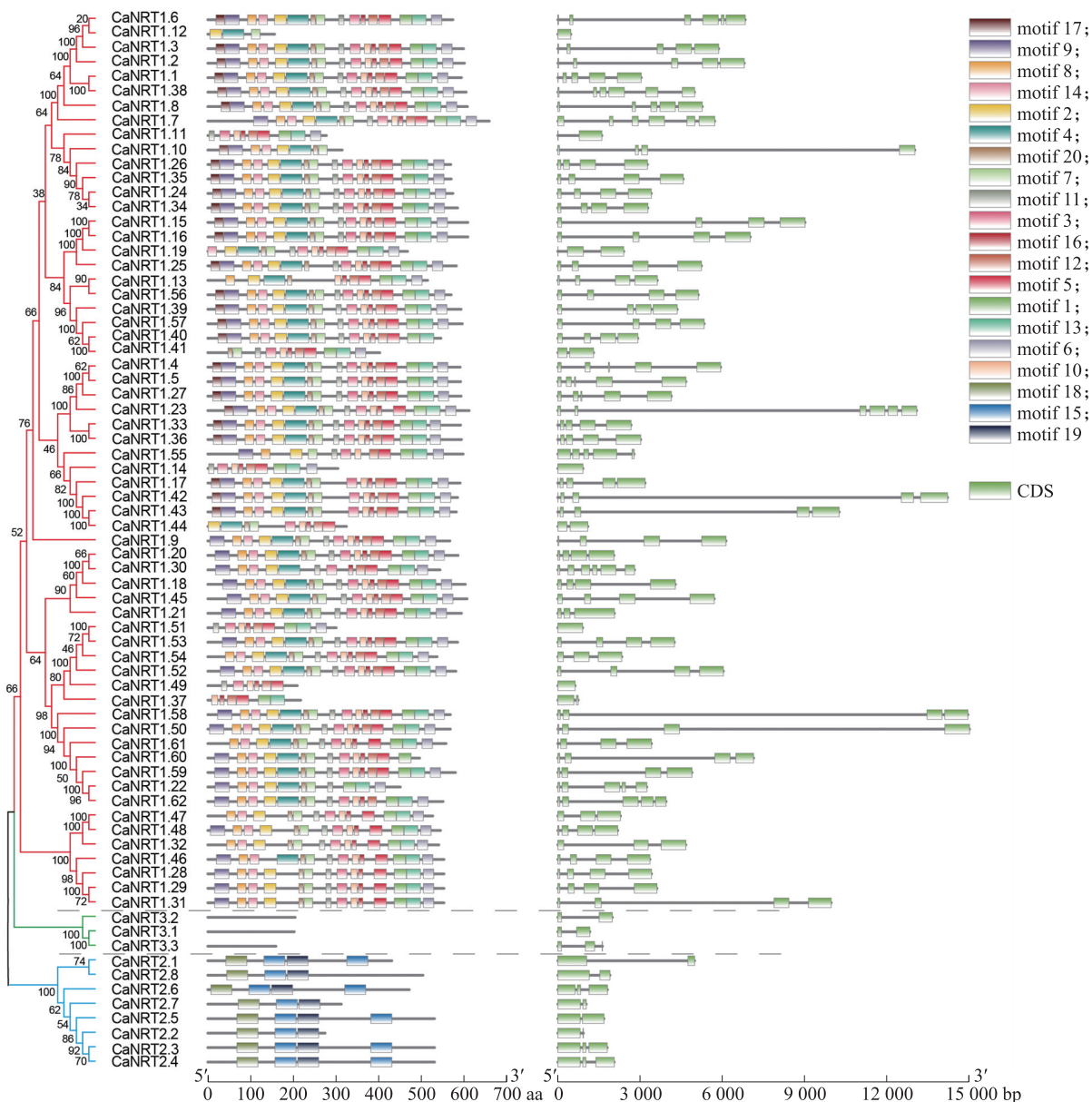


图 2 辣椒 NRT 蛋白保守基序和基因结构

Fig. 2 NRT proteins conserves motif and genes structure in pepper

2.5 辣椒 *CaNRT* 基因顺式作用元件分析

为进一步探究辣椒 *NRT* 基因家族功能,分析其上游 2 000 bp 区域的顺式作用元件。结果(图 5)显示,辣椒中包含的顺式作用元件可以分为 4 种类型,激素响应元件、逆境响应元件、光响应元件和生长发育调节元件。激素响应元件方面,有 55 个 *CaNRT* 基因含有脱落酸响应元件,40 个 *CaNRT* 基因含有茉莉酸甲酯响应元件,34 个 *CaNRT* 基因含有水杨酸响应元件,26 个 *CaNRT* 基因含有玉米素响应元件,17 个 *CaNRT* 基因含有赤霉素响应元件;在逆境响应元件方面,53 个 *CaNRT* 基因含有厌氧诱导元件,25 个 *CaNRT* 基因含有干旱诱导性元件,22 个 *CaNRT* 基因含有低温响应元件。此外,所有 *CaNRT* 基因家族成员均含有光响应元件。这些结果表明辣椒 *NRT* 基因在植物生长发育以及抵抗逆境胁迫方面有多种功能。

2.6 *CaNRT* 基因在不同组织的表达分析

对辣椒不同组织以及果实不同阶段转录组数据进行分析,*CaNRT* 基因的表达具有明显组织差异性(图 6)。在不同组织中,*CaNRT1.2*、*CaNRT1.5*、*CaNRT3.1*、*CaNRT3.3* 在根中表达量较高,*CaNRT1.27* 和 *CaNRT1.36* 在茎中高表达,*CaNRT1.20* 和 *CaNRT1.45* 在叶中有较高表达量,*CaNRT1.36* 在花芽期表达量较高,*CaNRT1.5* 和 *CaNRT1.21* 在花期表达量高于其他基因。在辣椒果实发育阶段,*CaNRT1.10*、*CaNRT1.11*、*CaNRT1.45*、*CaNRT1.56* 和 *CaNRT2.8* 在所有时期都有较高的表达量;*CaNRT1.1*、*CaNRT1.5*、*CaNRT1.13*、*CaNRT1.17*、*CaNRT1.24*、*CaNRT1.27*、*CaNRT1.32*、*CaNRT1.36*、*CaNRT1.52*、*CaNRT1.53* 和 *CaNRT1.54* 在果

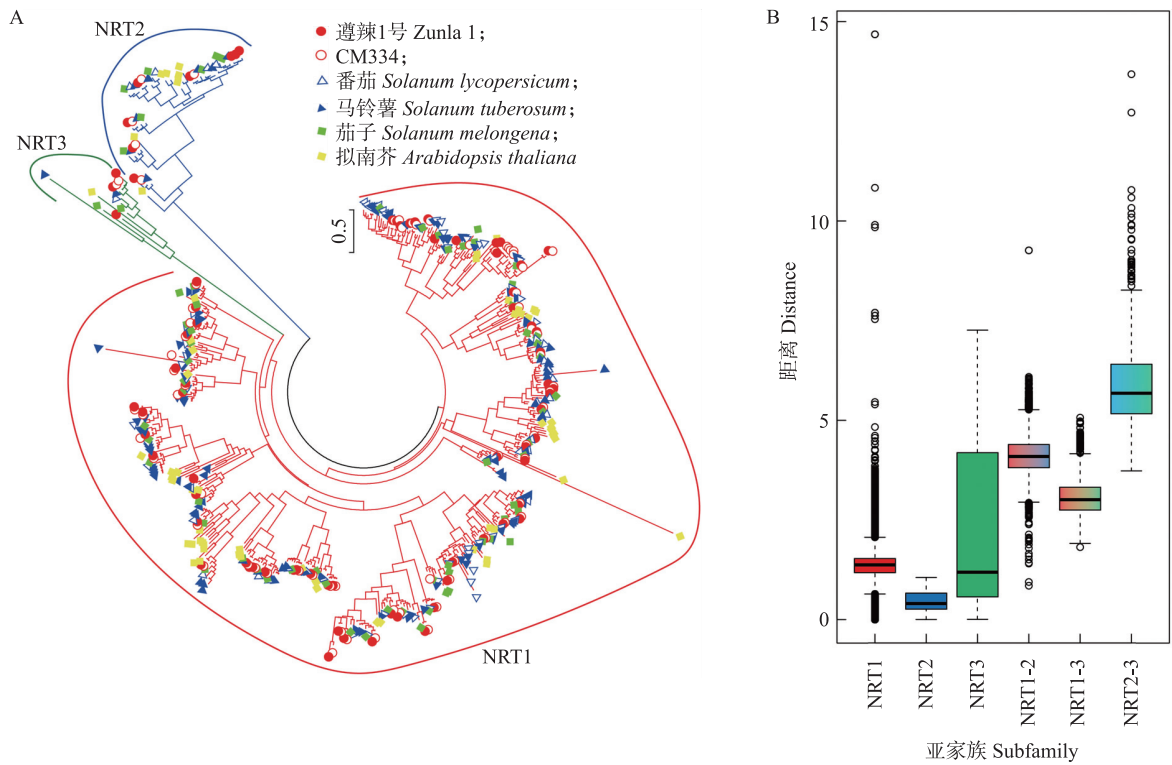


图 3 NRT 在辣椒‘遵辣 1 号’‘CM334’、番茄、马铃薯、茄子中的进化关系

Fig. 3 Evolutionary relationship of NRT in pepper ‘Zunla 1’ ‘CM334’, tomato, potato and eggplant

A. 系统进化树 Phylogenetic tree; B. NRT 亚家族核苷酸差异比较盒形图 Boxplot for the nucleotide difference comparison of the NRT subfamily.

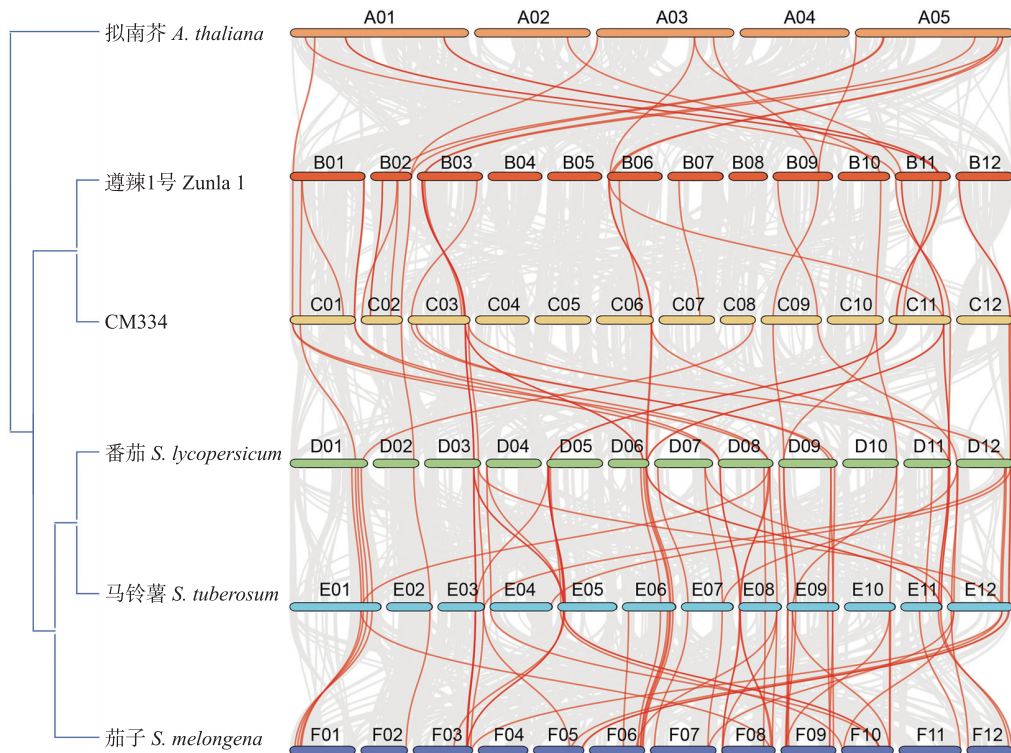
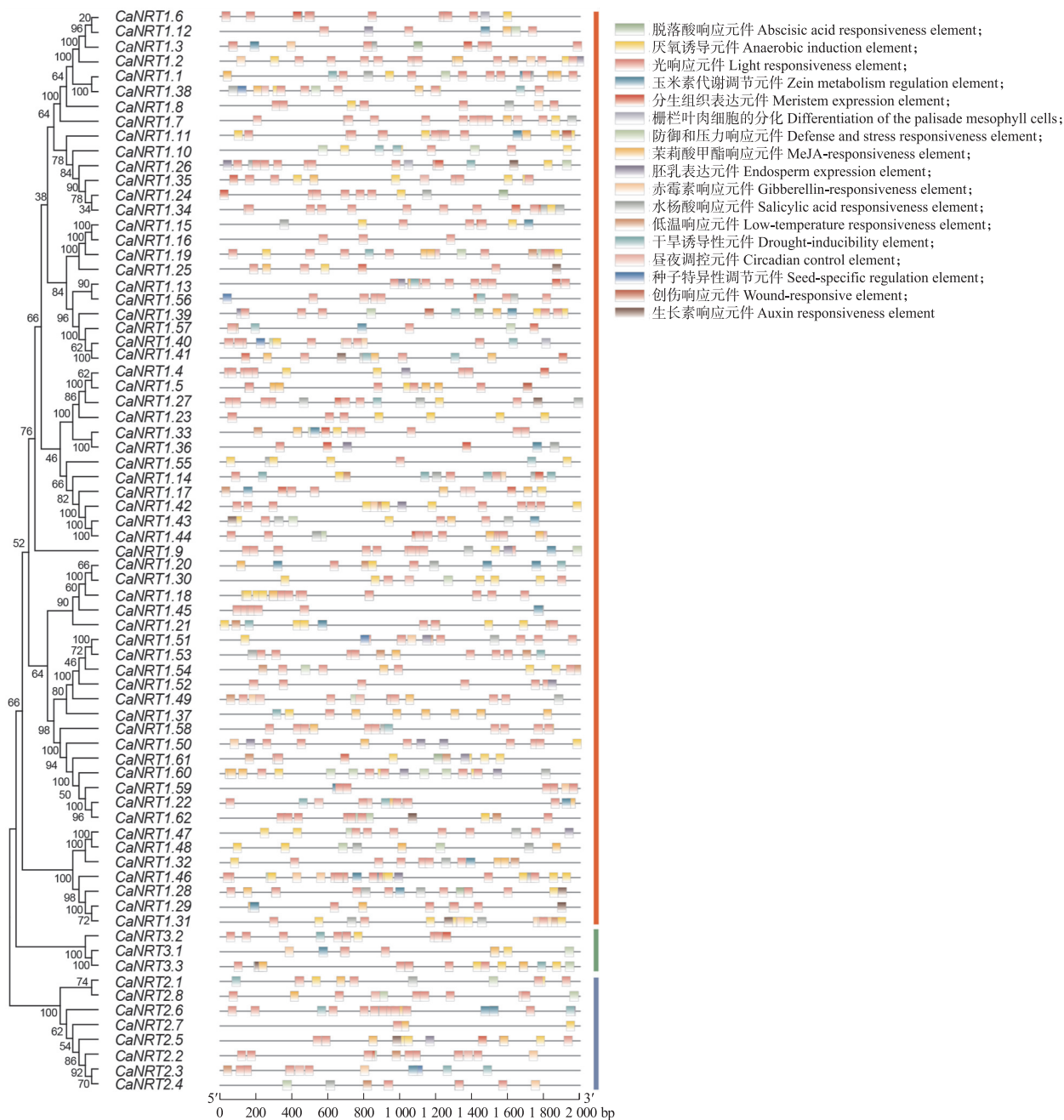


图 4 NRT 基因共线性分析

Fig. 4 Collinearity analysis of NRT gene

实发育初期表达量高于果实后期; *CaNRT1.6*、*CaNRT1.24*、*CaNRT1.43*、*CaNRT2.1*、*CaNRT3.1* 和 *CaNRT3.3* 表达量则是果实后期高于前期; 而 *CaNRT1.12*、*CaNRT1.19*、*CaNRT1.37*、*CaNRT1.44*、*CaNRT1.51*、*CaNRT2.2*、*CaNRT2.3*、*CaNRT2.5*、*CaNRT2.7* 在果实任何时期都不表达。此外, *CaNRT2* 亚家族除 *CaNRT2.1* 和 *CaNRT2.8* 外, 其余成员在不同组织或果实发育阶段均不表达或表达量很低。

图5 辣椒 *NRT* 基因顺式作用元件预测Fig. 5 Prediction of *cis*-acting elements of *NRT* gene in pepper

2.7 辣椒 *NRT* 基因在不同非生物胁迫下的表达情况

由图7可见,低温胁迫下,16个 *CaNRT* 基因均有明显的响应。其中, *CaNRT1.4*、*CaNRT1.18*、*CaNRT1.36* 在处理6和12 h后响应比较强烈,表达量上升均在7倍以上, *CaNRT1.18* 接近10倍,推测这3个基因在抵抗低温环境时起到重要作用。高温胁迫下,除 *CaNRT1.1*、*CaNRT1.24* 外,其余 *CaNRT1* 家族成员对高温处理响应并不明显,且部分基因表达量有下调趋势,而 *CaNRT2.1*、*CaNRT3.1* 和 *CaNRT3.3* 的表达量上调明显, *CaNRT3.3* 在处理4 h表达量增加6倍以上。在模拟干旱处理条件下, *CaNRT1.1*、*CaNRT1.5*、*CaNRT1.9*、*CaNRT1.18*、*CaNRT1.23*、*CaNRT1.24*、*CaNRT1.52*、*CaNRT2.1*、*CaNRT3.1* 的表达量明显上调,其余基因无明显上调变化, *CaNRT1.52*、*CaNRT2.1*、*CaNRT3.1* 分别在24、6、2 h表达量达到最高值。在NaCl胁迫下, *CaNRT1.1*、*CaNRT1.9*、*CaNRT2.1*、*CaNRT3.3* 表达明显上调, *CaNRT1.1* 最大上调量为对照组表达量的2倍。氧化胁迫处理时, *CaNRT1.5*、*CaNRT1.18*、*CaNRT1.23*、*CaNRT2.1*、*CaNRT3.1*、*CaNRT3.3* 在处理12 h后表达量最高,而 *CaNRT1.45* 则在24 h后表达量最高。

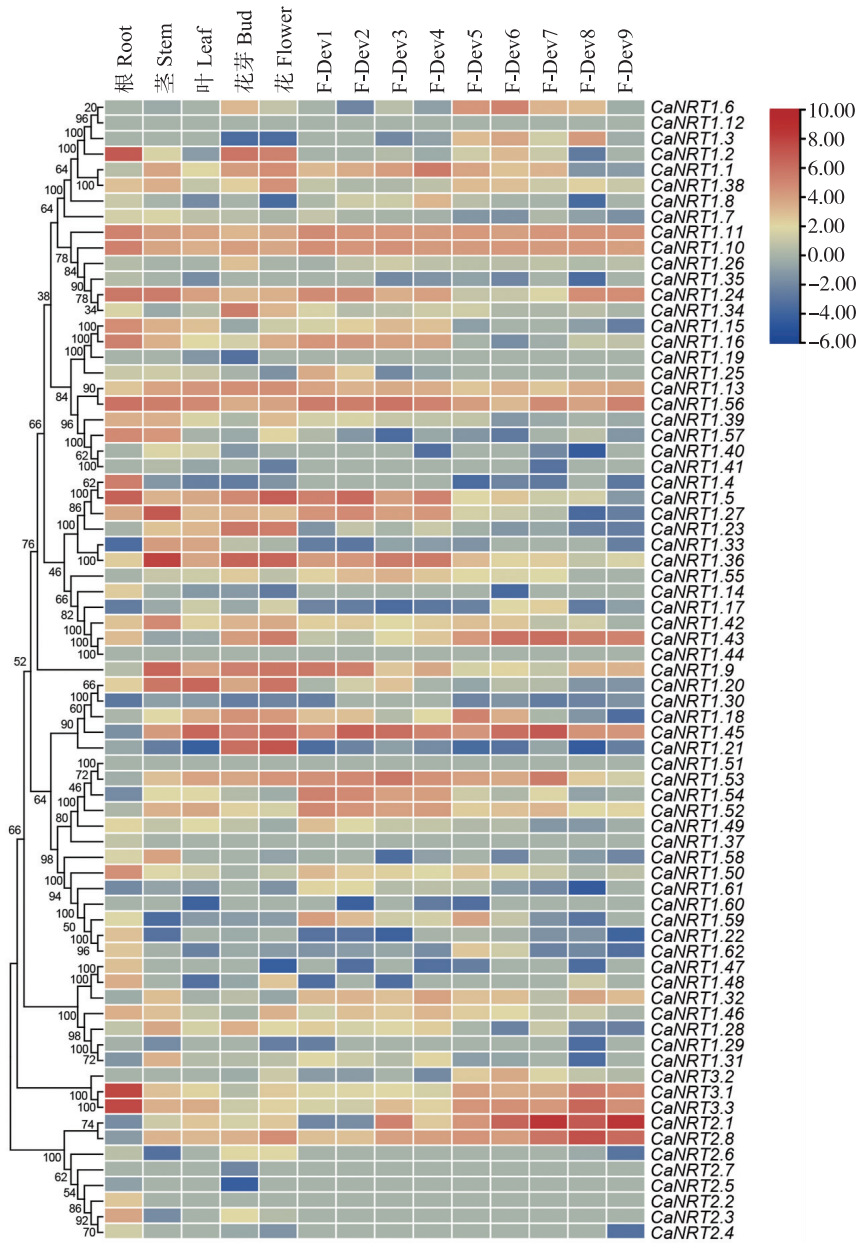


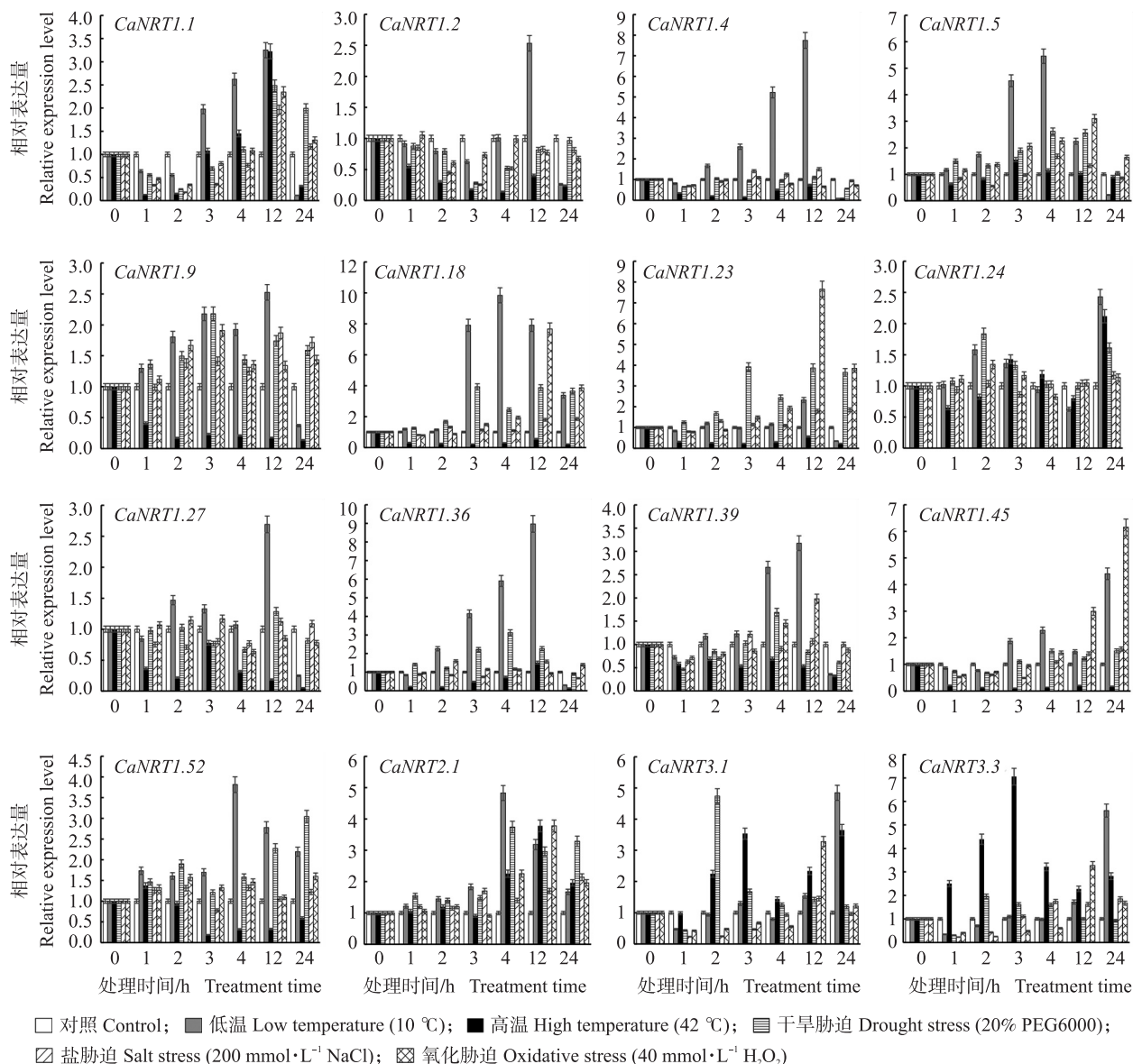
图 6 *CaNRT* 基因在辣椒不同组织和果实不同阶段的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *CaNRT* gene in different tissues and fruits at different stages of pepper

F-Dev1:刚授粉 After pollination;F-Dev2—F-Dev4:果实大小 1~3 cm、3~4 cm、4~5 cm Fruit size 1~3 cm,3~4 cm,4~5 cm;
F-Dev5:绿熟果 Green ripe fruit;F-Dev6—F-Dev9:破色后期 0、3、5、7 d Late breaking stages 0,3,5,7 d.

3 讨论

在植物中,基因是调控生长发育的关键因子。被子植物在漫长进化过程中经历了不同的加倍事件,为基因复制和分化提供了动力^[32-33]。然而由于不同植物所处地域和外界环境不同,同源基因的调控机制也存在差异^[34]。*NRT* 基因家族参与吸收和转运硝酸盐,在植物生长发育和逆境胁迫中具有重要作用。目前,*NRT* 基因家族已经在拟南芥、水稻、杨树、菠萝和马铃薯等多种作物中被鉴定,但辣椒 *NRT* 基因家族研究较少。本研究在辣椒全基因组中共鉴定到 73 个 *CaNRT* 基因,*CaNRT1* 亚家族成员最多。理化性质分析显示,辣椒 *CaNRT* 蛋白相对分子质量、等电点、氨基酸数目等均存在较大差异,大多数 *CaNRT* 蛋白定位在细胞质膜上,这与马春敏等^[35] 研究结果一致,表明这些蛋白可能有硝酸盐跨膜运转功能。而 *CaNRT3* 亚家族定位与 *CaNRT1* 和 *CaNRT2* 亚家族有显著差异,表明 *CaNRT3* 可能具有更复杂的结构与功能。染色体定位显示,*CaNRT* 基因在染色体上分布不均匀,有多个基因在同一条染色体上呈簇状分布,其中多个基因发生串联复制,推测串联复制是辣椒 *NRT* 基因扩增的主要方式。

图7 *CaNRT* 基因在不同胁迫下的表达分析Fig. 7 Expression analysis of *CaNRT* gene under different stresses

根据系统发育关系,可以将辣椒 *NRT* 基因分为 3 个亚家族,其中 *CaNRT1* 基因最多(62 个),*CaNRT2* (8 个)和 *CaNRT3* 基因(3 个)数目较少,这与拟南芥^[19-20]、马铃薯^[21]等不同作物中鉴定得到的结果相似。与同为氮素转运蛋白——铵转运蛋白(AMT)家族相比,辣椒 *NRT* 家族基因数目远远多于 AMT 家族(8 个)^[36],且功能更加多样化。从基序分析可以观察到,除 *CaNRT1.12*、*CaNRT1.37*、*CaNRT1.49* 外,所有 *CaNRT1* 蛋白均含有相同保守基序,这些基序对于 *NRT1* 亚家族保守结构域的形成至关重要。*CaNRT1* 亚家族基因结构普遍较长,且含多个外显子,结构复杂;*CaNRT2* 和 *CaNRT3* 亚家族序列长度较短,外显子数量均为 2~3 个。共线性分析显示,辣椒与拟南芥以及其他茄科作物均存在同源基因,与茄科作物同源基因数目多于与拟南芥的数目。在辣椒中,有少数同源基因在拟南芥和其他茄科物种中没有找到对应的基因,推测 *NRT* 基因在不同物种中发生了不同的保留和复制事件。

大多数 *CaNRT* 亚家族在根和叶中表达,这与 Zhang 等^[21]在马铃薯中研究结果相似,其中 *CaNRT1.2*、*CaNRT1.5*、*CaNRT3.1*、*CaNRT3.3* 在根中高表达,表明它们可能促进硝酸盐吸收;*CaNRT1.27*、*CaNRT1.36* 在茎中有较高表达量,说明可能参与硝酸盐运输;而 *CaNRT1.12*、*CaNRT1.44*、*CaNRT1.51* 在任何组织和果实任何阶段都不表达,说明这些可能是冗余基因。在番茄中,*SINRT2.3* 基因在根中表达量最高,*SINRT2.1* 基因在花中表达量最高^[37],而在辣椒中,所有 *CaNRT2* 基因在不同组织和器官中几乎都不表达或表达量较低,猜想 *CaNRT2* 基因可能在其他方面发挥作用。由以上结果可知,*CaNRT* 基因在不同组织、器官和发育

阶段均发挥作用,存在组织表达差异性,有部分基因发生了异功能化现象。在辣椒碱基-抗坏血酸转运蛋白(NAT)基因家族中也存在相同亚组基因,其在不同物种间及不同品种间既有功能相似也有功能分化的现象,这可能是物种适应性的一种表现^[38]。

CaNRT 成员包含多种激素响应元件和逆境胁迫响应元件,说明 *CaNRT* 基因可能参与各种植物激素和非生物胁迫调控。前人研究也发现 *NRT* 基因在逆境胁迫中具有重要作用,在干旱胁迫下水稻^[39]或拟南芥^[40] *NRT1* 亚家族的部分基因表达显著上调;在苹果根部也发现干旱诱导了高亲和的 *NRT* 基因表达^[14]。*CaNRT1* 基因也有同样结果,且 *CaNRT2.1* 和 *CaNRT3.1* 对干旱也有明显响应。在高温胁迫下,*CaNRT3* 亚家族表达明显高于 *CaNRT2* 家族和 *CaNRT1* 家族,但在毛白杨中,*PtoNRT3.1a* 基因表达量却呈下降趋势^[15]。在低温胁迫下,所有基因均明显上调,其中,*CaNRT1.4*、*CaNRT1.18*、*CaNRT1.36* 这3个基因响应最为强烈,上调达7倍以上,*CaNRT1.18* 表达在处理6 h 上调接近10倍,推测 *CaNRT* 基因在低温胁迫时起到重要的防御作用。值得关注的是,*CaNRT1.1* 基因在面对各种非生物逆境胁迫时,均有较为明显的正向响应。在辣椒多个基因家族中,均发现部分基因参与抗逆调控,如主要参与光周期调控的 *CONSTANS-like* 基因家族^[41]、转运蛋白 *NAT* 家族等^[38],这为后续辣椒抗逆胁迫研究和基因资源利用提供了新的思路 and 基础。本研究从辣椒 *NRT* 基因的结构特征、复制类型、进化特征和组织表达分析探讨了辣椒 *NRT* 基因的进化特征及表达功能,为深入了解辣椒中该基因家族成员功能和研究其在生长发育过程中的响应分子机制奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] Amtmann A, Armengaud P. Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(3): 275-283.
- [2] Li H, Hu B, Chu C C. Nitrogen use efficiency in crops: lessons from *Arabidopsis* and rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(10): 2477-2488.
- [3] 武姣娜, 魏晓东, 李霞, 等. 植物氮素利用效率的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(9): 1401-1408.
Wu J N, Wei X D, Li X, et al. Research progress in nitrogen use efficiency in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(9): 1401-1408 (in Chinese with English abstract).
- [4] Dechognat J, Nguyen C T, Armengaud P, et al. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(4): 1349-1359.
- [5] O'Brien J A, Vega A, Bouguyon E, et al. Nitrate transport, sensing, and responses in plants[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(6): 837-856.
- [6] Krapp A, David L C, Chardin C, et al. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(3): 789-798.
- [7] Nazoa P, Vidmar J J, Tranbarger T J, et al. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52(3): 689-703.
- [8] Imran M, Sun X C, Hussain S, et al. Molybdenum supply increases root system growth of winter wheat by enhancing nitric oxide accumulation and expression of *NRT* genes[J]. *Plant and Soil*, 2021, 459(1): 235-248.
- [9] Li W M, Yan M K, Hu B Y, et al. Characterization and the expression analysis of nitrate transporter(*NRT*) gene family in pineapple[J]. *Tropical Plant Biology*, 2018, 11(3): 177-191.
- [10] Tang Z, Fan X R, Li Q, et al. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(4): 2052-2063.
- [11] Fang Z M, Xia K F, Yang X, et al. Altered expression of the PTR/*NRT1* homologue *OsPTR9* affects nitrogen utilization efficiency, growth and grain yield in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(4): 446-458.
- [12] Bai H, Euring D, Volmer K, et al. The nitrate transporter(*NRT*) gene family in poplar[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72126.
- [13] Wang X L, Cai X F, Xu C X, et al. Identification and characterization of the NPF, *NRT2* and *NRT3* in spinach[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 158: 297-307.
- [14] Bassett C L, Baldo A M, Moore J T, et al. Genes responding to water deficit in apple (*Malus × domestica* Borkh.) roots[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 182.
- [15] Zhao L, Chen P F, Liu P, et al. Genetic effects and expression patterns of the nitrate transporter(*NRT*) gene family in *Populus tomentosa*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 661635.
- [16] Fan X R, Tang Z, Tan Y W, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(26): 7118-7123.
- [17] Zhao Z Q, Li M D, Xu W W, et al. Genome-wide identification of *NRT* gene family and expression analysis of nitrate transporters in response to salt stress in *Poncirus trifoliata*[J]. *Genes*, 2022, 13(7): 1115.

- [18] Tong J F, Walk T C, Han P P, et al. Genome-wide identification and analysis of high-affinity nitrate transporter 2 (NRT2) family genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) and their responses to various stresses [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 464.
- [19] Okamoto M, Vidmar J J, Glass A D M. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(3): 304–317.
- [20] Tsay Y F, Chiu C C, Tsai C B, et al. Nitrate transporters and peptide transporters [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(12): 2290–2300.
- [21] Zhang J Y, Han Z J, Lu Y, et al. Genome-wide identification, structural and gene expression analysis of the nitrate transporters (NRTs) family in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *PLoS One*, 2021, 16(10): e0257383.
- [22] 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.
- [23] 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: 270–278.
- [24] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [M] // *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005: 571–607.
- [25] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: W585–W587.
- [26] 胡灿, 刘峰, 王运生. 辣椒 *CaNRAMP* 基因家族的鉴定与表达分析 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(10): 69–74.
Hu C, Liu F, Wang Y S. Identification and expression analysis of *CaNRAMP* gene family in pepper [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(10): 69–74 (in Chinese).
- [27] Chen C J, Chen H, He Y H, et al. TBtools, a Toolkit for Biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface [J]. *BioRxiv*, 2018. DOI: 10.1101/289660.
- [28] 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.
- [29] Bailey T L, Williams N, Misleh C, et al. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: W369–W373.
- [30] Wang Y P, Tang H B, DeBarry J D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): e49.
- [31] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Research*, 1996, 6(10): 986–994.
- [32] Taylor J S, Raes J. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas [J]. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 615–643.
- [33] Rensing S A. Gene duplication as a driver of plant morphogenetic evolution [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 17: 43–48.
- [34] Wang Z, Zhou Z K, Liu Y F, et al. Functional evolution of phosphatidylethanolamine binding proteins in soybean and *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(2): 323–336.
- [35] 马春敏, 李维希, 李芳军, 等. 陆地棉硝酸盐转运体 NRT 基因家族鉴定及表达分析 [J]. *作物学报*, 2023, 49(6): 1496–1517.
Ma C M, Li W X, Li F J, et al. Identification and expression analysis of nitrate transporter NRT gene family in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(6): 1496–1517 (in Chinese with English abstract).
- [36] Fang L, Wang M M, Chen X, et al. Analysis of the AMT gene family in chili pepper and the effects of arbuscular mycorrhizal colonization on the expression patterns of *CaAMT2* genes [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 158.
- [37] Akbudak M A, Filiz E, Çetin D. Genome-wide identification and characterization of high-affinity nitrate transporter 2 (NRT2) gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) and their transcriptional responses to drought and salinity stresses [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2022, 272: 153684.
- [38] 黄志楠, 段伟科, 白雪滢, 等. 辣椒碱基-抗坏血酸转运蛋白 (NAT) 家族基因的鉴定和表达分析 [J]. *园艺学报*, 2020, 47(11): 2132–2144.
Huang Z N, Duan W K, Bai X Y, et al. Identification, phylogenetic evolution and expression analysis of NAT gene family in pepper [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(11): 2132–2144 (in Chinese with English abstract).
- [39] Hu T Z, Cao K M, Xia M, et al. Functional characterization of a putative nitrate transporter gene promoter from rice [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2006, 38(11): 795–802.
- [40] Chen C Z, Lv X F, Li J Y, et al. *Arabidopsis NRT1.5* is another essential component in the regulation of nitrate reallocation and stress tolerance [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1582–1590.
- [41] Huang Z N, Bai X Y, Duan W K, et al. Genome-wide identification and expression profiling of CONSTANS-like genes in pepper (*Capsicum annuum*): gaining an insight to their phylogenetic evolution and stress-specific roles [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 828209.