王梦,柳璐,郑晓美,等.辣椒*CaFLK*基因克隆及表达分析[J].山西农业大学学报(自然科学版),2025,45(6):12-22.
Wang M, Liu L, Zheng X M, et al.Cloning and expression analysis of *CaFLK* gene in pepper[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2025,45(6):12-22.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202508012

辣椒*CaFLK*基因克隆及表达分析

王梦,柳璐,郑晓美,臧巧路*

(山西农业大学 园艺学院,山西 晋中 030801)

摘　要:[目的]本文旨在初步研究*CaFLK*基因在辣椒中潜在的生物学功能。[方法]以'晋椒204'为试验材料,采用PCR技术进行*CaFLK*基因及其启动子序列的克隆,并运用生物信息学手段对所获序列展开系统分析,同时对不同组织中该基因的转录水平差异以及各类胁迫下其表达量的动态变化进行分析。[结果]克隆得到*CaFLK*基因全长1452 bp,编码483个氨基酸残基,含有3个KH保守结构域;理化性质分析表明该蛋白的分子量为51.75 kDa,等电点为4.83,为酸性蛋白,不稳定系数为59.18,为不稳定蛋白,亲水性指数4.83,为亲水性蛋白;该蛋白含有38个磷酸化位点、2个N-糖基化位点;该蛋白缺乏信号肽及跨膜结构域,无规则卷曲与α-螺旋作为关键构成部分在该基因的二、三级结构中占据主导地位;系统进化结果表明CaFLK与番茄、多疣茄、枸杞、烟草等茄科作物的同源性达95%;克隆得到2000 bp *CaFLK*启动子序列,顺式作用元件预测发现该区域含有多种胁迫和激素响应元件;互作蛋白预测结果表明有5个和开花有关的蛋白与其互作;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)结果表明*CaFLK*基因在叶中表达量较高,在低温、ABA和MeJA处理下有较高的表达水平。[结论]*CaFLK*基因受不同胁迫和激素调控,并可能与开花相关蛋白互作,研究结果为其功能鉴定提供了思路。

关键词:辣椒; *FLK*基因; 生物信息学; 表达分析
中图分类号:S641.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2025)06-0012-11

Cloning and expression analysis of *CaFLK* gene in pepper

Wang Meng, Liu Lu, Zheng Xiaomei, Zang Qiaolu*

(*College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China*)

Abstract: [Objective] This paper aimed to investigate the potential biological functions of the *CaFLK* gene in pepper. [Methods] Using 'Jinjiao 204' as experimental material, the *CaFLK* gene and its promoter sequence was successfully cloned via PCR technology. Systematic bioinformatics analysis was performed on the obtained sequences. Furthermore, the differences in the transcriptional level of this gene across various tissues and its dynamic expression changes under different stresses were analyzed. [Results] The full length of the cloned *CaFLK* gene was 1452 bp, encoding 483 amino acid residues and containing three KH conserved domains. Analysis of physicochemical properties indicated that the CaFLK protein had a molecular weight of 51.75 kDa and an isoelectric point of 4.83, classifying it as an acidic protein. Its instability index was 59.18, categorizing it as an unstable protein, and its grand average of hydrophilicity index was 4.83, indicating it is a hydrophilic protein. The protein was predicted to contain 38 phosphorylation sites and 2 N-glycosylation sites. It lacked a signal peptide and transmembrane domains. Random coils and α-helices were the key structural components, dominating the secondary and tertiary structures of this

收稿日期:2025-08-07　　**修回日期**:2025-09-01
基金项目:山西省重点研发计划项目(202402140601003-02);山西农业大学博士科研启动项目(2022BQ13);蔬菜花卉种质资源创新与利用山西省重点实验室2024年度开放课题(SCHHZDSYS2024-14);山西省基础研究计划(自由探索类)青年科学研究项目(202203021212454);山西省博士毕业生来晋工作奖励科研项目(SXBYKY2022060);山西省科技创新人才团队(202304051001018)
作者简介:王梦(ORCID:0009-0004-0513-5366),硕士研究生,研究方向:辣椒种质创新与利用研究
*通信作者:臧巧路(ORCID: 0000-0002-1901-0896),博士,讲师,硕士生导师,E-mail:zangql@sxau.edu.cn

gene. Phylogenetic analysis showed that CaFLK shared up to 95% homology with Solanaceae crops such as tomato (*Solanum lycopersicum*), sticky nightshade (*Solanum verrucosum*), goji berry (*Lycium barbarum*), and tobacco (*Nicotiana tabacum*). A 2000 bp *CaFLK* promoter sequence was cloned, and cis-acting element prediction identified various stress and hormone response elements within this region. Protein interaction prediction suggested that five flowering-related proteins interact with CaFLK. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) results showed that the *CaFLK* gene has a high expression level in leaves and exhibited elevated expression level under low temperature, ABA and MeJA treatment. [Conclusion]The *CaFLK* gene was regulated by different stresses and hormones and may interact with flowering-related proteins. These findings provided insights for its functional characterization.

Keywords: Pepper, *FLK* gene, Bioinformatics, Expression analysis

辣椒(*Capsicum annuum* L.)为一年或多年生草本植物,其遗传多样性非常丰富,是全球消费量最大的辛辣调味品,也是中国种植面积最大的蔬菜[1]。近年来,随着辣椒种植业的快速发展,市场需求量逐年增加,辣椒种植的形式以及茬口安排也呈现多样化的发展趋势,因此需要培育生育期短的辣椒品种[2-3]。此外,越夏一直是辣椒面对的难题,当环境温度超过35 ℃时,辣椒植株会显现出花粉形态异常、花器官发育不良、花瓣异常增厚等生长受阻的情况,严重影响其生长发育[4-5]。因此在高温来临前开花坐果有助于解决这一难题。由此可见,开花时间及花期对蔬菜的成熟速度和育种进程而言十分重要[6-7]。开花期与辣椒早熟性密切相关,其表现受遗传、栽培措施及环境条件等影响,因此探究开花期的变化规律对辣椒遗传育种工作而言具有重要价值[6]。植物体内的开花途径可分为4种,即光周期途径、赤霉素途径、春化途径和自主途径,拟南芥中的研究表明开花过程的自主途径是由植物通过内部信号调控开花的途径,不受外部环境因素(如光照强度、光周期、温度等)的影响[8]。因此挖掘调控辣椒开花的关键基因,并用基因工程手段来改变开花时间和进程是非常重要的。

FLK(*FLOWER LOCUS K*)是自主开花途径中抑制阻遏蛋白FLC(FLOWERING LOCUS C)并调节开花的关键基因之一,是开花的正向调节因子[8-9]。*FLK*基因具有3个KH(K-homology)结构域,每个KH结构域都包含共有的IGXXG序列[9]。当前关于*FLK*基因的研究,主要放在拟南芥上。例如,Lim等[10]的研究发现,flk突变体可表现出晚花表型,且赤霉素和春化处理会改善晚花表型,同时,突变体中*FLC*的转录水平升高,其下游的*FT*(*FLOWERING LOCUS T*)和*SOC1*(*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*)的转录水平则显著下降,表明FLK可能通过FLC调控开花过程。另外,FLK通过与RNA结合蛋白PEP(PEPPER)互作来调控FLC,从而影响植物的开花时间[11]。FLK与PEP互作后,可在转录后水平对*AG*(*AGAMOUS*)进行调节,影响花形态的建成[12]。综上所述,FLK可以调控植物的开花时间以及花形态建成。

*FLK*在植物响应逆境中也发挥重要作用。多种植物在受到逆境胁迫时会出现环状RNA[13],而*FLK*基因的突变会引发植物出现环状RNA[14-15],推测*FLK*可能参与植物的逆境响应过程。有学者研究发现FLK蛋白主要由过氧化氢酶基因*CAT2*调节植物活性氧(ROS)平衡,*FLK*基因突变会导致胁迫环境下植物体内ROS含量的迅速降低,并对ROS诱导的胁迫具有更高的抵抗力[16]。有研究发现在*FLK*突变后,植物体内由SA介导的防御信号遭到破坏,表明*FLK*与SA通路有关的几个主要基因间存在复杂的互作关系,RNA测序结果表明*FLK*能够调控与防御相关的基因表达,即*FLK*参与植物对生物胁迫的应答[17]。由此可知*FLK*基因在植物花器官发育及胁迫应答过程中发挥着关键作用。

目前*FLK*基因在辣椒中的功能尚不明确。本研究克隆得到*CaFLK*基因及启动子序列,通过生物信息学方法解析*CaFLK*的基因结构与蛋白序列特征等信息,并利用实时荧光定量PCR技术对该基因的表达模式进行分析,以进一步明确*CaFLK*基因在辣椒中的潜在功能,为培育辣椒抗性品种提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料和试剂

试验材料:选取保存于山西农业大学园艺学院的辣椒品种'晋椒204',将种子用温水浸泡6~8 h,

放入培养箱28 ℃催芽4~5 d,最后用基质土(草炭∶蛭石∶珍珠岩=2∶1∶1)培育辣椒苗。在辣椒苗生长至开花期时,分别取辣椒的根、茎、叶和花4个部位的组织,速冻后放入-80 ℃冰箱保存。另外在幼苗长至4叶1心时,选取长势一致的植株进行处理∶(1)盐(NaCl)处理∶200 mmol/L;(2)低温(Low temperature)处理∶4 ℃;(3)干旱(Drought)处理∶20% PEG6000;(4)茉莉酸甲酯(methyl jasmonate,MeJA)处理∶100 μmol/L;(5)脱落酸(abscisic acid,ABA)处理∶100 μmol/L;(6)吲哚乙酸(indole acetic acid,IAA)处理∶100 μmol/L。每组处理以叶片喷洒蒸馏水为对照,分别在处理后1、3、6、12和24 h取同一位置的叶片,将叶片速冻放入-80 ℃冰箱保存。上述样品用于DNA和RNA提取。

试验试剂∶DNA提取试剂盒、RNA提取试剂盒、大肠杆菌DH5α感受态、克隆载体均从北京金沙生物科技有限公司购置;DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂盒购于全式金(北京)生物技术有限公司;PCR克隆试剂由博迈德(北京)基因技术有限公司提供;荧光定量试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *CaFLK*基因及启动子克隆

利用RNA提取试剂盒提取上述冷冻辣椒样品的总RNA,并使用反转录试剂盒获得辣椒不同组织及处理的cDNA。利用DNA提取试剂盒提取辣椒基因组DNA。

通过辣椒'zunla-1_v2.0'的基因组数据,获得辣椒*CaFLK*基因的参考序列,同时利用TBtools提取位于*CaFLK*基因上游2000 bp的启动子序列,利用Primer Premier 5.0设计*CaFLK*基因及其启动子的特异性引物(表1),引物由生工生物(上海)股份有限公司合成。

以辣椒的cDNA和DNA作为扩增模板,分别对*CaFLK*的基因及其启动子进行扩增。PCR反应体系总容积为25 μL,包含1 μL的cDNA或DNA模板、12.5 μL的酶、9.5 μL的ddH_2O、正向和反向引物各1 μL。反应程序设定为∶94 ℃,1 min;98 ℃,5 s;58 ℃,1 min;72 ℃,1 min;72 ℃,5 min,共进行38个循环,产物于4 ℃保存。用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测产物大小符合后进行回收,并将其连接入克隆载体,转化大肠杆菌DH5α,进行质粒提取及测序。

1.2.2 染色体定位、基因结构和保守结构域分析

利用MG2C在线网站(http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)绘制*CaFLK*在染色体上的位置图,运用GSDS在线网站(https://gsds.gao-lab.org/Gsds_help.php)绘制*CaFLK*的基因结构图,同时运用NCBI的CDD数据库对基因的结构域进行预测,并用TBtools进行可视化分析。利用克隆得到的*CaFLK*基因序列和DNAMAN 6.0软件作*CaFLK*的核苷酸-氨基酸序列对照图。

1.2.3 *CaFLK*基因的生物信息学分析

通过在线网站ExPASy Prot Param(https://web.expasy.org/protparam/),对该基因编码蛋白质的理化性质进行分析。借助在线网站NetPhos3.1 Server(https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/)与NetNGlyc 1.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/),解析CaFLK蛋白的磷酸化和糖基化位点。利用ExPASy Prot Scale(https://web.expasy.org/protscale/),对该蛋白的亲疏水性作出预测。

借助在线网站工具SignalP 6.0(https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/)和TMHMM 2.0(https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/),对CaFLK蛋白的信号肽及跨膜结构域展开预测。通过在线网站SOPMA(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)和SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org),完成该蛋白二级和三级结构的分析与预测。

采用NCBI网站的Blastp工具,对辣椒CaFLK的氨基酸序列实施同源性分析,获取其它物种的同源序列后,用DNAMAN软件进行多序列比对,再以MEGA-X软件的邻接法(Neighbor-Joining,NJ)构建系统进化树。

1.2.4 *CaFLK*的启动子顺式作用元件分析

利用PlantCARE网站(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/),对*CaFLK*启动子序列中包含的顺式作用元件展开分析。

1.2.5　辣椒*CaFLK*基因表达模式分析

以辣椒*CaUBI3*基因(登录号为AY486137)作为内参基因,根据序列设计*CaUBI3*和*CaFLK*的荧光定量PCR引物(表1)。以不同组织、处理的cDNA为模板进行qRT-PCR分析。反应体系为25 μL,包含TB Green Premix Ex Taq II FAST qPCR(2×)12.5 μL、上下游引物各1 μL、cDNA模板2 μL、ddH_2O 8.5 μL,反应程序为:95 ℃,30 s;95 ℃,15 s,60 ℃,30 s,72 ℃,30 s,45个循环,进行3次生物学重复,表达量结果采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$的方法进行分析。

1.2.6　CaFLK的互作蛋白预测

以拟南芥的FLK蛋白序列作为参考,使用STRING在线网站(https://plantregmap.gao-lab.org/binding_site_prediction.php)对辣椒CaFLK蛋白进行互作蛋白预测分析。

1.2.7　数据处理

利用SPSS 26.0进行数据处理,并使用Microsoft Excel 2019软件作图,最后用Adobe Illustrator 2021软件美化图片。

表1　试验所用引物

Table 1　Primers used in this study

基因 Gene	正向引物(5′—3′) Forward primer	反向引物(5′—3′) Reverse primer	用途 Purpose
CaFLK	ATGGAGGAACTTGATCTTATC	TCAATAGCCGTAATTGTTACC	克隆
	TATTGGACGCAAAGGAGA	ATAGCAGGTGGAAGAGGG	实时荧光定量PCR
CaFLK promoter	CTCAAGTCTCACTGTAAACCCCA	GATCAGAGAATGAATGCCTGCCC	克隆
CaUBI3	TTGGCAAGCAACAATCAT	GCAGATGGACAGCAGGAC	内参基因

2　结果与分析

2.1　基因克隆、染色体定位、基因结构和保守结构域

以辣椒'zunla-1_v2.0'的基因组数据为依据对*CaFLK*的基因和启动子进行克隆和测序比对,最终确定该基因的CDS长度为1452 bp,启动子长度为2000 bp(图1A)。MG2C网站预测结果表明*CaFLK*基因定位于辣椒的8号染色体上(图1B)。GSDS网站结果表明*CaFLK*基因没有UTR编码区,包含9个外显子和8个内含子(图1C)。保守结构域结果表明CaFLK蛋白具有3个KH保守结构域,KH-Ⅰ_PEPPER_rpt1_like、KH-Ⅰ_PEPPER_rpt2_like以及KH-Ⅰ_PEPPER_like_rpt3(图1D)。*CaFLK*基因编码的蛋白含有483个氨基酸,其起始与终止密码子分别为ATG和TAG(图2)。

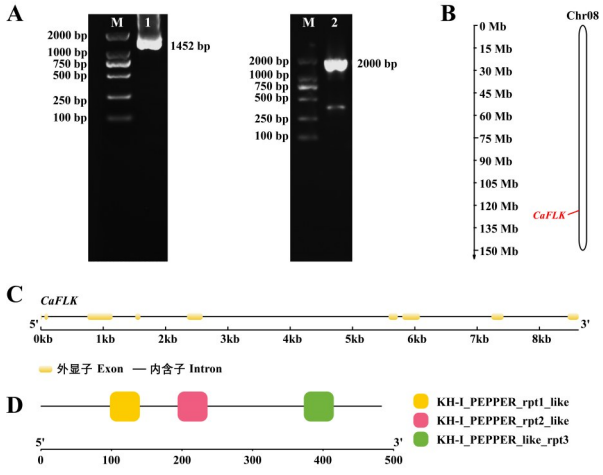


图1A中M表示marker,1表示*CaFLK*的基因克隆,2表示*CaFLK*的启动子克隆

M represents marker, 1 represents the gene cloning of *CaFLK*, and 2 represents the promoter cloning of *CaFLK* in Fig. 1A

图1 CaFLK的基因和启动子克隆(A)、基因在染色体上的位置(B)、基因结构特征(C)和保守结构域(D)

Fig.1 Gene and promoter clones of *CaFLK* (A), gene location on chromosomes (B), gene structural characteristics (C), and conserved domains (D)

2.2　CaFLK蛋白的生物信息学分析

2.2.1　理化性质

CaFLK蛋白的理化性质预测分析结果表明其分子质量为51.75 kDa,分子式为$C_{2270}H_{3572}N_{626}O_{721}S_{18}$,原子总数为7207,等电点为4.83,属于酸性蛋白。脂肪系数为72.07,不稳定系数为59.18,表明CaFLK蛋白属于不稳定蛋白。亲水性指数为-0.49,表明CaFLK蛋白为亲水性蛋白。

2.2.2　蛋白的磷酸化、N-糖基化位点及亲疏水性

对CaFLK蛋白N-糖基化位点预测结果显示(图3A),CaFLK蛋白有2个N-糖基化位点,分别位于第165位和第411位氨基酸残基处。CaFLK蛋白磷酸化位点的预测分析表明(图3B),其共有38个磷酸化位点,其中丝氨酸(Ser)24个、苏氨酸(Thr)9个、酪氨酸(Tyr)5个。亲疏水性结果表明CaFLK蛋白为亲水性蛋白(图3C)。

```
1       ATGGAGGAACTTGATCTTATCAAACAAGAGACTCTGGAGGAACTTGATGAAAGCCTTAATCAACATGAGAACGAGGGAGTACCAGAGGACTTACTCCTTGAGGTGAAAGAAGAACCATCT
1        M  E  E  L  D  L  I  K  Q  E  T  L  E  E  L  D  E  S  L  N  Q  H  E  N  E  G  V  P  E  D  L  L  L  E  V  K  E  E  P  S
121     CCCCTTGAGGTGAAGCAAGATCAAGAGCAAGAACAAGAACAGGAACAAGTGCAGGAACAAAAACAAGAACAAGCACAAGAAAATGTTGCTGCTACTGGAGGTGGTGGTGACAGGTGGCCA
41       P  L  E  V  K  Q  D  Q  E  Q  E  Q  E  Q  E  Q  V  Q  E  Q  K  Q  E  Q  A  Q  E  N  V  A  A  T  G  G  G  G  D  R  W  P
241     GGATGGCCTGGAGAAAGTGTATTTCGCATTTTGGTCCCTTCACAAAAAGTAGGGGGCCTTATTGGACGCAAAGGAGAGTTCATCAAAAAAATTGTTGAAGAATCAAAAGCTCGTATTAAG
81       G  W  P  G  E  S  V  F  R  I  L  V  P  S  Q  K  V  G  G  L  I  G  R  K  G  E  F  I  K  K  I  V  E  E  S  K  A  R  I  K
361     GTTCTCGATGGTCCTCCAGGGACTACTGAGAGAGCAGTAATGGTATCTGCCAAGGAGGAGCCTGAATCCCCTCTTCCACCTGCTATAGATGGTCTTCTGAGGGTTCATAGACGTGTTGTG
121      V  L  D  G  P  P  G  T  T  E  R  A  V  M  V  S  A  K  E  E  P  E  S  P  L  P  P  A  I  D  G  L  L  R  V  H  R  R  V  V
481     GATGGGCTGGAGAATGATTCTTCTCAGCATCCTCCAACTGTAGCTGGAAAGGTTTCGACAAAGCTGCTTGTGCCAGCTTCACAGGCTGGAAGCCTTATTGGAAAACAAGGGACAACCGTC
161      D  G  L  E  N  D  S  S  Q  H  P  P  T  V  A  G  K  V  S  T  K  L  L  V  P  A  S  Q  A  G  S  L  I  G  K  Q  G  T  T  V
601     AAGTCCATTCAAGAAGCATCCAGTTGTATTGTTAGAGTTCTTGGAACAGAGGACCTTCCCATGTTCGCACTTCAAGATGATAGGGTAGTTGAAGTAGTAGGGGAACCTGTGGGTGTGCAC
201      K  S  I  Q  E  A  S  S  C  I  V  R  V  L  G  T  E  D  L  P  M  F  A  L  Q  D  D  R  V  V  E  V  V  G  E  P  V  G  V  H
721     AAGGCAGTTGAGTTGATTGCTTCTCATCTGAGGAAATTTTTGGTTGATCGTGGCATAATCCCAGTATTTGAGATGCAAATGCAAATGCCAAATCCACCAGTGGAACACATGCCACCTCCC
241      K  A  V  E  L  I  A  S  H  L  R  K  F  L  V  D  R  G  I  I  P  V  F  E  M  Q  M  Q  M  P  N  P  P  V  E  H  M  P  P  P
841     CAATCTTGGGGTCCTCCTCCCCCAAGCTTTCCCACCAAGCGCAGCTGGAGGTCCGGGATACGGAAGTAGTCCTCATTTCATGCCACCATCCAGGCAACATGACAGTTATTATCCACCACCT
281      Q  S  W  G  P  P  P  Q  A  F  P  P  S  A  A  G  G  P  G  Y  G  S  S  P  H  F  M  P  P  S  R  Q  H  D  S  Y  Y  P  P  P
961     GACATGCCACCTCCTATGGAAAAACAACCTCATCAAGGCATTTCTGCATATGGAAGAGAAGCTCCAATGTCGATGCATTCATCATCCAACAACCCAGCTGCTCCGTCTCTTGTTACTCAG
321      D  M  P  P  P  M  E  K  Q  P  H  Q  G  I  S  A  Y  G  R  E  A  P  M  S  M  H  S  S  S  N  N  P  A  A  P  S  L  V  T  Q
1081    ATTACACAGCAGATGCAGATCCCACTGGCCTTTGCTGATGCTGTGATTGGAACAAATGGTGCAAGCATAAGCTACATCCGACGGGTTAGTGGTGCTACTGTTACAATACAGGAAACAAAA
361      I  T  Q  Q  M  Q  I  P  L  A  F  A  D  A  V  I  G  T  N  G  A  S  I  S  Y  I  R  R  V  S  G  A  T  V  T  I  Q  E  T  K
1201    GGAGTTCCTGGGGAGATGACAGTTGAGATCAATGGAACTGCTTCTCAAGTGCAAACAGCACAACAGTTGATACAGAATTTCATGGCAGACGCTGGGGCACCTCCGGCACAGGCAGGTCCA
401      G  V  P  G  E  M  T  V  E  I  N  G  T  A  S  Q  V  Q  T  A  Q  Q  L  I  Q  N  F  M  A  D  A  G  A  P  P  A  Q  A  G  P
1321    CCAGCTGACCAAGGTTACAACCCCTATGGAGCTCCTCCTGCTGCTATGTATTCTTCTGCCCCTTCAAATGCAGGCATTCCGGGGCAACCTGGGGGCTATGGTTCAATGTATGGTAACAAT
441      P  A  D  Q  G  Y  N  P  Y  G  A  P  P  A  A  M  Y  S  S  A  P  S  N  A  G  I  P  G  Q  P  G  G  Y  G  S  M  Y  G  N  N
1441    TACGGCTATTGA
481      Y  G  Y  *
```

图2 *CaFLK*基因的序列对照图

Fig.2 Sequence control diagram of the *CaFLK* gene

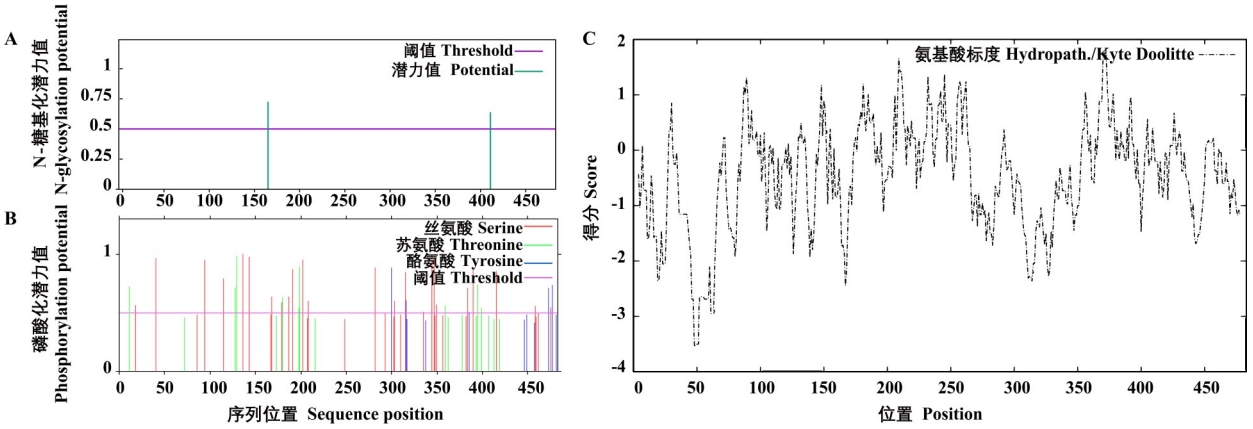


图3 CaFLK蛋白的磷酸化(A)、N-糖基化位点(B)和亲疏水性(C)

Fig.3 Phosphorylation (A), N-glycosylation sites (B) and hydrophilicity (C) of CaFLK protein

2.2.3 CaFLK蛋白的结构预测

CaFLK蛋白不存在跨膜结构(图4A),同时蛋白不具有信号肽(图4B),表明其属于非分泌蛋白。CaFLK蛋白的二级结构由无规则卷曲(319个,占比66.05%)、α-螺旋(92个,19.05%)、延伸链(64个,13.25%)和β-转角(8个,1.66%)4部分所组成,其中β-转角的数目最少,表明此蛋白主要由无规则卷曲和α-螺旋构成,属混合型蛋白(图4C)。CaFLK蛋白的三级结构在整体特征上与二级结构基本一致,无规则卷曲和α-螺旋占据了结构的大部分区域,而延伸链与β-转角以分散形式存在于其中(图4D)。

2.3 CaFLK蛋白的系统进化分析

通过NCBI数据库比对筛选得到与辣椒CaFLK蛋白序列相似性较高的9个物种FLK蛋白序列,物种名称分别为枸杞(*Lycium barbarum*,XP_060218225.1)、番茄(*Solanum lycopersicum*,XP_004230074.1)、多疣茄(*Solanum verrucosum*,XP_049351001.1)、烟草(*Nicotiana tabacum*,XP_016462448.1)、芝麻(*Sesamum indicum*,XP_011087393.1)、茶树(*Camellia sinensis*,XP_028099469.1)、开心果(*Pistacia vera*,XP_031268789.1)、毛果杨(*Populus trichocarpa*,XP_006382821.3)和可可树(*Theobroma cacao*,XP_

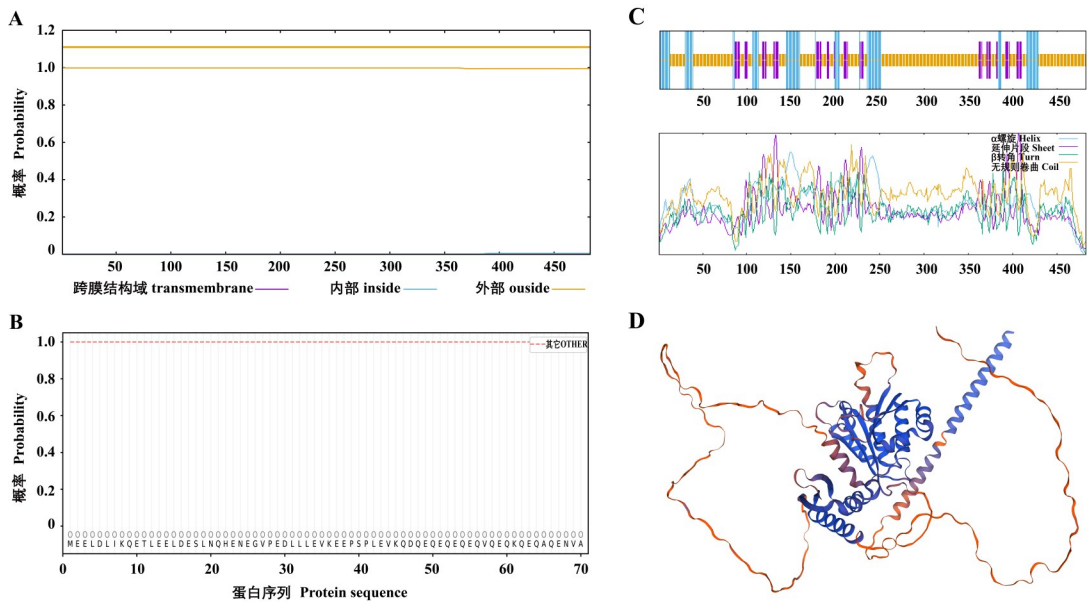


图4　CaFLK蛋白的跨膜结构(A)、信号肽(B)、二级结构(C)和三级结构(D)

Fig.4　The transmembrane domain (A), signal peptide sequence (B), secondary structure (C), and tertiary structure (D) of the CaFLK protein

017977374.1),通过DMAMAN软件进行多序列比对发现CaFLK的蛋白序列与9个物种的序列相似性高达70%以上(图5)。从系统进化树的结果可知,CaFLK蛋白与茄科作物(枸杞、番茄、多疣茄及烟草)的亲缘关系最为密切,同源性可达到95%,与毛果杨、开心果、可可树、茶树和芝麻的亲缘关系较远,推测CaFLK蛋白在辣椒中发挥的功能与枸杞、番茄、多疣茄和烟草的功能相似(图6)。

2.4　*CaFLK*基因在不同组织中的表达分析

对*CaFLK*基因在辣椒不同组织中的表达水平进行分析,结果表明其在辣椒叶片中的表达量最高,在花中表达最低,在根和茎中的表达量相近(图7)。由此推测其表达具有一定组织特异性。

2.5　启动子顺式作用元件分析

*CaFLK*的启动子区域含有13种顺式作用元件,其中除启动子必需的核心元件外,还含有5种光响应元件,推测该基因的表达可能受光调控。此外,该基因中含有与胁迫相关的干旱响应元件和与植物生长发育相关的厌氧诱导和胚乳表达相关的顺式作用元件。同时*CaFLK*基因的启动子上还含有赤霉素和脱落酸等激素响应元件,表明该基因可能受胁迫响应和激素信号诱导,参与调控植物的生长发育过程(表2)。

2.6　*CaFLK*在不同非生物胁迫和激素诱导下的表达分析

辣椒*CaFLK*基因的表达水平受非生物胁迫和激素的诱导,且表达水平随胁迫处理类型和处理时间的不同而表现出较大差异(图8)。在盐胁迫下,*CaFLK*基因的表达先下降再上升,在处理24 h达到峰值,为对照的1.61倍以上。在低温胁迫下,*CaFLK*基因的表达水平表现为先上升后下降,且在处理后12 h达到最大,为对照的17倍以上。在干旱处理下,*CaFLK*的表达呈现为先升后降,在处理1 h后达到最大,达对照的2.59倍。MeJA和IAA处理后,该基因的表达均表现为先升后降而后再回升的趋势,分别在处理后6 h和1 h达到峰值,分别为对照的4.48倍和2.15倍。在ABA处理下,*CaFLK*的表达表现为先升后降的趋势,在处理后3 h后达到峰值,达对照的4.68倍。综上所述,*CaFLK*基因在低温、干旱、MeJA和ABA处理下有较高的表达水平,且该基因在低温下的表达最高,表明其可能参与辣椒抵御低温的响应。

2.7　互作蛋白预测

为了揭示CaFLK蛋白的调控机制,运用蛋白质互作网络预测网站(STRING)对其互作蛋白进行预测分析(图9)。结果显示有5个蛋白质与CaFLK蛋白互作,分别是开花调节因子MSI4;含有2个RNA结合结构域和1个与WW蛋白相互作

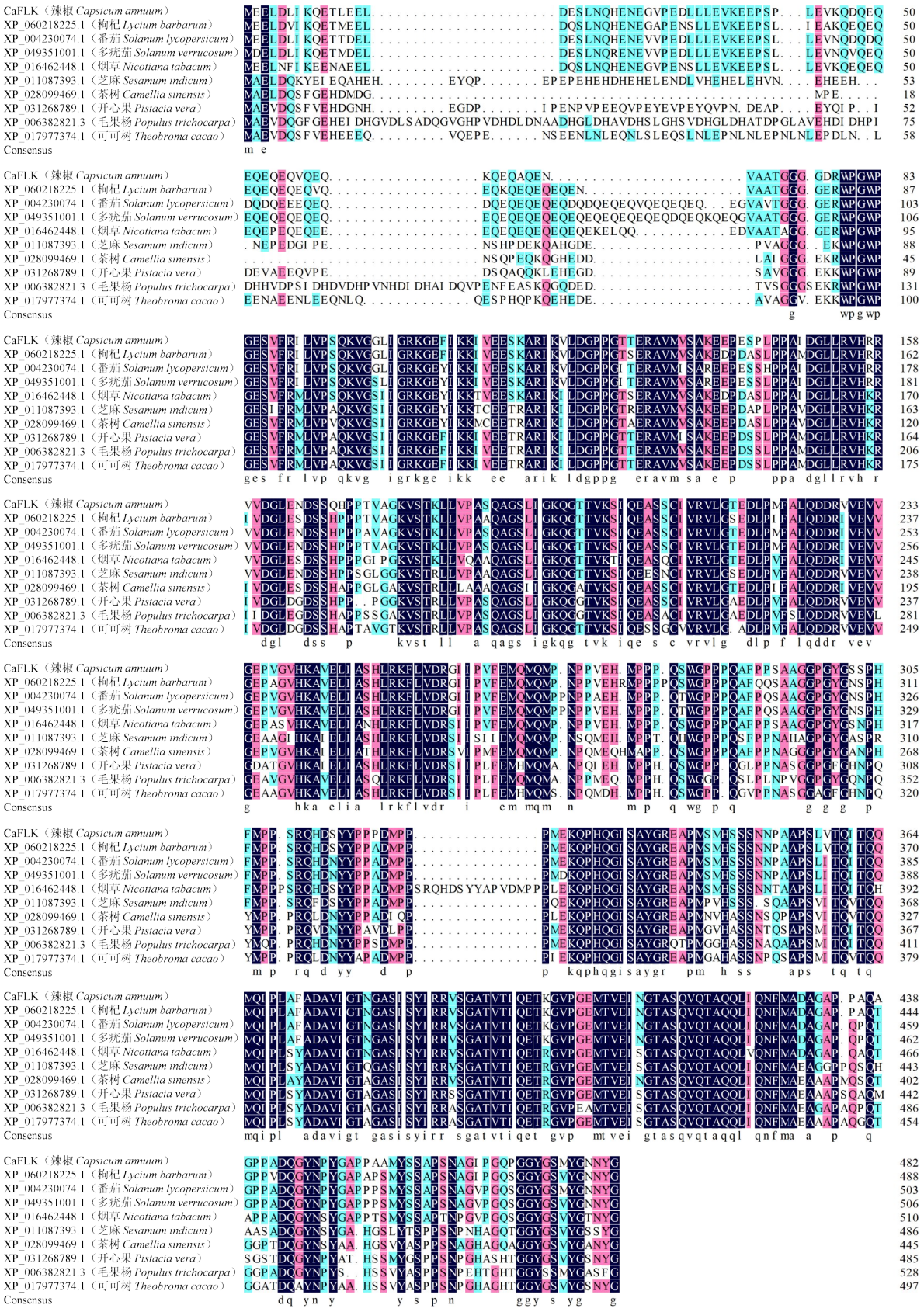


图5 CaFLK蛋白与其它物种的序列比对分析

Fig.5 Sequence alignment analysis of CaFLK protein with other species

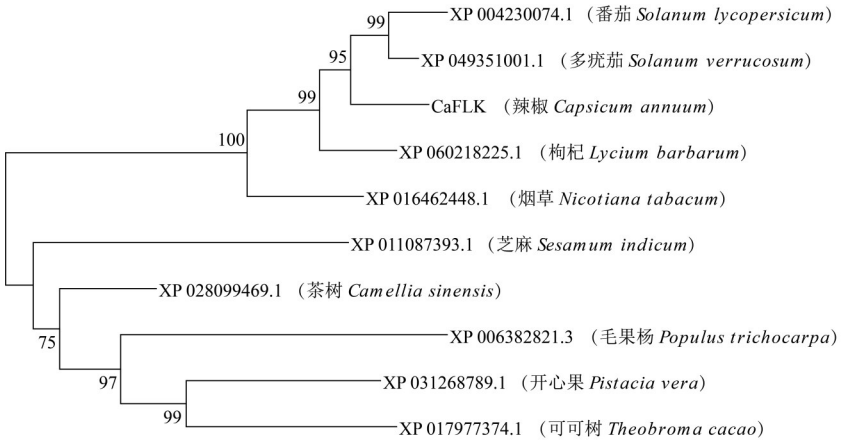
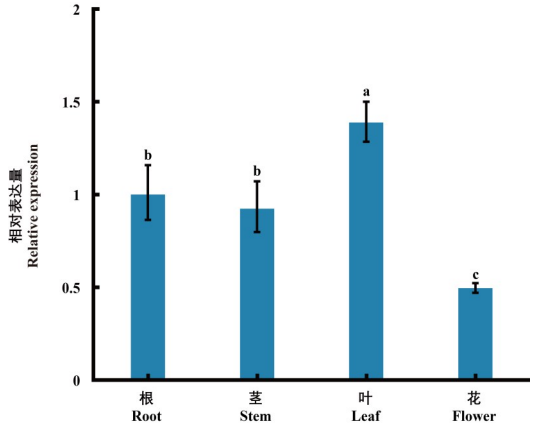


图6　CaFLK蛋白与其他不同物种间的系统进化分析

Fig.6　Phylogenetic analysis of CaFLK proteins and other different species



不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters denote significant differences at the $P<0.05$ level

图7　*CaFLK*基因在不同组织中的表达

Fig.7　Expression of *CaFLK* gene in different tissues

表2　*CaFLK*基因启动子顺式作用元件

Table 2　*CaFLK* gene promoter cis-acting elements

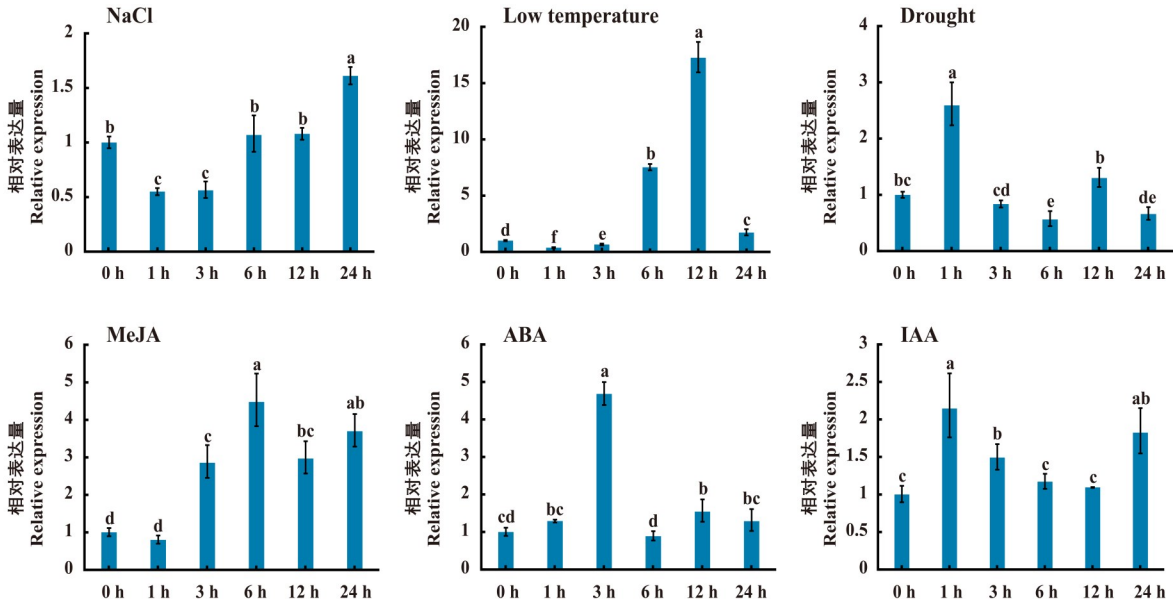
顺式元件类型 Cis-acting element	生物学功能 Biological function
TCT-motif	光响应元件
MBS	参与干旱诱导性的MYB结合位点
GCN4-motif	与胚乳表达有关的顺式元件
G-box	参与光响应的顺式元件
MRE	参与光响应的MYB结合位点
GC-motif	参与缺氧特异性诱导的增强样元件
AE-box	光响应模块的一部分
P-box	赤霉素响应元件
ABRE	参与脱落酸反应的顺式元件
ARE	参与厌氧诱导的顺式元件
ATCT-motif	参与光反应的保守DNA模块的一部分
CAAT-box	启动子和增强子
TATA-box	转录起始-30左右的核心启动子元件

用结构域的蛋白FCA;在N末端区域包含三个RNA识别基序的开花调节蛋白FPA;酵母多聚腺苷酸化因子Pcf11p的拟南芥同源物、在N端具有完整CID结构域的开花调节蛋白PCFS4和含CCCH锌指基序的RNA结合蛋白HUA1。

3　讨论

*FLK*作为调节植物开花的关键基因之一,能够通过负调控开花抑制基因*FLC*的表达,从而对开花进行调控,同时该基因在逆境适应过程中也有重要作用[9]。本研究成功从辣椒中克隆得到了*CaFLK*基因,该基因的序列全长为1452 bp,编码483个氨基酸,同时该蛋白含有3个KH保守结构域,分别为KH-Ⅰ_PEPPER_rpt1_like、KH-Ⅰ_PEPPER_rpt2_like和KH-Ⅰ_PEPPER_like_rpt3,这与拟南芥的研究相似[18]。CaFLK蛋白序列分析表明该蛋白属于酸性蛋白和不稳定蛋白,且蛋白没有信号肽和跨膜结构域,为非分泌蛋白,同时其二、三级结构预测表明CaFLK的结构主要由无规则卷曲和α-螺旋组成;系统进化分析发现CaFLK蛋白与枸杞、番茄、多疣茄和烟草等茄科作物的亲缘关系最近,这表明该蛋白具有高度保守性。

*FLK*基因在不同组织中存在较大差异。在菊花的营养生长阶段,*CmFLK*在顶端分生组织、幼叶及根中高表达;在其生殖生长阶段,花器官中*CmFLK*的表达水平急剧下降。该基因在营养生长阶段的高表达能发挥其促进植株生长、构建植

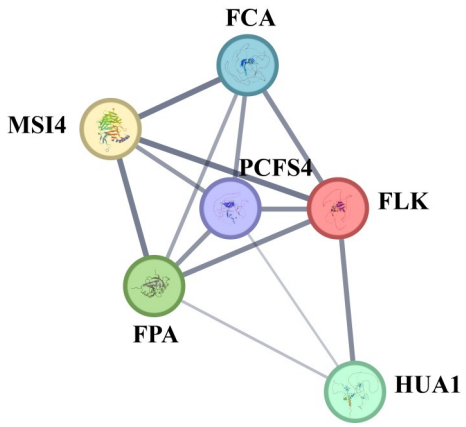


不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Varied lowercase letters denote significant differences at the 0.05 level

图8 *CaFLK*基因在不同胁迫和激素诱导下的相对表达

Fig.8 Relative expression of *CaFLK* gene under different stresses and hormone induction



节点间线条粗细及颜色深浅代表互作强度,线条越粗,颜色越深,互作强度越强;线条越细,颜色越浅,互作强度越弱

The thickness and darkness of the lines between nodes represent the intensity of interaction. The thicker and darker the line, the stronger the interaction; the thinner and lighter the line, the weaker the interaction

图9 CaFLK蛋白的互作蛋白预测

Fig.9 Prediction of CaFLK protein interactions

株形态的作用;在花期低表达则可以避免干扰花器官的发育及后续生殖过程。此外,CmFLK还能与乙烯响应因子CmERF110相互作用,且其调控的生物钟基因表达呈现明显节律性,在光周期转换节点表达波动显著,推测其可能通过互作调控生物钟节律,进而影响菊花光周期响应及开花进程[19]。*GmFLK*在大豆的花、叶、根、种子和茎中均有表达,其中在叶和种子中表达相对较高,在花中表达相对较低;此外该基因在长、短日照条件下的整体表达模式相似,但在一天中呈动态变化,在光照后0、12 h表达较高,4 h较低,暗示其可能通过响应生物钟影响大豆花发育[20]。在本研究中,同样发现辣椒*CaFLK*基因的表达水平在叶片、根和茎中表达较高,在花中的表达稍低,这与菊花和大豆FLK基因的表达模式相似,推测其可能以类似的方式调控辣椒的开花过程。

启动子作为基因表达过程中的调控序列,是理解基因转录调控机制和表达模式的关键[21],因此对*CaFLK*基因的启动子进行顺式作用元件分析,能够了解该基因具有的潜在功能。*CaFLK*的启动子区域含有大量光响应元件,表明该基因在光信号调控中发挥作用[22];还含有干旱、厌氧诱导和胚乳表达等非生物胁迫响应元件,表明其可能在抵御干旱和厌氧等胁迫时发挥重要作用[23];此外,该基因启动子还含有赤霉素和脱落酸等激素响应元件,表明该基因可能在激素信号诱导过程中起重要作用[24]。不同物种中*FLK*基因对胁迫及激素的响应不同。在拟南芥中FLK通过稳定DELLA蛋白调控高温环境下的花粉发育,而在低温下,FLK的活性会增强,这会促进DELLA蛋白积累,进而抑制赤霉素(GA)信号,通过延缓开花

来帮助植物适应低温环境[9]。在番茄*flc*突变体中,由于其ABA合成存在缺陷,盐热复合胁迫通过ABA非依赖途径诱导*FLK*相关基因表达,其调控的差异基因主要富集于氧化代谢、转录调控和转运活性通路[25]。*FLK*通过调控水杨酸介导的防御信号、防御及发育相关基因的表达丰度与可变剪接(如影响*ACD6*的内含子滞留),影响拟南芥对细菌性和坏死性病原菌的抗性,平衡植物的防御与发育过程[26]。*FLK*基因还可能通过调控水杨酸介导的信号通路,间接参与到茉莉酸甲酯和脱落酸的信号交叉调控,通过影响相关基因的表达及可变剪接,协调植物防御与发育的平衡[27]。本研究发现在不同胁迫下,*CaFLK*基因在低温下的表达水平最高,其次是干旱和盐胁迫;在不同激素处理下,*CaFLK*基因在MeJA和ABA下具有较高的表达水平。

辣椒*FLK*基因分子机制的研究对于揭示其功能有重要意义。蛋白质互作网络预测研究表明CaFLK蛋白与5个蛋白存在互作关系。MSI4蛋白通过与CUL4-DDB1及CLF-PRC2复合体结合,促进FLC染色质的H3K27三甲基化以抑制FLC表达,解除FLC对FT的抑制,促进开花[28]。FCA能感知温度,较高温度下其表达升高,通过RNA识别基序促进初级miR172加工,诱导FT表达促进开花;低温则表达低,延迟开花[29]。FPA属自主途径调控蛋白,含RNA识别基序,在发育组织中高表达,过表达使植物在短日照下提前开花,突变导致开花极晚[30]。PCFS4与FY形成复合体,参与FCA选择性多聚腺苷酸化,调控*FLC*以促开花,突变则开花延迟[31]。HUA1作为含CCCH锌指的RNA结合蛋白,调控AG等基因相关RNA,保障生殖器官正常形成[32]。上述研究结果表明这5个蛋白都与开花时间相关,由此推测与之有互作关系的辣椒FLK蛋白也可能调控辣椒的开花时间。后续可构建辣椒*CaFLK*基因的过表达及沉默载体进行遗传转化,以期进一步明确其功能,为辣椒育种提供理论依据。

4　结论

本研究成功克隆了*CaFLK*基因,对其基因结构和蛋白序列的特征等进行了系统分析,并通过实时荧光定量PCR技术对该基因在辣椒不同组织及不同胁迫和激素处理下的表达模式进行了分析。结果表明*CaFLK*基因受不同胁迫和激素诱导表达,可能在辣椒抵御胁迫的过程中发挥作用,此外互作蛋白预测结果表明*CaFLK*基因可能与花期调控相关蛋白互作,这为研究该基因在辣椒中的功能提供了方向。

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.
Zou X X,Zhu F. Origin,evolution and cultivation history of the pepper[J]. Acta Horticulturae Sinica,2022,49(6):1371-1381.

[2]陈卫国,田斌,刘克禄,等. 极早熟辣椒新品种甘科4号的选育[J]. 中国蔬菜,2019(7):88-91.
Chen W G,Tian B,Liu K L,et al. A new hot pepper F_1 hybrid—'ganke No. 4'[J]. China Vegetables,2019(7):88-91.

[3]张子峰.我国辣椒产业发展现状,主要挑战与应对之策[J].北方园艺,2023(14):153-158.
Zhang Z F. Current development situation, main challenges and its countermeasures of the pepper industry in China [J]. Northern Horticulture,2023(14): 153-158.

[4]王丽,王剑峰,孔鑫,等. 辣椒育种、繁殖、逆境胁迫的研究进展[J]. 分子植物育种,2025,23(13):4456-4464.
Wang L, Wang J F, Kong X, et al. Research progress on breeding, propagation, and adversity stress in pepper [J]. Molecular Plant Breeding,2025,23(13):4456-4464.

[5]张雪莲,罗德旭,刘欣,等.高温胁迫下不同辣椒耐热性鉴定及生理生化特性研究[J].江西农业学报,2023,35(1):70-75.
Zhang X L, Luo D X, Liu X, et al. Identification of heat tolerance and physiological and biochemical characteristics of different peppers under high temperature stress [J]. Acta Agriculturae Jiangxi,2023,35(1): 70-75.

[6]徐小万,曾莉,李颖,等.辣椒开花期的主基因+多基因遗传分析[J].生物数学学报,2012,27(4):753-757.
Xu X W, Zeng L, Li Y, et al. Major gene plus poly-gene inheritance analysis of the flowing time in pepper (*Capsicum annuum* .L)[J]. Journal of Biomathematics, 2012, 27(4): 753-757.

[7]方荣,陈学军,周坤华,等. 辣椒早熟性状遗传研究进展[J]. 中国蔬菜,2009(22):1-5.
Fang R, Chen X J, Zhou K H, et al. Research progress in pepper genetic characteristics of earliness [J]. China Vegetables,2009(22):1-5.

[8]段若晨. AtHD2D通过赤霉素途径调控开花的分子机制初探[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2024.
Duan R C. Preliminary study on molecular mechanism of AtHD2D regulating flowering through gibberellin pathway[D]. Yangling:Northwest A & F University,2024.

[9]潘婷. FLK通过稳定DELLA蛋白调控拟南芥高温下的花粉发育[D]. 兰州:兰州大学,2024.
Pan T. FLK regulates pollen development of *Arabidopsis*

thaliana under high temperature by stabilizing DELLA protein [D]. Lanzhou:Lanzhou University,2024.

[10]Lim M H,Kim J,Kim Y S,et al. A new *Arabidopsis* gene, FLK encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time *via* FLOWERING LOCUS C [J]. 2004,16(3):731-740.

[11]Ripoll J J, Rodríguez-Cazorla E, González-Reig S, et al. Antagonistic interactions between *Arabidopsis* K-homology domain genes uncover PEPPER as a positive regulator of the central floral repressor FLOWERING LOCUS C [J]. Developmental Biology,2009,333(2):251-262.

[12]Rodríguez-Cazorla E, Ripoll J J, Andújar A, et al. K-homology nuclear ribonucleoproteins regulate floral organ identity and determinacy in *Arabidopsis*[J]. PLoS Genetics, 2015,11(2):e1004983.

[13]Zhao W, Chu S S, Jiao Y Q. Present scenario of circular RNAs (circRNAs) in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2019,10:379.

[14]Wang P L,Bao Y,Yee M C,et al. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life[J]. PLoS One,2014,9(6): e90859.

[15]Philips A, Nowis K, Stelmaszczuk M, et al. *Arabidopsis thaliana* cbp80, *c2h2*, and *flk* knockout mutants accumulate increased amounts of circular RNAs[J]. Cells, 2020, 9(9): 1937.

[16]Fabian M,Vrydagh L,Cervasio M,et al. The flowering time regulator FLK acts through the ROS scavenging gene CATALASE 2 in pathogen defense in *Arabidopsis*[J]. Plant Science,2025,359:112618.

[17]Glander S,He F,Schmitz G,et al. Assortment of flowering time and immunity alleles in natural *Arabidopsis thaliana* populations suggests immunity and vegetative lifespan strategies coevolve[J]. Genome Biology and Evolution,2018, 10(9):2278-2291.

[18]Rodríguez-Cazorla E,Ripoll J J,Candela H,et al. The KH-domain genes *FLK* and HOS5 integrate flowering and stress responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany,2025:eraf286.

[19]Huang Y Y,Xing X J,Tang Y,et al. An ethylene-responsive transcription factor and a flowering locus KH domain homologue jointly modulate photoperiodic flowering in *Chrysanthemum*[J]. Plant,Cell & Environment,2022,45(5): 1442-1456.

[20]赵胜男,高美欣,于朝杭,等.大豆*GmFLK*基因的克隆及特性分析[J].华北农学报,2023,38(3):26-34.
Zhao S N, Gao M X, Yu Z H, et al. Cloning and characteristic analysis of soybean *GmFLK* gene [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2023,38(3): 26-34.

[21]Hernandez-Garcia C M,Finer J J. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements [J]. Plant Science,2014,217:109-119.

[22]李濯雪,陈信波. 植物诱导型启动子及相关顺式作用元件研究进展[J]. 生物技术通报,2015,31(10):8-15.
Li Z X, Chen X B. Research advances on plant inducible promoters and related *cis*-acting elements[J]. Biotechnology Bulletin,2015,31(10):8-15.

[23]Yoshida T,Fujita Y,Sayama H,et al. AREB1,AREB2,and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation[J]. The Plant Journal,2010,61(4):672-685.

[24]Saidi A, Hajibarat Z. Characterization of *cis*-elements in hormonal stress-responsive genes in *Oryza sativa*[J]. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology,2019: 95-102.

[25]Pardo-Hernández M,Arbona V,Simón I,et al. Specific ABA-independent tomato transcriptome reprogramming under abiotic stress combination[J]. The Plant Journal,2024,117(6):1746-1763.

[26]Fabian M, Gao M, Zhang X N, et al. The flowering time regulator FLK controls pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology,2023,191(4):2461-2474.

[27]Aleman F, Yazaki J, Lee M, et al. An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 transcription factor: a putative link of ABA and JA signaling [J]. Scientific Reports,2016,6:28941.

[28]Pazhouhandeh M, Molinier J, Berr A, et al. MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2011,108(8):3430-3435.

[29]Jung J H,Seo P J,Ahn J H,et al. *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012,287(19):16007-16016.

[30]Schomburg F M,Patton D A,Meinke D W,et al. *FPA* a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs[J]. The Plant Cell,2001, 13(6):1427-1436.

[31]Xing D H,Zhao H W,Xu R Q,et al. Arabidopsis PCFS4,a homologue of yeast polyadenylation factor Pcf11p, regulates FCA alternative processing and promotes flowering time[J]. The Plant Journal,2008,54(5):899-910.

[32]Li J J,Jia D X,Chen X M. HUA1,a regulator of stamen and carpel identities in *Arabidopsis*, codes for a nuclear RNA binding protein[J]. The Plant Cell,2001,13(10):2269.

(编辑:吕俊俐)