

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.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.10.016

辣椒 *CaNRAMP* 基因家族的鉴定与表达分析

胡 灿¹, 刘 峰², 王运生¹

(1. 湖南农业大学, 湖南长沙 410128; 2. 湖南省农业科学院蔬菜研究所, 湖南长沙 410128)

摘要:为了初步研究辣椒(*Capsicum annuum* L.)*NRAMP* 家族基因在重金属镉胁迫下的表达情况,通过生物信息学方法从辣椒基因组中鉴定出 *NRAMP* 基因,并对这些基因的序列结构、系统进化树、表达谱等进行系统分析。结果表明,辣椒中含有 5 个具有典型 *NRAMP* 结构域的基因,根据其在染色体上的位置,分别将其命名为 *CaNRAMP1* ~ *CaNRAMP5*,根据系统进化分析,将辣椒的 *NRAMP* 基因分为 2 类,Ⅰ类包含 2 个基因(*CaNRAMP1*、*CaNRAMP3*),分别含有 10、12 个内含子,Ⅱ类包含 3 个基因(*CaNRAMP2*、*CaNRAMP4*、*CaNRAMP5*),均含有 3 个内含子。基于基因组织表达模式的分析结果表明,*CaNRAMP1* 在不同组织中均未检测到其表达;*CaNRAMP5* 的表达集中在花器官,其余 *CaNRAMP* 基因均有不同的表达模式;通过逆转录定量 PCR(qRT-PCR)分析发现,辣椒苗期中的叶片经过镉处理后,*CaNRAMP3* 基因呈明显上调的趋势,参与镉胁迫反应的正向调控,其他基因则不参与镉胁迫反应的调控。研究结果为进一步分析辣椒 *NRAMP* 基因家族的功能奠定了基础。

关键词:辣椒;*NRAMP* 基因家族;生物信息学;基因表达

中图分类号: S641.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)10–0069–06

辣椒(*Capsicum annuum* L.)为茄科辣椒属一年或有限多年生草本植物。2016 年我国辣椒的种植面积超过 133.33 万 hm^2 ,占世界辣椒种植面积的 35%,经济总产值超过 700 亿元,产值和效益位居蔬菜作物前列。*NRAMP* (natural resistance associated macrophage protein,天然抗性相关巨噬细胞蛋白)家族蛋白是一类广泛存在于生物界、能转运不同金属离子的跨膜蛋白家族,它们对于调控和维持生物内金属离子的稳态发挥着重要作用。*NRAMP* 家族蛋白采用质子共运输方式,参与铁离子(Fe^{2+})、锰离子(Mn^{2+})、锌离子(Zn^{2+})、铜离子(Cu^{2+})、镉离子(Cd^{2+})、镍离子(Ni^{2+})、钴离子(Co^{2+})、铝离子(Al^{3+})、砷离子(As^{3+})等不同金属离子的运

输^[1–4]。*NRAMP* 首先于哺乳动物巨噬菌细胞内被发现,因其能增加对胞内寄生物的敏感性而得名^[5]。随后,*NRAMP* 同源基因被证实存在于细菌、酵母、藻类和动植物中^[1]。研究发现,*NRAMP* 在不同物种中高度保守,一般具有 10~12 个典型的跨膜结构域、1 个胞质外转运蛋白特征结构域^[6]。

目前,研究者已经在拟南芥、水稻等植物中进行了 *NRAMP* 基因的克隆与功能鉴定,发现植物 *NRAMP* 家族蛋白基本定位于质膜和液泡膜上,主要在根、芽中表达,参与一些必需营养元素的转运和调控^[7]。拟南芥中的 *AtNRAMP1* 对植株从土壤中吸收 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 发挥着重要作用^[8–9]。*AtNRAMP3* 在低 Fe^{2+} 环境下于植株维管束中表达,可能参与 Fe^{2+} 的长途运输^[10]。*AtNRAMP3/4* 可以从拟南芥种子液泡中转运 Fe^{2+} 供幼苗在低 Fe^{2+} 环境下萌发生长^[11]。水稻 *OsNRAMP3* 通过调控植物体内和外界的 Mn^{2+} 浓度,从而使植株正常生长^[12]。此外研究也发现,*NRAMP* 家族蛋白同样参与有毒重金属的吸收和转运,在提高植物的抗性方面发挥着重要作用。拟南芥的 *AtNRAMP1/3/4* 在酵母中异源表达时具有转运 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 的相关能力^[11,13]。*AtNRAMP6* 对

收稿日期:2018–03–16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31470105);南方蔬菜优质高效生产关键技术研究示范项目(编号:2014BAD05B04)。

作者简介:胡 灿(1991—),男,湖南岳阳人,硕士研究生,主要从事微生物与植物分子互作研究。E-mail:912514197@qq.com。

通信作者:王运生,博士,教授,主要从事生物信息学研究。E-mail:54757519@qq.com。

1 is required for trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. Molecular Plant, 2015, 8(9): 1396–1411.

[8] Ricardi MM, González, Rodrigo M, Zhong S, et al. Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 29.

[9] 刘 希,李远凤,齐亚飞,等. 拟南芥自噬蛋白 ATG8e 的原核表达及多克隆抗体制备 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(18): 47–51.

[10] 李海玲,彭属明,李 凇,等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(4): 277–278, 282.

[11] Dai Y, Qin Q, Dai D et al. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding methyl jasmonate-responsive transcription factor

TcAP2 from *Taxus cuspidata* [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31: 1801.

[12] 高学慧. 金黄色葡萄球菌(ATCC6538)蛋白 A 基因的克隆及应用研究 [M]. 东北农业大学, 2010.

[13] 刘运超,冯丽丽,赵 宝,等. O 型口蹄疫病毒 VP3 蛋白的可溶性表达与反应原性分析 [J]. 河南农业科学, 2015, 44(11): 124–128.

[14] 顾文亮,夏启玉,姚 晶,等. 植物甜蛋白马宾灵(Mabinlin II)多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(18): 194–198.

[15] 黄国文,韩玉珍,傅永福. SUA41 蛋白表达和纯化及其多克隆抗体制备 [J]. 生物技术通报, 2012(3): 153–158.

Cd^{2+} 敏感并能调节 Cd^{2+} 在拟南芥和酵母细胞内的分布^[14]。水稻 OsNRAMP1 在拟南芥的木质部中表达时可以转运和积累 Cd^{2+} 、 As^{2+} ^[4,15-16]。OsNRAT1 (OsNRAMP4 的同源物) 和 OsNRAMP5 分别是植株内 Al^{3+} 和 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 的主要运输载体^[3,17]。另外, 在一些特殊植物如超富集植物遏蓝菜 (*Thlaspi caerulescens*) 中, 发现 TcNRAMP3/4 在酵母中异源表达时都能转运 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} , 并且 TcNRAMP 4 大都具备转运 Zn^{2+} 的能力^[18], 但是 TcNRAMP3/4 蛋白除了比拟南芥的同源蛋白 AtNRAMP3/4 的表达程度更高外, 在功能上并无明显区别。

2014 年, Qin 等对栽培辣椒品种遵辣 1 号及其野生祖先进行了基因组测序, 从而为辣椒的分子生物学研究奠定了良好基础^[19], 但是关于辣椒中的 NRAMP 基因是否参与重金属镉的转运却鲜有报道。本研究利用生物信息学方法, 对辣椒的 NRAMP 基因家族进行鉴定, 并通过逆转录定量 PCR (qRT-PCR) 分析辣椒苗期叶片在镉胁迫下相应基因家族的表达情况, 以期对辣椒 NRAMP 基因的镉运输功能研究和耐性品种选育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为辣椒 Zunla-1 号, 由湖南省农业科学院蔬菜研究所提供。将辣椒种子消毒后进行催芽处理, 种植于穴盘中, 置于光照培养箱内, 培养温度周期为 27℃—20℃, 光—暗周期为 14 h—10 h, 在幼苗有 4~6 张真叶时, 选择长势整齐的幼苗进行重金属 Cd^{2+} 胁迫处理 (100 $\mu\text{mol/L}$), 叶片样品分别设置 0、3、6、12、24 h 5 个时间点进行处理, 每次测试取 7 株样品, 设 3 次重复, 取样后立即放于液氮中速冻并置于 -80℃ 冰箱中待用。

1.2 辣椒 NRAMP 基因家族成员的鉴定与序列分析

辣椒全基因组数据从 Zunla-1 基因组数据库 (<http://peppersequence.genomics.cn>) 中获得, 利用 Pfam 数据库中的 NRAMP 隐马尔可夫模型搜索辣椒 NRAMP 家族蛋白。候选基因利用 MEGA 6.0 提供的 Clustal W 工具去除重复序列^[20], 在 Pfam 网站 (<http://pfam.xfam.org/search>) 上进行 NRAMP 结构域的鉴定。借助 Expasy 网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 获得辣椒 NRAMP 蛋白序列相关信息, 在 ProtComp 网站 (<http://www.softberry.com>) 上分析相应

蛋白的亚细胞定位, 通过 GSDS 网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 获得 NRAMP 基因的结构^[21]。利用生物学软件 DNAMAN 8.0 进行辣椒 NRAMP 结构域序列的多重比对, 通过 MEME 网站 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 进行基序 (motif) 分析, 参数设计如下: 基序长度为 6~50 个, 保守基序最大为 15; 其他参数为默认值。

采取同源搜索法从 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 官网 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 上下载拟南芥、水稻、大豆、苜蓿、番茄的 NRAMP 家族蛋白相关序列, 借助工具 MEGA 6.0, 采用邻接法构建相关系统进化树, 自举 (Bootstrap) 检测次数为 1 000 次, 其他均为默认设置。从 NCBI 网站上下载辣椒遵辣一号 (Zunla-1) 的不同组织和果实发育各时期的转录组测序技术 (RNA-seq) 数据, 利用 Tophat、Cufflink 软件进行转录组表达的差异分析, 运用 R 软件绘制 NRAMP 基因的表达热图。

1.3 总 RNA 的提取和 qRT-PCR 分析

参考张亚利等的研究方法^[22], 按照 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (北京博迈斯科技发展有限公司) 的操作方法提取叶片总 RNA, 利用 RNA 逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 反转录成 cDNA。按照 SYBR Premix Ex TaqTM II Mix (TaKaRa) 试剂盒的操作方法进行 qRT-PCR 试验, 利用 ABI 7000 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Prism, 美国) 检测表达量。以 β -actin 为内参基因, 利用 DNAMAN 8 软件设计特异性引物。设 3 个技术重复, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量^[23]。

2 结果与分析

2.1 辣椒 NRAMP 基因家族的鉴定

通过生物信息学方法, 从辣椒全基因组中得到 8 个候选基因, 剔除不含有 NRAMP 典型结构域的蛋白, 获得 5 个辣椒 NRAMP 基因。根据基因在染色体上的排列顺序, 分别命名为 *CaNRAMP1*~*CaNRAMP5* (表 1), 其中 1 个基因在染色体上的位置未知, 在染色体 2 和染色体 3 上各有 1 个基因, 在染色体 4 上有 2 个基因。辣椒 NRAMP 基因编码蛋白质的长度范围为 468 aa (*CaNRAMP1*)~541aa (*CaNRAMP4*), 分子量范围为 50.77 ku (*CaNRAMP1*)~58.95 ku (*CaNRAMP4*), 等电点介于 (*CaNRAMP4*) 5.54~8.82 (*CaNRAMP3*) 之间。

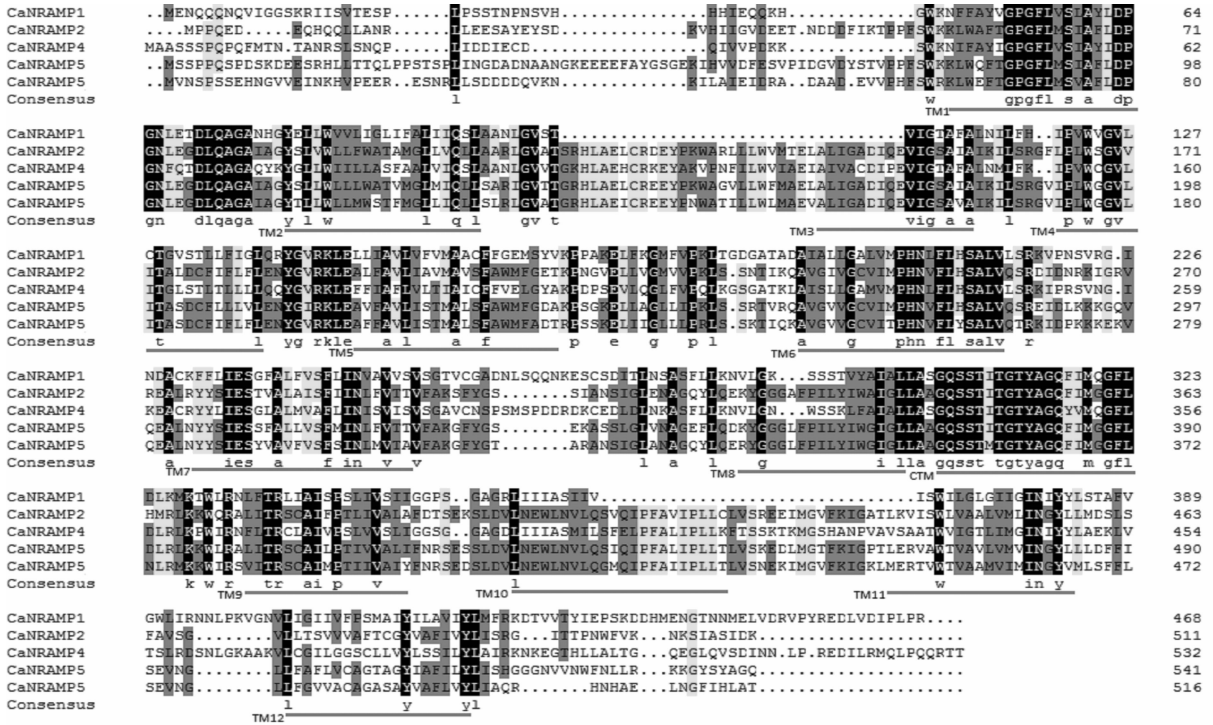
表 1 辣椒 NRAMP 基因家族的成员信息

基因名	基因序列号	编码区长度 (bp)	蛋白质长度 (aa)	分子量 (ku)	等电点	外显子数 (个)	亚细胞定位
<i>CaNRAMP1</i>	Capana00g003933	1 407	468	50.77	8.48	11	细胞质膜
<i>CaNRAMP2</i>	Capana02g003020	1 536	511	56.28	6.13	4	液泡膜
<i>CaNRAMP3</i>	Capana03g000474	1 602	533	57.78	8.82	13	细胞质膜
<i>CaNRAMP4</i>	Capana04g000633	1 626	541	58.95	5.54	4	液泡膜
<i>CaNRAMP5</i>	Capana04g000634	1 551	516	57.04	6.47	4	液泡膜

2.2 辣椒 NRAMP 蛋白的结构域与保守基序分析

通过 DNAMAN 6.0 对辣椒 *CaNRAMP* 的蛋白成员进行序列比对。由图 1 可以看出, *CaNRAMP1* 与 *CaNRAMP3* 的序列相似性为 50%, *CaNRAMP2* 与 *CaNRAMP4*、*CaNRAMP5* 的序列相似性分别为 69%、67%, 说明 *CaNRAMP* 蛋白成员之间存在较高的保守性。

利用在线工具 MEME 进一步分析辣椒 NRAMP 蛋白的保守基序, 在 15 个基序中, 基序 1、2、4、5、6、9 出现在所有成员中 (图 2)。基序 1 位于 TMD8、TMD9 及胞质内转运结构域 (CTM) 区, 其 CTM-GQSSTI (/M) TGTYAGQF (/Y) I (/V) MG (/Q) GFLD (/H/N) 是最长基序和最大的严格保守区域; 基序 2 位于 TMD1、TMD2 及其中的区域, 包含 TMD1 的严格保守氨



黑色区域显示有 100% 的序列相似性, 浅灰色区域显示至少有 75% 的序列相似性, 深灰色区域显示至少有 50% 的序列相似性。
右侧数据为氨基酸位点

图1 辣椒 NRAMP 蛋白的多重序列比对结果

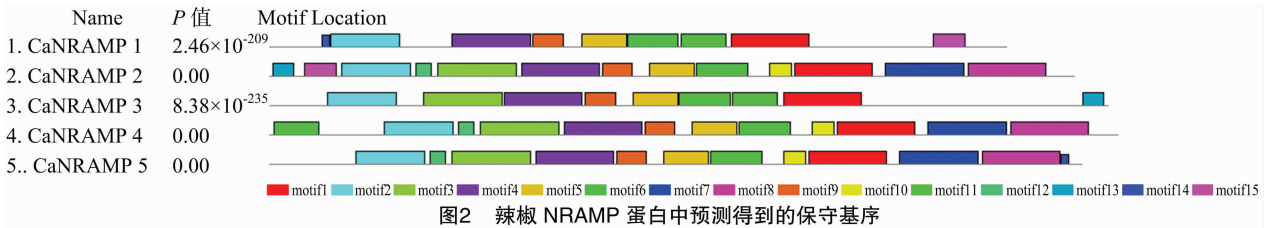


图2 辣椒 NRAMP 蛋白中预测得到的保守基序

基酸残基天冬氨酸 - 脯氨酸 - 甘氨酸 - 天冬酰胺 (Asp - Pro - Gly - Asn, 简称 DPGN)、甘氨酸 - 脯氨酸 - 甘氨酸 - 苯丙氨酸 - 亮氨酸 (Gly - Pro - Gly - Phe - Leu, 简称 GPGFL); 基序 5 位于 TMD6 及其中的区域, 包含位于 TMD6 的严格保守氨基酸残基脯氨酸 - 组氨酸 - 天冬酰胺 (Pro - His - Asn, 简称 PHN)、丝氨酸 - 丙氨酸 - 亮氨酸 - 缬氨酸 (Ser - Ala - Leu - Val, 简称 SALV); 基序 4, 6, 9 也相应地包含一些严格保守的氨基酸残基。总之, 上述结果说明, 辣椒的 NRAMP 蛋白结构具有高度的保守性, 其中严格保守残基可能在 NRAMP 蛋白行使转运金属离子的功能中发挥重要作用。此外, 辣椒 CaNramp1 丢失了部分基序, 这可能导致相应基因成为假基因或者失去了转运金属离子的功能。

2.3 辣椒 NRAMP 基因的系统发育树分析

通过 MEGA 6.0 对辣椒与拟南芥 AtNRAMP (6 个)、水稻 OsNRAMP (7 个)、大豆 GmNRAMP (8 个)、苜蓿 MtNRAMP (7 个)、番茄 LeNRAMP (3 个) 中已报道的 NRAMP 蛋白序列进行聚类分析。由图 3 可以看出, 6 种植物的 NRAMP 基因家族成员可以分为 2 大类 (I 和 II), 分别包含 2、3 个辣椒相关基因。I 类中辣椒的 CaNRAMP1 与番茄的 LeNRAMP1, II 类中辣椒的 CaNRAMP2/CaNRAMP4 分别与番茄的 LeNRAMP3、

LeNRAMP2 为直系同源基因; 大豆与苜蓿也有 2 对直系同源基因。由以上结果可知, 同科植物间的 NRAMP 基因进化关系更近。而大豆 (假多倍体植物) 有 4 对旁系同源基因, 说明大豆的 NRAMP 基因非常保守且扩张, 可能是由染色体基因组的复制造成的^[24]。另外, 在植物 NRAMP 基因成员聚类中, I 类基因中一般含有 10 ~ 12 个内含子, II 类中一般含有 3 个内含子, 这种高度相似的外显子 - 内含子结构揭示了植物 NRAMP 基因家族的进化保守性; 同时 NRAMP 基因在内含子数量或长度上都有不同的进化, 表明 I 类 NRAMP 基因在进化上更加复杂和具有多样性, 而 II 类 NRAMP 基因更趋向于保守。

2.4 辣椒 NRAMP 基因家族的组织表达模式

为了分析辣椒 NRAMP 基因的表达模式, 从 NCBI 中获取 Zunla - 1 不同组织 (根、茎、叶、花蕾、花) 及果实发育各时期的 RNA - seq 数据, 结果未检测到 CaNRAMP1 基因的表达信号。由图 4 可以看出, CaNRAMP5 在花蕾、花中具有中等丰度的表达, 其余 3 个基因各有不同组织的表达模式。在不同组织中, CaNRAMP2 的表达量在花蕾中最高, 然后依次是根、花和茎中的表达量, 在叶中的表达量相对最低; CaRAMP3 的表达量在花中最高, 其后依次是叶和根, 在茎、花蕾中的表达量相对最低; CaNRAMP4 的表达量在根中最高, 其后依次是在

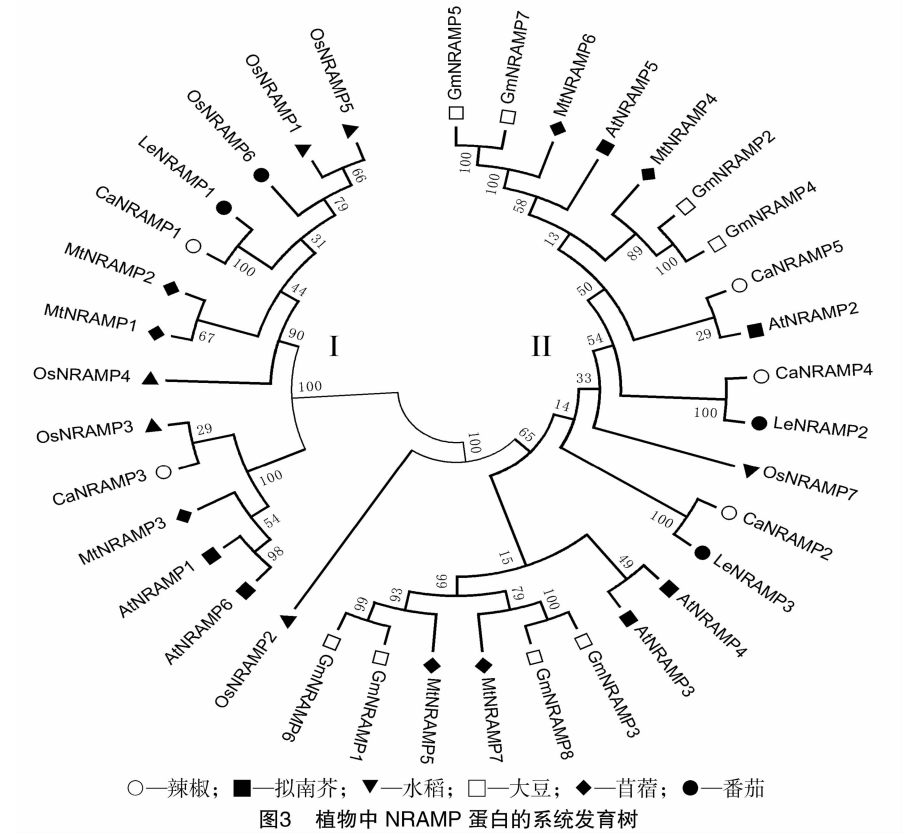
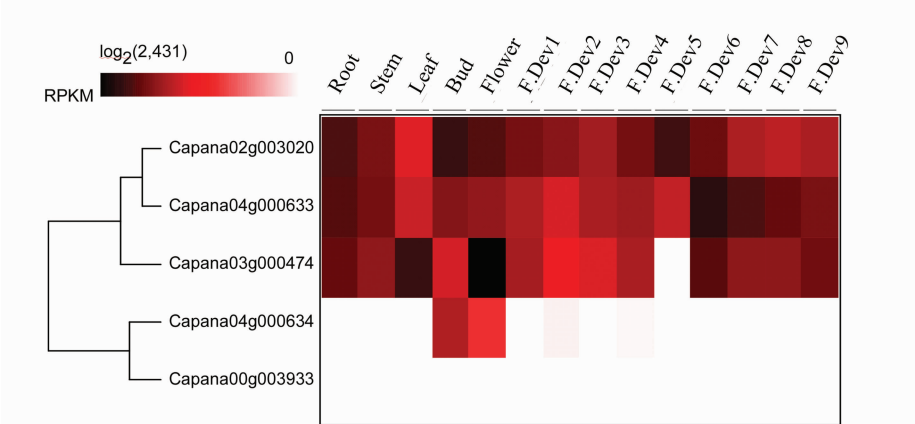


图3 植物中 NRAMP 蛋白的系统发育树



图中包括 5 个不同组织[根(root)、茎(stem)、叶(leaf)、花蕾(bud)、花(flower)]和 9 个果实发育阶段 (0~1 cm 果实、1~3 cm 果实、3~4 cm 果实、4~5 cm 果实、绿熟果、破色期、破色后 3 d 的果实、破色后 5 d 的果实、破色后 7 d 的果实)。白色代表 RNA-seq 数据为 0, 其他数据用 \log_2 校正。
RPKM (reads per kilobases per million reads) 代表每百万 reads 中来自某基因的每千碱基长度的 reads 数。F.Dev1~F.Dev9 代表果实的 9 个发育时期: 果实发育 1 期 (F.Dev1)、果实发育 2 期 (F.Dev2), ……., 果实发育 9 期 (F.Dev9)

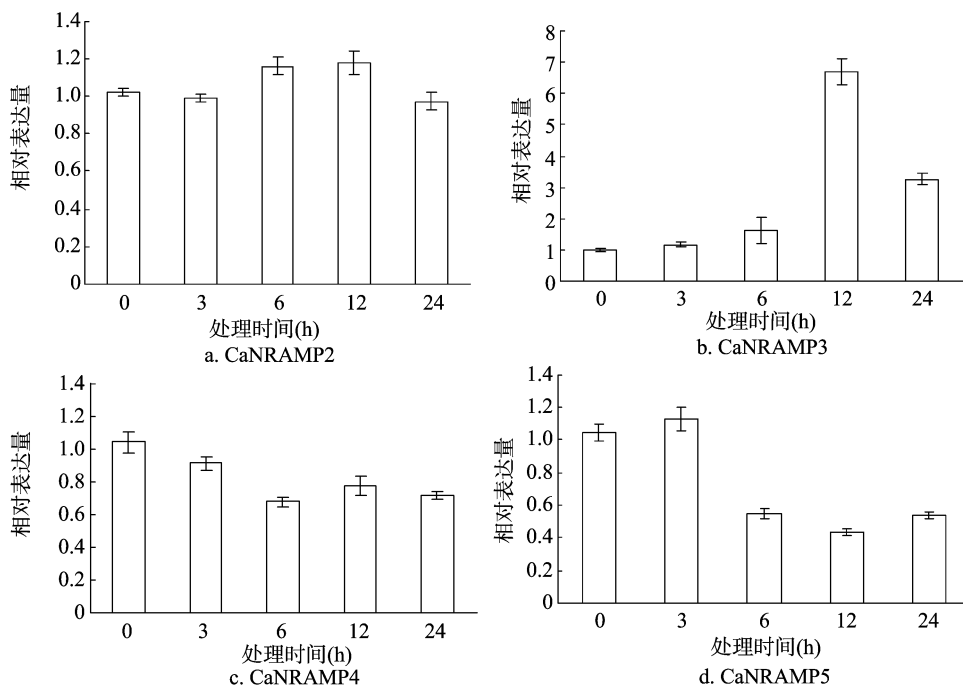
图4 辣椒 NRAMP 基因的表达热图

茎、花蕾中的表达量,在花、叶中的表达量相对最低。此外,本研究结果显示,*CaNRAMP2*、*CaNRAMP3*、*CaNRAMP4* 全程参与果实发育阶段的调控,其中 *CaNRAMP2*、*CaNRAMP4* 的表达量分别在绿熟果期、破色期最高,*CaNRAMP3* 的表达量在绿熟果期最低,在破色期的表达量迅速上升到最高值,而 *CaNRAMP5* 仅在果实发育前期少量表达。

2.5 辣椒幼苗在镉胁迫下 NRAMP 基因的表达分析

利用 qRT-PCR 分析辣椒叶片中 NRAMP 家族基因在 100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理后不同时间点的表达情况,结果未检测

到 *CaNRAMP1* 基因表达信号。由图 5 可以看出,在 Cd^{2+} 胁迫下,*CaNRAMP2*、*CaNRAMP4* 基因在叶片中的相对表达量分别呈现缓慢上升、缓慢下降的表达趋势,但在各个时间点间没有明显变化。*CaNRAMP3* 基因在处理 0~12 h 呈明显的上调趋势,在处理 12 h 时表达量最高,为处理 0 h 时表达量的 6.68 倍;处理 24 h 时表达量有所减弱,但仍为处理 0 h 时表达量的 3.26 倍。*CaNRAMP5* 基因在处理 3~24 h 的表达量整体呈下降趋势,处理 12 h 时的表达量最低。结合基因组织表达热图可以看出,*CaNRAMP3* 基因参与镉胁迫反应的正调控,而

图5 Cd²⁺胁迫下辣椒 NRAMP 基因的表达

CaNRAMP2、*CaNRAMP4*、*CaNRAMP5* 基因不参与镉胁迫反应的调控。

3 讨论与结论

NRAMP 家族蛋白是一类能在生物中转运不同金属离子的跨膜蛋白家族,在植物基本营养元素 (Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 等) 的吸收和抵御重金属 (Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 As^{3+} 等) 毒害等方面发挥着重要作用。目前,人们已在拟南芥、水稻、大豆、苜蓿、番茄等植物中发现相关 NRAMP 家族蛋白,本研究也从辣椒中鉴定出 5 个 NRAMP 相关基因,根据系统进化关系,将 6 个植物中的 NRAMP 家族蛋白分为 2 大类。植物 I 类 NRAMP 蛋白成员参与 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 等金属离子的运输。拟南芥 *AtNRAMP1*、番茄 *LeNRAMP1*、水稻 *OsNRAMP1*、苜蓿 *MtNRAMP1* 分别在缺 Fe^{2+} 环境下于各植物根部的表达量上调^[8,25-26];部分水稻、拟南芥的 NRAMP 蛋白也参与到 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 的转运和调节中^[6,9,12,17]。而在植物 II 类 NRAMP 蛋白成员中,也同样具有部分金属离子转运的功能, *AtNRAMP3*、*AtNRAMP4* 定位在拟南芥种子液泡中,参与 Fe^{2+} 的运输,在叶片中也参与 Mn^{2+} 的转运^[11-12];部分大豆的 NRAMP 蛋白被预测定位在液泡上,发现具有转运 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 的能力^[27]。此外,在植物 NRAMP 蛋白成员中, I 类成员已被证实或预测定位于细胞质膜上,而 II 类则被证实或存在于液泡膜上。这些研究结果表明,植物 NRAMP 同类成员之间可能有着相同的亚细胞定位,行使着类似的金属离子转运功能。

本研究对辣椒 NRAMP 基因的组织表达模式和 qRT-PCR 的分析结果显示,均未检测到 *CaNRAMP1* 基因的表达情况;*CaNRAMP5* 的组织表达特异地集中于花蕾、花中,在叶中不表达,可能在花器官的发育过程中起重要作用;*CaNRAMP2*、*CaNRAMP3*、*CaNRAMP4* 可能全程参与辣椒各生长发育阶段的调控。在辣椒苗期叶中应对镉胁迫处理时,

CaNRAMP3 基因的表达量有明显上调趋势,其余基因表达量皆无上调变化,说明 *CaNRAMP3* 参与镉胁迫的正向调控,推测 *CaNRAMP3* 在叶中参与了 Cd^{2+} 的转运调控。*CaNRAMP2*、*CaNRAMP4* 在根、茎中均有中较高的组织表达量,研究也发现,*CaNRAMP2* 的直系同源基因 *LeNRAMP3* 在番茄根部可以转运 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} ^[23,28], *CaNRAMP4* 的直系同源基因 *LeNRAMP2* 在番茄木质部可以转运 Zn^{2+} ^[29],预测这 2 个 *CaNRAMP* 基因在辣椒中可能具有类似的金属离子转运功能。

本研究通过生物信息学方法,在辣椒全基因组中鉴定了辣椒 NRAMP 基因家族,并对其序列结构、系统发育关系及表达情况进行了分析,对辣椒 NRAMP 基因成员在生长发育和 Cd^{2+} 胁迫下的应答功能进行了初步预测。通过对辣椒 NRAMP 基因家族成员的全面了解,将有助于研究辣椒如何适应外界的镉胁迫,可以为降低辣椒中镉的积累量和优化作物品质提供参考。

参考文献:

- [1] Nevo Y, Nelso N. The NRAMP family of metal-ion transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2006, 1763 (7): 609-620.
- [2] Colangelo E P, Guerinet M L. Put the metal to the petal; metal uptake and transport throughout plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9 (3): 322-330.
- [3] Xia J X, Yamaji N, Kasai T, et al. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (43): 18381-18385.
- [4] Tiwari M, Sharma D, Dwivedi S, et al. Expression in *Arabidopsis* and cellular localization reveal involvement of rice NRAMP, OsNRAMP1, in arsenic transport and tolerance [J]. *Plant Cell & Environment*, 2014, 37 (1): 140-152.

- [5] Vidal S M, Malo D, Vogan K, et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites; isolation of a candidate for *Bcg* [J]. *Cell*, 1993, 73 (3) : 469 – 485.
- [6] Bairoch A. The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21 (13) : 3097 – 3103.
- [7] Krämer U, Talke I N, Hanikenne M. Transition metal transport [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581 (12) : 2263 – 2272.
- [8] Curie C, Alonso J M, le Jean M, et al. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport [J]. *The Biochemical Journal*, 2000, 347 : 749 – 755.
- [9] Cailliatte R, Schikora A, Briat J F, et al. High – affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions [J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (3) : 904 – 917.
- [10] Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, et al. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency [J]. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 2003, 34 (5) : 685 – 695.
- [11] Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron [J]. *EMBO Journal*, 2005, 24 (23) : 4041 – 4051.
- [12] Yamaji N, Sasaki A, Xia J X, et al. A node – based Switch for preferential distribution of manganese in rice [J]. *Nature Communications*, 2013, 4 (9) : 2442 – 2452.
- [13] Thomine S, Wang R C, Ward J M, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (9) : 4991 – 4996.
- [14] Cailliatte R, Lapeyre B, Briat J F, et al. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity [J]. *Biochemical Journal*, 2009, 422 (2) : 217 – 228.
- [15] Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T A, et al. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (14) : 4843 – 4850.
- [16] Takahashi R, Ishimaru Y, Nakanishi H, et al. Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2011, 6 (11) : 1813 – 1816.
- [17] Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, et al. OsNRAMP5, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2012, 7 (7) : 763 – 766.
- [18] Oomen R J, Wu J, Lelièvre F, et al. Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *New Phytologist*, 2009, 181 (3) : 637 – 650.
- [19] 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]. *PNAS*, 2014, 111 (14) : 5135 – 5140.
- [20] Oliani L C, Lidani K C, Gabriel J E. Differentiated evolutionary relationships among chordates from comparative alignments of multiple sequences of MyoD and MyoG myogenic regulatory factors [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14 (4) : 12561 – 12566.
- [21] 郭安源, 朱其慧, 陈 新, 等. GSDS: 基因结构显示系统 [J]. *遗传*, 2007, 29 (8) : 1023 – 1026.
- [22] 张亚利, 谢玲玲, 欧阳娟, 等. 辣椒 VQ 基因家族的鉴定与低温胁迫下的表达分析 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36 (7) : 11 – 19.
- [23] Arocho A, Chen B, Ladanyi M, et al. Validation of the 2 – DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR – ABL P210 transcripts [J]. *Diagnostic Molecular Pathology; the American Journal of Surgical Pathology*, Part B, 2006, 15 (1) : 56 – 61.
- [24] 胡润芳, 林国强, 张广庆, 等. 大豆 *Nramp* 基因家族的序列特征与亲缘关系分析 [J]. *分子植物育种*, 2011, 9 (2) : 245 – 250.
- [25] Berczky Z, Wang H Y, Schubert V, et al. Differential regulation of nramp and irt metal transporter genes in wild type and Iron uptake mutants of tomato [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (27) : 24697 – 24704.
- [26] Tejada – Jiménez M, Castro – Rodríguez R, Kryvoruchko I, et al. MtNramp1 is required for iron uptake by rhizobia – infected *Medicago truncatula* nodule cells [J]. *Plant Physiology*, 2015, 168 (1) : 258 – 272.
- [27] Qin L, Han P P, Chen L Y, et al. Genome – wide identification and expression analysis of NRAMP family genes in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8 (10) : 1436 – 1454.
- [28] Hartke S, Da S A. de Moraes M G. Cadmium accumulation in tomato cultivars and its effect on expression of metal transport – related genes [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013, 90 (2) : 227 – 232.
- [29] Kendziorok M, Klimecka M, Barabas A, et al. Engineering high Zn in tomato shoots through expression of ATHMA4 involves tissue – specific modification of endogenous genes [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17 (1) : 625 – 644.