



唐凯,黄志楠,刘同坤,等. 茄科植物 *PMI* 基因进化研究及辣椒 *CaPMI* 基因克隆和表达分析[J]. 南京农业大学学报,2026,49(3):502-512.
Tang K,Huang Z N,Liu T K,et al. Evolutionary study of *PMI* genes in Solanaceae plants and cloning and expression analysis of *CaPMI* genes in *Capsicum annuum*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(3):502-512.

茄科植物 *PMI* 基因进化研究及辣椒 *CaPMI* 基因克隆和表达分析

唐凯¹,黄志楠¹,刘同坤²,刘燕飞¹,夏玲¹,孙小川¹,段伟科^{1*}

(1.淮安大学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 211800)

摘要:[目的]本研究旨在鉴定茄科及辣椒磷酸甘露糖异构酶(*PMI*)基因,探究其进化过程,并系统解析辣椒 *CaPMI* 基因在非生物胁迫及激素处理下的表达调控网络。[方法]利用生物信息学与分子克隆技术解析 *PMI* 基因家族特征,分析转录组数据,阐明茄科 *PMI* 在器官发育与果实成熟中的表达特征;利用 RT-qPCR 技术检测 *CaPMI* 在多重胁迫下的表达模式。[结果]*PMI* 基因在进化过程中受到强化选择($K_a/K_s < 1$),形成 3 个独立分支,不同物种发生了特异性保留。在辣椒基因组中鉴定出 3 个 *CaPMI* 基因,茄科 *PMI* 基因启动子区中富集生长发育、逆境响应及激素调控相关元件,但数量与组合模式差异明显。茄科 *PMI* 基因具有组织表达特异性,其中 *CaPMI1* 高表达于各器官,*CaPMI3* 特异性富集于花器官。在辣椒 cDNA 文库中克隆获得 *CaPMI1*(1 299 bp/432 aa)和 *CaPMI2*(1 326 bp/441 aa)基因,两者所编码的蛋白均为酸性蛋白(pI 4.83~4.91)。胁迫响应分析显示,*CaPMI1* 在低温、高温及赤霉素(GA_3)处理下被显著激活;*CaPMI2* 和 *CaPMI3* 则对低温、高温、干旱、 GA_3 和水杨酸(SA)胁迫快速响应。[结论]本研究揭示了茄科 *PMI* 基因在进化中的保守性与功能,辣椒 *CaPMI* 基因家族通过亚功能化形成了 *CaPMI1*、*CaPMI2* 和 *CaPMI3* 协作互补的胁迫响应模块,增强了辣椒对复杂环境压力的适应性,为辣椒抗逆种质创制提供了基因资源与理论支撑。

关键词:辣椒;磷酸甘露糖异构酶(*PMI*);进化关系;基因克隆;表达分析;非生物胁迫响应

中图分类号:S641.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2026)03-0502-11

Evolutionary study of *PMI* genes in Solanaceae plants and cloning and expression analysis of *CaPMI* genes in *Capsicum annuum*

TANG Kai¹,HUANG Zhinan¹,LIU Tongkun²,LIU Yanfei¹,XIA Ling¹,SUN Xiaochuan¹,DUAN Weike^{1*}

(1.College of Life Science and Food Engineering,Huai'an University,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 211800,China)

Abstract:[Objectives] This study aimed to identify the phosphomannose isomerase (*PMI*) gene in Solanaceae and *Capsicum annuum*, investigate its evolutionary processes, and systematically analyze the expression regulatory network of the *CaPMI* gene in *C. annuum* under abiotic stress and phytohormone treatments. [Methods] The characteristics of *PMI* gene family were analyzed by bioinformatics and molecular cloning techniques, and the transcriptome data were analyzed to clarify the expression characteristics of Solanaceae *PMI* in organ development and fruit maturation. The expression pattern of pepper under multiple stresses was detected by RT-qPCR. [Results] *PMI* gene was strongly purified and selected ($K_a/K_s < 1$) during the evolutionary process, forming three independent evolutionary branches, and specific preservation occurred in different species. Three *CaPMI* genes were identified in the pepper genome, and all the promoter regions of Solanaceae *PMI* genes were enriched with elements related to growth and development, stress response and hormone regulation, but there were significant differences in the number and combination patterns. The *CaPMI1*(1 299 bp/432 aa) and *CaPMI2*(1 326 bp/441 aa) genes were cloned from a pepper cDNA library, and their encoded proteins were acidic(pI 4.83-4.91). Stress response analysis revealed that *CaPMI1* was significantly activated under cold, heat, and gibberellin(GA_3) treatments, whereas *CaPMI2* and *CaPMI3* responded rapidly to cold, heat, drought, GA_3 , and salicylic acid(SA) stresses. [Conclusions] This study revealed the conservation and functional innovation of Solanaceae *PMI* genes in evolution, and the

收稿日期:2025-02-26

基金项目:国家自然科学基金项目(31902021)

*通信作者:段伟科,副教授,研究方向为园艺作物遗传育种及基因组学,E-mail:weikeduan@126.com。

CaPMI gene family formed a stress-response module of *CaPMI1*, *CaPMI2* and *CaPMI3* through neo-functionalization, which enhanced the adaptability of pepper to complex environmental pressures and provided genetic resources and theoretical support for the creation of stress-resistant germplasm in pepper.

Keywords: pepper; phosphomannose isomerase (PMI); phylogenetic evolution; gene cloning; expression analysis; abiotic stress

环境因子(干旱、盐碱化和极端温度等)是决定植物地理分布格局的关键因素,对物种适应性进化具有重要影响^[1]。当植物遭遇不同环境胁迫时,光合碳同化效率及其同化产物在源-库器官间的再分配过程均会受到影响^[2]。可溶性糖类不仅为细胞构建提供碳骨架,更通过复杂的信号转导网络精细调控植物生长周期各阶段的发育进程^[3]。在糖代谢调控网络中,磷酸甘露糖异构酶(PMI)作为连接糖酵解途径与L-半乳糖合成通路的关键节点酶,催化D-果糖-6-磷酸与D-甘露糖-6-磷酸之间的可逆异构化反应^[4],D-甘露糖-6-磷酸经L-半乳糖途径多酶级联反应生成对植物适应环境具有重要作用的抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)分子^[5]。

系统发育分析表明,PMI蛋白属于Cupin超家族成员^[6],其结构域包含2个保守 β 链基序:G(X)5HxH(X)3,4E(x)6G和G(x)5PxG(x)2H(x)3N。近年研究揭示PMI作为管家酶在植物生命活动中发挥多效性功能,如细胞壁生物合成调控、逆境信号转导网络构建以及胁迫响应通路激活等^[7-9]。在烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中,*PMI1*基因缺失会显著降低细胞壁 α -葡聚糖组分含量,并导致致死表型,证实其在真菌细胞壁稳态维持中的必要性^[8];在对泡桐(*Paulownia fortunei*)研究中,*PjPMI2*可显著上调茉莉酸信号通路关键基因*JAR1*的表达水平,表明其可能通过调控JA信号转导阈值影响植物防御反应^[10],同时,*PjPMI2*过表达可协同激活水杨酸信号通路下游基因*TGA*和*PR-1*的表达,进而参与植物抗逆交叉调控网络^[10]。在不结球白菜(*Brassica rapa* ssp. *chinensis*)中,*BcPMI2*过表达烟草株系在氧化胁迫条件下叶片黄化指数显著低于野生型对照;不同浓度盐胁迫处理下,其种子萌发率显著高于野生型对照^[9]。这些研究结果阐明了PMI基因在植物基础代谢调控和逆境适应机制中的重要地位。

辣椒(*Capsicum annuum*)作为茄科重要经济作物,富含AsA及多种对人体健康有益的生物活性成分。然而在栽培实践中,生物及非生物胁迫常影响辣椒生长发育,造成产量和品质显著下降。基因组研究表明,全基因组复制(WGD)或多倍化(WGP)事件可通过基因组冗余为植物应对环境变迁提供原始素材,是物种进化的重要驱动力^[11-13]。茄科植物在演化过程中经历了2次全基因组三倍化(WGT)事件,该过程伴随大规模基因丢失与新功能亚型的保留^[14-15]。尽管PMI基因已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[7]、泡桐^[10]和甘蔗(*Saccharum officinarum*)^[16]等物种中完成鉴定,但关于辣椒*CaPMI*基因的研究仍较少。因此,本研究通过整合进化生物学、表达分析及功能分析等方法,系统解析辣椒*CaPMI*基因的生物学特性,旨在阐明其在逆境应答中的分子机制,为指导辣椒分子育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 PMI基因的鉴定

从拟南芥数据库(TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>)中获取PMI蛋白序列,从茄科基因组数据库(<https://solgenomics.net/>)中下载‘遵辣1号’‘CM334’、番茄(*Solanum lycopersicum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、茄子(*Solanum melongena*)、长筒蓝悬铃果(*Ichroma cyaneum*)、野生番茄(*Solanum lycopersicoides*)、樱桃番茄(*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*)、潘那利番茄(*Solanum pennellii*)和醋栗番茄(*Solanum pimpinellifolium*)基因组文件。从Phytozome数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)中下载江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)、水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)基因组文件。为鉴定PMI蛋白序列,以拟南芥PMI氨基酸序列作为查询序列,进行BLASTp搜索,*E*-value: 1×10^{-20} 。

1.2 PMI进化关系分析

为揭示辣椒和其他物种之间的进化关系,选择辣椒、番茄、马铃薯、茄子、毛果杨、江南卷柏、拟南芥、葡萄、水稻、玉米、小立碗藓和莱茵衣藻共12个物种。利用Timetree(<http://www.timetree.org/>)构建物种系统发育树。参考已有的研究,在系统发育树上标注已经发生的WGT事件^[14-15, 17-19]。利用CLUSTALW比对分析PMI氨基酸序列,在MEGA 11软件^[20]中通过最大似然法构建进化树,自展值(Bootstrap)设定为1 000。

1.3 共线性分析及 K_a/K_s 分析

利用 MCScanX 软件^[21]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,利用 TBtools 软件^[22]进行可视化分析并标注 *PMI* 基因共线性关系。同时,利用 TBtools 计算 *PMI* 同源基因对 K_a/K_s 和 K_a/K_s 值。

1.4 *PMI* 基因启动子顺式作用元件分析

通过检索数据库获得辣椒、番茄、马铃薯和茄子 *PMI* 起始密码子上游 2 000 bp 序列,提交 Plant-CARE 在线软件(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 *PMI* 基因启动子元件进行在线分析。利用 R 软件处理启动子元件数据并绘图。

1.5 *PMI* 基因在茄科植物中表达量分析

从已发表的番茄^[15]、马铃薯^[15]及辣椒^[18,23]的 RNA-Seq 数据中获取 *PMI* 基因在茄科植物中不同组织的表达量,将表达数据取对数并通过 R 软件绘制热图。

1.6 材料种植与处理

将辣椒品种‘先红一号’的种子在 25 ℃ 下进行催芽处理,并在 2 d 后在光照培养箱中采用漂浮育苗法培育幼苗,培养液为园试营养液,pH6.0,昼/夜温度 25 ℃/18 ℃,相对湿度为 60%~70%,光照度 6 000 lx。在植株 5 叶 1 心时,选择生长健康、粗细一致的植株进行处理。处理条件:1)高温处理:42 ℃;2)低温处理:10 ℃;3)盐胁迫处理:200 mmol·L⁻¹ NaCl;4)模拟干旱胁迫处理:200 g·L⁻¹ PEG-6000;5)氧化胁迫处理:40 mmol·L⁻¹ H₂O₂;6)脱落酸(ABA)处理:40 μmol·L⁻¹ ABA;7)赤霉素(GA₃)处理:2 μmol·L⁻¹ GA₃;8)茉莉酸(JA)处理:10 μmol·L⁻¹ JA;9)水杨酸(SA)处理:2 mmol·L⁻¹ SA。各处理分别设置平行对照(正常生长)。选取各处理植株的第 3 片顶部叶片,分别于处理后的 0、1、2、4、6、12 和 24 h 取样,样品用锡箔纸包裹并迅速放入液氮中,1 h 后储存于-80 ℃冰箱中备用。每个时间点设置 3 次生物学重复。

1.7 辣椒 *CaPMI* 基因的克隆及理化性质分析

根据辣椒基因组文件得到 *CaPMI* 基因的参考序列,设计 *CaPMI* 基因的扩增引物(表 1)。引物合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成。参照 2 × Proofast[®] Master Mix 说明书进行基因克隆,将目的基因片段连接到含卡那霉素抗性的 pCambia1300-35S-GFP 载体上。将目的基因按照南京巨匠公司 DH5α 化学感受态细胞说明书转入大肠杆菌 DH5α(CC301),挑取阳性单菌落进行菌液 PCR 鉴定,由苏州金唯智生物科技有限公司测序分析,将测序结果上传 NCBI 数据库。

表 1 *CaPMI* 基因克隆和 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for *CaPMI* gene cloning and RT-qPCR

基因名称 Gene name	正义引物序列 Sense primer sequence	反义引物序列 Anti-sense primer sequence	功能 Function
<i>CaPMI1</i>	gagaacacgggggactctaga ATGGAGGGGAAAGGGAG	gcccttgctcaccatggatcc CTCATCAAAAACCTGCTATT	基因克隆 Gene cloning
<i>CaPMI2</i>	gagaacacgggggactctaga ATGGAGGCTGATGCT	gcccttgctcaccatggatcc TTCTCAAAAAATCTGCTG	
<i>Actin</i>	TGCTATTGTTGTTGACTCT	CTTCATCAGGTTATCAGTTAGG	RT-qPCR
<i>CaPMI1</i>	ATATGGCGATTGTGTTGAAT	CCTGTCTATAAGTAAGCATTGAG	
<i>CaPMI2</i>	CATAAGGAGCAGCCACTA	CACTACCAACCACTTCAAC	
<i>CaPMI3</i>	ATTGTGGAAGTGGTTGCTA	TTGCGAACTGTCATTATGTC	

注:小写字母为 GFP 载体同源臂。Lowercase letters refer to homologous arms of GFP vectors.

测序结果通过 DNAMAN 9.0 软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列。同时,将茄科 *PMI* 氨基酸序列进行多序列比对。通过 Plant-mPLoc 在线网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)对辣椒 *CaPMI* 蛋白进行亚细胞定位预测。利用 SOPMA 软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)分析 *CaPMI* 蛋白质二级结构及相关理化性质。

1.8 辣椒 *CaPMI* 在逆境胁迫下的表达分析

使用 TIANGEN 公司 Simple Total RNA Kit 提取处理后的辣椒叶片 RNA,之后采用 TaKaRa 公司试剂盒逆转录得到不同处理下辣椒叶片的 cDNA。以辣椒的 *Actin*(登录号:GQ339766.1)为内参基因,设计 *CaPMI* 基因引物(表 1)。并使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行 RT-qPCR。最后采用 2^{-ΔΔC_t} 方法计算辣椒 *CaPMI* 基因在非生物胁迫下的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *PMI* 基因鉴定

本研究系统鉴定了 18 个植物物种中共 49 个 *PMI* 基因家族成员(表 2)。其中,栽培辣椒‘遵辣 1 号’与‘CM334’品种均包含 3 个 *PMI* 基因,与茄科其他代表性物种(番茄、马铃薯、茄子)的 *PMI* 基因数目一致。全基因组演化历程研究结果(图 1)表明,植物 *PMI* 基因数量的差异与物种演化历程中经历的全基因组

表 2 相关 *PMI* 基因的编号及数据来源

Table 2 Number and data source of related *PMI* genes

基因名 Gene name	基因序列号 Gene ID	物种 Species	来源 Source
<i>AtPMI1</i>	AT1G67070	拟南芥	The Arabidopsis Information Resource (TAIR)
<i>AtPMI2</i>	AT3G02570	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
<i>CaPMI1</i>	Capana02g000534	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	Sol Genomics Network
<i>CaPMI2</i>	Capana02g002791		
<i>CaPMI3</i>	Capana04g002217		
<i>CaCMPMI1</i>	CA02g05570	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	Sol Genomics Network
<i>CaCMPMI2</i>	CA02g23480		
<i>CaCMPMI3</i>	CA04g06320		
<i>CrePMI</i>	Cre02.g147650.t1.2	莱茵衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Phytozome
<i>ICPMI1</i>	IC12g010400.1	长筒蓝悬铃果 <i>Lochroma cyaneum</i>	Sol Genomics Network
<i>ICPMI2</i>	IC02g013020.1		
<i>ICPMI3</i>	IC02g030690.1		
<i>OsPMI1</i>	LOC_Os01g03710.1	水稻 <i>Oryza sativa</i>	Phytozome
<i>OsPMI1</i>	LOC_Os09g22090.1		
<i>OsPMI1</i>	LOC_Os11g38810.1		
<i>PpPMI1</i>	Pp1s195_48V6.1	小立碗藓 <i>Physcomitrella patens</i>	Phytozome
<i>PpPMI2</i>	Pp1s15_422V6.1		
<i>PtrPMI1</i>	Potri.004G099100.1	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	Phytozome
<i>PtrPMI2</i>	Potri.017G115500.1		
<i>SLyPMI1</i>	Solyd02g056740.1	野生番茄 <i>Solanum lycopersicoides</i>	Sol Genomics Network
<i>SLyPMI2</i>	Solyd02g074780.1		
<i>SLyPMI3</i>	Solyd06g063920.1		
<i>SLYcerPMI1</i>	SLYcer02g03246.1	樱桃番茄 <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Sol Genomics Network
<i>SLYcerPMI2</i>	SLYcer02g05016.1		
<i>SLYcerPMI3</i>	SLYcer06g03825.1		
<i>SpPMI1</i>	Sopen02g014290.1	潘那利番茄 <i>Solanum pennellii</i>	Sol Genomics Network
<i>SpPMI2</i>	Sopen02g030780.1		
<i>SpPMI3</i>	Sopen06g020210.1		
<i>SPIPMI1</i>	SPI02g02128.1	醋栗番茄 <i>Solanum pimpinellifolium</i>	Sol Genomics Network
<i>SPIPMI2</i>	SPI02g03943.1		
<i>SPIPMI3</i>	SPI06g03728.1		
<i>SIPMI1</i>	Solyc02g063220.2.1	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	Sol Genomics Network
<i>SIPMI2</i>	Solyc02g086090.2.1		
<i>SIPMI3</i>	Solyc06g060100.2.1		
<i>StPMI1</i>	PGSC0003DMP400018384	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	Sol Genomics Network
<i>StPMI2</i>	PGSC0003DMP400020866		
<i>StPMI3</i>	PGSC0003DMP400045815		
<i>SmPMI1</i>	SMEL4.1_02g006930.1.01	茄子 <i>Solanum melongena</i>	Sol Genomics Network
<i>SmPMI2</i>	SMEL4.1_02g022870.1.01		
<i>SmPMI3</i>	SMEL4.1_06g014910.1.01		
<i>SmoPMI</i>	125724	江南卷柏 <i>Selaginella moellendorffii</i>	Phytozome
<i>VviPMI1</i>	GSVIVT01011870001	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	Phytozome
<i>VviPMI2</i>	GSVIVT01031017001		
<i>ZmaPMI1</i>	GRMZM2G121066_P01	玉米 <i>Zea mays</i>	Phytozome
<i>ZmaPMI2</i>	GRMZM2G355009_P01		
<i>ZmaPMI3</i>	GRMZM2G438998_P02		
<i>ZmaPMI4</i>	GRMZM2G448466_P01		
<i>ZmaPMI5</i>	GRMZM2G456471_P01		
<i>ZmaPMI6</i>	GRMZM2G456917_P01		

复制(WGD)事件密切相关。如双子叶植物在经历共有的 γ 古六倍化事件(γ WGT)后,葡萄与毛果杨未发生新的WGD事件^[24-25],其 PMI 基因家族维持在2个成员水平;茄科植物在60~70百万年前(Mya)发生了全基因组三倍化事件(WGT)^[15,18],因此茄科物种 PMI 基因数量稳定维持在3个拷贝;单子叶植物中,水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)分别保留3和6个 PMI 基因。

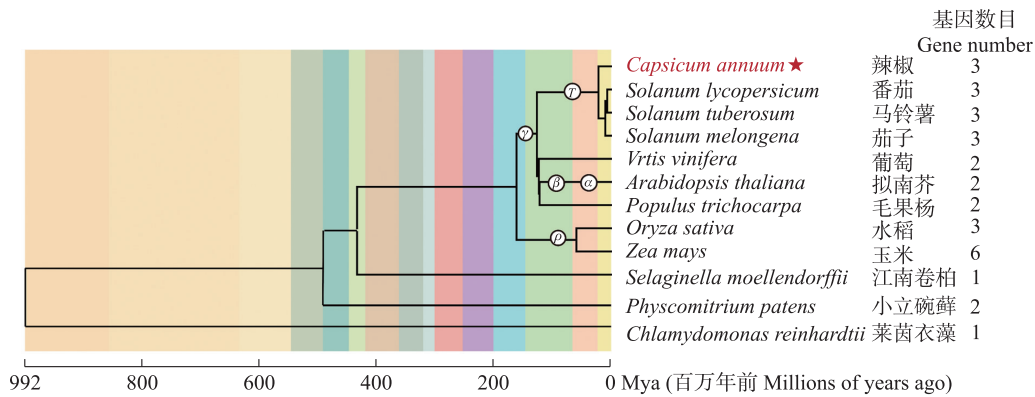


图1 12种植物物种的系统发育及 PMI 基因分布情况

Fig. 1 Phylogenesis and PMI gene distribution of 12 plant species

2.2 PMI 系统进化分析

为阐明 PMI 基因进化关系,选取18种植物共49个 PMI 氨基酸序列构建系统发育树。结果(图2)显示,进化树分为5大分支:藻类(莱茵衣藻)、苔藓类(小立碗藓)、蕨类(江南卷柏)、单子叶植物(水稻、玉米)和双子叶植物(葡萄、拟南芥、毛果杨及茄科物种)。值得注意的是,茄科 PMI 基因在进化树中形成3个独立分支,分别为 $PMI1$ 、 $PMI2$ 和 $PMI3$ 这3个亚家族。但与其他茄科物种不同的是,马铃薯 $StPMI2$ 位于 $PMI3$ 类型分支中, $StPMI3$ 位于 $PMI2$ 类型分支中,表明马铃薯 $StPMI$ 基因在进化过程中可能经历了独特的结构域重组事件。

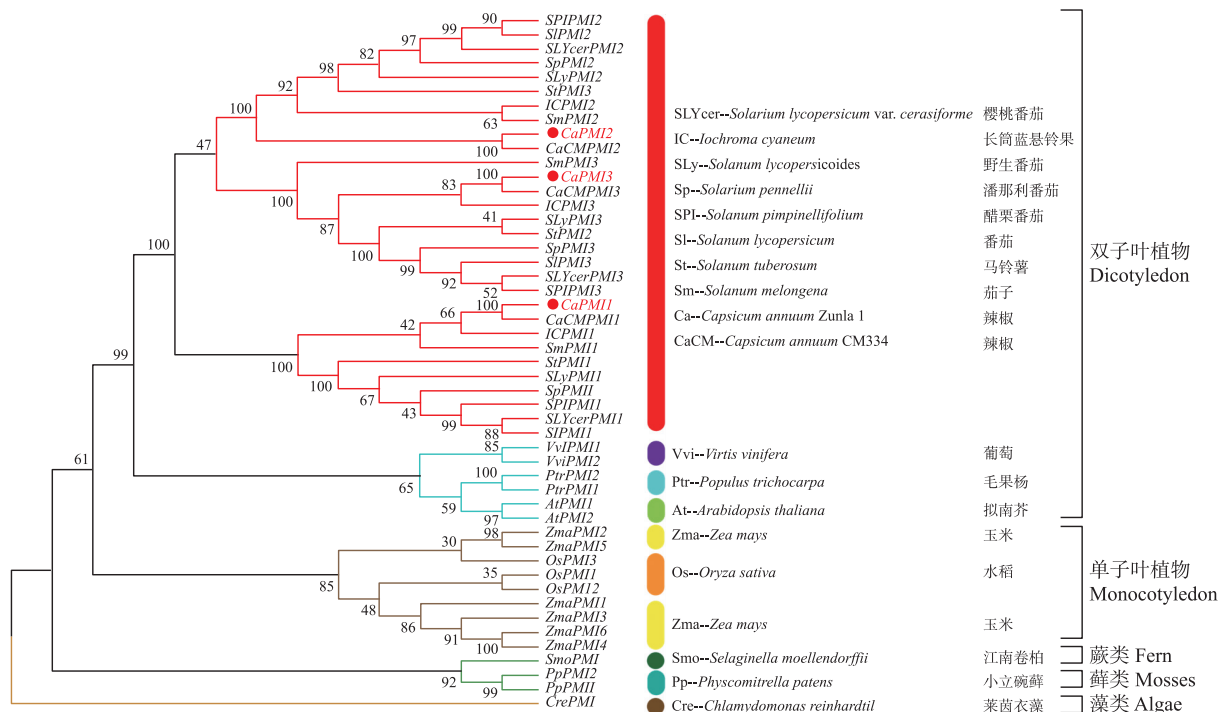


图2 PMI 基因系统进化关系分析

Fig. 2 Analysis of the phylogenetic relationships of PMI genes

2.3 PMI 基因共线性分析

共线性分析结果(图3)表明,茄科植物 PMI 基因在染色体水平上呈现出显著的结构保守性。在辣椒中, PMI 同源基因主要定位于4号染色体保守区块,而番茄、马铃薯和茄子的同源基因则集中分布于6号

染色体同源区域。辣椒‘遵辣 1 号’与‘CM334’品种间 *PMI* 基因在 4 号染色体上的位置分布差异可能与品种特异性染色体重排事件相关。在番茄基因组中未检测到与辣椒‘CM334’品种 4 号染色体 *PMI* 基因对应的同源序列,该位点可能在茄科分化过程中发生了特异性丢失。为进一步探讨 *PMI* 基因的进化选择模式,对拟南芥、‘遵辣 1 号’‘CM334’、番茄、马铃薯和茄子基因对进行选择压力分析。结果如表 3 所示,所有同源基因对的非同义替换率与同义替换率比值(K_a/K_s)均小于 1,表明这些基因在长期进化过程中受到纯化选择压力。

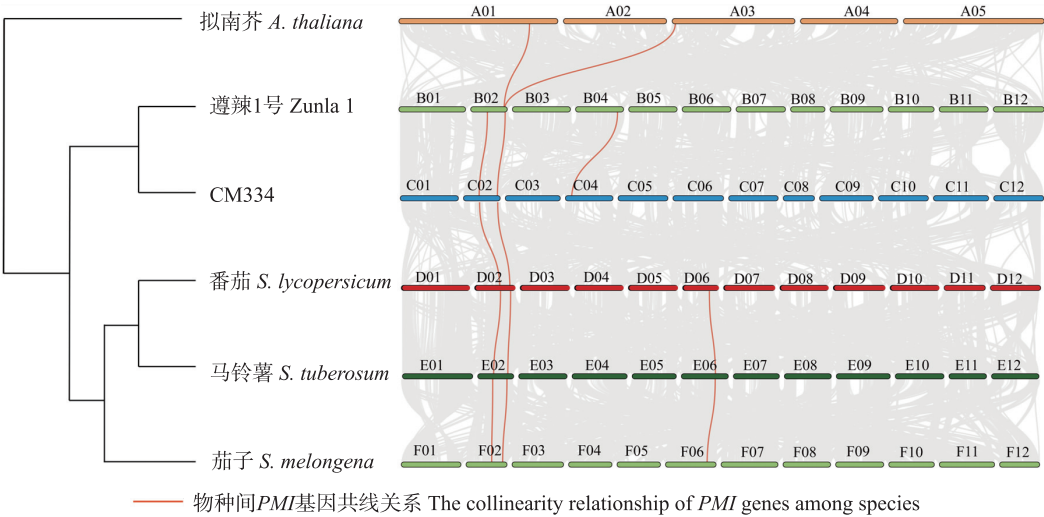


图 3 *PMI* 基因共线性分析
Fig. 3 Collinearity analysis of *PMI* genes

表 3 *PMI* 基因 K_a/K_s 分析
Table 3 K_a/K_s analysis of *PMI* genes

基因名 Gene name	基因名 Gene name	K_a	K_s	K_a/K_s
<i>AtPMI1</i>	<i>CaPMI2</i>	0.324	1.802	0.180
<i>AtPMI2</i>	<i>CaPMI2</i>	0.338	3.998	0.085
<i>CaPMI1</i>	<i>CaCMPMI1</i>	0	0.011	0
<i>CaPMI2</i>	<i>CaCMPMI2</i>	0	0	0
<i>CaPMI3</i>	<i>CaCMPMI3</i>	0	0	0
<i>CaCMPMI1</i>	<i>SlPMI1</i>	0.069	0.412	0.169
<i>CaCMPMI2</i>	<i>SlPMI2</i>	0.058	0.305	0.190
<i>SlPMI1</i>	<i>SlPMI1</i>	0.018	0.106	0.172
<i>SlPMI2</i>	<i>SlPMI2</i>	0.170	0.762	0.223
<i>SlPMI3</i>	<i>SlPMI3</i>	0.180	0.713	0.252
<i>StPMI1</i>	<i>SmPMI1</i>	0.044	0.225	0.197
<i>StPMI2</i>	<i>SmPMI2</i>	0.173	0.714	0.242
<i>StPMI3</i>	<i>SmPMI3</i>	0.198	0.730	0.272

2.4 茄科植物 *PMI* 基因启动子元件分析

对辣椒‘遵辣 1 号’和‘CM334’及茄科近缘物种(番茄、茄子、马铃薯)*PMI* 基因启动子序列(起始密码子上游 2 000 bp)进行系统比较分析,结果(图 4)发现,所有 *PMI* 基因启动子均包含 3 类元件:植物生长和发育(plant growth and development)、植物激素响应(phytohormone responsive)及非生物胁迫和生物胁迫(abiotic and biotic stresses)元件。尽管所有茄科 *PMI* 基因均携带这 3 类顺式作用元件,但其数量与组合模式存在显著差异:如辣椒与马铃薯含有生物和非生物胁迫元件数量最多,分别为 64 和 49 个;而番茄与茄子含有植物激素响应元件数量最多,分别为 28 和 43 个。这些差异可能与茄科植物在进化过程中经历的基因加倍事件及染色体重排导致的调控网络重塑密切相关。

在辣椒 *CaPMI* 基因中,*CaPMI1* 和 *CaPMI2* 的启动子区域包含大量与植物激素相关元件,表明这 2 个基因可能通过植物激素响应参与生长发育调控;而 *CaPMI3* 启动子区富含胁迫响应相关元件,推测该基因在辣椒逆境应答过程中发挥调控作用。

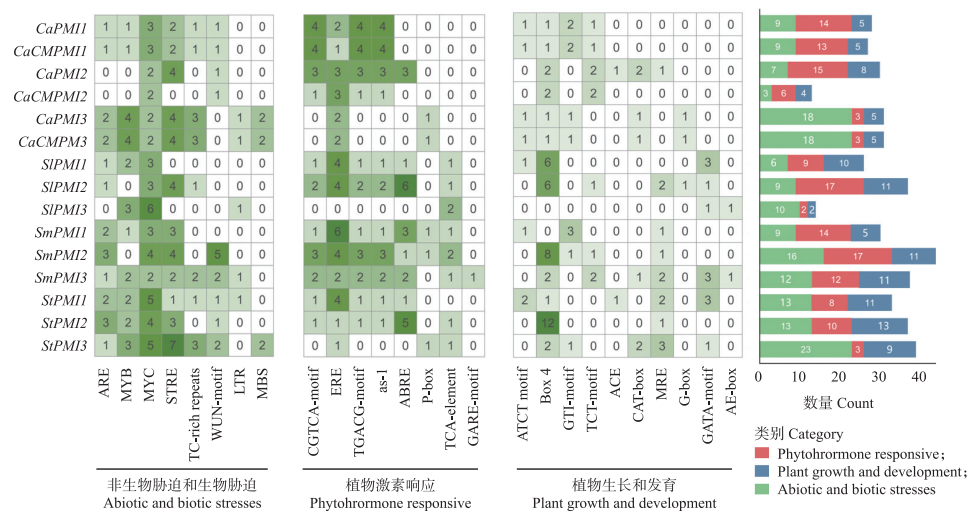


图 4 *PMI* 基因顺式作用元件预测

Fig. 4 Prediction of *cis*-acting elements of *PMI* gene

2.5 茄科植物 *PMI* 基因在不同组织中的表达分析

为了进一步解析茄科三倍化事件对 *PMI* 基因功能分化的影响,本研究系统分析了茄科植物 *PMI* 基因在器官发育及果实成熟过程中的时空表达特征。结果(图 5)显示,*PMI* 基因在不同组织间表现出显著的亚功能化表达特征。在辣椒‘遵辣 1 号’中,*CaPMI1* 在根、茎、叶、花及果实等器官中普遍高表达,*CaPMI2* 在根、茎和叶中高表达,而 *CaPMI3* 特异富集于花芽和花中;‘CM334’品种的 *CaCMPMI1* 在根、茎和叶中普遍高表达,*CaCMPMI2* 在根中表达量较低,*CaCMPMI3* 则特异性地在根中高表达,表明不同辣椒品种间 *PMI* 基因表达调控网络存在种质特异性差异。马铃薯 *StPMI1* 特异性高表达于匍匐茎、叶柄和顶芽, *StPMI2* 在所有组织中基本不表达。番茄 *SIPMI3* 广泛高表达, *SIPMI1* 和 *SIPMI2* 在根中表达量较低, *SIPMI2* 在果实发育期被激活。

在辣椒果实发育过程中,*CaPMI1* 和 *CaPMI2* 在不同发育阶段均表现出较高表达水平,而 *CaPMI3* 的表达量低。这一结果表明 *CaPMI1* 和 *CaPMI2* 可能通过调控 AsA 合成参与细胞扩张过程,进而在辣椒果实发育过程中发挥作用。在辣椒‘CM334’中,*CaCMPMI2* 在果实成熟期后表达量降低,可能与果实成熟相关的糖代谢通路重构相关。在马铃薯块茎发育过程中,*StPMI1* 在幼块茎和成熟茎中高表达,表达量随块茎成熟逐渐降低,而 *StPMI2* 基本不表达。在番茄中,*SIPMI* 的表达量呈现明显的差异性, *SIPMI2* 和 *SIPMI3* 在果实发育前期高表达,而 *SIPMI1* 在果实发育后期高表达。

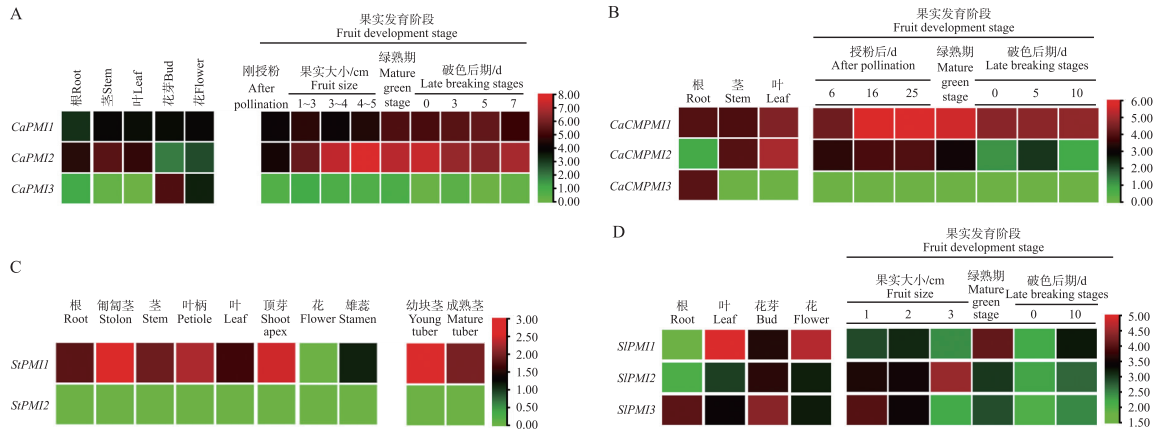


图 5 *PMI* 基因在不同物种不同组织中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of the *PMI* gene in different tissues of different species

A.遵辣 1 号 Zunla 1; B. CM334; C. 马铃薯 Patato; D. 番茄 Tomato.

2.6 辣椒 *CaPMI* 基因克隆和序列分析

在辣椒 cDNA 文库中克隆获得 *CaPMI1* 和 *CaPMI2* 2 个基因(图 6-A),测序数据已提交 GenBank 数据库(PQ737546)。序列特征分析结果表明,*CaPMI1* 编码区全长 1 299 bp,编码 432 个氨基酸,相对分子质

量 47.46×10^3 ; *CaPMI2* 编码区全长为 1 326 bp, 编码 441 个氨基酸, 相对分子质量 48.78×10^3 。*CaPMI1* 和 *CaPMI2* 均为酸性蛋白, 蛋白等电点为 4.83~4.91, 均预测定位于叶绿体中。二级结构预测(PS I PRED)显示, *CaPMI* 蛋白以无规则卷曲(47.85%~48.15%)和 α -螺旋(36.51%~36.81%)为主要结构元件(图 6-B)。多重序列比对结果发现, 所有茄科 *PMI* 蛋白共同含有真核生物 *PMI* 特异性序列 YXDXNHKPE(图 7), 且含有 4 个 Zn^{2+} 结合位点。

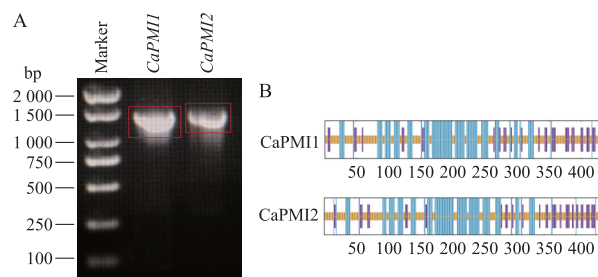


图 6 辣椒 *CaPMI* 基因凝胶电泳图(A)及蛋白二级结构(B)

Fig. 6 Gel electropherogram of pepper *CaPMI* gene(A) and protein secondary structure(B)

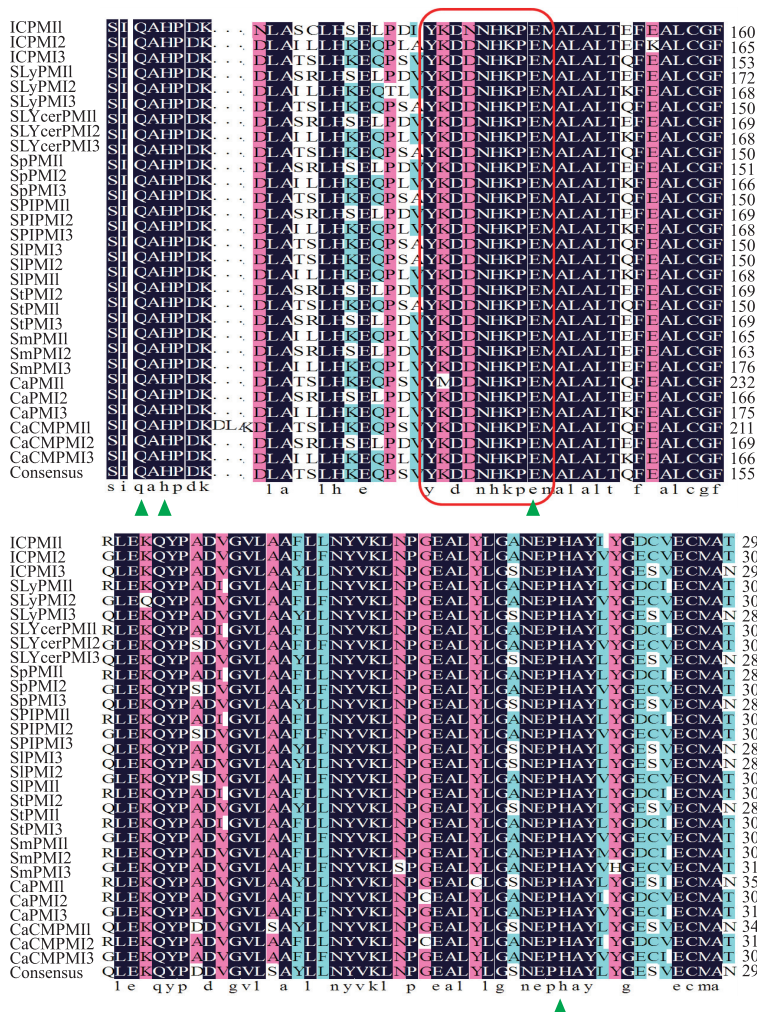


图 7 *PMI* 氨基酸序列比对

Fig. 7 Amino acid sequence alignment of *PMI*

绿色三角表示 Zn^{2+} 结合位点; 红色框表示保守序列 YXDXNHKPE。

Green triangle indicates Zn^{2+} binding site; red box indicates conservative sequence YXDXNHKPE.

2.7 辣椒 *CaPMI* 基因在不同非生物胁迫和激素处理下的表达情况

基于 RT-qPCR 结果分析, *CaPMI1*、*CaPMI2* 和 *CaPMI3* 在非生物胁迫及激素处理中呈现差异化表达模式(图 8)。在低温胁迫下, *CaPMI1* 在处理 12 h 后响应强烈, 表达量上升约 2.8 倍, *CaPMI2* 在处理 4 h 后表达量达到峰值, 表达量上升约 2.2 倍, *CaPMI3* 在处理 2 h 后达到峰值, 表达量上升约 2 倍; 在高温胁迫下, *CaPMI1* 在 24 h 达到峰值, 上升约 2.5 倍, *CaPMI2* 表达量呈现先上升后下降趋势, 在 6 h 达到峰值, 表达量上升约 1.9 倍, *CaPMI3* 表达量分别在 2 和 24 h 达到峰值, 表达量分别上升约 1.5 和 1.9 倍; 在盐胁迫下, 3 个 *CaPMI* 基因表达趋势基本一致, 但 *CaPMI1* 在 6 h 达到峰值, 而 *CaPMI2* 和 *CaPMI3* 在 12 h 达到峰

值。在干旱胁迫和氧化胁迫下, *CaPMI2* 和 *CaPMI3* 均显著响应, *CaPMI2* 分别在 24 h 后表达量上升约 1.8 和 1.5 倍, *CaPMI3* 主要集中在前期, 2 h 达到峰值, 表达量分别上升约 2.1 和 1.8 倍, 而 *CaPMI1* 的表达量变化趋势相对较缓。

激素处理结果显示 *CaPMI2* 和 *CaPMI3* 对多种信号分子具有广谱敏感性; 在 GA_3 处理下, *CaPMI2* 在 2 h 后表达量升高 1.6 倍, *CaPMI3* 在 2 h 表达量显著提高 1.9 倍; 在 SA 处理下, *CaPMI2* 和 *CaPMI3* 同样在 2 h 表达量提高约 1.7 倍; 此外, JA 处理仅显著诱导 *CaPMI2* 表达, ABA 处理仅显著诱导 *CaPMI3* 表达。值得注意的是, *CaPMI2* 和 *CaPMI3* 对干旱和氧化胁迫具有显著特异性, 表明其可能在 ROS 稳态维持中发挥主要作用。

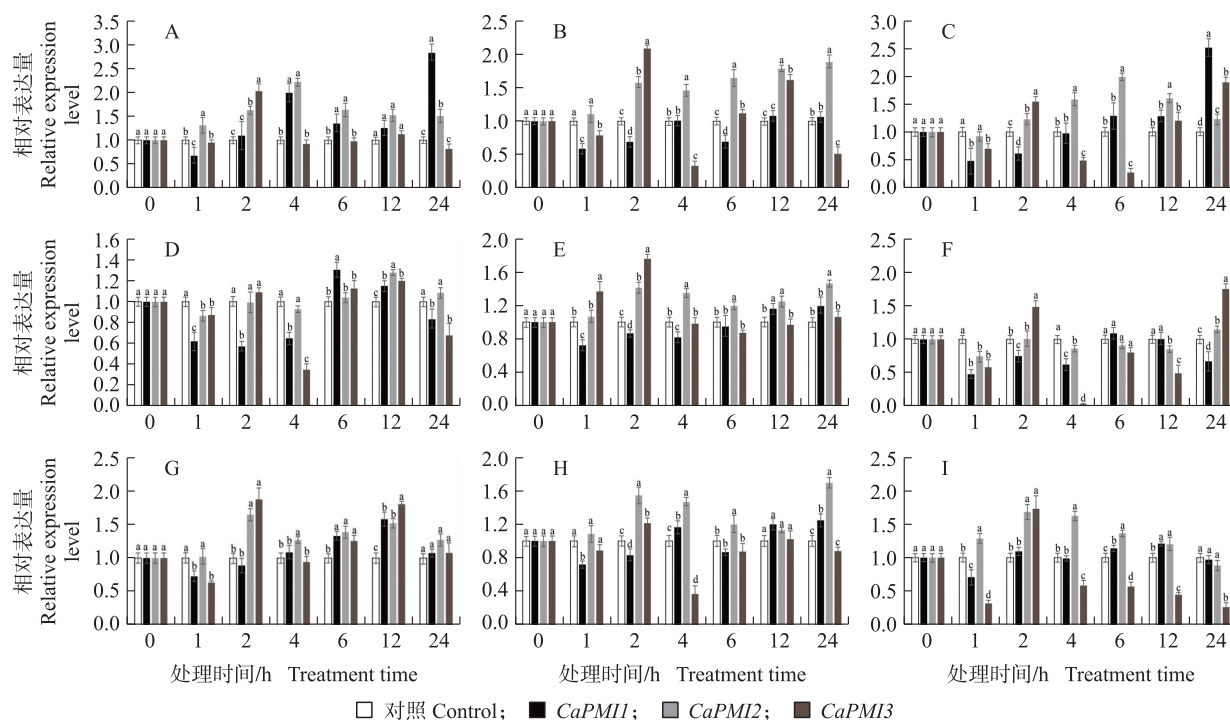


图8 *CaPMI* 基因在不同非生物胁迫和激素处理下的表达情况

Fig. 8 Expression of *CaPMI* gene under different abiotic stresses and hormone treatments

A. 低温胁迫 Low temperature stress; 10 °C; B. 干旱胁迫 Drought stress; 200 g·L⁻¹ PEG6000; C. 高温胁迫 High temperature stress; 42 °C; D. 盐胁迫 Salt stress; 200 mmol·L⁻¹ NaCl; E. 氧化胁迫 Oxidative stress; 40 mmol·L⁻¹ H₂O₂; F. ABA 处理 Absciscic acid treatment; 30 μmol·L⁻¹; G. GA_3 处理 Gibberellin treatment; 2 μmol·L⁻¹; H. JA 处理 Jasmonic acid treatment; 10 μmol·L⁻¹; I. SA 处理 Salicylic acid treatment; 2 mmol·L⁻¹.

不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。The different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level in the same time among different treatments.

3 讨论

PMI 酶作为糖代谢网络的核心组分, 在光合碳同源转化及 AsA 生物合成途径中具有多重生理功能^[5,16]。尽管其分子机制已在拟南芥^[7]、甘蔗^[16]和不结球白菜^[9]等物种中被解析, 但在茄科植物, 特别是辣椒中研究还较少。本研究在辣椒‘遵辣1号’和‘CM334’全基因组中分别鉴定出3个 *PMI* 基因, 结合多物种比较分析发现, *PMI* 基因家族规模与植物多倍化事件密切相关。茄科、水稻和玉米分别保留3、3和6个 *PMI* 基因, 而经历较少 WGD 事件的毛果杨、葡萄及低等植物 (如莱茵衣藻) 仅保留1~2个拷贝, 这与多倍化后基因丢失/保留的进化规律一致^[12,17,26-27]。系统进化分析结果显示, 茄科 *PMI* 基因在64~75万年前的三倍化事件后形成3个独立分支, 并通过亚功能化在基因组中稳定保留, 为后续功能分化奠定结构基础^[28]。复制基因不仅可以通过亚功能化保留, 还可以通过新功能化保留。本研究中, *PMI* 基因未表现出显著新功能, 在进化过程中茄科所有同源基因对的非同义替换率与同义替换率比值 (K_a/K_s) 均小于1, 这符合管家基因在进化过程中受强纯化选择的特性^[9]。

为了探讨茄科三倍化事件对 *PMI* 基因亚功能化保留的影响, 本研究对辣椒、番茄和马铃薯 *PMI* 基因表达模式进行分析, 结果发现 *PMI* 基因在茄科植物中呈现显著的时空表达异质性。辣椒 *CaPMI1*、马铃薯

StPMI1 及番茄 *SIPMI3* 在叶、根等营养器官中的优势表达,与泡桐 *PfPMI2* 的组织表达特征高度吻合^[10],表明 *PMI* 在光合器官中的基础代谢功能具有跨物种保守性。同时,*CaPMI1*、*CaPMI2*、*CaCMPMI1* 和 *StPMI1* 在果实发育全程维持高表达水平,表明其在茄科果实碳同化中的核心作用。而 *CaPMI3*、*CaCMPMI3*、*SIPMI3* 等基因在器官中的特异性表达,则印证了 WGT 事件后基因通过亚功能化实现功能互补^[29-30]。

亚功能化的功能互补还体现在对环境变化的感知中。本研究在胁迫和激素响应层面分析了 *CaPMI1*、*CaPMI2* 和 *CaPMI3* 基因在不同处理下的表达模式,结果发现三者在非生物胁迫及激素处理中呈现差异化的时序表达模式。在高温、干旱和 GA_3 胁迫中,*CaPMI1* 均表现为渐进式响应模式,而 *CaPMI2* 和 *CaPMI3* 则表现出快速应答特征,两者呈互补关系。*CaPMI2* 对 JA、SA 及干旱胁迫表现出快速应答特征,与泡桐 *PfPMI2* 通过调控 JA/SA 信号增强抗逆性的机制相呼应^[10],但不同于不结球白菜 *BcPMI2* 在盐胁迫中的主导作用^[9]。辣椒 *CaPMI2* 更倾向于通过激素信号交叉对话(如 SA-JA 拮抗)协调生物胁迫防御,这与其启动子中富集的激素响应元件的结构相符。通过多次试验,在辣椒 cDNA 文库中成功克隆了 2 个辣椒 *CaPMI* 基因(*CaPMI1* 和 *CaPMI2*),但使用多对 *CaPMI3* 引物均未成功克隆 *CaPMI3*。*CaPMI3* 顺式作用元件中包含大量生物和非生物胁迫响应元件,不同胁迫和激素处理可以诱导 *CaPMI3* 以不同程度表达,推测该基因可能为备份基因^[31]。综上所述,*CaPMI2* 和 *CaPMI3* 作为快速应答枢纽,整合生物/非生物胁迫信号;*CaPMI1* 则通过基础代谢调控参与长期适应,这种功能互补性为辣椒应对复杂环境压力提供了弹性支持。

综上所述,本研究系统揭示了茄科 *PMI* 基因的进化轨迹,克隆了 2 个辣椒 *CaPMI* 基因,详细分析茄科 *PMI* 基因在不同组织和辣椒 *CaPMI* 基因在不同逆境胁迫、激素处理下的表达调控特征,为指导辣椒分子育种工作提供了理论依据和基因资源。但研究仍存在局限性,当前分析仅涵盖茄科部分代表物种,未能全面解析 *PMI* 基因家族在整个茄科的进化动态。下一步可通过纳入更多近缘野生种及栽培种,进一步阐明 *CaPMI* 在辣椒适应性进化及农艺性状形成中的作用。

参考文献 References:

- [1] Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(1): 15-19.
- [2] Rosa M, Prado C, Podazza G, et al. Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress; a complex network in the life of plants[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(5): 388-393.
- [3] Meloni D A, Gulotta M R, Martínez C A. Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho* Colorado: seed germination, growth, ion relations and metabolic responses[J]. Journal of Arid Environments, 2008, 72(10): 1785-1792.
- [4] Roux C, Bhatt F, Foret J, et al. The reaction mechanism of type I phosphomannose isomerases; new information from inhibition and polarizable molecular mechanics studies[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2011, 79(1): 203-220.
- [5] Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(3): 229-235.
- [6] Dunwell J M. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1998, 15: 1-32.
- [7] Maruta T, Yonemitsu M, Yabuta Y, et al. *Arabidopsis* phosphomannose isomerase 1, but not phosphomannose isomerase 2, is essential for ascorbic acid biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(43): 28842-28851.
- [8] Fang W X, Yu X Y, Wang B, et al. Characterization of the *Aspergillus fumigatus* phosphomannose isomerase Pmi1 and its impact on cell wall synthesis and morphogenesis[J]. Microbiology, 2009, 155(Pt 10): 3281-3293.
- [9] Wang X H, Zhang S, Hu D, et al. BcPMI2, isolated from non-heading Chinese cabbage encoding phosphomannose isomerase, improves stress tolerance in transgenic tobacco[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(4): 2207-2216.
- [10] 徐赛赛. 泡桐 *PfPMI2* 基因对毛果杨基因表达变化的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
Xu S S. Effect of *PfPMI2* gene on the changes of gene expression in *Populus trichocarpa*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [11] Zhang J. Evolution by gene duplication: an update[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(6): 292-298.
- [12] Wang X Y, Guo H, Wang J P, et al. Comparative genomic de-convolution of the cotton genome revealed a decaploid ancestor and widespread chromosomal fractionation[J]. New Phytologist, 2016, 209(3): 1252-1263.
- [13] Zeng L, Tu X L, Dai H, et al. Whole genomes and transcriptomes reveal adaptation and domestication of pistachio[J]. Genome Biology, 2019, 20(1): 79.
- [14] Xu X Y, Yang Y H, Liu C X, et al. The evolutionary history of the sucrose synthase gene family in higher plants[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 566.

- [15] Sato S, Tabata S, Hirakawa H, et al. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution[J]. *Nature*, 2012, 485(7400): 635–641.
- [16] Zhang M Q, Zhuo X L, Wang J H, et al. Phosphomannose isomerase affects the key enzymes of glycolysis and sucrose metabolism in transgenic sugarcane overexpressing the *manA* gene[J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35(3): 100.
- [17] Wu S D, Han B C, Jiao Y N. Genetic contribution of paleopolyploidy to adaptive evolution in angiosperms[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(1): 59–71.
- [18] 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.
- [19] Zhang L S, Chen F, Zhang X T, et al. The water lily genome and the early evolution of flowering plants[J]. *Nature*, 2020, 577(7788): 79–84.
- [20] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022–3027.
- [21] Wang Y P, Tang H B, DeBarry J D, et al. MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): e49.
- [22] Chen C J, Xia R, Chen H. TBtools, a Toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface[J]. *BioRxiv*, 2018: 289660.
- [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(3): 270–278.
- [24] Jaillon O, Aury J M, Noel B, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm *Phyla*[J]. *Nature*, 2007, 449(7161): 463–467.
- [25] 田郎. 毛果杨基因组序列草图的构建与初步分析[J]. *陕西林业科技*, 2013, 41(2): 100–108.
Tian L. Construction and preliminary analysis of draft genome sequence of *Populus tomentosa*[J]. *Shaanxi Forest Science and Technology*, 2013, 41(2): 100–108 (in Chinese).
- [26] Bowers J E, Chapman B A, Rong J K, et al. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events[J]. *Nature*, 2003, 422(6930): 433–438.
- [27] Jia C P, Guo B, Wang B K, et al. The LEA gene family in tomato and its wild relatives: genome-wide identification, structural characterization, expression profiling, and role of SILEA6 in drought stress[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 596.
- [28] Cao Y L, Li Y L, Fan Y F, et al. Wolfberry genomes and the evolution of *Lycium* (Solanaceae)[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 671.
- [29] Force A, Lynch M, Pickett F B, et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations[J]. *Genetics*, 1999, 151(4): 1531–1545.
- [30] van Hoof A. Conserved functions of yeast genes support the duplication, degeneration and complementation model for gene duplication[J]. *Genetics*, 2005, 171(4): 1455–1461.
- [31] Qian W F, Liao B Y, Chang A Y, et al. Maintenance of duplicate genes and their functional redundancy by reduced expression[J]. *Trends in Genetics*, 2010, 26(10): 425–430.

责任编辑: 范雪梅