

苹果中磷酸蔗糖合酶家族基因的表达特性 及其与蔗糖含量的关系

李会霞, 祝令成, 张 钊, 马锋旺, 李明军*

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要: 磷酸蔗糖合酶(sucrose phosphate synthase, SPS)是植物中蔗糖合成的主要限速酶, 影响植物的生长发育和果实中蔗糖的含量。为探明苹果中 SPS 基因家族特性及其在蔗糖合成中的作用, 该研究从苹果基因组中分离了 *MdSPS* 家族基因, 分析了它们的进化关系以及 mRNA 表达特性与酶活性和蔗糖含量的关系。结果显示: (1) 在苹果基因组中有 8 个 SPS 家族基因表达, 它们分别属于双子叶植物的 3 个 SPS 亚家族。(2) 荧光定量 PCR 分析显示, 苹果 C 类的 *MdSPS6* 基因和 A 类的 *MdSPS1a/b* 基因是苹果中表达丰度最高的 SPS 基因成员, 其中 *MdSPS6* 在苹果成熟果中表达丰度最高, 其次是成熟叶片, 而 *MdSPS1a/b* 在不积累蔗糖的幼果中表达丰度最高。(3) 在果实发育过程中, 除 *MdSPS1a/b* 之外, 其它 5 个苹果 *MdSPS* 家族基因均随果实的生长表达丰度增加, 与 SPS 活性和蔗糖含量明显呈正相关关系。研究表明, C 类家族 *MdSPS6* 是苹果果实发育后期和叶片中蔗糖合成的主要 SPS 基因。

关键词: 苹果; 磷酸蔗糖合酶; 表达; 酶活性; 蔗糖

中图分类号: Q789 文献标志码: A

Expression Analysis of Apple Sucrose Phosphate Synthase Gene Families and Their Relationship with Sucrose Accumulation in Apple

LI Huixia, ZHU Lingcheng, ZHANG Zhao, MA Fengwang, LI Mingjun*

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Sucrose phosphate synthase (SPS) is a major rate-limiting enzyme to sucrose synthesis in plant, which affects the growth of plants and sucrose content of fruits. To know the features of SPS family gene and their role in sucrose synthesis, we isolated *MdSPS* family genes from apple genome, analyzed the relationship between their evolutionary relationships, profiled the mRNA expression characteristics, measured the enzyme activity and sucrose content. The results showed that: (1) there were 8 genes of the SPS gene family expressing in the apple, they belong to three dicot SPS subfamilies. (2) Quantitative real time PCR analysis showed that C type *MdSPS6* and A type *MdSPS1a/b* had the highest expression in apple. Especially, *MdSPS6* expression levels are the highest in mature fruit, followed by those in mature leaves, meanwhile *MdSPS1a/b* was primarily expressed in young fruit which had no sucrose accumulation. (3) Apart from *MdSPS1a/b*, expression levels of other 5 *MdSPS* family genes had a significant positive correlation with SPS activity and sucrose concentration, and increased with fruit development. These results suggest that the class C of the SPS gene family is main genes related with sucrose syntheses in the develop-

收稿日期: 2017-02-14; 修改稿收到日期: 2017-04-23

基金项目: 国家自然科学基金(31372038)

作者简介: 李会霞(1989—), 女, 硕士, 主要从事果树分子生物学研究。E-mail: 1182916330@qq.com

* 通信作者: 李明军, 博导, 主要从事果树逆境生物学与果实品质形成的研究。E-mail: limingjun@nwsuaf.edu.cn

ment of apple leaves and fruits.

Key words: *Malus domestica*; sucrose phosphate synthase; expression; enzyme activity; sucrose

蔗糖是大多数植物叶片中光合同化物输出的主要形式,也是水果中可溶性糖的主要组成部分,影响着植物的生长发育和果实甜度。磷酸蔗糖合酶(sucrose phosphate synthase, SPS)催化 UDP-葡萄糖(5-diphosphoglucose disodium, UDPG)和果糖-6-磷酸(fructose-6-phosphate, F6P)生成蔗糖-6-磷酸,蔗糖-6-磷酸再在蔗糖磷酸酯酶作用下不可逆的生成蔗糖。研究表明,SPS 是植物中蔗糖合成的限速酶^[1],是提高蔗糖合成能力的主要靶基因^[2-3]。SPS 在高等植物中存在多个基因家族,不同家族之间甚至同一家族的不同成员之间有着不同的磷酸化和蛋白激酶结合位点^[4],如拟南芥 4 个 SPS 基因编码的蛋白在调控植物蔗糖合成中的能力各不相同^[5]。研究植物中 SPS 各家族的特性对于调控蔗糖合成能力及生长发育具有重要意义。此外,与拟南芥、烟草、水稻等相比,苹果中蔗糖的合成能力不仅与光合同化物的长距离运输有关,也是果实等经济器官主要品质性状的组成部分,苹果 SPS 研究不仅对于源库关系的调控,而且对经济器官中蔗糖水平的调控均有重要意义。苹果作为蔷薇科代表果树,其叶片中光合输出的同化物除了 20% 左右的蔗糖之外,山梨醇占主导地位^[6]。在大多数栽培苹果品种的果实中,蔗糖是果实中仅次于果糖之后的主要贮存糖^[7]。在苹果果实成熟过程中,液泡中蔗糖的积累主要依赖于果实中的合成^[8],即经过 SPS 催化合成的蔗糖。大多数基因在苹果基因组中存在多个家族成员,行使不同的功能^[9],但目前尚未报道有关基于全基因组对苹果 SPS 基因家族的分析,尚不清楚哪个 SPS 基因表达在苹果蔗糖合成中起关键作用。为探明苹果中 SPS 基因家族特性及其与 SPS 活性和蔗糖含量的关系,从苹果基因组中分离了 SPS 家族基因,分析了它们的进化关系,研究了它们在苹果不同组织器官和果实发育过程中的表达特性及其与 SPS 活性、蔗糖含量的关系,该研究为进一步研究苹果 SPS 的功能和苹果蔗糖水平改良奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为 6 年生‘嘎拉’苹果(*Malus domestica* Borkch. cv. ‘Gala’),砧木为新疆野苹果(*M.*

sieversii)。选取 12 棵长势基本一致的树,花期进行疏花,使每棵树的坐果量基本一致。于全园 50% 花瓣脱落时记为果实发育的花后 0 d,之后每隔 15 d (± 2 d,选取连续晴天)采样 1 次,直到果实成熟(约花后 122 d)。每次采样时间为下午 16:00~17:00 间,样品采集后,立即将 3 棵树上的果实(至少 9 个)进行称重,切碎混合,用液氮速冻后作为一个重复存于一 80 °C 冰箱(共 4 个重复)。同时,在花后 30 d 采取成熟叶和茎尖幼叶。

1.2 方法

1.2.1 *MdSPS* 基因的筛选 在苹果基因组数据库(<https://www.rosaceae.org>)中,分别以 4 个拟南芥 SPS^[10] 的氨基酸序列为模板进行 Blastp,获得 E-Value 大于 1.00E-4 且 cDNA 大于 800 bp(拟南芥 SPS 序列的全长均大于 3 000 bp)的 12 个预测基因。由于苹果基因组数据库中预测的基因存在假基因现象^[9],为进一步确定序列的可靠性,以基因组预测的 12 个序列为模板在 GenBank 中进行 Blastn,获得矫正的 SPS 预测序列共 8 个,并经苹果 EST 数据库验证确认这 8 个候选基因在苹果转录组中是表达的 SPS 基因。

1.2.2 序列同源性和进化树分析 利用 Laser-gene 软件(DNASTAR, USA)中 Clustal V 多重比较分析氨基酸序列的同源性;苹果 *MdSPS* 与拟南芥 SPS 基因的进化分析采用最大可能性法,利用 <http://www.phylogeny.fr> 网站构建进化树。

1.2.3 SPS 基因定量表达分析 采用 Gasic 等^[11]改良 CTAB-LiCl 法提取苹果不同样品中的总 RNA,总 RNA 经 DNase 清除 DNA 后,利用 Prime-scriptTM RT reagent Kit(TaKaRa)进行反转录,合成的 cDNA 第一链用于实时荧光定量 PCR 分析 *MdSPS* 基因的表达情况。根据 8 个 *MdSPS* 的同源性,利用 Primer5 软件设计通用引物(表 1),其中 *MdSPS1a* 和 *MdSPS1b* 及 *MdSPS5a* 和 *MdSPS5b* 序列高度相似,分别设计了通用引物 *MdSPS1a/b* 和 *MdSPS5a/b*,引物的特异性经测序和溶解曲线分析验证。定量 PCR 仪为 Roche 公司 LightCycler96 型,试剂为 SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa)。以 *MdActin* 为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算出待测基因相对表达量。

1.2.4 SPS 活性的测定 参考 Moscatello 等^[12] 的

表 1 *MdSPS* 及 *MdActin* 实时荧光定量 PCR 分析所用引物及其序列

Table 1 Primers and sequences of *MdSPS* and *MdActin* required in qRT-PCR

基因 Gene	正向引物序列 Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'→3')
<i>MdSPS1a/b</i>	AGTGTAGTACTCAAGGGAGTTGG	TGCTCATGGGGAAGGCTTTAC
<i>MdSPS2</i>	GTGTAGTGCTGAAAGGAGTTGC	CTAGTTTCTCCAAGGAAGCACG
<i>MdSPS3</i>	TCATTGAGAAGGTTACTGAGGCAG	ACCACCACTGTTACAGATAAAAGC
<i>MdSPS4</i>	GCTATGCCAATGTTAGAACTGTAG	ACAACCCCAACGGTAGTCAATAT
<i>MdSPS5a/b</i>	TGTTACTGCCCATGATTCCGA	TGCAAGTATAGTGGGCTTGTGAG
<i>MdSPS6</i>	AGGTTCTGTTGAGTATGGCAGTGAG	GTGCTTCAAGTGCCGCTGAGA
<i>MdActin</i>	GGACAGCGAGGACATTTCAGC	CTGACCCATTCCAACCATAACA

方法提取酶液,采取两步法测定 SPS 的活性。由于 SPS 酶动力学特性可能受到蛋白质可逆磷酸化的调控^[13],SPS 活性受基因表达和粗调控的双重调控^[1]。因此,SPS 活性测定分为饱和底物条件下的最大酶活性(SPS Amax)和以无机磷为抑制蛋白质可逆磷酸化并且底物限制条件下的限制性酶活性(SPS Alim)。SPS Amax 是反映受 SPS 蛋白量影响的最大酶活性,而 SPS Alim 反映的是样品中有多少 SPS 蛋白是处于活化状态。SPS Amax 测定反应体系(200 μL)中含有 50 mmol/L Hepes-KOH (pH 7.4),4 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L EDTA,4 mmol/L F6P,20 mmol/L G6P,3 mmol/L UDPG 和 100 μL 提取液。27 ℃反应 30 min,沸水中煮 3 min 终止反应。煮死的酶液为空白对照。12 000×g 离心 1 min。75 μL 反应液加入 50 mmol/L Hepes-KOH (pH 7.0),5 mmol/L MgCl₂,0.3 mmol/L NADH,0.8 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸盐,14 U 乳酸脱氢酶,最后加入 4 U 丙酮酸激酶启动反应,最终体积为 1.0 mL。340 nm 下测定 NADH 减少量来表示 SPS Amax 酶活性。同时,SPS Alim 测定与 Amax 的不同是反应体系中 F6P 和 G6P 分别是 2 mmol/L 和 10 mmol/L,同时含有 10 mmol/L Pi 作为蛋白质可逆磷酸化的抑制剂。

1.2.5 蔗糖含量的测定 蔗糖测定同 Wei 等^[14]的方法,利用气质联用(GC-MS,gas chromatography-mass spectrometry)技术测定。称取 0.1 g 样品,1.4 mL 75%甲醇中研磨,并加入 60 μL 2 mg/mL Ribitol 作为内标;70 ℃,950 r/min 振荡培养 30 min,11 000×g 离心 10 min;上清液转移到玻璃离心管中,加入 750 μL 氯仿(−20 ℃)和 1 500 μL ddH₂O(4 ℃)一起涡旋 10 s,2200×g 离心 15 min 后分离水相为提取液。取 2 μL 提取液分别加入 40 μL 5 mg/mL 甲氧基胺盐酸盐(methoxyamine hydrochloride),于 37 ℃,950 r/min 振荡培养 2 h

后加入 60 μL N-甲基-N-三甲基硅烷基-三氟乙酰胺(N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroace-tamide)(MSTFA),37 ℃继续培养 30 min 后,离心转入上样瓶中上机检测(Shimadzu GCMS-2010SE,日本)。

1.2.6 数据统计分析 基因表达分析均以 *MdActin* 作为内参基因,采用 2^{−ΔΔCt} 法计算相对表达量,以 3 个生物学重复的平均数±标准差(SD)表示大小。糖含量和酶活数据运用 SPSS 16.0 软件进行统计和相关分析,采用 one-way ANOVA 方法对每个变量进行 Duncan 检验(*P*<0.05),以平均数±标准差(SD)表示大小。

2 结果与分析

2.1 苹果 SPS 基因家族成员的筛选及其信息分析

以拟南芥 4 个 *AtSPS* 为模板,在苹果基因组中发现了 18 个预测的同源基因,但其中 4 个预测基因的 cDNA 长度不足 800 bp,且是其它预测基因中的部分 cDNA 片段,经过滤,获得了 12 个 cDNA 序列大于 800 bp 且与 *AtSPS* 序列高度一致的基因。再经与 GenBank 中矫正的苹果基因组预测的相似基因序列比较分析,发现这 12 个基因组数据中候选的 SPS 基因与 GenBank 中 8 个预测的矫正序列相匹配(表 2),且经 EST 分析发现,这 8 个矫正的序列均存在 EST。

对苹果和拟南芥 *AtSPS* 基因的进化分析发现,苹果的 8 个 *MdSPSs* 分别属于拟南芥中 A、B 和 C 类 SPS^[10]。其中,序列较短的 *MdSPS1b* 与 *MdSPS1a* 氨基酸序列相似性高达 99%,*MdSPS1b* 可能是 *MdSPS1a* 的部分重复序列,同时,*MdSPS5b* 也是 *MdSPS5a* 的部分重复序列。*MdSPS1*~3 属于同一组,与拟南芥的 *AtSPS1F* (At5g20280) 和 *AtSPS2F* (At5g11110) 同属于 A 亚家族。*MdSPS1a/b* 和 *MdSPS2* 有很高的相似度,和 *AtSPS1F* 具有较高的一致性;*MdSPS3* 和 *AtSPS2F*

表 2 苹果基因组中 SPS 基因的相关信息

Table 2 Information of sucrose-phosphate synthase (SPS) genes identified in apple

基因名称 Gene name	cDNA/bp /氨基酸 cDNA/bp /Amino acid	GenBank 登录号 ID in GenBank	苹果基因组 <i>Malus domestica</i> genome		相同 EST 数量 EST number	拟南芥同源基因 Homologous genes in <i>Arabidopsis</i>	
			染色体 Position on Chr.	基因编码 Gene ID		Locus in TAIR	氨基酸相似度 Similarity of amino acid/%
<i>MdSPS1a</i>	3168/1055	XM_008356139	chr2 chr2	MDP0000855287 MDP0000288876	19	At5g20280 (<i>AtSPS1F</i>)	77.4
<i>MdSPSS1b</i>	939/312	XM_008364778	chr2 chr2	MDP0000215182 MDP0000185404	5	At5g20280 (<i>AtSPS1F</i>)	77.6
<i>MdSPS2</i>	3195/1064	XM_008338757	chr15	MDP0000213919	5	At5g20280 (<i>AtSPS1F</i>)	77.1
<i>MdSPS3</i>	3174/1057	XM_001294100	chr15 chr8	MDP0000414968 MDP0000137330	7	At5g11110 (<i>AtSPS2F</i>)	71.7
<i>MdSPS4</i>	3198/1065	XM_008382294	chr9	MDP0000783676	6	At1g04920 (<i>AtSPS3F</i>)	76.0
<i>MdSPS5a</i>	3075/1024	XM_008350490	chr10	MDP0000147573	2	At4g10120 (<i>AtSPS4F</i>)	68.9
<i>MdSPS5b</i>	1338/445	XM_008367577	chr10	MDP0000570741	2	At4g10120 (<i>AtSPS4F</i>)	68.2
<i>MdSPS6</i>	3075/1024	XM_008383448	chr10 chr16	MDP0000288684 MDP0000311125	15	At4g10120 (<i>AtSPS4F</i>)	73.3

同源(图 1)。*MdSPS4* 和 *AtSPS3F* (At1g04920)同属于 B 亚家族。*MdSPS5a/b*、*MdSPS6* 和 *AtSPS4F* (At4g10120)同属于 C 亚家族(表 2,图 1)。

2.2 *MdSPS* mRNA 表达水平在嘎拉苹果不同组织及果实发育过程中的变化

MdSPSs 在嘎拉苹果幼叶、成熟叶、幼果和成熟果中表现出不同表达模式,其中 *MdSPS6* 的总体表达丰度高于其它 *MdSPSs*,其次是 *MdSPS1a/b*。*MdSPS1a/b* 在幼果中 mRNA 相对表达丰度最高,其次是成熟果,成熟叶中最低,仅为幼果中表达量的 1/19。*MdSPS2* 与 *MdSPS1a/b* 在果实中的表达模式相反,在成熟果中表达丰度最高,其次是幼果,而成熟叶和茎尖中表达没有明显差别,成熟叶中约为成熟果中的 1/27。*MdSPS3*、*MdSPS4* 和 *MdSPS6* 的表达丰度均在成熟果中最高,尤其 *MdSPS6* 在成熟果中的表达丰度最高,其次是成熟叶片,在幼叶和幼果中的表达量相对较低。而 *MdSPS5a/b* 在成熟叶中表达丰度最高,其次是成熟果(表 3)。

在‘嘎拉’苹果果实发育过程中,*MdSPS1a/b* 表达在花后 34 d 达到最高峰,之后呈现下降的趋势,并在花后 122 d 的成熟果中达到最低表达水平。尽管这样,其它 5 个 *MdSPSs* 表达均表现出上升趋势,其中 *MdSPS2* 在花后 98 d 达到最高峰,*MdSPS3* 和 *MdSPS4* 在花后 55 d 后开始明显增加,而 *MdSPS5a/b* 和 *MdSPS6* 在花后 98 d 之后显著增

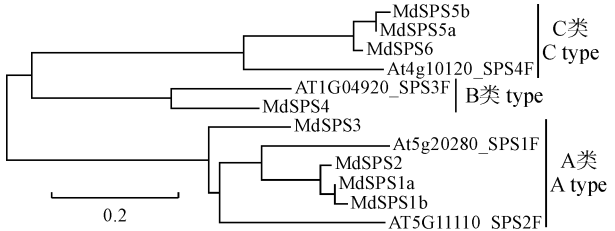


图 1 苹果 *MdSPS* 和拟南芥 *AtSPS* 家族氨基酸序列的系统进化树^[5]

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of deduced amino acid sequences of *MdSPS* with *Arabidopsis*'s^[5]

加,尤其 *MdSPS6* 从花后 98 d 到 122 d 增加幅度最大,约增加了 4 倍(图 2)。

2.3 SPS 活性在嘎拉苹果不同组织及果实发育过程中的变化

图 3,A 显示,在不同组织中,SPS Amax 和 Alim 活性在果实和叶片中最高,均无显著差异,幼果中 SPS Amax 活性不足成熟果的 1/2,SPS Alim 活性不足成熟果的 1/8,幼叶中二者的活性最低,分别为成熟叶的 10.4%和 6.3%,从 SPS Amax/Alim 的比率来看,幼果中最高,其次是幼叶(图 3,A)。

图 3,B 显示,在果实发育过程中 SPS Amax 和 Alim 活性均在花后 15 ~75 d 表现出上升的趋势,且 SPS Alim 的活性增加趋势更明显。在花后 75 ~98 d,二者活性均有一个快速的增加,并维持最高活性直至果实成熟(图 3,B)。在果实发育过程中 SPS Amax/Alim 表现出明显降低趋势,在花后 98 d

表 3 *MdSPS* 在‘嘎拉’苹果不同组织中 mRNA 相对表达量

Table 3 mRNA relative expression level of *MdSPS* in different tissues of ‘Gala’ apple

基因 Gene	幼叶 Young leaf	成熟叶 Mature leaf	幼果 Young fruit	成熟果 Mature fruit
<i>MdSPS1a/b</i>	10.0±0.67	6.26±1.02	125±4.12	57.6±1.54
<i>MdSPS2</i>	1.60±0.26	1.32±0.38	9.65±1.34	36.7±4.26
<i>MdSPS3</i>	2.33±0.30	5.31±0.63	1.06±0.41	25.7±1.38
<i>MdSPS4</i>	1.14±0.21	4.26±0.32	0.96±0.11	45.9±3.57
<i>MdSPS5a/b</i>	5.47±0.56	57.8±3.22	3.62±0.31	18.4±1.91
<i>MdSPS6</i>	12.3±1.05	86.8±6.55	11.6±0.79	395±7.90

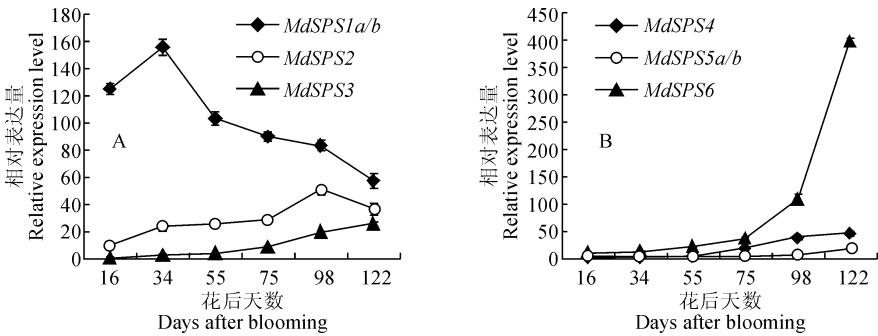


图 2 ‘嘎拉’苹果果实发育过程中 *MdSPS* 相对表达丰度的变化

Fig. 2 Changes of relative expression abundance of *MdSPS* during fruit development of ‘Gala’ apple

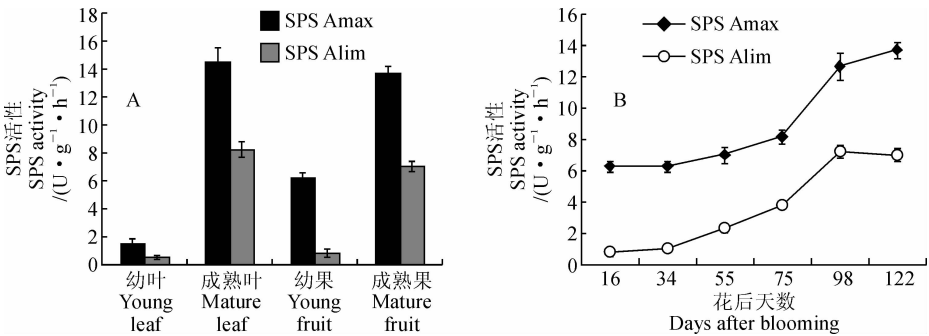


图 3 ‘嘎拉’苹果不同组织器官(A)和果实发育过程(B)中 SPS 活性的变化

Fig. 3 Changes of SPS enzyme activity in different tissues(A)and during fruit development of ‘Gala’ apple (B)

的果实中其由花后 16 d 的 7.62 降低到了 1.75，SPS Amax/Alim 的变化趋势与 *MdSPS1a/b* 的表达水平呈明显正相关。基因表达相关性分析发现，在果实发育过程中 *MdSPS3* 和 *MdSPS4* 与 SPS 活性的相关性最高，呈极显著正相关(表 4)。

2.4 嘎拉苹果中蔗糖含量的变化及其与 *MdSPS* 表达和酶活性的关系

在‘嘎拉’苹果中，成熟果实中的蔗糖含量显著高于叶片，是成熟叶片的近 5 倍，但幼果中的蔗糖含量低于成熟叶片，幼叶中的含量最低。在果实发育过程中，花后 55 d 之后的果实中蔗糖开始显著线性增加，在花后 122 d 的成熟果实中，蔗糖含量增加了近 6 倍(图 4)。相关性分析表明(表 4)，在苹果果实发育过程中，蔗糖含量与 *MdSPS3* 和 *MdSPS4* 相

对表达量的相关性最高， $r=0.985$ 和 0.993 ($P<0.01$)，也与 *MdSPS5a/b* 和 *MdSPS6* 相对表达量呈正相关，而与 *MdSPS1a/b* 的表达量呈负相关。同时果实发育过程中蔗糖含量也与 SPS Amax 和 Alim 的活性呈显著正相关，且与 SPS Amax 的相关性高于 SPS Alim 的。

3 讨 论

在苹果基因组中，预测出 8 个 *AtSPS* 同源基因 *MdSPSs*。Wei 等^[14]对苹果糖转运蛋白的分析，由于苹果基因组较大且重复序列较多^[9]，‘金冠’苹果基因组数据库中预测的基因存在多个冗余序列，且部分序列在剪切模式上有误，在参考或克隆过程中需要多方位分析。在预测的 8 个 *MdSPS* 中，*Md*-

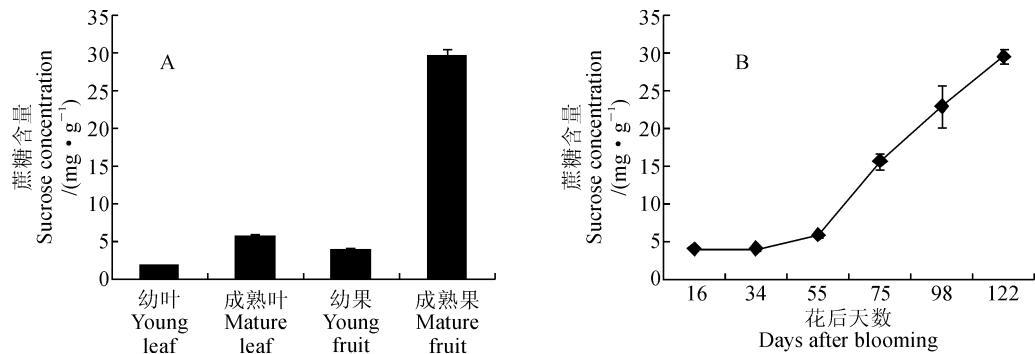


图4 ‘嘎拉’苹果不同组织器官(A)和果实发育过程(B)中蔗糖含量的变化

Fig. 4 Changes of sucrose concentration in different tissues(A)and during fruit development of ‘Gala’ apple (B)

表4 苹果果实发育过程中 *MdSPS* 相对表达丰度与蔗糖含量和 *SPS* 活性的相关系数

Table 4 Correlation coefficient between relative expression abundance of *MdSPS* with sucrose concentration and *SPS* enzyme activity during fruit development of apple

项目 Item	表达量 Expression level						蔗糖含量 Sucrose concentration	SPS Amax 活性 SPS Amax enzyme activity	SPS Alim 活性 SPS Alim enzyme activity
	<i>MdSPS</i> 1	<i>MdSPS</i> 2	<i>MdSPS</i> 3	<i>MdSPS</i> 4	<i>MdSPS</i> 5	<i>MdSPS</i> 6			
蔗糖含量 Sucrose concentration	-0.886 *	0.806	0.985 **	0.993 **	0.826 *	0.848 *			
SPS Amax 酶活 SPS Amax enzyme activity	-0.843 *	0.840 *	0.993 **	0.991 **	0.831 *	0.845 *	0.972 *		
SPS Alim 酶活 SPS Alim enzyme activity	-0.871 *	0.905 *	0.968 *	0.981 **	0.721	0.745	0.969 *	0.978 *	
SPS Amax/Alim	0.830 *	-0.833 *	-0.745	-0.757	-0.453	-0.501	-0.788	-0.728	0.835 *

注：* 和 ** 分别表示 0.05 和 0.01 水平显著性
Note: * and ** mean significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively

SPS1b 和 *MdSPS5b* 预测的序列较短,氨基酸序列不足 500 个氨基酸,这与报告的植物 *SPS* 蛋白大于 1 000 个氨基酸不一致^[10],这可能是在苹果基因组中由于复制、突变等产生的基因片段,作为 *MdSPS1a* 和 *MdSPS5a* 的部分重复序列存在苹果的转录组中,二者是否有功能需要进一步验证。

8 个预测的 *MdSPS* 分别属于双子叶植物 *SPS* 家族的 3 个亚家族^[10]。其中 *MdSPS1a/b*、*MdSPS2* 和 *MdSPS3* 与 *AtSPS1F* 和 *AtSPS2F* 高度同源,属于低亲和力高 *K_m* 值的 A 类 *SPS*。在拟南芥中,*AtSPS1F* 对叶片 *SPS* 活性具有决定作用,其突变引起 *SPS Amax* 活性降低了近 80%,植物生长受抑^[15-16]。西瓜中 *CmSPS1*(与 *AtSPS1F* 和 *MdSPS2* 同源)的表达水平也与 *SPS* 活性和蔗糖的含量相关^[17]。苹果中 *MdSPS1a/b* 作为表达丰度最高的 A 类 *MdSPS*,幼果中表达量最高,叶片中表达量较低。相对于其它 *MdSPS*,在苹果叶片中相对表达丰度最高是 *MdSPS5a/b* 和 *MdSPS6*,二者属于 C 类 *SPS*。冯凤娟^[18] 在绿袖苹果中对叶片中 C 类 *SPS* 的干扰研究发现,C 类 *SPS* 的干扰显著降低了苹果叶片中蔗糖的含量。这些结果表明,苹果叶片中主要是 C 类 *SPS*。

SPS 酶动力学特性受到蛋白质可逆磷酸化的调控^[13,19],其活性受基因表达和粗调控的双重调控^[1],其中 *SPS Amax* 主要受 A 类 *SPS* 蛋白影响,而 *SPS Alim* 可以反映样品中 C 类 *SPS* 蛋白的活性^[12,15-16]。在苹果中,C 类 *SPS* 在叶片和果实中的表达丰度占有主导地位,*SPS Amax* 和 *SPS Alim* 在果实发育过程中与 *MdSPS5a/b* 和 *MdSPS6* 表达均相一致。尽管如此,在苹果果实发育过程中,花后 16 d 和 34 d 的幼果中 *SPS Alim* 活性明显低于成熟果,这与 *MdSPS1a/b* 在幼果中的高表达模式是一致的。虽然 *MdSPS4* 在苹果果实发育过程中与蔗糖含量和 *SPS* 活性相关性最高,但拟南芥中其同源基因 *AtSPS3F* 对 *SPS* 活性没有影响^[16],*MdSPS4* 在苹果中是否对 *SPS* 活性和蔗糖合成有调控作用需要进一步验证。

苹果果实发育过程中,蔗糖含量随果实的生长处于增加的趋势,尤其在果实成熟期间其增加幅度更大^[7,14]。果实发育后期,苹果中蔗糖的积累主要有两个来源,一方面是叶片运输到果实的蔗糖直接被转运到液泡中贮存,这与苹果发育后期参与蔗糖分解的蔗糖合成酶和转移酶活性的下降相一致^[6];另一方面由山梨醇、淀粉等碳源的代谢物合成蔗糖。

Beruter 等^[8]利用同位素示踪试验证明,果实中的蔗糖可由山梨醇合成。成熟果实中 *MdSPS2* 至 *MdSPS6* 表达的上调及 SPS 活性与蔗糖含量相关表明在苹果果实发育后期,增加的蔗糖含量与合成有关。同时,花后 98 和 122 d 快速增加的 *MdSPS5a/b* 和 *MdSPS6* 的表达也说明,在嘎拉苹果成熟期,蔗糖的合成主要依赖于 C 类 SPS,它们是对苹果进行蔗糖含量调控的主要基因。

本研究结果表明,在苹果基因组中有 8 个 SPS

家族基因表达,它们分别属于双子叶植物的 3 个 SPS 亚家族。在果实发育过程中,除 *MdSPS1a/b* 之外,其它的 *MdSPS* 均随果实的生长表达丰度增加,且与 SPS 活性及蔗糖含量明显正相关。C 类家族 *MdSPS6* 是苹果果实发育后期和叶片中蔗糖合成的主要 SPS 基因。进一步研究苹果中 *MdSPS6* 的亲性和其过量表达对植物蔗糖合成能力的影响,对于利用其提高植物源的供应能力,或提高果实的蔗糖含量具有重要意义。

参考文献:

[1] LUNN J E, MACRAE E. New complexities in the synthesis of sucrose[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6: 208-214.

[2] MALONEY V J, PARK J Y, UNDA F, *et al.* Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact in planta and promote plant growth and biomass accumulation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, **66**(14): 4 383-4 394.

[3] HUBBARD N L, PHARR D M, HUBER S C. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species[J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, **82**: 191-196.

[4] LUNN J E, MACRAE E A. New complexities in the synthesis of sucrose[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6: 208-214.

[5] LUTFIYYA L L, XU N, D'ORDINE R L, *et al.* Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, **164**(7): 923-933.

[6] LI M, FENG F, AND CHENG L. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development[J]. *Plos One*, 2012, **7**: e33055.

[7] ZHANG Y, LI P, AND CHENG L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in "Honeycrisp" apple flesh[J]. *Food Chemistry*, 2010, **123**: 1 013-1 018.

[8] BERUTER J, KALBERER P P. The uptake of sorbitol by apple fruit tissue [J]. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, 1983, **110**: 113-125.

[9] VELASCO R, ZHARKIKH A, AFFOURTIT J, *et al.* The genome of the domesticated apple (*Malus×domestica* Borkh.) [J]. *Nature Genetics*, 2010, **42**: 833-839.

[10] LUTFIYYA L L, XU N, D'ORDINE R L, *et al.* Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, **164**: 923-933.

[11] GASIC K, HERNANDEZ A, KORBAN S S. RNA extrac-

saccharides for cDNA library construction[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, **22**: 437a-437g.

[12] MOSCATELLO S, FAMIANI F, PROIETTI S, *et al.* Sucrose synthase dominates carbohydrate metabolism and relative growth rate in growing kiwifruit (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, **128**: 197-205.

[13] HUBER S C. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1989, **91**: 656-662.

[14] WEI X, LIU F, CHEN C, *et al.* The *Malus domestica* sugar transporter gene family: identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**: 569.

[15] VOLKERT K, DEBAST S, *et al.* Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(18): 5 217-5 229.

[16] SUN J D, ZHANG J S, LARUE C T, *et al.* Decrease in leaf sucrose synthesis leads to increased leaf starch turnover and decreased RuBP regeneration-limited photosynthesis but not Rubisco-limited photosynthesis in *Arabidopsis* null mutants of *SPSA1* [J]. *Plant Cell and Environment*, 2011, **34**: 592-604.

[17] DAI N, COHEN S, PORTNOY V, *et al.* Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, **76**: 1-18.

[18] 冯凤娟. 苹果果实碳水化合物和酚类物质代谢及 MdSPS 基因干扰对叶片同化物碳分配影响研究[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学, 2013.

[19] STITT M, WILKE I, FEIL R, *et al.* Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: Alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose[J]. *Planta*, 1988, **174**: 217-230.

(编辑:宋亚珍)