

梨蔗糖合成相关酶 SUS 和 SPS 基因家族的鉴定与表达分析

吕佳红, 王英珍, 程 瑞, 王国明, 张绍铃, 吴 俊, 张虎平*

(南京农业大学园艺学院, 梨工程技术研究中心, 南京 210095)

摘 要: 运用生物信息学方法, 对梨蔗糖合酶 (SUS) 和蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 基因进行全基因组鉴定与基因结构、系统发育关系、蛋白质保守功能域、染色体定位和基因进化模式分析, 利用转录组数据和实时荧光定量 PCR 技术分析低蔗糖型‘砀山酥梨’和高蔗糖型‘翠冠’果实发育过程中 SUS 和 SPS 家族基因的表达模式。结果表明, 梨中包含 17 个 SUS 基因 (*PbrSUS1* ~ *PbrSUS17*) 和 8 个 SPS 基因 (*PbrSPS1* ~ *PbrSPS8*); SUS 基因家族分为 3 个亚家族, 分别为 SUS1、SUSA 和 SUS2。梨 SUS 和 SPS 基因家族成员不均匀地分布在 10 条染色体上, 主要通过片段复制事件进行扩张, 且在进化过程中主要受纯化选择作用。*PbrSPS3*、*PbrSPS4*、*PbrSPS8*、*PbrSUS2* 和 *PbrSUS15* 是调控梨果实蔗糖合成积累的重要基因。

关键词: 梨; 蔗糖合酶; 蔗糖磷酸合成酶; 基因; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S 661.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 03-0421-15

Genome-wide Identification and Expression Analysis of Sucrose Synthase (SUS) and Sucrose Phosphate Synthase (SPS) Gene Families in Pear

LÜ Jiahong, WANG Yingzhen, CHENG Rui, WANG Guoming, ZHANG Shaoling, WU Jun, and ZHANG Huping*

(Department of Horticulture, Centre of Pear Engineering Technology Research, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, the sucrose synthase (SUS) and sucrose phosphate synthase (SPS) gene families were identified from pear (*Pyrus bretschneideri* ‘Dangshan Suli’) genome database, and their gene structure, phylogenetic relationship, protein conserved domains, chromosomal locations and gene evolution pattern were analyzed by bioinformatic approaches. Transcriptome data and quantitative real-time PCR were used separately to analyze the expression patterns of SUS and SPS gene families during the fruit development of low-sucrose ‘Dangshan Suli’ and high-sucrose ‘Cuiguan’ (*P. pyrifolia*). The results showed 17 SUS genes (*PbrSUS1* – *PbrSUS17*) and 8 SPS genes (*PbrSPS1* – *PbrSPS8*) were identified in *P. bretschneideri*, including 3 subfamilies for SUS gene family (*SUS1*, *SUSA* and *SUS2*). The expansion of *PbrSUS* and *PbrSPS* gene families distributed unevenly on 10 chromosomes were mainly

收稿日期: 2017-11-13; 修回日期: 2018-03-02

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (KYZ201510); 国家自然科学基金项目 (31260454)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hpzhang@njau.edu.cn)

caused by segmental duplication, and their evolutionary processes were affected by purify selection. *PbrSPS3*, *PbrSPS4*, *PbrSPS8*, *PbrSUS2*, and *PbrSUS15* are the important genes in regulating the synthesis and accumulation of sucrose for pear fruit.

Keywords: *Pyrus*; sucrose synthase; sucrose phosphate synthase; gene; bioinformatics analysis; expression analysis

蔗糖合酶 (sucrose synthase, SUS, EC 2.4.1.13) 和蔗糖磷酸合成酶 (sucrose phosphate synthase, SPS, EC 2.4.1.14) 是参与蔗糖合成积累过程中的关键酶, 主要分布在细胞质中。其中 SUS 催化可逆反应: 蔗糖 + UDP ↔ UDP - 葡萄糖 + 果糖 (Geigenberger et al., 1999), 是唯一能使蔗糖参与到组织构建、物质贮藏和植物细胞新陈代谢等多种路径的代谢过程的酶 (Ruan et al., 1997; Tanase et al., 2002)。由 SPS 合成蔗糖的方向是不可逆的, 在蔗糖积累型库中具有重要作用, 但在不同植物、不同品种果实蔗糖积累中的调控作用差异较大 (Hubbard et al., 1991)。据报道, 许多果实的糖分以蔗糖为主 (Hubbard et al., 1990; 张玲 等, 2017), 成熟过程中蔗糖积累与 SUS 和 SPS 活性升高密切相关 (Moriguchi et al., 1990; Miron & Schaffer, 1991; Stommel, 1992; 赵智中 等, 2001; 刘永忠和李道高, 2003; 王惠聪 等, 2003; Wind et al., 2010; 谢鹏 等, 2012)。自从 1955 年首次在小麦胚芽中发现 SUS 及 SPS 以来 (Leloir & Cardini, 1955), 相继在很多物种中克隆出了 SUS 以及 SPS 基因。如在胡萝卜 (Šebková et al., 1995)、拟南芥 (Haouazine-Takvorian et al., 1997)、甘蔗 (Lingle & Dyer, 2001)、柑橘 (Komatsu et al., 2002)、草莓 (Anh et al., 2015; Zhao et al., 2017) 等植物中克隆了 SUS 基因; 在玉米 (Worrell et al., 1991)、苹果 (Ross et al., 1996)、水稻 (Valdez-Alarcón et al., 1996)、柑橘 (Komatsu et al., 1996) 等植物中克隆了 SPS 基因。随着近年来全基因组的公布, 已知 SUS 和 SPS 基因在植物中以家族存在, 成员数量因物种不同而异 (Castleden et al., 2004)。最近从桃中鉴定出 6 个 SUS 基因 (Zhang et al., 2015)、葡萄中鉴定出 5 个 SUS 基因 (Zhu et al., 2017)、苹果基因组中鉴定出有 8 个 SPS 基因 (李会霞 等, 2017)。

梨果实随着成熟进程, 糖分含量会发生显著的变化, 尤其是砂梨品种中的蔗糖含量变化较大 (姚改芳 等, 2010; Zhang et al., 2014)。高蔗糖积累型砂梨品种 ‘长十郎’ 果实成熟时 SUS 和 SPS 的活性增加与蔗糖含量增加相一致, 然而这些酶的活性在低蔗糖积累型白梨品种 ‘鸭梨’ 果实中并没有增加 (Moriguchi et al., 1992); 砂梨品种 ‘新高’ 及 ‘黄金梨’ 在果实发育前期, 蔗糖含量较低, 而 SUS 及 SPS 活性弱, 当蔗糖含量达到最高时, SUS 及 SPS 的活性也达到最大值 (Jinho et al., 2009); 西洋梨 ‘La France’ 在幼果期直至果实成熟时, 蔗糖含量都很少, SPS 的活性也很弱 (Suzue et al., 2006); ‘翠冠’ 梨果实发育中, SPS 活性随果实发育持续上升, 在果实发育的中后期急剧升高, 与蔗糖迅速积累的时期一致 (陈露露 等, 2011); 据最新的研究, ‘黄冠’ 梨中 *SPS1*、*SUS*、*SUT* 显著上调可导致果实中蔗糖含量的大幅度积累 (Shen et al., 2017)。种种迹象表明, 梨蔗糖含量的变化与 SUS 及 SPS 关系密切, 但尚无从全基因组水平上关于它们的报道。2013 年梨 (*Pyrus bretschneideri*) 基因组测序完成 (Wu et al., 2013), 为在全基因组水平上进行梨基因家族系统的生物信息学分析和重要功能基因的发掘提供了良好的数据平台。

本研究基于全基因组测序结果对梨 SUS 和 SPS 基因家族成员进行鉴定, 以期对梨和相近蔷薇科植物中 SUS 及 SPS 基因的功能研究提供候选的参考基因, 对进一步研究梨果实蔗糖积累的分子机制提供指导作用。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验于 2016—2017 年进行。供试梨品种为‘砀山酥梨’和‘翠冠’，种植于南京农业大学江浦农场园艺实验站。两个品种各选择长势一致的 3 株结果树，从树冠外围不同方向选取大小一致、无病虫害的果实作为待测样品，每次至少采集 30 个果实，随机分为 3 份，每份为 1 个生物学重复。采样时间按照果实发育初期（S1, S2）、发育中期（S3, S4）、成熟期（S5, S6）3 个阶段划分，‘砀山酥梨’共采集 6 次，依次为盛花后 22 d（S1）、45 d（S2）、90 d（S3）、120 d（S4）、150 d（S5）、165 d（S6），而‘翠冠’因成熟期较早故采集 5 次，依次为盛花后 37 d（S1）、65 d（S2）、86 d（S3）、107 d（S4）、120 d（S5）。样品采后立即去皮，削取果肉用液氮速冻后存于 - 80 °C 冰箱备用。

1.2 梨 SUS 和 SPS 基因家族筛选

从拟南芥在线信息资源库（The Arabidopsis Information Resource, TAIR: <http://www.arabidopsis.org>）下载 AtSUS 和 AtSPS 蛋白序列作为参考序列，与梨（*P. bretschneideri*）蛋白数据库（<http://www.peargenome.njau.edu.cn>）比对，获得相似性高的序列。通过 Pfam 数据库（<http://pfam.xfam.org>）检测所有候选基因的保守结构域，将仅含有蔗糖合成酶结构域（Sucrose-synth, PF00862）和糖基转移酶结构域（Glycos-transf-1, PF00534）的蛋白序列作为梨 SUS 基因家族候选序列（Baud et al., 2004），将同时含有 Sucrose-synth、Glycos-transf-1 和蔗糖 - 6 - 磷酸磷酸水解酶（S6PP, PF05116）3 个结构域的蛋白序列作为梨 SPS 基因家族候选序列（强毅, 2007），去除不含上述结构域以及结构域不完整的成员，并在美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information, NCBI）保守结构数据库（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>）进一步验证，确定目的基因。

1.3 生物信息学分析

利用在线软件 SMS（Sequence Manipulation Suite, <http://www.bioinformatics.org/sms2/>）对梨 SUS 和 SPS 基因家族候选成员进行基本理化性质分析，亚细胞定位用 CELLO v.2.5（<http://cello.life.nctu.edu.tw/>）和 WoLF PSORT（<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>）预测。利用 ClustalW 软件对梨候选基因的蛋白序列和 6 个拟南芥 SUS 及 4 个 SPS 基因家族的蛋白序列进行多重比对，使用软件 MEGA6.0 中邻接法（Neighbor-joining）绘制系统进化树，Bootstrap 值设置为 1 000。用在线软件 GSDS 2.0（Gene Structure Display Server, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>）分析梨候选基因的结构信息。运用在线软件 Evolgenius（<http://www.evolgenius.info/evolview/#login>）绘制候选基因蛋白序列保守结构域示意图。从梨基因组注释信息上获取候选基因的染色体位置信息，并用 Circos 绘图。采用软件 MCScanX 对梨基因组复制事件进行鉴定。同源基因对从 PGDD 数据库（Plant Genome Duplication Database, <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>）中获得。用软件 KaKs_Calculator 2.0 中邻接法计算基因对之间 Ks 和 Ka/Ks 值，根据 Ks 值计算进化时间， $T = Ks/2k$ ，k 值为 1.5×10^{-9} （Wu et al., 2013）。从本实验室之前所测‘砀山酥梨’不同果实发育时期的转录组数据（NCBI 登录号：PRJNA185970）中提取出候选基因的表达量数据，利用 R 语言 heatmap.2 包绘制表达量热图。

1.4 蔗糖含量的测定

糖的提取参考姚改芳等（2010）的方法，测定采用超高效液相色谱法（UPLC）。液相色谱仪为

H-class 系统, 色谱柱 (ACQUITY UPLC[®] RBEH Amide 1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm Column)。流动相: A (脱气后的超纯水, 电阻率为 18.25 M Ω ·cm), B (0.8%乙腈溶液), 流速为 0.2 mL·min⁻¹。柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积: 2 μL 。ELSD 条件: 漂移管温度为 50 $^{\circ}\text{C}$; 载气: 氮气; 气体压力: 0.138 MPa; 喷雾器模式: 冷却。蔗糖含量根据样品峰面积和外标准曲线计算, 标样购自 Sigma 公司。

1.5 RNA 的提取及 cDNA 的合成

RNA 提取采用成都福际植物总 RNA 提取试剂盒进行, 样品量为 1 g。总 RNA 经 DNase 清除基因组 DNA 后, 用 NanoDrop 2000 (Thermo) 检测 RNA 的浓度, 利用 1.0%琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的完整性。按照 TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒 (全式金) 进行反转录, 合成的 cDNA 用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。

1.6 引物设计与表达分析

使用软件 Primer Premier 5.0 设计各基因的 qRT-PCR 引物, 并在 NCBI 数据库上检测引物的特异性。由于基因 *PbrSPS3* 与 *PbrSPS4*、*PbrSPS5* 与 *PbrSPS6*、*PbrSUS3* 与 *PbrSUS16*、*PbrSUS4* 与 *PbrSUS14*、*PbrSUS10* 与 *PbrSUS11* 的序列高度一致, 一致性分别达到 99.50%、100%、98.87%、100%和 100% 而无法设计特异性引物, 故使用共同引物。以 *Tubulin* (No. AB239681) 作为内参基因 (Yamada et al., 2007)。各基因引物序列如表 1。

表 1 用于 qRT-PCR 分析的引物序列
 Table 1 Oligonucleotide sequences for primers used in qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 (5' - 3') Forward primer sequence	反向引物 (5' - 3') Reverse primer sequence	产物大小/bp Product size	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
<i>PbrSPS1</i>	ATGCCAAGTCGTCGTTGTTG	GTTCAAGACGACGTTTAGCCTTC	229	56
<i>PbrSPS2</i>	ACCCACATGACCAGAAAGC	CACCTACATTGCTAGTGGACG	201	56
<i>PbrSPS3/4</i>	GAAACGACTGGGTGAAC	GTGGAGATCGGTCTCAT	144	61
<i>PbrSPS5/6</i>	ATGGAGCTCGGTCCGGGA	GAGTCAGCATCTCTGTGGGCT	147	58
<i>PbrSPS7</i>	CATGAACTGAACCTTAGITTTTATTCGTG	TACACTCTGGTGTGGTA	130	60
<i>PbrSPS8</i>	ACCGGATGGAGATGGGGAT	CATAATCAATGTAAGGTTAGCAAGCTCC	195	57
<i>PbrSUS1</i>	CTGACCAATCCGCTACTTTCCCTC	CTCAACGAGTCCTGTGAGGTTCTTC	159	60
<i>PbrSUS2</i>	GAGGAATGGCTATGACTTGTGGA	CCCTGGTACGGATCAATGTG	142	57
<i>PbrSUS3/16</i>	ACCCGGTCCAGAGCTTAC	AGCTTCTGGGTGTGCTTCAAAC	187	58
<i>PbrSUS4/14</i>	CATGTTTCAGCTAAATTCTCAGTTCACAC	GAGGAACGCAATCTCTATCATAGTG	163	57
<i>PbrSUS5</i>	GACCACATTAAGGCATGTCATATTAATAT	GTCACCTCCTAATACATGCTTGTAG	179	56
<i>PbrSUS6</i>	CAAGGCGCTCACAGTCTC	GAATGCAATCTTTGTCATAGTGGTGA	180	57
<i>PbrSUS7</i>	CTGGAGGCAGTTGAACAAGA	TGTGGGATCTTACTCTTACCT	180	56
<i>PbrSUS8</i>	AGTTCGCGCAACTACAC	GGCAAACCAAGACGT	225	57
<i>PbrSUS9</i>	CTCCCGTAAGAATACGGTTGGT	GGAGGCTGGTAAGTCTCTTTTGC	156	67
<i>PbrSUS10/11</i>	CAGAAGTCTCCCGCTACATTG	GAACCATGGAGGCTGGTAAG	190	57
<i>PbrSUS12</i>	GCAAGGACCGACCTGGA	GAAAGTAGACGGATTGGTCAGCA	117	57
<i>PbrSUS13</i>	CAGGCATGAAAGAAGCAAGGTC	GTAGCAGAAATGCCATCCACTG	152	57
<i>PbrSUS15</i>	GTTGTGGCTGCGGGTGATCA	AGCCTCAATGACAGTCAAGCCG	213	60
<i>PbrSUS17</i>	CTGACCCTACCGGAGTTTATG	TGGGAAAACGTTCTCTTTCACCT	203	58
<i>Tubulin</i>	TGGGCTTGGCTCTCTTAC	CCTTCGTGCTCATCTTACC	169	58

qRT-PCR 试验利用 Roche 公司生产的 LightCycler 480 qPCR 仪进行, 反应试剂 SYBR Green 购自 Roche。反应总体系为 20 μL , 包括 2 \times SYBR Premix ExTaq 10 μL , 正向、反向引物各 2.5 μL , cDNA 0.2 μL , DEPC 处理的水 5 μL 。程序设置: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 55 个循环。PCR 循环结束后立即进行溶解, 其程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 再从 65 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 95 $^{\circ}\text{C}$, 每 0.11 s 收集 1 次荧光。最后在 LightCycler 480 的 Gene Scanning 1.5v 软件中自动生成扩增产物的熔解曲线。每个样品进行 3 次重复, 不同样品得到的数据经内参基因均一化处

理后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 计算基因的相对表达量。应用 Microsoft Excel 2007 进行图表绘制和统计分析, 结果均为 3 次重复的平均值 \pm 标准差 (SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 梨 SUS 和 SPS 基因家族的鉴定

通过对梨基因组数据的筛选, 最终获得 17 个 SUS 基因和 8 个 SPS 基因, 分别命名为 *PbrSUS1* ~ *PbrSUS17* 和 *PbrSPS1* ~ *PbrSPS8*, 其基本理化性质如表 2 所示。亚细胞定位同时采用 CELLO v.2.5 和 WoLF PSORT 两种软件进行预测, 除基因 *PbrSUS4*、*PbrSUS5*、*PbrSUS6*、*PbrSUS12*、*PbrSUS13*、*PbrSUS14*、*PbrSPS2*、*PbrSPS7* 存在差异外, 其余基因均定位在细胞质中, 可能与两种软件的计算方法不同有关 (表 2)。

表 2 梨 SUS 及 SPS 基因家族基本特性
Table 2 Basic characteristics of the SUS and SPS gene families in *Pyrus bretschneideri*

基因名 Name	ID	DNA/bp	CDS/bp	氨基酸/aa Amino acid	蛋白质分子量/kD Protein molecular weight	pI	亚细胞定位 Subcellular localization	
							CELLO v.2.5	WoLF PSORT
<i>PbrSUS1</i>	Pbr001616.1	3 995	2 571	857	96.14	6.90	CP	ChP
<i>PbrSUS2</i>	Pbr003394.1	3 513	2 373	791	90.76	6.33	CP	CP
<i>PbrSUS3</i>	Pbr003395.1	3 435	2 424	808	92.66	6.05	CP	CP
<i>PbrSUS4</i>	Pbr008457.1	11 794	3 429	1 143	129.44	8.62	OM	PM
<i>PbrSUS5</i>	Pbr008464.1	10 218	3 360	1 120	126.84	8.66	OM	PM
<i>PbrSUS6</i>	Pbr012641.1	12 887	3 417	1 139	128.73	8.51	OM	PM
<i>PbrSUS7</i>	Pbr012642.1	4 067	2 535	845	95.54	7.26	CP	CP
<i>PbrSUS8</i>	Pbr014902.1	4 602	2 403	801	91.18	5.95	CP	CP
<i>PbrSUS9</i>	Pbr022715.1	3 153	1 680	560	63.59	7.60	CP	CP
<i>PbrSUS10</i>	Pbr026336.1	3 100	1 701	567	64.29	7.80	CP	CP
<i>PbrSUS11</i>	Pbr026342.1	3 100	1 701	567	64.29	7.80	CP	CP
<i>PbrSUS12</i>	Pbr028302.1	4 031	2 604	868	96.77	6.82	CP	ChP
<i>PbrSUS13</i>	Pbr031564.1	4 111	2 448	816	91.57	7.16	CP	PM
<i>PbrSUS14</i>	Pbr033571.1	10 606	3 429	1143	129.44	8.62	OM	PM
<i>PbrSUS15</i>	Pbr035996.1	3 460	2 406	802	91.92	6.20	CP	CP
<i>PbrSUS16</i>	Pbr035997.1	3 436	2 424	808	92.70	6.27	CP	CP
<i>PbrSUS17</i>	Pbr037395.1	4 688	2 514	838	96.50	6.85	CP	CP
<i>PbrSPS1</i>	Pbr003107.1	5 449	3 219	1073	120.35	6.68	CP	CP
<i>PbrSPS2</i>	Pbr008035.1	4 424	2 457	819	91.18	5.75	CP	NUC
<i>PbrSPS3</i>	Pbr009578.1	5 498	3 165	1055	117.62	6.46	CP	CP
<i>PbrSPS4</i>	Pbr027868.1	5 489	3 165	1055	117.64	6.57	CP	CP
<i>PbrSPS5</i>	Pbr032090.1	4 608	2 622	874	97.23	6.32	CP	CP
<i>PbrSPS6</i>	Pbr032093.1	4 608	2 622	874	97.23	6.32	CP	CP
<i>PbrSPS7</i>	Pbr034361.1	5 983	3 201	1 067	119.50	6.46	CP	NUC
<i>PbrSPS8</i>	Pbr042506.1	5 111	2 889	963	106.76	6.46	CP	CP

注: CP: 胞质; ChP: 叶绿体; PM: 质膜; OM: 外膜; NUC: 细胞核。

Note: CP: Cytoplasm; ChP: Chloroplast; PM: Plasma membrane; OM: Outer membrane; NUC: Nuclear.

2.2 梨 SUS 和 SPS 家族基因结构分析

对梨 SUS、SPS 基因的编码区结构进行分析 (图 1), 发现梨 SUS 家族基因的外显子个数在 10 ~ 21 个之间, 其中, *PbrSUS6* 含有 21 个, 而 *PbrSUS9*、*PbrSUS10*、*PbrSUS11* 只有 10 个, 表明梨 SUS 基因家族在进化过程中出现了外显子增加或者缺失现象。而 SPS 家族基因外显子数量相差较小, 在 10 ~ 13 个之间。在基因长度方面, 亚家族 *SUS2* 中有 4 个基因的长度明显大于其他基因, 主要体现在内含子和外显子的数量上。

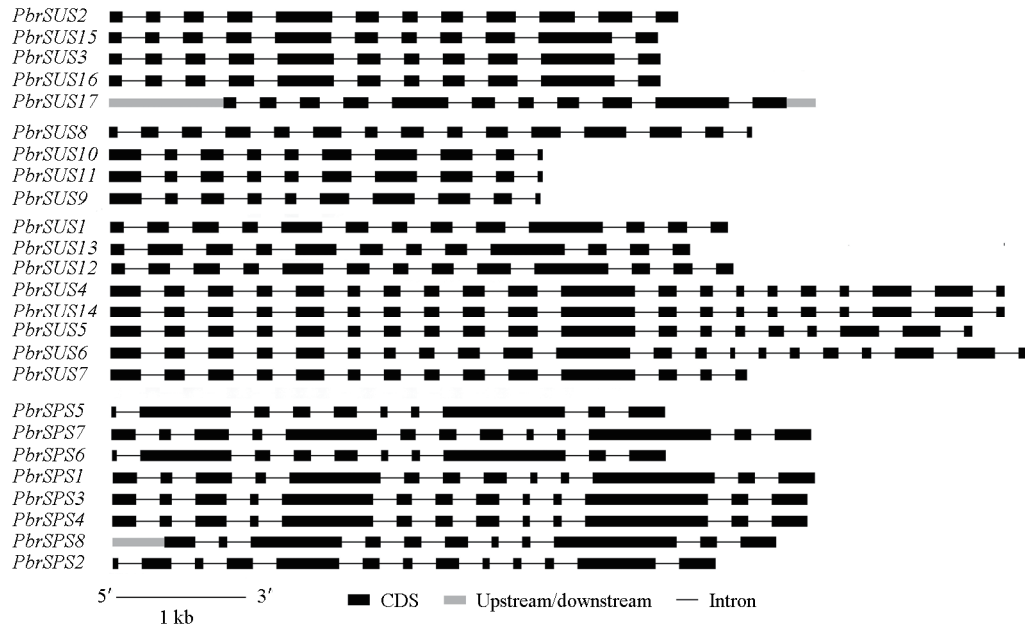


图1 梨 SUS 和 SPS 基因家族外显子-内含子组成

Fig. 1 Exon - intron organization of the SUS and SPS gene families in *Pyrus bretschneideri*

2.3 梨 SUS 和 SPS 家族系统发育关系与蛋白质保守功能域

选择梨中 17 个 SUS 基因、8 个 SPS 基因与拟南芥中 6 个 SUS 基因 (*AtSUS1* ~ *AtSUS6*)、4 个 SPS 基因 (*AtSPS1* ~ *AtSPS4*) 编码的蛋白序列构建系统发育树 (图 2), 可以看出 SUS 和 SPS 分为两大家族, 其中 SUS 家族又包括 3 个亚家族, 各家族的序列具有高度保守性, 大部分序列的同源性达 90% 以上。拟南芥中 (Baud et al., 2004) *AtSUS1*, *AtSUS4* 属于双子叶植物 SUS1 亚家族, *AtSUS2* 和 *AtSUS3* 属于 SUSA 亚家族, 而 *AtSUS5* 和 *AtSUS6* 构成单独的亚家族 SUS2, 将 *PbrSUS* 的 3 个亚家族分别命名为相对应的 SUS1、SUSA 和 SUS2 亚家族。

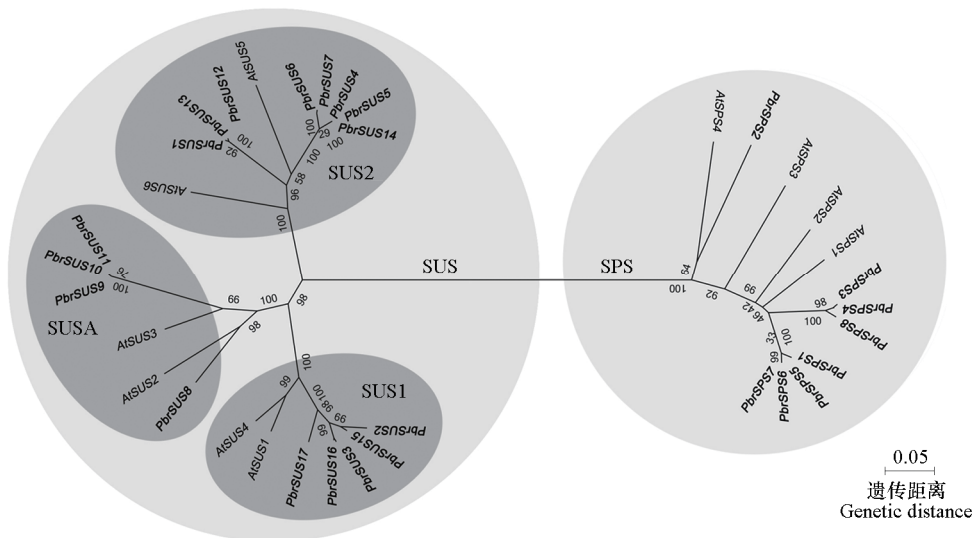


图2 梨和拟南芥 SUS 和 SPS 基因家族系统发育关系

Fig. 2 Phylogenetic relationship of the SUS and SPS gene families in *Pyrus bretschneideri* and *Arabidopsis thaliana*

分析梨中 SUS 及 SPS 基因编码蛋白质序列的保守功能域(图 3),发现 SPS 家族除了含有与 SUS 家族一样的两个功能结构域 Sucrose-synth 和 Glycos-transf-1 外,还含有 S6PP 结构域。SUS 家族中大部分成员的结构域长度基本一致,且排列整齐。PbrSUS9、PbrSUS10、PbrSUS11 的结构域稍短,PbrSUS4、PbrSUS5、PbrSUS6、PbrSUS14 扩张出新的结构域 CDC50。

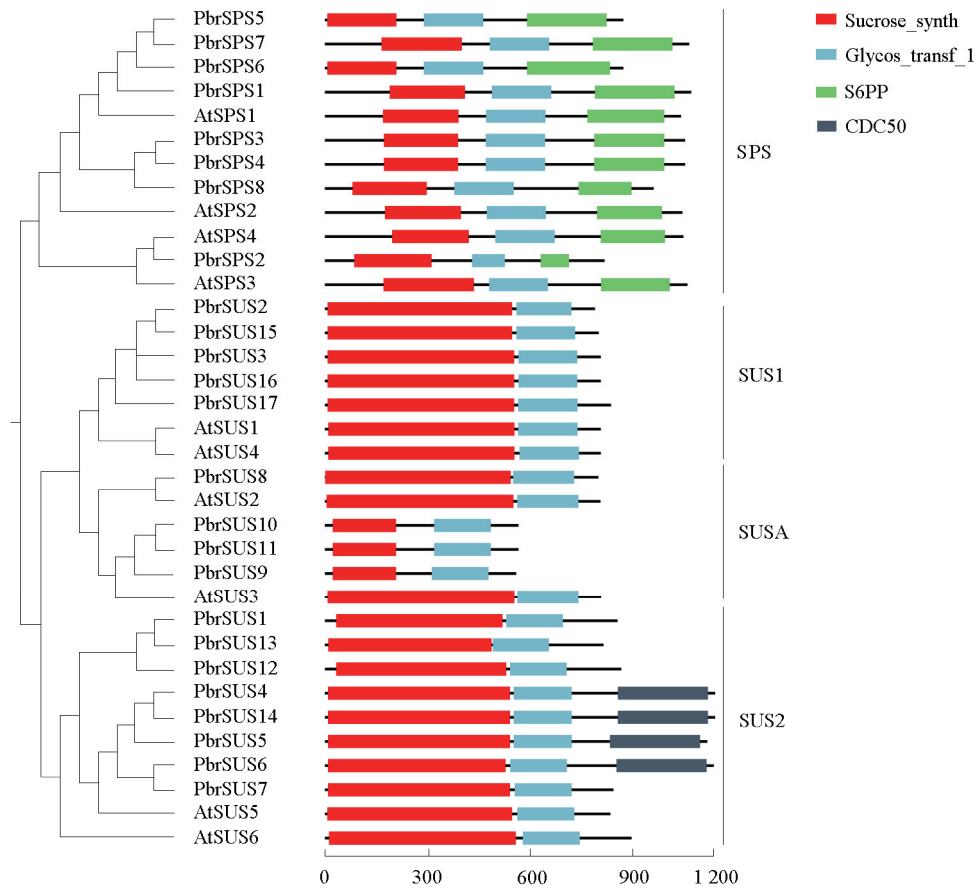


图 3 梨 SUS 和 SPS 基因家族蛋白质保守结构域

Fig. 3 Protein conservative domains of the SUS and SPS gene families in *Pyrus bretschneideri*

2.4 梨 SUS 和 SPS 基因家族的进化模式

根据梨染色体基因组信息,分析了 17 个 SUS 基因以及 8 个 SPS 基因在染色体上的分布情况(图 4)。发现有 19 个基因不均匀地分布在染色体上,6 个基因分布在 Scaffold 上。其中分布基因最多的染色体为 Chr15,分布有 5 个基因;其次是 Chr2 和 Chr9,各分布 3 个;Chr17 分布 2 个,Chr3、Chr5、Chr6、Chr8、Chr11、Chr13 各分布 1 个。并且有 12 对基因存在共线性,分别为 *PbrSUS2* 和 *PbrSUS15*、*PbrSUS2* 和 *PbrSUS17*、*PbrSUS4* 和 *PbrSUS7*、*PbrSUS12* 和 *PbrSUS13*、*PbrSUS15* 和 *PbrSUS17*、*PbrSPS1* 和 *PbrSPS3*、*PbrSPS1* 和 *PbrSPS4*、*PbrSPS1* 和 *PbrSPS5*、*PbrSPS1* 和 *PbrSPS7*、*PbrSPS3* 和 *PbrSPS4*、*PbrSPS4* 和 *PbrSPS7*、*PbrSPS4* 和 *PbrSPS8*。

基因复制模式推动着基因家族的进化,复制模式主要包括片段复制或全基因组复制、串联复制以及染色体或基因水平的重排等 (Maher et al., 2006)。从 PGDD 数据库获得梨中 SUS 和 SPS 基因家族中共 20 个同源基因对,其中 17 对为片段复制,3 对为串联复制(表 3)。

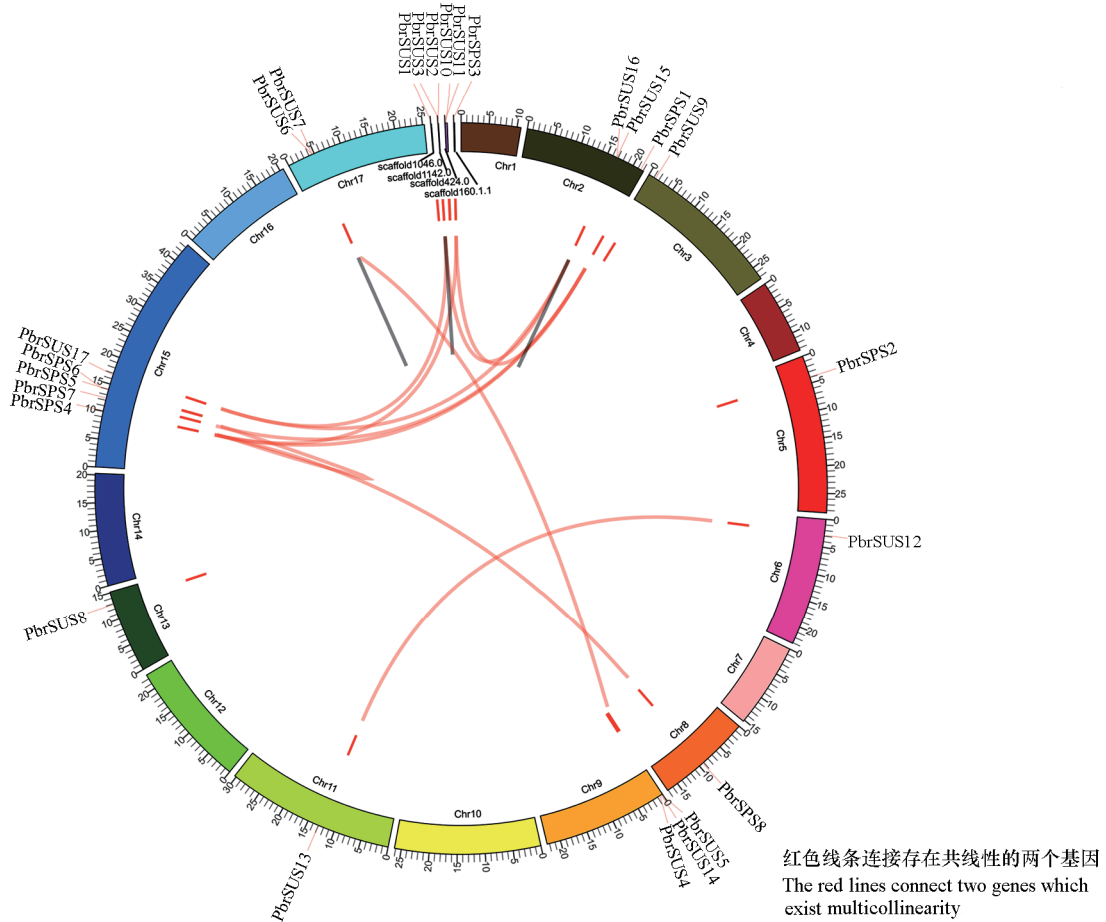


图 4 梨 SUS 和 SPS 基因家族在染色体上的分布

Fig. 4 Chromosomal distribution of the SUS and SPS gene families in *Pyrus bretschneideri*

表 3 梨 SUS 及 SPS 基因家族同源基因对 KaKs 值分析

Table 3 KaKs values of the homologous gene pairs for SUS and SPS gene families in *Pyrus bretschneideri*

类型 Type	同源基因对 Homologous gene pair	Ka	Ks	Ka/Ks	复制时间 (百万年前) Duplication time (Millions of years ago)
片段复制 Segmental	<i>PbrSUS2</i> <i>PbrSUS15</i>	0.0100	0.0184	0.5424	0.6138
	<i>PbrSUS2</i> <i>PbrSUS17</i>	0.0569	0.2723	0.2088	9.0770
	<i>PbrSUS7</i> <i>PbrSUS4</i>	0.0538	0.2274	0.2367	7.5813
	<i>PbrSUS9</i> <i>PbrSUS10</i>	0.0009	0.0022	0.4079	0.0730
	<i>PbrSUS12</i> <i>PbrSUS1</i>	0.0036	0.0048	0.7504	0.1607
	<i>PbrSUS13</i> <i>PbrSUS1</i>	0.0000028	0.0028	0.0010	0.0935
	<i>PbrSUS13</i> <i>PbrSUS12</i>	0.0040	0.0052	0.7680	0.1729
	<i>PbrSUS17</i> <i>PbrSUS15</i>	0.0485	0.2530	0.1916	8.4319
	<i>PbrSUS4</i> <i>PbrSUS5</i>	NA	NA	NA	NA
	<i>PbrSUS10</i> <i>PbrSUS11</i>	NA	NA	NA	NA
	<i>PbrSPS3</i> <i>PbrSPS1</i>	0.1428	1.1385	0.1254	37.9483
	<i>PbrSPS4</i> <i>PbrSPS1</i>	0.1410	1.1529	0.1223	38.4314
	<i>PbrSPS4</i> <i>PbrSPS3</i>	0.0021	0.0122	0.1697	0.4067
	<i>PbrSPS4</i> <i>PbrSPS7</i>	0.1382	1.2036	0.1148	40.1207
串联复制 Tandem	<i>PbrSPS4</i> <i>PbrSPS8</i>	0.0203	0.0996	0.2036	3.3212
	<i>PbrSPS5</i> <i>PbrSPS1</i>	0.0210	0.1168	0.1794	3.8949
	<i>PbrSPS7</i> <i>PbrSPS1</i>	0.0218	0.1348	0.1614	4.4931
	<i>PbrSUS2</i> <i>PbrSUS3</i>	0.0236	0.1243	0.1896	4.1438
	<i>PbrSUS7</i> <i>PbrSUS6</i>	0.0275	0.0834	0.3297	2.7800
	<i>PbrSUS15</i> <i>PbrSUS16</i>	0.0146	0.1104	0.1327	3.6792

注: Ka: 异义替换; Ks: 同义替换; NA: 缺失值。

Note: Ka: Non-synonymous substitution; Ks: Synonymous substitution; NA: No result.

利用软件 KaKs 计算片段复制和串联复制基因对的 KaKs 值 (表 3), 由于基因对 *PbrSUS4* 与 *PbrSUS5*、*PbrSUS10* 与 *PbrSUS11* 的 CDS 序列一致性分别达到 97.99% 和 100%, 而没有计算出 KaKs 值 (表中用 NA 表示), 其余基因对的 Ks 值介于 0.0022 和 1.2036 之间, 表明复制时间最早发生在 40.1207 百万年前, 最晚发生在 0.1729 百万年前, 且算出的所有基因对的 KaKs < 1, 表明梨 SUS 和 SPS 基因家族在进化过程中主要受纯化选择的作用 (Yang & Nielsen, 2000), 可能与人类长期对糖含量优质品种的驯化和培育有关。

2.5 ‘砀山酥梨’和‘翠冠’梨果实发育过程中蔗糖含量的变化

通过对‘砀山酥梨’和‘翠冠’不同发育时期果实蔗糖含量测定发现,‘砀山酥梨’在果实整个发育过程中蔗糖含量变化趋势较平缓,且果实成熟时,蔗糖含量较低;而‘翠冠’果实发育前期蔗糖含量变化平缓,后期急剧增高,至果实成熟时的蔗糖含量为‘砀山酥梨’的 10 倍以上 (图 5)。

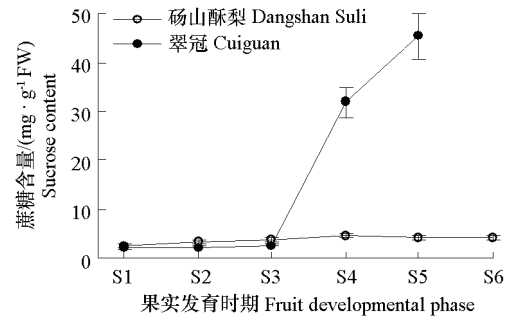


图 5 ‘砀山酥梨’与‘翠冠’果实发育过程中蔗糖含量变化
Fig. 5 Changes of sucrose content during fruit development of ‘Dangshan Suli’ and ‘Cuiguan’ pear

2.6 ‘砀山酥梨’果实发育过程中 SUS 和 SPS 基因表达变化

根据 2011 年所测的不同发育阶段‘砀山酥梨’果实转录组数据,对 25 个梨 SUS 和 SPS 基因的表达谱进行分析,结果发现有 7 个基因在果实中没有表达量,而其余 18 个基因的表达如图 6 所示。

其中, *PbrSPS1*、*PbrSPS3*、*PbrSPS4*、*PbrSPS8* 的表达量随果实发育整体上呈升高趋势, *PbrSUS1*、*PbrSUS3*、*PbrSUS7*、*PbrSUS12*、*PbrSUS13*、*PbrSUS15*、*PbrSUS16*、*PbrSUS17* 的表达量在幼果期时很高,随着果实的成熟又逐渐降低,而其他基因的表达趋势不明显 (图 6)。

进一步以‘砀山酥梨’不同发育时期的果实为材料,选择趋势明显的 10 个基因 *PbrSPS1*、*PbrSPS3*、*PbrSPS8*、*PbrSUS1*、*PbrSUS3*、*PbrSUS7*、*PbrSUS12*、*PbrSUS13*、*PbrSUS15*、*PbrSUS17*, 对上述转录组数据进行 qRT-PCR 验证,并选择拟合系数 R^2 值更接近 1 的趋势线进行回归分析来检验基因随果实发育的表达趋势 (图 7), 结果表明各基因的表达变化与转录组结果相符。

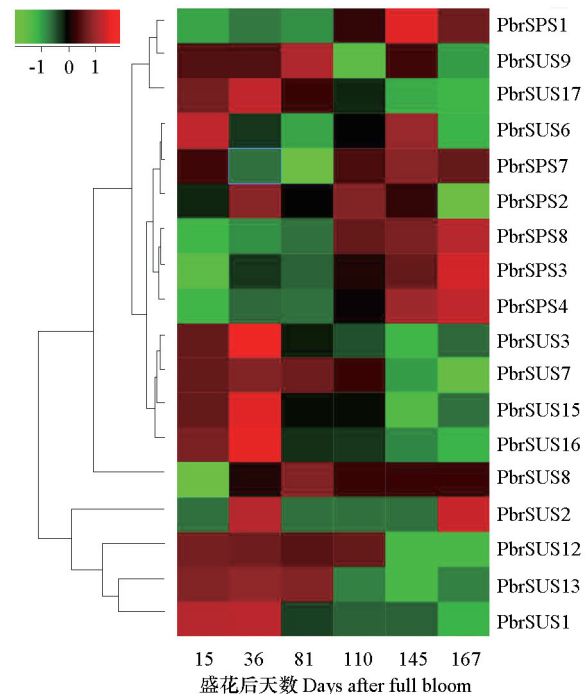


图 6 ‘砀山酥梨’果实 SUS 和 SPS 家族基因表达谱
绿色代表低表达,红色代表高表达。
Fig. 6 Expression profiles of the SUS and SPS gene families of ‘Dangshan Suli’ pear fruit
Green indicates low expression and red indicates high expression.

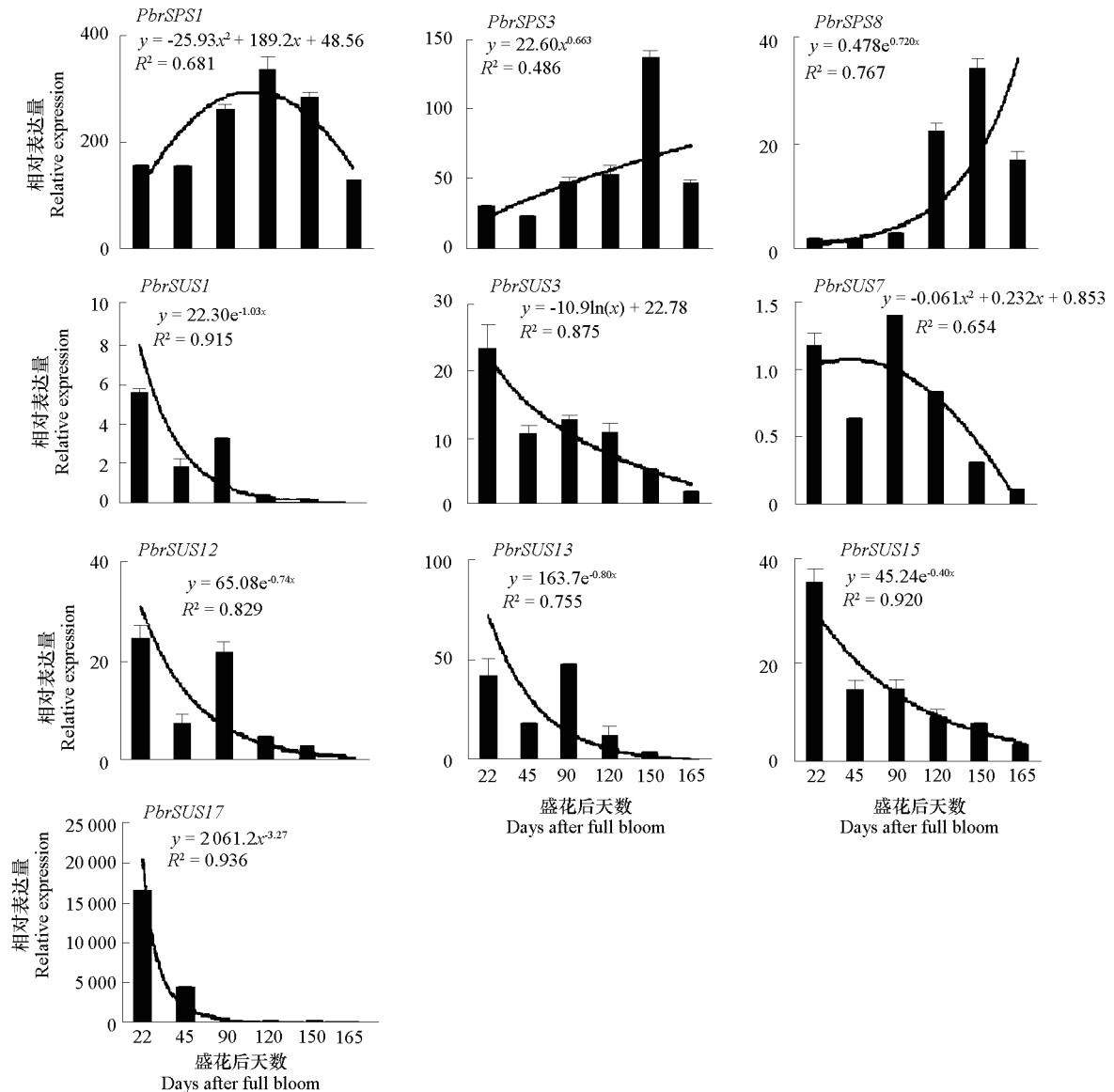


图7 ‘砀山酥梨’果实不同发育阶段 SUS 和 SPS 家族基因表达量及其回归分析
Fig. 7 Expression and regression analysis of the SUS and SPS family genes at different developmental stages of ‘Dangshan Suli’ pear fruit

2.7 ‘翠冠’梨果实发育过程中 SUS 和 SPS 基因表达变化

为研究不同蔗糖积累型梨果实中 SUS 和 SPS 基因家族的表达差异, 对高蔗糖积累型梨 ‘翠冠’果实不同发育时期的 SUS 和 SPS 基因进行 qRT-PCR 分析。

结果表明有 12 个 SUS 基因和 7 个 SPS 基因在 ‘翠冠’果实中表达 (图 8), 有 6 个基因在果实中不表达。

回归分析发现拟合度较高且表达量呈升高趋势的基因有 *PbrSPS3/4*、*PbrSPS8*、*PbrSUS2*、*PbrSUS15*, 拟合度较高且表达量呈降低趋势的基因有 *PbrSPS2*、*PbrSUS1*、*PbrSUS3/16*、*PbrSUS12*、*PbrSUS13*、*PbrSUS17*。

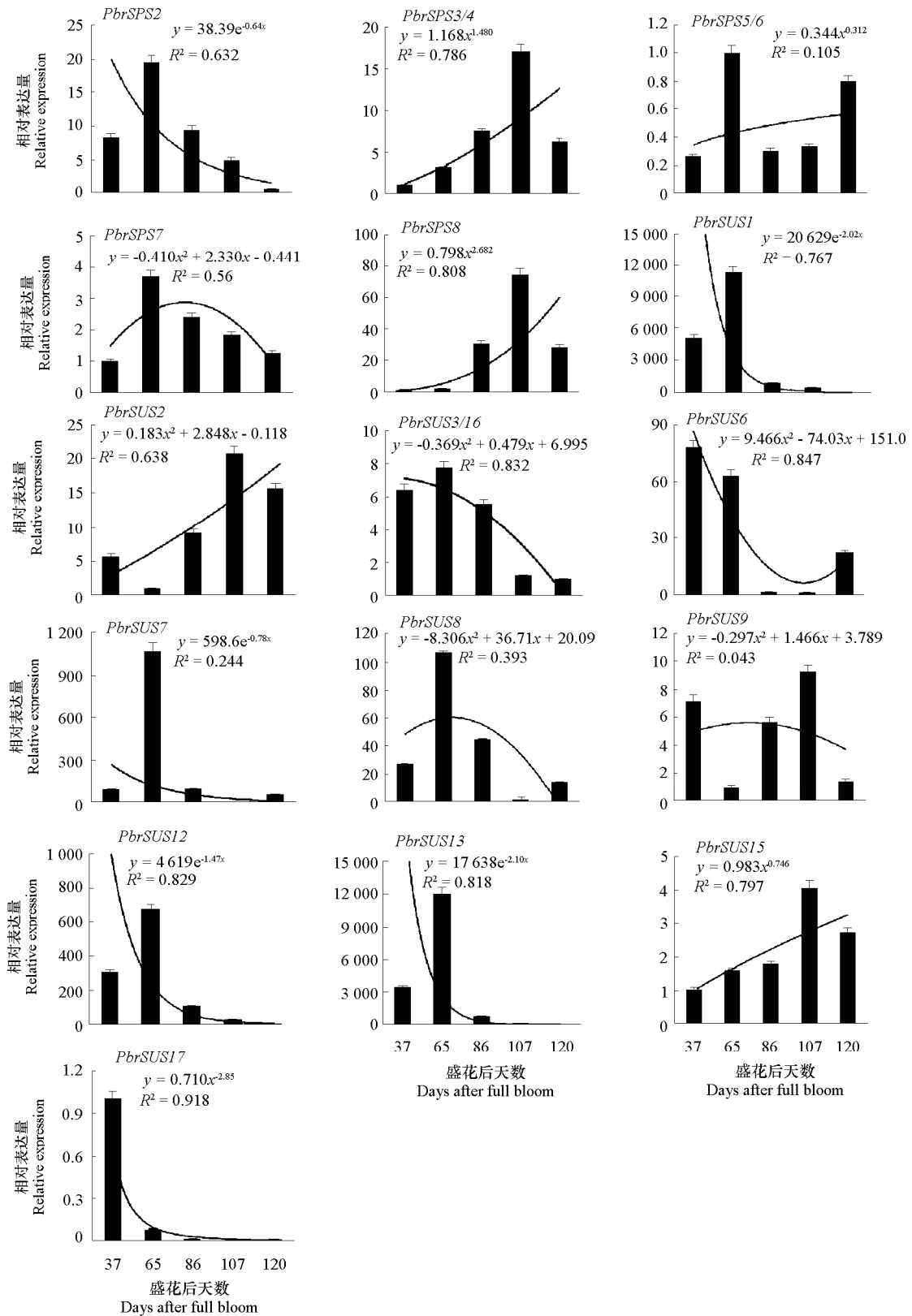


图 8 ‘翠冠’果实不同发育阶段 SUS 和 SPS 基因家族表达量及其回归分析

Fig. 8 Expression and regression analysis of the SUS and SPS gene families at different developmental stages of ‘Cuiguan’ pear fruit

2.8 ‘砀山酥梨’和‘翠冠’梨果实发育过程中SUS和SPS基因表达关系

比较SUS和SPS基因在‘砀山酥梨’和‘翠冠’果实发育过程中的表达趋势，发现有3个基因（*PbrSPS3*, *PbrSPS4*, *PbrSPS8*）在两品种中的表达量同为增加，有7个基因的表达量同为减少，有1个基因（*PbrSUS15*）的表达呈相反趋势，即在‘翠冠’中增加，而在‘砀山酥梨’中减少（图9）。除此之外，*PbrSPS1*在‘砀山酥梨’中增加而在‘翠冠’中不表达，*PbrSPS2*在‘翠冠’中减少而在‘砀山酥梨’中趋势不明显，*PbrSUS2*在‘翠冠’中增加而在‘砀山酥梨’中趋势不明显。

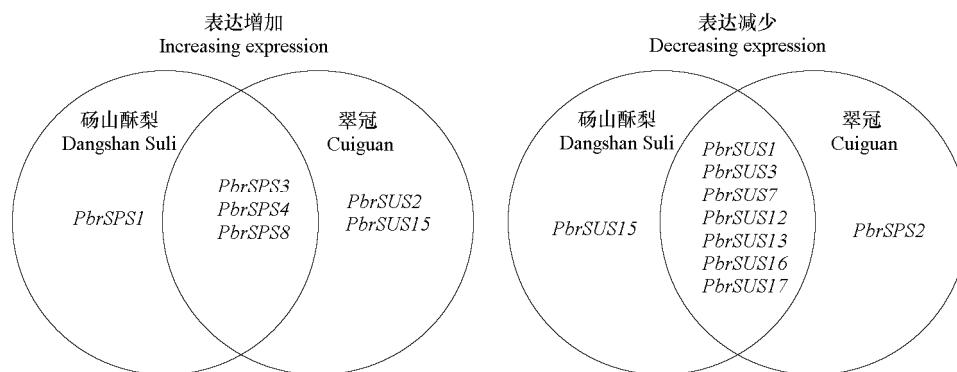


图9 ‘砀山酥梨’和‘翠冠’果实中SUS及SPS家族基因表达韦恩图

Fig. 9 Expression Venn diagram of the SUS and SPS gene families in ‘Dangshan Suli’ and ‘Cuiguan’ pear fruits

3 讨论

本研究中利用比较基因组学的方法在梨（*P. bretschneideri*）基因组数据库中筛选出了17个SUS基因和8个SPS基因，其数量大于拟南芥（Bieniawska et al., 2007）、水稻（Lunn & Macrae, 2003）、桃（Zhang et al., 2015）、葡萄（Zhu et al., 2017）中的同源家族的数量，但是SPS的数量与苹果（李会霞等, 2017）相同。本研究中SUS和SPS基因主要定位于细胞质中，*PbrSUS4*、*PbrSUS5*、*PbrSUS6*、*PbrSUS14*可能位于质膜或外膜上，这几个基因除了含有SUS家族应有的结构域Sucrose-synth和Glycos-transf-1外，还含有特殊结构域CDC50，该结构是酿酒酵母中通过质膜的磷脂易位所需的（Chen et al., 2006）。由于所有的真核细胞都有一些类似的基本的生理过程，所以推测基因*PbrSUS4*、*PbrSUS5*、*PbrSUS6*和*PbrSUS14*有可能参与了细胞质或线粒体的磷脂转运过程。

通过对‘砀山酥梨’和‘翠冠’不同发育时期果实中蔗糖含量测定发现，‘翠冠’属于高蔗糖积累型品种，‘砀山酥梨’属于低蔗糖积累型品种，与前人的研究结果（胡红菊等, 2007；姚改芳等, 2010）一致。为了进一步明确SUS和SPS基因的表达特性，测定了其家族成员在‘砀山酥梨’和‘翠冠’果实成熟过程中的表达变化，发现除*PbrSPS1*在‘翠冠’中未表达外，其余SPS基因在两个品种中均有所表达。而且也发现*PbrSPS3*、*PbrSPS4*、*PbrSPS8*在‘翠冠’中的表达变化趋势与果实蔗糖积累增加相一致，表明这3个基因在高蔗糖积累型梨果实中具有重要的作用，这与苹果、甜瓜的研究结果（Dai et al., 2011；Li et al., 2012）一致；尽管这3个基因在‘砀山酥梨’果实成熟期间表达量也在升高，但并没有促进果实蔗糖的积累，可能是果实成熟期间蔗糖转化酶的活性较高，导致合成的蔗糖在转化酶的作用下发生水解（Tanase & Yamaki, 2000）。根据拟南芥中SPS亚家族的分类（Lutfiyay et al., 2007）发现，基因*PbrSPS2*与*AtSPS4*分布在同一个亚家族SPSC中，拟南芥中

AtSPS4 突变使 SPS 酶的活性仅降低了 13%, 表明 *AtSPS4* 对于拟南芥蔗糖的积累作用不大(Sun et al., 2011), 而在‘翠冠’果实发育过程中, *PbrSPS2* 的表达量随果实中蔗糖含量的升高而呈降低趋势, 表明其在梨果实蔗糖积累过程并没有起到明显的作用, 可能主要促进叶片中蔗糖的积累, 但其具体功能还需进一步的验证。基因 *PbrSUS2*、*PbrSUS15* 的表达趋势与‘翠冠’果实中蔗糖含量增高趋势一致, 而基因 *PbrSUS1*、*PbrSUS3*、*PbrSUS7*、*PbrSUS12*、*PbrSUS13* 和 *PbrSUS16* 的表达趋势却和蔗糖含量变化趋势相反, 表明后者主要负责 SUS 总活性(Li et al., 2012)。从 *PbrSUS2* 和 *PbrSUS15* 在两个品种间的表达关系看, 认为其在蔗糖代谢过程中主要起合成蔗糖的作用, 编码的酶属于 SUSII (Tanase & Yamaki, 2000), 不过, 对于其具体功能还需要进一步研究。

References

- Anh N Q, Sheng L, Wi S G, Hanhong B, Dae-Seok L, Hyeun-Jong B. 2015. Pronounced phenotypic changes in transgenic tobacco plants overexpressing sucrose synthase may reveal a novel sugar signaling pathway. *Frontiers in Plant Science*, 6 (306): 1 - 15.
- Baud S, Vaultier M N, Rochat C. 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396): 397 - 409.
- Castleden C K, Aoki N, Gillespie V J, MacRae E A, Quick W P, Buchner P, Foyer C H, Furbank R T, Lunn J E. 2004. Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiology*, 135 (3): 1753 - 1764.
- Chen Lu-lu, Wang Tao, Huang Xue-yan, Lu Cai-yu, Liu Dong-feng, Zheng Xiao-yan, Teng Yuan-wen. 2011. Study on enzyme activities involved in sugar accumulation and sucrose metabolization in Cuiguan pear under plastic tunnel culture. *Journal of Fruit Science*, 28 (3): 400 - 405. (in Chinese)
- 陈露露, 王 涛, 黄雪燕, 卢彩玉, 刘冬峰, 郑小艳, 滕元文. 2011. 大棚翠冠梨果实糖积累及蔗糖代谢相关酶活性的研究. *果树学报*, 28 (3), 400 - 405.
- Chen S, Wang J, Muthusamy B, Liu K S, Andersen R, Graham T. 2006. Roles for the drs2p-cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. *Traffic*, 7 (11): 1503 - 1517.
- Dai N, Cohen S, Portnoy V, Tzuri G, Harel-Beja R, Pompan-Lotan M, Carmi N, Zhang G, Diber A, Pollock S, H Karchi, Yeselson Y, Petreikov M, Shen S, Sahar U, Hovav R, Lewinsohn E, Tadmor Y, Granot D, Ophir R, Sherman A, Fei Z, Giovannoni J, Burger Y, Katzir N, Schaffer A A. 2011. Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant Molecular Biology*, 76 (1 - 2): 1 - 18.
- Geigenberger P, Reimholz R, Deiting U, Sonnewald U, Stitt M. 1999. Decreased expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress - induced synthesis of sucrose in growing potato tubers. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 19 (2): 119 - 129.
- Haouazine-Takvorian N, Tymowska-Lalanne Z, Takvorian A, Tregear J, Lejeune B, Lecharny A, Kreis M. 1997. Characterization of two members of the *Arabidopsis thaliana*, gene family, *Atβfruct3* and *Atβfruct4*, coding for vacuolar invertases. *Gene*, 197 (1 - 2): 239 - 251.
- Hu Hong-ju, Chen Qi-liang, Wang You-ping, Tian Rui, Yang Xiao-ping. 2007. Changes in contents of sugar and acid during fruit development of four sand pears. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 26 (2): 251 - 255. (in Chinese)
- 胡红菊, 陈启亮, 王友平, 田 瑞, 杨晓平. 2007. 4 个砂梨品种果实发育过程中主要糖酸含量的变化. *华中农业大学学报*, 26 (2): 251 - 255.
- Hubbard N L, Pharr D M, Huber S C. 1990. Role of sucrose phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climacteric. *Plant Physiology*, 94 (1): 201 - 208.
- Hubbard N L, Pharr D M, Huber S C. 1991. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum*, 82 (2): 191 - 196.
- Jinho C, Jangjeon C, Bang C S, Jungsup L, Dong-woog C, Hyesun C, Jun C A. 2009. Changes of sugar composition and related enzyme activities during fruit development of asian pear cultivars ‘Niitaka’ and ‘Whangkeumbaek’. *Horticulture Environment & Biotechnology*, 50 (6): 582 - 587.
- Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, Omura M, Akihama T. 2002. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and

- phylogenetic relationships. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366): 61 - 71.
- Komatsu A, Takanokura Y, Omura M, Akihama T. 1996. Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc.) . *Molecular & General Genetics* Mgg, 252 (3): 346 - 351.
- Leloir L F, Cardini C E. 1955. The biosynthesis of sucrose phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 214 (1): 157 - 165.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Li Hui-xia, Zhu Ling-cheng, Zhang Zhao, Ma Feng-wang, Li Ming-jun. 2017. Expression analysis of apple sucrose synthase gene families and their relationship with sucrose accumulation in apple. *Journal of Northwest Botanical Sciences*, 37 (5): 872 - 878. (in Chinese)
- 李会霞, 祝令成, 张 钊, 马锋旺, 李明军. 2017. 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. *西北植物学报*, 37 (5): 872 - 878.
- Lingle S E, Dyer J M. 2001. Cloning and expression of sucrose synthase-1 cDNA from sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, 158 (1): 129 - 131.
- Li M, Feng F, Cheng L. 2012. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. *PLoS ONE*, 7 (3), e33055.
- Liu Yong-zhong, Li Dao-gao. 2003. Sugar accumulation and changes of sucrose-metabolizing enzyme activities in *Citrus* fruit. *China Acta Horticulturae Sinica*, 30 (4): 457 - 459. (in Chinese)
- 刘永忠, 李道高. 2003. 柑橘果实糖积累与蔗糖代谢酶活性的研究. *园艺学报*, 30 (4): 457 - 459.
- Lunn J E, Macrae E. 2003. New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (3): 208 - 214.
- Lutfiyya L L, Xu N, D'Ordine R L, Morrell J A, Miller P W, Duff S M. 2007. Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *Journal of Plant Physiology*, 164 (7): 923 - 933.
- Maher C, Stein L, Ware D. 2006. Evolution of *Arabidopsis* microRNA families through duplication events. *Genome Research*, 16 (4): 510 - 519.
- Miron D, Schaffer A A. 1991. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb and Bonpl. *Plant Physiology*, 95 (2): 623 - 627.
- Moriguchi T, Abe K, Sanada T, Yamaki S. 1992. Levels and role of sucrose synthase, sucrose-phosphate synthase, and acid invertase in sucrose accumulation in fruit of Asian pear. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117 (2): 274 - 278.
- Moriguchi T, Sanada T, Yamaki S. 1990. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115 (2): 278 - 281.
- Qiang Yi. 2007. Bioinformatics analysis on sucrose phosphate synthase in different plants. *Progress in Modern Biomedicine*, 7 (4): 557 - 560. (in Chinese)
- 强 毅. 2007. 植物蔗糖磷酸合成酶的生物信息学分析. *现代生物医学进展*, 7 (4): 557 - 560.
- Ross G A, Johanna P, Toshiyuki M, Gavin S R, Elspeth A M. 1996. A stress-, pathogenesis-, and allergen-related cDNA in apple fruit is also ripening-related. *New Zealand Journal of Crop & Horticultural Science*, 24 (1): 103 - 107.
- Ruan Y L, Chourey P S, Delmer D P, Perez-Grau L. 1997. The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed. *Plant Physiology*, 115 (2): 375 - 385.
- Šebková V, Unger C, Hardegger M, Sturm A. 1995. Biochemical, physiological, and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*. *Plant Physiology*, 108 (1): 75 - 83.
- Shen C, Wang J, Jin X, Liu N, Fan X, Dong C, Shen Q, Xu Y. 2017. Potassium enhances the sugar assimilation in leaves and fruit by reulating the expression of key genes involved in sugar metabolism of Asian pears. *Plant Growth Regulation*, 83 (2): 287 - 300.
- Stommel J R. 1992. Enzymic components of sucrose accumulation in the wild tomato species *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Physiology*, 99 (1): 324 - 328.
- Sun J, Zhan J, Larue C T, Huber S C. 2011. 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. *Plant Cell & Environment*, 34 (4): 592 - 604.
- Suzue Y, Tsukuda M, Hatano S, Kanayama Y, Yamada K, Shiratake K. 2006. Changes in the activity and gene expression of sorbitol- and

- sucrose-related enzymes with leaf development of 'La France' pear. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75 (1): 45 - 50.
- Tanase K, Shiratake K, Yamaki S. 2002. Mechanisms of sucrose accumulation in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit. *Acta Horticulturae*, 587 (62): 479 - 487.
- Tanase K, Yamaki S. 2000. Sucrose synthase isozymes related to sucrose accumulation during fruit development of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) . *Engei Gakkai Zasshi*, 69 (6): 671 - 676.
- Valdez-Alarcón J J, Ferrando M, Salerno G, Jimenez-Moraila B, Herrera-Estrella L. 1996. Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase-encoding gene. *Gene*, 170 (2): 217 - 222.
- Wang Hui-cong, Huang Hui-bai, Huang Xu-ming. 2003. Sugar accumulation and related enzyme activities in the litchi fruit of 'Nuomici' and 'Feizixiao' . *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (1): 1 - 5. (in Chinese)
- 王惠聪, 黄辉白, 黄旭明. 2003. 荔枝果实的糖积累与相关酶活性. *园艺学报*, 30 (1): 1 - 5.
- Wind J, Smeekens S, Hanson J. 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71 (15): 1610 - 1614.
- Worrell A C, Bruneau J M, Summerfelt K, Boersig M, Voelker T A. 1991. Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *The Plant Cell*, 3 (10): 1121 - 1130.
- Wu J, Wang Z, Shi Z, Zhang S, Ming R, Zhu S, Khan M A, Tao S, Korban S S, Wang H, Chen N J, Nishio T, Xu X, Cong L, Qi K, Huang X, Wang Y, Zhao X, Wu J, Deng C, Guo G, Zhou W, Yin H, Qin G, Sha Y, Tao Y, Chen H, Yang Y, Song Y, Zhan D, Wang J, Li L, Dai M, Gu C, Wang Y, Shi D, Wang X, Zhang H, Zeng L, Zheng D, Wang C, Chen M, Wang G, Xie L, Sovero V, Sha S, Huang W, Zhang S, Zhang M, Sun J, Xu L, Li Y, Liu X, Li Q, Shen J, Wang J, Paull R E, Bennetzen J L, Wang J, Zhang S. 2013. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) . *Genome Research*, 23 (2): 396 - 408.
- Xie Peng, Guo Su-juan, Xiong Huan, Li Guang-hui, Lü Wen-jun. 2012. Changes in sugar, starch, some enzymes involved and their relationships during the development of Chinese chestnut. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (12): 2369 - 2376. (in Chinese)
- 谢 鹏, 郭素娟, 熊 欢, 李广会, 吕文君. 2012. 板栗果实糖和淀粉积累及相关酶活性关系的研究. *园艺学报*, 39 (12): 2369 - 2376.
- Yamada K, Kojima T, Bantog N, Shimoda T, Mori H, Shiratake K, Yamaki S. 2007. Cloning of two isoforms of soluble acid invertase of Japanese pear and their expression during fruit development. *Journal of Plant Physiology*, 164 (6): 746 - 755.
- Yang Z, Nielsen R. 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Molecular Biology & Evolution*, 17 (1): 32 - 43.
- Yao Gai-fang, Zhang Shao-ling, Cao Yu-fen, Liu Jun, Wu Jun, Yuan Jiang, Zhang Hu-ping, Xiao Chang-cheng. 2010. Characteristic of components and contents of soluble sugars in pear fruits from different species. *China Agricultural Sciences*, 43 (20): 4229 - 4237. (in Chinese)
- 姚改芳, 张绍铃, 曹玉芬, 刘 军, 吴 俊, 袁 江, 张虎平, 肖长城. 2010. 不同栽培种梨果实中可溶性糖组分及含量特征. *中国农业科学*, 43 (20): 4229 - 4237.
- Zhang C, Yu M, Ma R, Shen Z, Zhang B, Korir N K. 2015. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*) . *Acta Physiologiae Plantarum*, 37 (4): 1 - 15.
- Zhang H P, Wu J Y, Qin G H, Yao G F, Qi K J, Wang L F, Zhang S L. 2014. The role of sucrose-metabolizing enzymes in pear fruit that differ in sucrose accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (1): 71 - 77.
- Zhang Ling, Wang Yan-xiu, Gao Qing-hua, Duan Ke. 2017. The phylogeny, expression patterns of alkaline/neutral invertase genes (*Fa.A/N-Invs*) family and their influence on sugar accumulation in strawberry fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (6): 1049 - 1060. (in Chinese)
- 张 玲, 王延秀, 高清华, 段 可. 2017. 蔗糖转化酶家族基因进化、表达及对草莓果实糖分积累的影响. *园艺学报*, 44 (6): 1049 - 1060.
- Zhao C, Hua L N, Liu X F, Li Y Z, Shen Y Y, Guo J X. 2017. Sucrose synthase *FaSSI* plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Growth Regulation*, 81 (1): 1 - 7.
- Zhao Zhiz-hong, Zhang Shan-glong, Xu Chang-jie, Chen Kun-song, Liu Shuan-tao. 2001. Roles of sucrose-metabolizing enzymes in accumulation of sugars in Satsuma Mand arin fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (2): 112 - 118. (in Chinese)
- 赵智中, 张上隆, 徐昌杰, 陈昆松, 刘拴桃. 2001. 蔗糖代谢相关酶在温州蜜柑果实糖积累中的作用. *园艺学报*, 28 (2): 112 - 118.
- Zhu X, Wang M, Li X, Jiu S, Wang C, Fang J. 2017. Genome-wide analysis of the sucrose synthase gene family in grape (*Vitis vinifera*): structure, evolution, and expression profiles. *Genes*, 8 (4): 111.