

# 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

张 玲<sup>1,2</sup>, 王延秀<sup>1,\*</sup>, 高清华<sup>2</sup>, 段 可<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070; <sup>2</sup>上海市农业科学院林木果树研究所, 上海 201403)

**摘 要:** 在草莓蔗糖碱性/中性转化酶家族基因 (*Fa.A/N-Inv*) 成员序列分析的基础上, 以‘申阳’和‘红颜’草莓为材料, 利用实时定量 PCR 技术分析了 *Fa.A/N-Inv* 家族基因在不同条件下的表达模式, 利用分光光度法测定了果实发育过程中 A/N-Inv 酶活性, 利用高效液相色谱法分析了果实发育阶段糖分积累规律。结果表明: (1) *Fa.A/N-Inv* 是由 8 个成员组成的多基因家族; (2) 4 个 *Fa.A/N-Invs* 不仅具有组织特异性, 还具有果实发育阶段特异性和品种特异性表达特点; (3) 4 个 *Fa.A/N-Invs* 的表达受细胞分裂素(BA)、赤霉素 (GA) 和生长素 (IAA) 诱导; (4) 蔗糖和葡萄糖作为 A/N-Inv 酶促反应的底物和产物, 分别对 4 个 *Fa.A/N-Invs* 转录表达起正、负反馈调节作用, 此外蔗糖还可作为一种信号分子诱导 *Fa.A/N-Invs* 表达; (5) ‘申阳’草莓 A/N-Inv 酶活性在绿果阶段低于‘红颜’, 其余阶段均高于‘红颜’; (6) 成熟果实中蔗糖含量‘红颜’ (50.7 mg·g<sup>-1</sup>FW) 约为‘申阳’ (23.2 mg·g<sup>-1</sup>FW) 的 2 倍。

**关键词:** 草莓; 蔗糖碱性/中性转化酶; 糖信号; 酶活性

**中图分类号:** S 668.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 06-1049-12

## The Phylogeny, Expression Patterns of Alkaline/Neutral Invertase Genes (*Fa.A/N-Invs*) Family and Their Influence on Sugar Accumulation in Strawberry Fruit

ZHANG Ling<sup>1,2</sup>, WANG Yanxiu<sup>1,\*</sup>, GAO Qinghua<sup>2</sup>, and DUAN Ke<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticultural Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; <sup>2</sup>Forest and Fruit Tree Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

**Abstract:** On the basis of gene sequence analysis of the strawberry alkaline/neutral invertase gene family (*Fa.A/N-Inv*), strawberry cultivars ‘Shen Yang’ and ‘Benihoppe’ were employed as materials. The expression patterns of *Fa.A/N-Inv* genes under different conditions were analyzed by qRT-PCR. The dynamic enzyme activity of A/N-Inv and the sugar accumulation during fruit development stages were determined by spectrophotography and high-performance liquid chromatography (HPLC), respectively. Eight members of alkaline/neutral invertases were identified in the strawberry genome. The expression patterns of 4 *Fa.A/N-Inv* genes are tissue-, developmental stage-, and genotype-specific. The expression of

**收稿日期:** 2017-01-09; **修回日期:** 2017-05-08

**基金项目:** 上海市农业基础性研究项目[沪农科攻字(2014)第7-2-2号]; 上海市科委基础研究重点项目(14JC1405400); 上海市科委农业科技重点攻关项目(16391901400)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangxy@gsau.edu.cn; duanke@saas.sh.cn)

4 *Fa.A/N-Invs* was differentially induced by cytokinin (BA), gibberellic acid (GA) and auxin (IAA). Sucrose and glucose, as substrate and product of A/N-Inv, hold positive and negative feedback regulation on expression of the 4 genes, respectively. Besides, as a signal molecule, sucrose could induce the expression of *Fa.A/N-Inv* genes. The enzyme activity of A/N-Inv in 'Shen Yang' was higher than that in 'Benihoppe' fruits of all stages except for the green fruit. The content of sucrose in ripe 'Benihoppe' fruit ( $50.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ) was double of that in 'Shen Yang' fruit ( $23.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ).

**Keywords:** strawberry; alkaline/neutral invertase; sugar signal; enzyme activity

高等植物中蔗糖是光合产物从“源器官”运输到“库器官”的主要形式(潘瑞炽, 2001; Patrick et al., 2013), 蔗糖在库器官中裂解为果糖和葡萄糖, 参与不同代谢途径以维持植物生长发育(Kennedy & Garrison, 1975)。蔗糖合成酶(sucrose synthase, SS, EC.2.4.1.13)和蔗糖转化酶(invertase, INV, EC.3.2.1.26)催化蔗糖裂解, 其中蔗糖转化酶不可逆地催化蔗糖裂解为果糖和葡萄糖。依据亚细胞定位和最适 pH, 转化酶分为酸性细胞壁转化酶(cell wall invertase, CWIN)和酸性液泡转化酶(vacuolar invertase, VIN), 最适 pH 4.5 ~ 5.5; 碱性/中性转化酶(alkaline/neutral invertase, A/N-Inv), 最适 pH 6.8 ~ 8.0 (Sturm, 1999; Vargas et al., 2003; Liu et al., 2015)。高媛媛等(2009)在番茄叶片中克隆到一个碱性/中性转化酶基因, 该基因在花蕾、花、果实中均有表达, 说明其可能参与花蕾糖分代谢为生殖生长提供碳源。牛俊奇等(2014)从甘蔗叶片中分离得到 *SoNINI*, 该基因表达模式具有组织特异性并且响应 PEG 和 NaCl 胁迫诱导。Qian 等(2016)、钱文俊等(2016)在茶树中发现 8 个碱性/中性转化酶基因, *CsINVs* 在根、茎、叶、花中特异表达, 并响应 PEG、NaCl 和 ABA 处理, 说明 *CsINVs* 在调控生长发育, 响应非生物胁迫方面发挥重要作用。Dahro 等(2016)在枳中分离得到 *PtrA/NINV*, 该基因表达受蔗糖、高盐、寒冷、干旱和 ABA 诱导, 受果糖抑制。其超表达植株通过降低氧化损伤、减少失水率、提高光合速率获得抗旱、抗盐、耐低温等能力。Liu 等(2015)在橡胶中克隆到 3 个碱性/中性转化酶基因, 发现 *HbNIN2* 具有 A/N-Inv 基因功能, 其动力特征与蔗糖浓度正相关, 与果糖、葡萄糖浓度负相关。以上研究表明: A/N-Inv 可参与植物能量代谢、生长发育, 维持碳水化合物平衡, 响应生物及非生物胁迫等。

草莓成熟果实的糖分以蔗糖为主。转化酶活性降低是蔗糖积累的必要条件, 甘蔗叶片中酸性转化酶(AI)活性随甘蔗成熟而降低(牛俊奇等, 2014), 在草莓果实中, A/N-Inv 活性在果实发育初期逐渐下降至最低并保持不变直至果实成熟(Chen et al., 2007)。但是, 关于草莓碱性/中性转化酶基因 *Fa.A/N-Inv* 的研究鲜有报道。本研究中初步探索了 *Fa.A/N-Inv* 基因家族的亲缘进化关系, 利用 qRT-PCR 技术分析了 *Fa.A/N-Inv* 基因组织特异性表达模式、果实发育时期表达模式及其对多种外源激素和外源糖的响应, 旨在为深入研究草莓碱性/中性蔗糖转化酶基因功能奠定理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 植物材料

以种植在上海农业科学院庄行试验站塑料大棚中生长状况良好的草莓 (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne) 品种 '申阳' 和 '红颜' 为试验材料。

## 1.2 *Fa.A/N-Invs* 表达分析

2016年3月, 采集‘申阳’和‘红颜’草莓根、茎尖、成熟叶、花、果、种子及茎尖脱分化形成的愈伤组织, 液氮速冻, 保存于超低温冰箱中备用。参照Fait等(2008)的方法, 将果实分为4个时期: 绿果期(果实绿色、瘦果紧密聚合); 白果期(果实白色, 膨大、瘦果不再紧密聚合); 转色期(果实着色面积达25%~50%); 成熟期(果实完全着色成熟)。采集草莓不同发育阶段的果实, 液氮速冻, 保存于超低温冰箱中备用。利用荧光定量技术(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析*Fa.A/N-Invs*在各样品中的表达情况。植物RNA提取试剂盒购于北京原平皓生物技术有限公司, 反转录试剂盒购于TaKaRa公司, SYBR Green I 荧光染料购于索莱宝公司, 引物(表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以草莓的延伸因子*FaEF1a*为内参基因, 荧光定量反应体系为 $10\times$  Taq Buffer 2  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 0.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )各0.1  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  SYBR Green I 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNAs 1  $\mu\text{L}$ , 加水至终体积20  $\mu\text{L}$ , 充分混匀。用罗氏480实时定量PCR仪进行PCR扩增, 反应程序为94  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 40个循环; 熔解曲线分析。每个处理设3个生物学重复, 3个技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法(Livak & Schmittgen, 2001)分析结果, 用SPSS19.0软件分析数据差异显著性。

表1 qRT-PCR 特异性引物  
Table 1 Specific primers used for quantitative RT-PCR

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence	扩增长度/bp Amplicon
<i>FaEF1a</i>	F: TGGATTTGAGGGTGACAACATGA R: GTATACATCCTGAAGTGGTAGACGGAGG	145
<i>Fa.A/N-Inv B</i>	F: ACAGCTCATTACGTGTTTGC R: CTCCAGAAGGAAGACGAAG	231
<i>Fa.A/N-Inv E</i>	F: CGCATATCTCAAGATAAGTGG R: ACGTTTCTTCTCGGGTTAG	222
<i>Fa.A/N-Inv A</i>	F: AGTTCACATTGGCATGCATC R: CACCTCTGGAGCACTTTTTC	303
<i>Fa.A/N-Inv C</i>	F: TTCTATAGATCATTTGGCCTG R: CTAGACCTGAATCTGAGAC	244

## 1.3 圆片孵育试验

参考贾海锋(2013)、韩瑜(2015)的方法选取生长一致的‘红颜’草莓绿果, 首先把果实种子去除干净, 用直径1 cm的打孔器取果肉, 用干净的手术刀片将柱状果肉迅速切成1 mm厚的薄片, 分别进行不同处理, 即在平衡液中分别加入50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>葡萄糖, 蔗糖和松二糖, 以及50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 生长素、赤霉素和细胞分裂素, 对照为平衡液(50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MES, pH 5.5, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>)中加入相同浓度DMSO。每个处理分别温育0、0.5、1、2、4和8 h时迅速吸干表面水分, 用液氮速冻-70  $^{\circ}\text{C}$ 存放备用。

## 1.4 蔗糖中性转化酶活性测定

参照乔永旭等(2004)的方法并加改进。400  $\mu\text{L}$ 酶反应液中含80 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>醋酸一磷酸钾(pH 7.5), 100 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>蔗糖, 100  $\mu\text{L}$ 酶提取液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min, 立即加入490  $\mu\text{L}$  DNS试剂终止反应, 沸水浴5 min, 冷却后测定A<sub>540</sub>。对照反应中不含蔗糖。

## 1.5 可溶性糖含量测定

参照陈俊伟等(2001)的方法略做改动。取1~2 g草莓果肉组织, 液氮充分研磨后称取0.3 g粉末, 加入装有4 mL 80%乙醇的10 mL离心管中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴1~2 h, 平衡后4  $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>离心15 min, 取上清液保存于15 mL刻度离心管中; 乙醇重复提取2次, 合并上清液, 定容至10 mL。

然后取 2 mL 提取液置于真空离心浓缩仪 (ZLS-1, 中国赫西公司) 60 °C 旋转蒸干, 用 1.0 mL 超纯水定容, 10 000 r · min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 10 min, 收集上清液, 经 0.45 μm 水相滤膜过滤清除较大颗粒, 于高效液相色谱 (HPLC) 分析。可溶性糖测定的色谱条件, 流动相: 超纯水, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 液相色谱糖柱 (SP0810: 8 mm × 300 mm, 日本 shodex 公司); 示差检测器 (Waters 2414, 美国 Waters 公司)。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化酶基因进化树构建

利用拟南芥同源基因序列, 从蔷薇科基因组数据库网站 ([https://www.rosaceae.org/species/fragaria/fragaria\\_vesca/genome\\_v1.1](https://www.rosaceae.org/species/fragaria/fragaria_vesca/genome_v1.1)) 经 BLAST 分析, 筛选出 10 个转化酶基因, 其中酸性转化酶基因 2 个, 碱性/中性转化酶基因 8 个。为了分析草莓蔗糖转化酶 (invertase) 基因家族的进化特性, 结合番茄 (*Solanum lycopersicum*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、茶树 (*Camellia sinensis*)、甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 和枳 (*Poncirus trifoliata*) 蔗糖转化酶蛋白序列, 利用 ClustalX2 和 MEGA5, 采用 NJ 法构建了系统进化树 (图 1)。

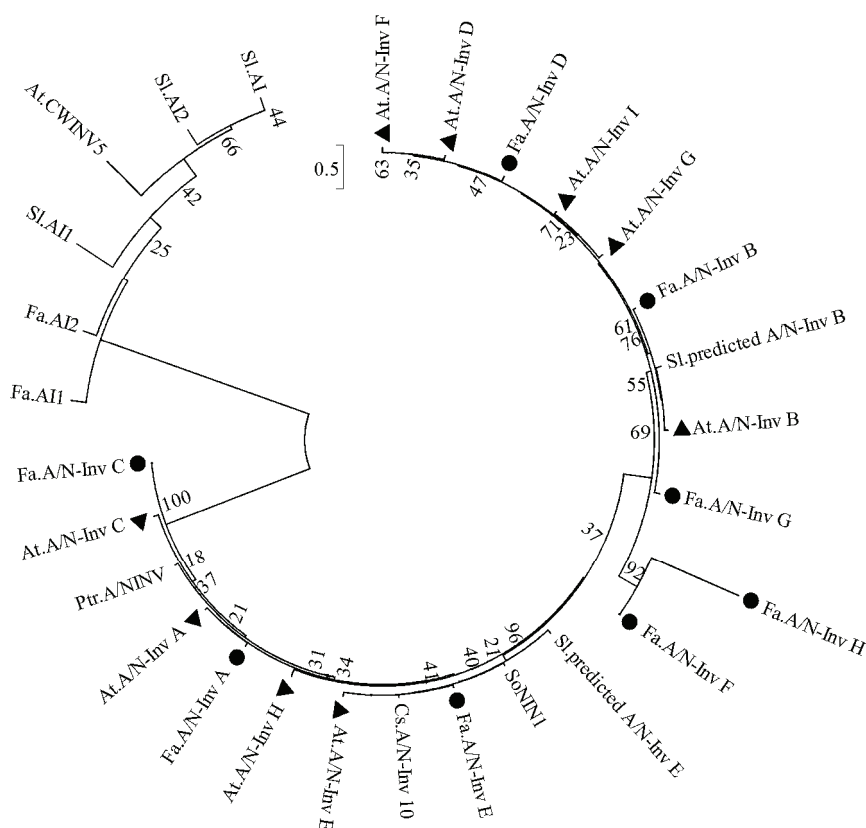


图 1 蔗糖转化酶系统进化分析

分支上的数值代表置信度, 线条长度表示进化距离。

Fig. 1 Phylogenetic analysis of invertases from *Fragaria × ananassa* (Fa), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Saccharum officinarum* (So), *Poncirus trifoliata* (Pt) and *Camellia sinensis* (Cs)

Number shown at internal nodes indicate bootstrap value, and bar represents evolutionary distance.

蔗糖转化酶基因分为两个大亚群, 即酸性转化酶基因与碱性/中性转化酶基因。草莓 2 个酸性转化酶基因分布于酸性转化酶亚群; 碱性/中性转化酶基因聚为 2 个小亚群, *Fa.A/N-Inv A*、*Fa.A/N-Inv C*、*Fa.A/N-Inv E* 和 *Cs.A/N-Inv 10*、*At.A/N-Inv E*、*At.A/N-Inv H*、*At.A/N-Inv C*、*At.A/N-Inv A*、*Sl.predicted A/N-Inv E*、*So.NIN1*、*Ptr.A/NINV* 分布在一个小亚群上, *Fa.A/N-Inv B*、*Fa.A/N-Inv D*、*Fa.A/N-Inv F*、*Fa.A/N-Inv G*、*Fa.A/N-Inv H* 和 *At.A/N-Inv B*、*At.A/N-Inv F*、*At.A/N-Inv D*、*At.A/N-Inv G*、*At.A/N-Inv I*、*Sl.predicted A/N-Inv B* 聚为另一个小亚群。草莓中 8 个碱性/中性转化酶基因在进化树上的分布与拟南芥中碱性/中性转化酶分布类似, 这可能与基因功能分化、蛋白质亚细胞定位有关。

## 2.2 *Fa.A/N-Invs* 组织特异性表达

利用 qRT-PCR 分析, 在草莓各组织中均未检测到 *Fa.A/N-Inv D*、*Fa.A/N-Inv F*、*Fa.A/N-Inv G*、*Fa.A/N-Inv H* 的表达, 可能不表达或表达水平较低, 且细胞类型特异性较强。*Fa.A/N-Inv A*、*Fa.A/N-Inv B*、*Fa.A/N-Inv C*、*Fa.A/N-Inv E* 在‘红颜’和‘申阳’草莓各个组织中均有表达, 存在组织特异性差异 (图 2), *Fa.A/N-Invs* 在成熟叶片的表达量极显著高于其他组织, 在花、种子中次之, 根、茎、愈伤组织和花托 (果肉) 中较少。4 个基因相比, *Fa.A/N-Inv A* 在两个品种成熟叶片中的转录产物积累量增加最多。总体来讲, ‘申阳’草莓中 *Fa.A/N-Invs* 转录产物积累量高于‘红颜’草莓。

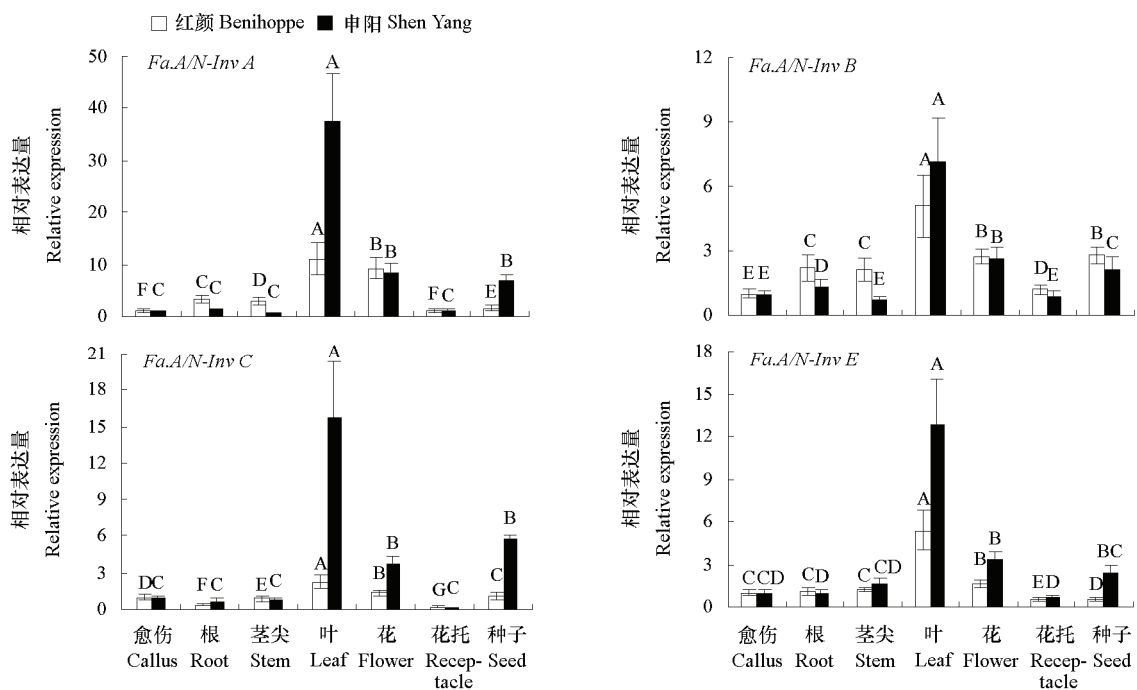


图 2 不同草莓品种 *Fa.A/N-Invs* 基因组织特异性表达模式

不同大写字母表示同一品种不同组织间差异达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

Fig. 2 The patterns of *Fa.A/N-Inv* genes expression in different tissues of 2 cultivars

The different capital letters were extremely significant differences in different organizations of the same cultivar ( $P < 0.01$ ).

## 2.3 *Fa.A/N-Invs* 在果实发育过程中的表达

‘红颜’和‘申阳’草莓多数 *Fa.A/N-Invs* 在果实发育过程中表达模式截然不同 (图 3)。随着果

实发育, ‘红颜’中4个基因从白果期开始都显著下降,后期基本不变。‘申阳’中仅 *Fa.A/N-Inv C* 表达模式与‘红颜’类似;‘申阳’从绿果期到白果期 *Fa.A/N-Inv A*、*Fa.A/N-Inv B* 与 *Fa.A/N-Inv E* 表达量差异不显著, *Fa.A/N-Inv B* 显著下降;从白果期到转色期 *Fa.A/N-Inv A*、*Fa.A/N-Inv B* 与 *Fa.A/N-Inv E* 表达量差异不显著, *Fa.A/N-Inv B* 的转录产物积累量显著上升。说明草莓碱性/中性转化酶在转录水平的调控不仅存在于不同的组织间,而且存在于同一组织的不同发育阶段。

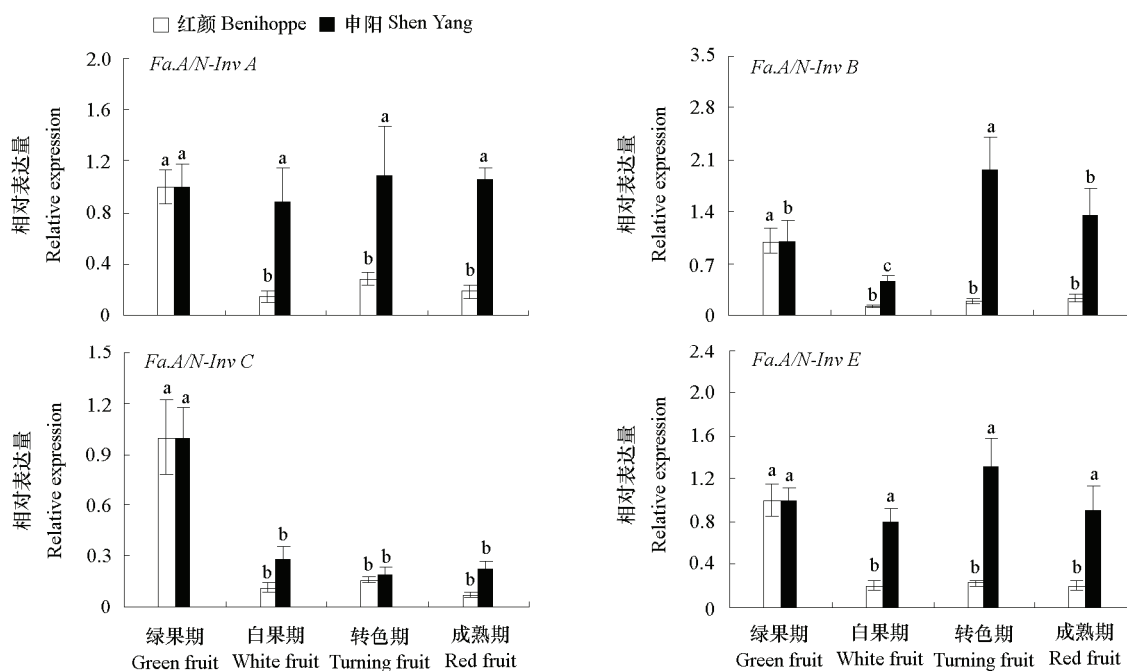


图3 不同草莓品种果实发育阶段 *Fa.A/N-Inv* 基因表达模式

不同小写字母表示同一品种不同阶段间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 3 The patterns of *Fa.A/N-Inv* genes expression during the development of fruits from two cultivars.

The different litter letters were significant differences in different stages of the same cultivar ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 *Fa.A/N-Invs* 对赤霉素、细胞分裂素和生长素的响应

取‘红颜’草莓胚成熟阶段绿果、去除种子的果实圆片,分析果实圆片分别在含有3种植物生长调节剂的平衡液处理后蔗糖中性转化酶家族基因转录水平上的早期响应(图4)。对照处理显示 *Fa.A/N-Invs* 转录产物积累有不同的波动, *Fa.A/N-Inv A* 转录水平受细胞分裂素(BA)诱导,从1 h开始到处理8 h一直被诱导;同时在早期受生长素(IAA)瞬时诱导(处理后2 h)和赤霉素(GA)瞬时诱导(处理后4 h)。 *Fa.A/N-Inv B* 受GA和BA瞬时诱导(处理4 h)。 *Fa.A/N-Inv C* 在生长素处理1 h和4 h后显著下降;并且迅速响应GA和BA处理。此外, *Fa.A/N-Inv E* 对3种植物生长调节剂处理均有显著响应。 *Fa.A/N-Invs* 可以响应生长素、赤霉素和细胞分裂素,说明该基因家族基因可能参与激素相关调节通路。

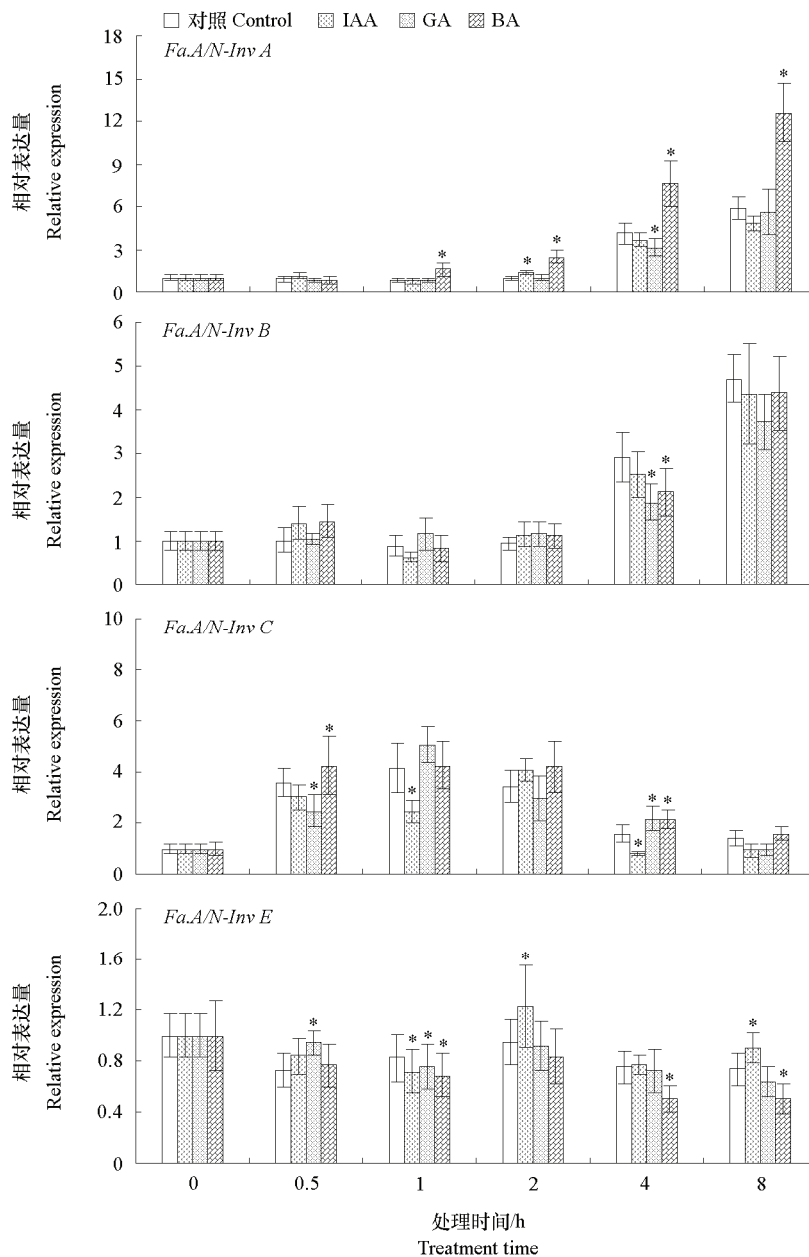


图 4 *Fa.A/N-Inv*s 对 IAA、GA 和 BA 处理响应的表达模式

柱上星号表示处理与对照间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 4 The patterns of *Fa.A/N-Inv* genes expression by IAA, GA and BA

The columns with \* were significantly differences between treatment and the control ( $P < 0.05$ ).

## 2.5 *Fa.A/N-Inv*s 对外源糖的响应

利用‘红颜’草莓果实圆片, 分析了蔗糖转化酶家族基因在转录水平对外源糖分的响应(图 5)。相比于对照处理, 在蔗糖处理下 *Fa.A/N-Inv A* 转录积累水平在 8 h 时显著上调; *Fa.A/N-Inv C* 与 *Fa.A/N-Inv E* 分别在 0.5 h 和 1 h 后瞬时上调; *Fa.A/N-Inv C* (处理后 2 h 和 8 h) 与 *Fa.A/N-Inv E* (处理后 2 h) 显著下调。在蔗糖类似物松二糖(模拟蔗糖功能, 本身不会被代谢掉)的处理下, *Fa.A/N-Inv*

*A*、*Fa.A/N-Inv B* 和 *Fa.A/N-Inv C* 分别在 1、4 和 4 h 瞬时显著上调, *Fa.A/N-Inv E* 迅速下调(处理 1 h), 说明蔗糖既可作为酶反应底物, 又可作为糖信号分子调控 *Fa.A/N-Invs* 基因表达。葡萄糖处理 8 h 后 *Fa.A/N-Invs* 瞬时显著下降, *Fa.A/N-Inv C* 与 *Fa.A/N-Inv E* 在 0.5 h 后瞬时上调。综上所述, 糖分可调节 *Fa.A/N-Invs* 家族基因表达, 以 *Fa.A/N-Inv E* 转录水平对不同糖分和糖信号分子响应最敏感。

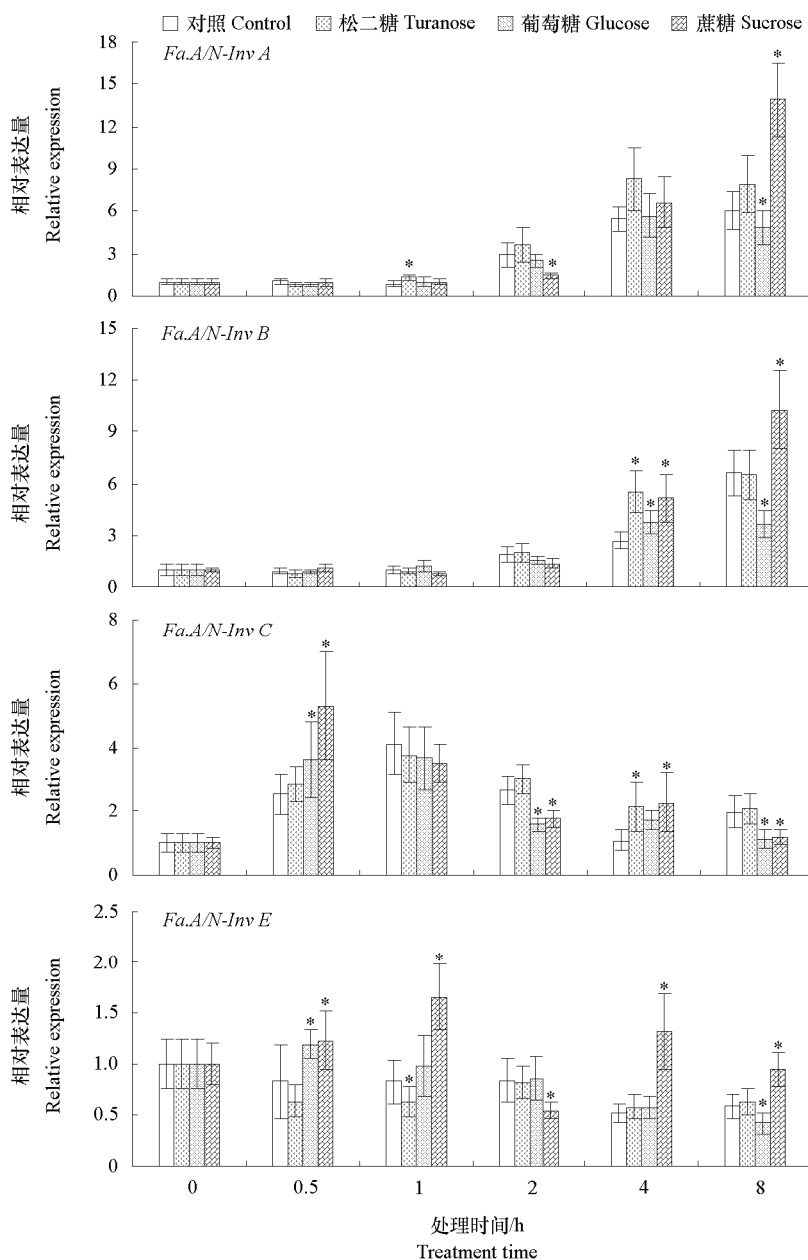


图 5 *Fa.A/N-Invs* 对外源糖响应的表达模式

柱上星号表示处理与对照间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 The patterns of *Fa.A/N-Inv* genes expression by exogenous sugars

The columns with \* were significantly differences between treatment and the control ( $P < 0.05$ ).



## 2.6 果实发育过程中蔗糖碱性/中性转化酶活性变化

‘红颜’草莓绿果期至白果期 A/N-Inv 活性迅速下降, 果实发育后期 A/N-Inv 活性缓慢下降(表 2)。  
‘申阳’草莓 A/N-Inv 活性从绿果期至白果期迅速增强, 随后急剧下降。

表 2 草莓果实发育阶段碱性/中性转化酶活性变化

材料	绿果期	白果期	转色期	成熟期
Material	Green fruit	White fruit	Turning fruit	Red fruit
红颜 Benihoppe	3.666 ± 0.267	1.232 ± 0.115	0.934 ± 0.070	0.717 ± 0.081
申阳 Shen Yang	2.238 ± 0.214	3.012 ± 0.050	1.822 ± 0.712	0.859 ± 0.055

## 2.7 果实发育过程中可溶性糖的积累

如图 6 所示两个草莓品种果实中糖分以蔗糖为主, 还有葡萄糖和果糖。葡萄糖和果糖都呈现缓慢增加的趋势, 且在果实成熟阶段的含量也很接近。两个品种蔗糖积累动态不同, 从白果期开始‘红颜’草莓中蔗糖迅速积累, 而‘申阳’中积累缓慢, 成熟果实中‘红颜’蔗糖含量(50.7 mg · g<sup>-1</sup> FW) 约为‘申阳’(23.2 mg · g<sup>-1</sup> FW) 的 2 倍。

草莓果实发育过程中蔗糖积累与碱性/中性转化酶活性两个品种均呈显著负相关(‘红颜’  $r = -0.833$ ; ‘申阳’  $r = -0.754$ )。

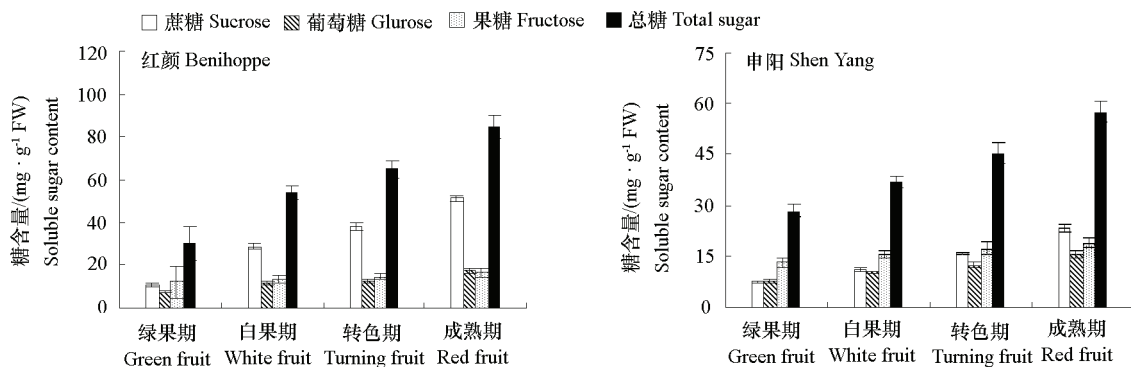


图 6 草莓果实发育过程中可溶性糖积累

Fig. 6 The accumulation of soluble sugar during the development of strawberry fruit

## 3 讨论

蔗糖碱性/中性转化酶不可逆地分解蔗糖为果糖和葡萄糖, 而从维持细胞渗透压, 这在多种发育和响应过程起重要作用 (Valluru & van den Ende, 2008)。前人研究表明, A/N-Inv 是一个多基因家族, 且不同物种中基因成员数不同。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 中有 9 个成员, 杨树 (*Populus trichocarpa*) 中有 16 个成员, 水稻 (*Oryza sativa*) 中有 8 个 (Nonis et al., 2008)。研究表明细胞中蔗糖转化酶作用不同分布位点不同 (俞鏗 等, 2013)。本研究中发现草莓碱性/中性转化酶基因由 8 个成员组成, 但在检测分析的所有草莓样品中, 仅检测到 4 个成员的转录产物积累,

即 *Fa.A/N-Inv A*、*Fa.A/N-Inv B*、*Fa.A/N-Inv C* 和 *Fa.A/N-Inv E*。

拟南芥蔗糖碱性/中性转化酶基因 (*AtCYT-INV1*) 通过调控细胞内己糖浓度参与渗透胁迫下诱导的侧根生长过程 (Qi et al., 2007); 百脉根和水稻蔗糖碱性/中性转化酶基因 (*LjINV1*, *OsCYT-INV1*) 突变后, 植株根部和地上部严重缩小, 花粉形成异常, 开花受阻 (Jia et al., 2008; Welham et al., 2009), 说明植物蔗糖碱性/中性转化酶在植物形态建成和生长发育过程中发挥关键作用。本研究中发现 4 个 *Fa.A/N-Inv* 基因在草莓成熟叶片中表达量最高, 其次为花和种子, 根、茎、愈伤组织和果肉中表达量较低, 表明这些基因可能参与多种生命过程。叶片作为主要的光合器官产生蔗糖, 叶片中较高碱性/中性转化酶活性可充分水解蔗糖产生葡萄糖和果糖参与草莓形态建成和生长发育。研究表明葡萄糖通过抑制 microRNA156 的表达促进拟南芥由童期向成年期转变 (Li et al., 2013), 草莓花和种子中 *Fa.A/N-Inv* 表达量较高, 推测该基因可能参与蔗糖水解, 对花和种子发育有作用, 而种子在花托上分布情况进一步影响草莓果实形态, 因此该类基因参与草莓花果发育过程。

蔗糖碱性/中性转化酶不仅参与调控了植物细胞的生长发育, 还影响果实品质。在蜜橘、甜瓜和柠檬果实发育过程中, 蔗糖中性转化酶活性逐渐降低至检测限之下, 蔗糖才开始迅速积累 (赵智中, 2001; 赵智中等, 2001; 刘永忠和李道高, 2003; 乔永旭等, 2003)。本研究中发现, 草莓果实中 A/N-Inv 活性变化与 *Fa.A/N-Invs* 表达模式相似, 说明 A/N-Inv 活性受碱性/中性转化酶基因调控; 不同草莓品种果实糖分含量不同, 但糖分积累规律大体相似, 随着果实发育糖分逐渐积累, 成熟果实糖分都以蔗糖为主, ‘申阳’草莓果实在成熟期蔗糖迅速增加; ‘红颜’草莓中蔗糖自白果期开始就迅速积累, 且果实发育过程中蔗糖积累与 A/N-Inv 活性呈显著负相关。说明随着果实发育, *Fa.A/N-Invs* 编码蛋白通过调控蔗糖分解, 从而影响果实糖分积累, 影响果实品质。

前人研究表明, 植物激素不仅能调控植物组织分化、生长发育还能调控蔗糖转化酶基因的表达; 如番茄中生长素 (IAA) 调控 *Lin5* 的表达 (Proels et al., 2003, 2006), 赤霉素 (GA) 调控 CWIN 基因 *Lin7* 的表达 (Proels et al., 2006); 烟草中 CWIN 的活性影响细胞分裂素 (CTK) 介导相关生理反应 (Lara et al., 2004)。本研究的结果表明, *Fa.A/N-Invs* 能响应生长素、赤霉素和细胞分裂素, 可能在激素相关通路发挥作用。

糖分既是能源物质也是重要的信号分子, 其通过糖感知和糖信号转导调节植物新陈代谢、生长发育、胁迫响应和基因表达 (Jang & Sheen, 1994; Rolland et al., 2002; 王玉华等, 2004; Tauzin & Giardina, 2014)。本研究的结果表明, *Fa.A/N-Invs* 瞬时响应蔗糖诱导, 转录产物积累显著上调; 葡萄糖处理后, *Fa.A/N-Invs* 对其响应较为缓慢, 转录积累呈下调趋势, 处理 8 h 后表达量显著下调。蔗糖和葡萄糖在蔗糖碱性/中性转化酶反应中, 作为该酶促反应的底物和产物, 分别起促进和反馈抑制作用。能够模拟蔗糖功能而本身不会被代谢掉的蔗糖类似物松二糖也能诱导蔗糖碱性/中性转化酶差异表达, 说明蔗糖对该基因家族起的调控作用不仅因为它可以作为酶促反应的底物, 它还可以作为一种信号分子诱导糖碱性/中性转化酶基因表达。

本研究中对草莓碱性/中性转化酶基因家族进化和表达分析基础上, 结合酶活性分析和糖分含量分析, 初步探索了该家族基因的转录表达特性和酶活性以及与果实蔗糖积累之间的联系。研究表明两草莓品种可溶性糖积累差异主要由蔗糖引起, ‘红颜’自白果期开始蔗糖含量迅速增加, ‘申阳’果实蔗糖积累缓慢, 果实成熟时 ‘红颜’果实蔗糖含量约为 ‘申阳’果实的 2 倍。两草莓品种碱性/中性转化酶活性随着果实发育显著下降和基因表达模式吻合, 都与果实蔗糖含量负相关, 说明草莓果实中转化酶家族基因的转录水平调控是很重要的调控方式。本研究中还分析了该基因家族对赤霉素、生长素、细胞分裂素和外源糖的响应模式, 为进一步的功能研究奠定了基础。

## References

- Chen Jun-wei, Qin Qiao-ping, Xie Ming, Jiang Gui-hua, Xu Hong-xia, Cheng Jian-hui, Wu Jiang, Sun Chong-bo. 2007. Characteristics of sucrose and hexose metabolism in relation to sugar accumulation in developing strawberry fruit. *Journal of Fruit Science*, 24 (1): 49 - 54.
- Chen Jun-wei, Zhang Shang-long, Zhang Liang-cheng, Xu Chang-jie, Chen Kun-song. 2001. Characteristics of photosynthate translocation and partitioning and sugar accumulation in developing satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 27 (2): 86 - 192. (in Chinese)
- 陈俊伟, 张上隆, 张良诚, 徐昌杰, 陈昆松. 2001. 温州蜜柑果实发育进程中光合产物运输分配及糖积累特性. *植物生理学报*, 27 (2): 86 - 192.
- Dahro B, Wang Fei, Peng Ting, Liu Ji-hong. 2016. PtrA/NINV, an alkaline/neutral invertase gene of *Poncirus trifoliata*, confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses by modulating ROS levels and maintaining photosynthetic efficiency. *BMC Plant Biology*, 16: 76 - 94.
- Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, Dai N, Rogachev I, Nikiforova V J, Fernie A R, Aharoni A. 2008. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiology*, 148: 730 - 750.
- Gao Yuan-yuan, Yang Yu-wen, Zhang Bao-long, Ni Wan-chao. 2009. Silicon cloning and analysis of neutral/alkaline invertase gene and construction of expression vector in *Solanum lycopersicum*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 104: 1002 - 1302. (in Chinese)
- 高媛媛, 杨郁文, 张保龙, 倪万潮. 2009. 番茄中性/碱性蔗糖转化酶基因的电子克隆、分析及表达载体的构建. *江苏农业科学*, 104: 1002 - 1302.
- Han Yu. 2015. The function and mechanism analysis of FaSnRK2.6/FaMPK3 signaling system during fruit development and ripening [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 韩瑜. 2015. FaSnRK2.6/FaMPK3 信号系统在草莓果实发育和成熟中的作用及机理分析 [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学.
- Jang J C, Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell*, 6: 1665 - 1679.
- Jia Hai-feng. 2013. Roles and mechanisms of sucrose and jasmonic acid signals in the regulation of strawberry fruit development [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 贾海峰. 2013. 蔗糖及茉莉酸信号在草莓果实发育中的作用及其机理分析 [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学.
- Jia Li-qiang, Zhang Bo-tao, Mao Chuan-zao, Li Jinhui, Wu Yun-rong, Wu Ping, Wu Zhong-chang. 2008. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 228: 51 - 59.
- Kennedy W J, Garrison R E. 1975. Sugar input, metabolism and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, 3 (6): 942 - 955.
- Lara M E B, Gonzalez M, Fatima T, Roitsch T. 2004. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell*, 16 (5): 1276 - 1287.
- Li Yang, Xu Ming-li, Koo Yeonjong, He Jia, Poethig R S. 2013. Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife*, doi: 10.7554/eLife.00260.
- Liu Shu-jin, Lan Ji-xian, Zhou Bin-hui, Qin Yun-xia, Zhou Yi-hua, Xiao Xiao-hu, Yang Jiang-hua, Gou Ji-qing, Qi Ji-yan, Huang Ya-cheng, Tang Chao-rong. 2015. HbNIN2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *New Phytologist*, 206: 709 - 725.
- Liu Yong-zhong, Li Dao-gao. 2003. Sugar accumulation and changes of sucrose-metabolizing enzyme activities in citrus fruit. *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.
- 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: 402 - 408.
- Niu Jun-qi, Wang Ai-qin, Huang Jing-li, Yang Li-tao, Li Yang-rui. 2014. Cloning and expression analysis of sugarcane alkaline/neutral invertase gene SoNIN1. *Acta Agronomica Sinica*, 40 (2): 253 - 263. (in Chinese)
- 牛俊奇, 王爱勤, 黄静丽, 杨丽涛, 李杨瑞. 2014. 甘蔗中性/碱性转化酶基因 SoNIN1 的克隆和表达分析. *作物学报*, 40 (2): 253 - 263.
- Nonis A, Ruperti B, Pierasco A, Canaguier A, Adam-Blondon A F, Gaspero G D, Vizzotto G. 2008. Neutral invertases in grapevine and comparative analysis with *Arabidopsis*, poplar and rice. *Planta*, 229: 129 - 142.

- Pan Rui-chi. 2001. Transport of organic matters in plant//Plant physiology. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 潘瑞炽. 2001. 植物体内有机物的运输//植物生理学. 北京: 高等教育出版社.
- Patrick J W, Botha F C, Birch R G. 2013. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 11: 142 - 156.
- Proels R K, González M., Roitsch T. 2006. Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular invertase Lin7 is required for pollen development. *Functional Plant Biology*, 33 (6): 547 - 554.
- Proels R K, Hause B, Berger S, Roitsch T. 2003. Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues. *Plant Mol Biol*, 52 (1): 191 - 201.
- Qi Xiao-peng, Wu Zhong-chang, Li Jin-hui, Mo Xiao-rong, Wu Shi-hua, Chu Jun, Wu Ping. 2007. AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress induced inhibition on lateral root growth in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 64: 575 - 587.
- Qian Wen-jun, Yue Chuan, Cao Hong-li, Hao Xin-yuan, Wang Lu, Wang Yu-chun, Huang Yu-ting, Wang Bo, Wang Xin-chao, Xiao Bin, Yang Ya-jun. 2016. Identification of the invertase gene family (INVs) in tea plant and their expression analysis under abiotic stress. *Plant Cell Rep*, 35: 2269 - 2283.
- Qian Wen-jun, Yue Chuan, Cao Hong-li, Hao Xin-yuan, Wang Lu, Wang Yu-chun, Huang Yu-ting, Wang Bo, Wang Xin-chao, Xiao Bin, Yang Ya-jun. 2016. Cloning and expression analysis of a neutral/alkaline invertase gene (*CsINV10*) in tea plant (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze). *Acta Agronomica Sinica*, 42 (3): 376 - 388. (in Chinese)
- 钱文俊, 岳川, 曹红利, 郝心愿, 王璐, 王玉春, 黄玉婷, 王博, 王新超, 肖斌, 杨亚军. 2016. 茶树中性/碱性转化酶基因 *CsINV10* 的克隆与表达分析. *作物学报*, 42 (3): 376 - 388.
- Qiao Yong-xu, Liu Shuan-tao, Zhao Zhi-zhong, Xing Guo-ming, He Qi-wei. 2004. Study on the correlation of sugar accumulation and sucrose-metabolizing enzymes during the developing period of muskmelon (*Cucumis melon*). *Journal of Fruit Science*, 21 (5): 447 - 450. (in Chinese)
- 乔永旭, 刘拴桃, 赵智中, 邢国明, 何启伟. 2004. 甜瓜果实发育过程中糖积累与蔗糖代谢相关酶的关系. *果树学报*, 21 (5): 447 - 450.
- Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14: 185 - 205.
- Sturm A. 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, 121: 1 - 7.
- Tauzin A, Giardina T. 2014. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 5: 293.
- Valluru R, van den Ende W. 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, 59 (11): 2905 - 2916.
- Vargas W, Cumino A, Salerno G L. 2003. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta*, 216: 951 - 960.
- Wang Yu-hua, Yang Qing, Chen Min. 2004. Sugar sensing and signaling in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 21 (3): 273 - 279. (in Chinese)
- 王玉华, 杨清, 陈敏. 2004. 植物糖感知和糖信号传导. *植物学通报*, 21 (3): 273 - 279.
- Welham T, Pike J, Horst I, Flegel E, Katinakis P, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Perr J, Pamiske M, Trevor L. 2009. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (12): 3353 - 3365.
- Yu Ke, Li Zhi-miao, Wan Hong-jian, Ye Qing-jing, Wang Rong-qing, Yang Yue-jian. 2013. Research advances on the function of invertase in higher plants. *Anhui Agri Sci*, 41 (33): 12815 - 12818, 12822. (in Chinese)
- 俞轲, 李志邈, 万红建, 叶青静, 王荣青, 杨悦俭. 2013. 高等植物蔗糖转化酶功能的研究进展. *安徽农业科学*, 41 (33): 12815 - 12818, 12822.
- Zhao Zhi-zhong. 2001. Studies on physiological mechanism of sugar accumulation in citrus fruit [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 赵智中. 2001. 柑橘果实糖积累的生理基础研究 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Zhao Zhi-zhong, Zhang Shang-long, Xu Chang-jie, Chen Kun-song, Liu Shuan-tao. 2001. Roles of sucrose-metabolizing enzymes in accumulation of sugars in satsuma mandarin 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.