

柑橘磷酸蔗糖合酶基因 *CsSPS* 的鉴定和表达

魏清江, 马张正, 勒 思, 雷常玉, 马巧利, 辜青青*

(江西农业大学农学院, 南昌 330045)

摘 要: 为探索柑橘磷酸蔗糖合酶基因 (sucrose-phosphate synthase, SPS) 特性及其在果实发育和成熟过程中的表达, 从甜橙基因组中鉴定了 4 个 SPS 基因 (*CsSPS1* ~ *CsSPS4*)。它们分布在不同染色体上, 属于 3 个不同的亚家族, 均含有 SPS 家族的特征功能域。定量 PCR 分析表明 4 个 *CsSPS* 在所检测的组织中均有表达, 其中 *CsSPS4* 具有明显的果实特异性表达特点。进一步研究发现, *CsSPS3* 和 *CsSPS4* 在‘融安金柑’和‘滑皮金柑’果实发育过程中的表达量高于 *CsSPS1* 和 *CsSPS2*。此外 *CsSPS4* 在果皮和果肉中的表达量均随着果实发育迅速升高, 推测其在金柑果实蔗糖的合成和积累中起关键作用。

关键词: 柑橘; 磷酸蔗糖合酶; 序列分析; 基因表达

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 02-334-11

Identification and Expression Analysis of Sucrose-phosphate Synthase (SPS) Genes in Citrus

WEI Qingjiang, MA Zhangzheng, LE Si, LEI Changyu, MA Qiaoli, and GU Qingqing*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In order to explore the characteristics of citrus sucrose-phosphate synthase (SPS) genes and their expression patterns during fruit development and ripening, four SPS genes (*CsSPS1* - *CsSPS4*) were identified in sweet orange genome. *CsSPSs* are distributed on different chromosomes and can be classified into three subfamilies, which also contain functional domains common in SPS family. Quantitative PCR revealed that *CsSPSs* were expressed in all tested tissues, and *CsSPS4* preferentially expressed in fruit. Further study found that the expression levels of *CsSPS3* and *CsSPS4* in ‘Rongan’ and ‘Huapi’ kumquat were higher than those of *CsSPS1* and *CsSPS2* during the fruit development. In addition, the expression levels of *CsSPS4* in the peel and pulp of two kumquats increased sharply with fruit development, suggesting its key functions in regulating sucrose synthesis and accumulation in kumquat fruit.

Keywords: citrus; sucrose-phosphate synthase; sequence analysis; gene expression

磷酸蔗糖合酶 (sucrose-phosphate synthase, SPS) 催化尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 和果糖 - 6 - 磷酸 (F6P) 生成蔗糖 - 6 - 磷酸 (S6P), S6P 在蔗糖磷酸酯酶 (SPP) 作用下不可逆形成蔗糖 (Lunn, 2003)。研究表明, SPS 是植物蔗糖合成过程中的限速酶, 其活性与蔗糖积累呈正相关 (刘凌

收稿日期: 2019 - 11 - 12; **修回日期:** 2020 - 01 - 30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460496); 江西省重点研发计划重点项目 (20171ACF60025); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ160358)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qingqinggu2006@126.com)

霄 等, 2005; Patrick et al., 2013)。SPS 在蔗糖代谢中影响“源”强和“库”强, 调节光合产物在蔗糖和淀粉之间分配, 此外还参与细胞分化、纤维细胞壁合成和生物产量的形成 (Wang et al., 2013; 张莉 等, 2018)。因此鉴定和分析植物中的 SPS 基因对研究植物的生长发育和果实品质形成具有重要意义。

植物中的磷酸蔗糖合酶由多基因家族编码, 在不同物种中的成员数量不同。拟南芥、可可和荔枝中均存在 4 个 SPS 基因 (Langenkämper et al., 2002; 李付鹏 等, 2015; Wang et al., 2018), 水稻基因组中鉴定到 5 个 SPS 基因 (Okamura et al., 2011), 苹果和梨中有 8 个 (李会霞 等, 2017; 吕佳红 等, 2018)。尽管不同植物 SPS 基因数量有差别, 但其蛋白序列相对保守, 均含有一些特征结构域, 如蔗糖合成酶结构域 (Sucrose-synth)、糖基转移酶结构域 (Glycos-transf-1) 和蔗糖 - 6 - 磷酸磷酸水解酶结构域 (S6PP)。植物中 SPS 基因可以分成 A、B、C、D 等 4 个亚家族, 其中 D 亚家族为小麦和其他单子叶植物中所特有, 进一步分为 DIII 和 DIV 亚家族 (Langenkämper et al., 2002; Castleden et al., 2004)。此外, SPS 家族不同成员的表达特性和功能也不同。Chen 等 (2005) 的研究表明, 烟草 *NtSPSA* 在所有组织中表达, *NtSPSB* 在花药和子房等生殖器官中大量表达, 而 *NtSPSC* 主要在成熟叶片中表达, 并参与烟草夜间蔗糖的合成, 同时能够维持淀粉正常运输。水稻 SPS 基因, 尤其是 *OsSPS1* 偏好“源”器官中表达, 而 *OsSPS2*、*OsSPS6* 和 *OsSPS8* 在“源”和“库”器官中等量表达 (Okamura et al., 2011)。

金柑是柑橘类水果中的重要一类, 带皮食用, 偶有辛辣味, 果肉则酸甜可口。‘融安金柑’是广西重要的金柑品种, 其实生变异品种‘滑皮金柑’果皮油胞较少, 果实风味更佳。前期研究 (马张正 等, 2019) 发现‘融安金柑’和‘滑皮金柑’果实中积累的糖分以蔗糖为主, 且前者果皮和果肉中蔗糖含量均显著低于后者。研究表明 3 个 *CitSPS* 在温州蜜柑叶片、花和果实等组织中的表达量不同 (Komatsu et al., 1996, 1999)。金柑果实蔗糖积累的差异与 SPS 基因的关系尚不明确。为了解柑橘 SPS 家族成员特性及其在金柑果实蔗糖积累中的作用, 在全基因组水平对柑橘 SPS 基因进行鉴定和序列分析, 研究它们在蔗糖积累差异的两种金柑果实发育过程中的表达情况, 以期筛选与蔗糖代谢相关的 SPS 基因, 为进一步研究柑橘果实蔗糖积累的分子机制提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验材料为种植在广西省融安县长安镇江口村商业生产果园的金柑 (*Fortunella crassifolia* Swingle) 品种‘融安金柑’和‘滑皮金柑’。2018 年 7—12 月于花后 90、120、150、180 和 210 d 采集果实, 自来水冲洗干净, 果皮 (称量勺刮取黄皮层部分) 和果肉分离后立即用液氮冷冻, 于 - 80 °C 保存。每 10 个果实为 1 个生物学重复, 共 3 次重复。

1.2 柑橘 SPS 基因家族鉴定

以拟南芥基因组中已知的 4 个 SPS 基因 (At5g20280、At5g11110、At1g04920、At4g10120) 编码蛋白序列作为参考 (Langenkämper et al., 2002), 对甜橙基因组数据库 (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>) 进行比对搜索, 获得相似性高的序列。通过 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 和 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org>) 检测所获得序列的保守结构域, 将含有蔗糖合成酶结构域 (Sucrose-synth, PF00862)、糖基转移酶结构域 (Glycos-transf-1, PF00534) 和蔗糖 - 6 - 磷酸磷酸

水解酶结构域 (S6PP, PF05116) 的序列作为柑橘 SPS 基因家族候选序列。

1.3 生物信息分析

柑橘 SPS 蛋白分子量和等电点使用在线服务工具 ExPASy (<http://www.expasy.org/prosite/>) 进行预测; 多序列比对和一致性分析使用 ClustalW 进行, 将比对结果输入 MEGA6 软件进行分析, 并使用 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树。基因结构分析使用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 完成。通过 Meme-suite (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析蛋白的保守元件, 同时利用 InterProScan 网站 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 对元件进行注释。

1.4 基因表达分析

从甜橙基因组数据库中下载 RNA-seq 数据, 用于 CsSPS 在甜橙不同组织中的表达模式分析。这些组织包括愈伤组织、花、叶片和成熟果实, 以及 3 个发育时期果实的混合样品 (Mix.1, Mix.2 和 Mix.3)。

金桔果皮和果肉组织 RNA 的提取采用多糖多酚样本 RNA 提取试剂盒 (北京华越洋) 完成, 使用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa) 进行第 1 链 cDNA 合成。基因表达分析采用实时荧光定量 PCR (Real-time qPCR) 方法, 在 CFX96 touch PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司) 上完成。柑橘 SPS 引物设计利用 NCBI 在线引物比对程序 PrimerBlast 完成, 以 β -actin (Cs1g05000) 作为参考基因, 引物 (表 1) 由上海生工合成。基因扩增体系为: 5 μ L 2 \times TB Green Premix Ex TaqII (TaKaRa), 0.4 μ L 正向和反向引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 0.1 μ g cDNA 并补充 ddH₂O 至 10 μ L。PCR 反应程序如下: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min (40 个循环)。每个样品的 cDNA 扩增反应进行 3 个独立重复。基因的表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ ct} 方法计算。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Specific primer sequences used for quantitative RT-PCR

目的基因 Gene name	上游引物 (5' - 3') Upstream primer	下游引物 (5' - 3') Downstream primer
CsSPS1	AAATTGGTGGTGGGAAGCCA	CGGATAGAAGGGCAGCTGAG
CsSPS2	TATTTGTGCAGTCTTCATGGCTT	AACATACTTAACCTGACCCCTGT
CsSPS3	GGCCGAAACGAGTGGATAA	TGCCAAGTTCCTGGGGTTT
CsSPS4	CTTGAATGTGCCGATGGTGC	GAAGCCTGCCTTGTTCAGC
β -actin	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA	TTCTGTGGACAATGGATGGA

2 结果与分析

2.1 柑橘 SPS 基因家族的鉴定及其性质分析

通过对甜橙基因组数据搜索和鉴定筛选, 共获得 4 个 SPS 基因。根据其于拟南芥 SPS 基因的进化关系, 分别命名为 CsSPS1 ~ CsSPS4, 其中 CsSPS1、CsSPS2 和 CsSPS4 分别定位在甜橙第 4、7 和 5 号染色体上, 而 CsSPS3 的染色体位置未知 (表 2)。4 个基因编码蛋白的长度在 977 ~ 1 067 aa 之间, 预测分子量在 109.14 ~ 120.13 kD 之间, 等电点均呈酸性, 范围为 6.11 ~ 6.34。亚细胞定位预测表明 4 个 CsSPS 均定位在细胞质中。此外, CsSPS 蛋白之间的序列相似性较高 (49.8% ~ 70.3%), 且 CsSPS1 和 CsSPS2 蛋白相似性明显高于其他序列。

表 2 柑橘 SPS 家族基因的基本性质

Table 2 Physicochemical properties of *CsSPS* gene family in sweet orange

名称 Name	基因编号 Gene ID	蛋白长度/ aa Protein length	分子量/kD Molecular weight	等电点 Isoelectric point	亚细胞定位 Subcellular localization	染色体位置 Chromosome location	蛋白相似性/% Protein identit		
							SPS2	SPS3	SPS4
<i>CsSPS1</i>	Cs4g05380.1	1 057	117.98	6.11	细胞质 cytoplasm	chr4:3230764..3238129	70.3	57.1	54.1
<i>CsSPS2</i>	Cs7g05690.2	977	109.14	6.29	细胞质 cytoplasm	chr7:3079996..3085596	—	51.8	49.8
<i>CsSPS3</i>	orange1.1t03668.1	1 067	120.13	6.14	细胞质 cytoplasm	chrUn:56282363..562898	—	—	56.9
<i>CsSPS4</i>	Cs5g19060.1	1 024	115.03	6.34	细胞质 cytoplasm	chr5:19554125..195629	—	—	—

2.2 柑橘 SPS 家族基因的序列比对和进化分析

多序列比对 (图 1) 显示, 4 个 *CsSPS* 成员均含有 SPS 蛋白的特征序列和功能结构域, 即蔗糖合成酶结构域 (Sucrose-synth)、糖基转移酶结构域 (Glycos-transf-1) 和蔗糖 - 6 - 磷酸磷酸水解酶结构域 (S6PP)。植物 SPS 蛋白中存在 3 个磷酸化位点调节相关酶的活性, 其中 Ser-158 与昼夜节律相关, Ser-229 与 14-3-3 蛋白结合相关, 而 Ser-424 与渗透胁迫相关 (Castleden et al., 2004)。分析表明, 这 3 个磷酸化位点在 *CsPSP1* 和 *CsSPS2* 中高度保守, 而 *CsPSP3* 在 Ser-424 位点以及 *CsPSP4* 在 Ser-229 发生替换。

为了解 *CsSPS* 家族成员的进化关系, 将柑橘 4 个 *CsPSP* 序列与其他植物 SPS 序列构建系统进化树, 结果 (图 2) 表明植物中所有 SPS 可以被分成 4 个亚家族 (A、B、C 和 D)。其中, *CsPSP1* 和 *CsPSP2* 属于 A 亚家族, *CsPSP3* 和 *CsPSP4* 分别属于 B 亚家族和 C 亚家族。D 亚家族为单子叶植物所特有 (Castleden et al., 2004), 因此仅包括了甘蔗和水稻的部分 SPS 蛋白, 不含有柑橘、苹果和拟南芥的 SPS 家族成员。在各亚族中柑橘 *CsSPS* 蛋白与木本果树苹果 *MdSPS* 聚在同一分支中。

2.3 柑橘 SPS 家族的基因结构和保守元件分析

基因结构分析表明, 除长度差异外, *CsSPS* 家族成员包含的外显子数相近, 其中 *CsSPS1* 为 13 个, *CsSPS2* 和 *CsSPS3* 均为 12 个, *CsSPS4* 为 14 个 (图 3)。利用 MEME 软件在柑橘 SPS 蛋白中预测了 25 个保守元件 (Motif)。根据注释, Motif 1 ~ Motif 8 都是糖基转移酶蛋白, Motif 2 ~ Motif 4、Motif 6 和 Motif 8 是 SPS 相关蛋白。大多数 Motif 在 4 个 *CsSPS* 蛋白中同时存在, 但是 *CsSPS2* 缺少 Motif 12 和 Motif 18, Motif 22 只在 A 亚家族的 *CsSPS1* 和 *CsSPS2* 蛋白中存在 (图 4)。

2.4 柑橘 *CsSPS* 基因的表达分析

2.4.1 组织特异性表达

利用甜橙基因组数据分析 *CsSPS* 在不同组织中的表达, 结果 (图 5) 发现 4 个基因在所检测的伏令夏橙 (Vloencia Orange) 各组织中均有表达, 但表达量不同。其中 *CsSPS1* 在果实中的表达量最高, 是其他组织 2 倍左右。*CsSPS2* 主要在愈伤和果实中表达, 在花和叶片中的表达量较低; *CsSPS3* 在愈伤和果实 Mix. 2 中的表达量最高, 其次是叶片和果实 Mix. 1, 在花、果实和果实 Mix. 3 的表达量最低; *CsSPS4* 则主要在果实中表达, 具有明显的组织特异性。

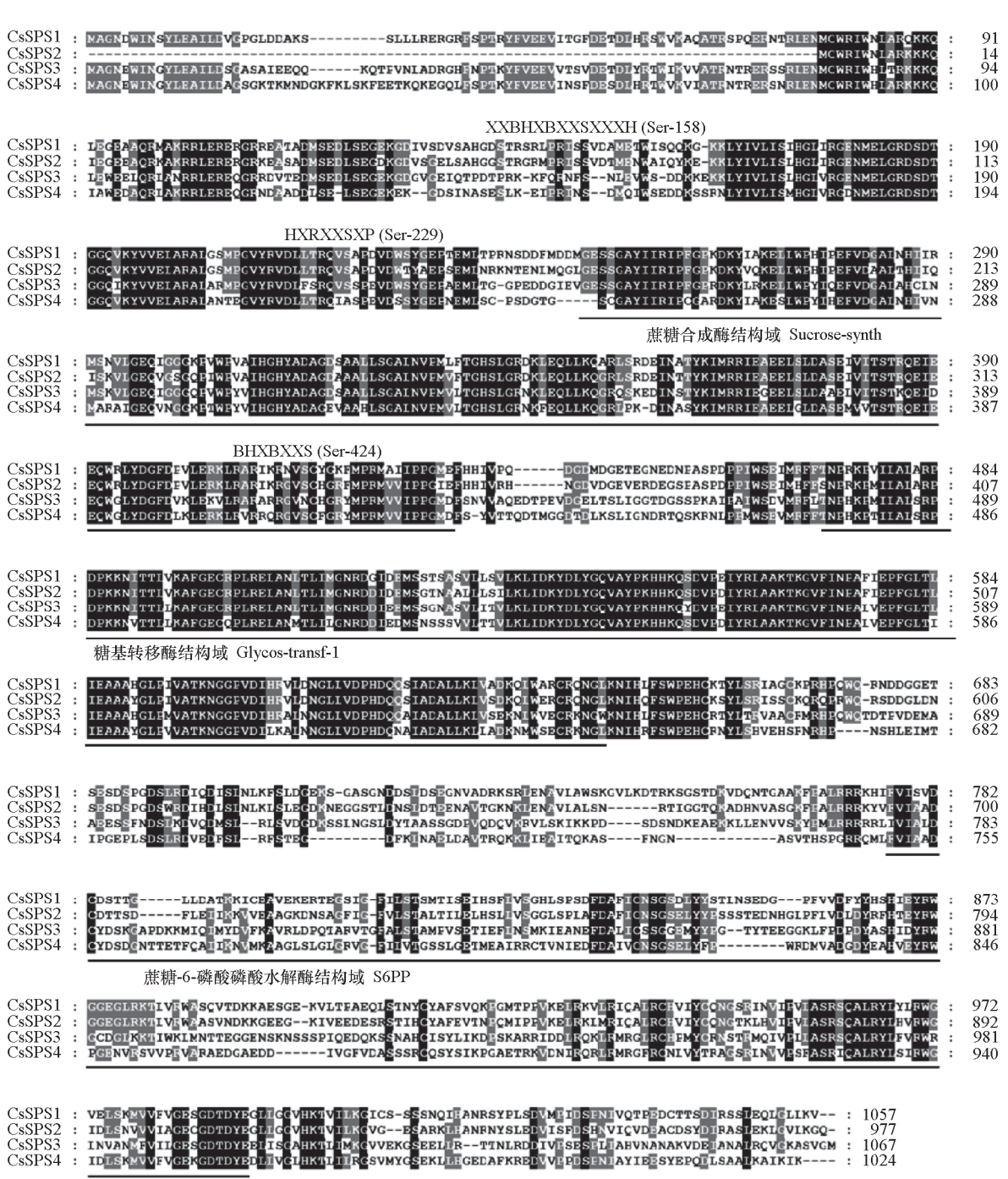


图 1 CsSPS 成员间多序列比对

黑色和灰色阴影分别表示序列的一致性和相似性，序列下方直线标示保守结构域，Ser-158、Ser-229 和 Ser-424 为 3 个磷酸化位点。

Fig. 1 Multiple sequence alignments of CsSPS members

Black and gray shaded backgrounds indicate that the amino acids are identical or similar, conserved domains are shown as lines under the sequences. The positions of the phosphorylation sites involved in light-dark regulation (Ser-158), 14-3-3 protein binding (Ser-229), and osmotic stress activation (Ser-424) of the citrus SPS are marked out.

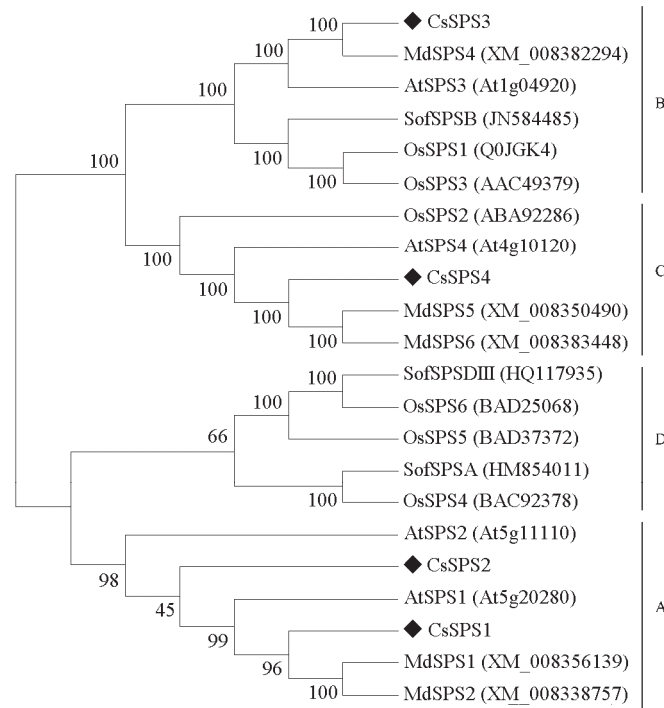


图2 柑橘与其他植物 SPS 蛋白的进化分析

Md: 苹果; At: 拟南芥; Sof: 甘蔗; Os: 水稻。序列后面括号内为其登录号。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the SPS proteins from citrus and other plants

Md: *Malus domestica*; At: *Arabidopsis thaliana*; Sof: *Saccharum officinarum*; Os: *Oryza sativa*. The accession numbers are listed in the parentheses after every sequence.

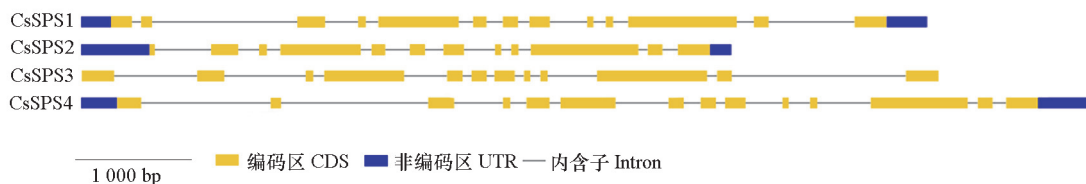


图3 柑橘 SPS 家族的基因结构

Fig. 3 Structure of *CsSPS* gene family

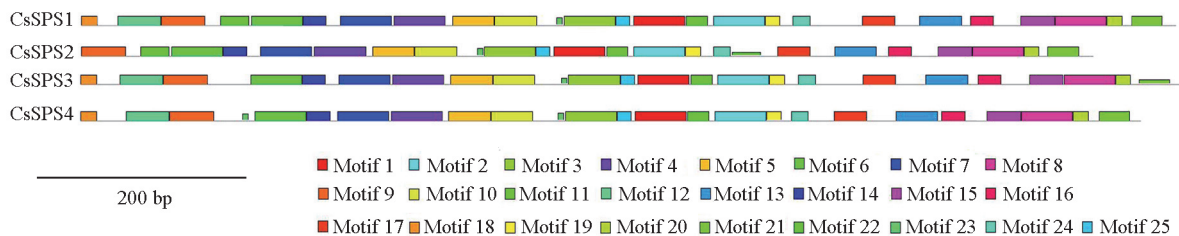


图4 柑橘 SPS 家族的保守元件

Fig. 4 Conserved motif of *CsSPS* gene family

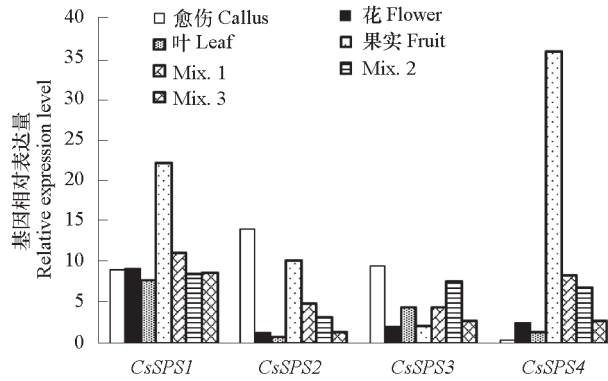


图 5 CsSPS 基因在甜橙 ‘伏令夏橙’ 不同组织中的表达
 Mix. 1 ~ Mix. 3 为 3 个发育时期的果实混合样品。

Fig. 5 Expression patterns of CsSPS genes in various tissues of sweet orange ‘Volencia Orange’
 Mix. 1 - Mix. 3 represents mixed tissues from fruit at three developmental stages.

2.4.2 在 2 种金柑果实发育过程中的表达

采用 qRT-PCR 分析 CsSPS 在 ‘融安金柑’ 和 ‘滑皮金柑’ 果皮和果肉中的表达，将 ‘融安金柑’ 花后 90 d 果实的基因表达量设为 1。图 6 表明，CsSPS 在两种金柑果皮中表达量的变化趋势相同，但不同果实发育时期和品种间存在差异。CsSPS1 和 CsSPS2 随着果实的发育呈先升后降的趋势：2 个品种 CsSPS1 表达量在花后 120 d 最高，至 150 d 急剧下降，其后随着果实发育又逐渐升高；CsSPS2 表达量在 ‘融安金柑’ 花后 120 d 最高，在 ‘滑皮金柑’ 花后 150 d 最高。除花后 90 d 外，CsSPS1 和 CsSPS2 在 ‘滑皮金柑’ 中的表达量均高于 ‘融安金柑’。2 个品种 CsSPS3 表达量在花后 120 d 最高，花后 150 d 下降，其后随着果实发育又逐渐升高，且在 ‘融安金柑’ 中的表达量始终低于 ‘滑皮金柑’。CsSPS4 的表达量则随着果实发育而升高，至花后 210 d 在 ‘融安金柑’ 和 ‘滑皮金柑’ 中分别增加了 29 倍和 122 倍；且在 ‘融安金柑’ 中的表达量始终低于 ‘滑皮金柑’。

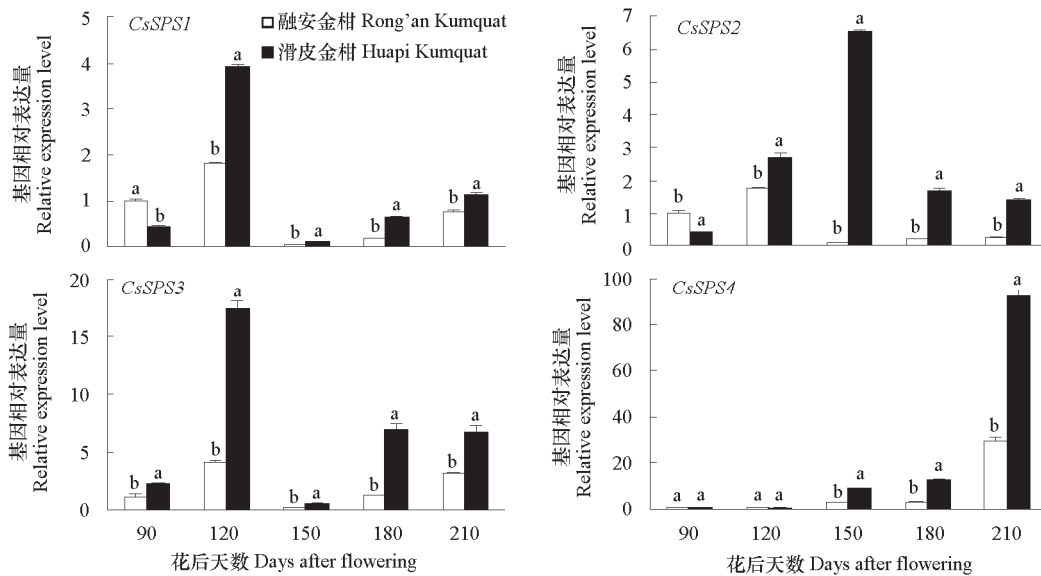


图 6 CsSPS 在金柑果皮中的表达

以 ‘融安金柑’ 花后 90 d 果实的基因表达量为 1。不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。下同。

Fig. 6 Expression patterns of CsSPS in peel of two kumquat fruits

Expression level in ‘Rongan’ kumquat at 90 days after flowering was set to 1. Different letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 7 表明, 果肉中 *CsSPS1* 在‘融安金柑’中的表达量相对稳定, 而在‘滑皮金柑’中呈上升趋势。品种间比较发现, *CsSPS1* 表达量在‘融安金柑’花后 90 ~ 150 d 高于‘滑皮金柑’, 至花后 210 d 则相反。*CsSPS2* 在 2 个品种果肉中的表达量均较低, 花后 90 和 150 d 时在‘融安金柑’中的表达量高于‘滑皮金柑’。*CsSPS3* 随着 2 种金柑果实的发育呈上升趋势, 且花后 120 d 后在‘融安金柑’中的表达量始终高于‘滑皮金柑’。与果皮中类似, 果肉中 *CsSPS4* 表达量也随着果实发育而急剧增加, 花后 90 ~ 180 d 在‘融安金柑’中的表达量始终高于‘滑皮金柑’, 但花后 210 d 品种间无明显差异。

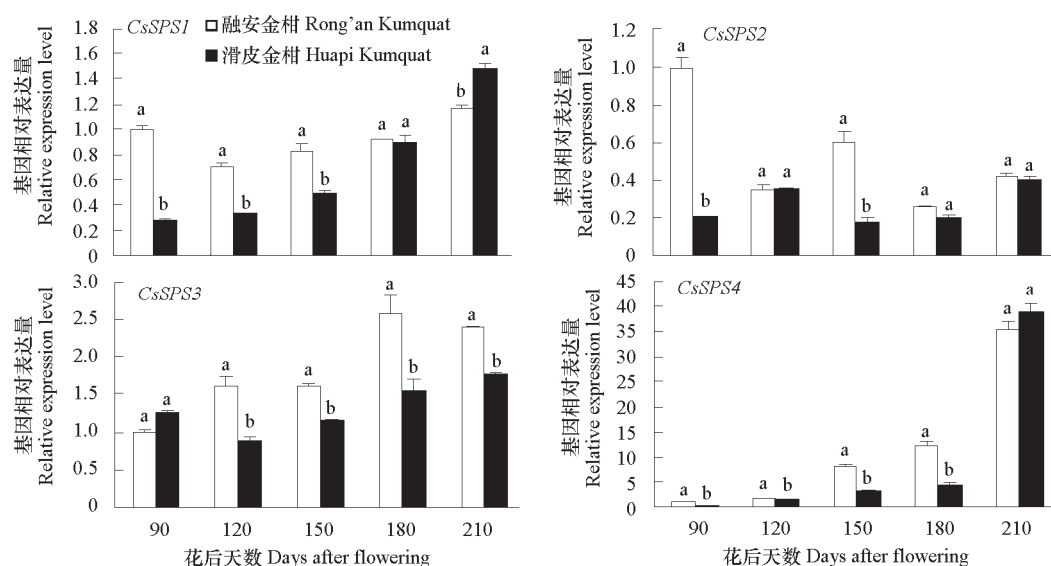


图 7 *CsSPS* 在金柑果肉中的表达
Fig. 7 Expression patterns of *CsSPS* in flesh of two kumquat fruits

3 讨论

SPS 基因最早在玉米中克隆, 此后在其他 20 多种植物中得到克隆或鉴定 (Worrell et al., 1991; 田红梅, 2011; Taneja & Das, 2014)。本研究中通过基因组数据搜索获得 4 个 *CsSPS* 基因, 这与拟南芥 SPS 家族基因的数量相同, 但少于苹果和梨 (Langenkämper et al., 2002; 李会霞 等, 2017; 吕佳红 等, 2018)。 *CsSPS* 分布在不同染色体上, 编码氨基酸的性质相似, 亚细胞定位相同。分析发现 *CsSPS2* 序列较短, 但其在克里曼丁和单倍体甜橙中的同源基因均编码 1 054 个氨基酸, 与其他 3 个 *CsSPS* 基因接近。据此推测 *CsSPS2* 序列短于其他成员可能与基因组测序不完整有关。此外, 4 个 *CsSPS* 蛋白均具有 SPS 家族的特征功能域。这些分析表明本研究中鉴定的 *CsSPS* 基因是 SPS 家族的不同成员。

植物 SPS 基因可以分为 4 个亚家族, 不同亚家族 SPS 基因的表达模式和功能特性也不相同 (Lutfiyya et al., 2007; Solís-Guzmán et al., 2017)。本研究中发现 *CsSPS1* 和 *CsSPS2* 聚在一起属于 A 亚家族成员, 编码氨基酸序列一致性也最高。*CsSPS3* 和 *CsSPS4* 分属于 B 亚家族和 C 亚家族, 同时这 2 个基因蛋白序列的部分磷酸化位点也发生了变异。这些结果暗示 *CsSPS3* 和 *CsSPS4* 的功能与 A 亚家族成员之间存在差异。*CsSPS* 的基因结构和保守元件与其他植物 SPS 基因非常相似 (Jiang

et al., 2015), 表明植物 SPS 在进化中高度保守。而 *CsSPS2* 表现出较大的特异性可能与其序列不完整有关。

蔗糖在果实中的含量由多种蔗糖代谢相关酶共同调控, 包括中性转化酶 (neutral invertase)、蔗糖合酶 (sucrose synthase) 和磷酸蔗糖合酶 (Rolland et al., 2006; 张玲 等, 2017)。研究表明大部分植物 SPS 基因在含糖量高的器官中表达较高, 如菠萝、温州蜜橘和苹果果实 (Komatsu et al., 1996; Li et al., 2012; Zhang et al., 2012)。柑橘 *CsSPS1* 和 *CsSPS4* 主要在“库”器官果实中表达, 而 *CsSPS2* 和 *CsSPS3* 在愈伤中有较高表达量, 这表明 *CsSPS* 不仅参与果实中蔗糖的再合成, 同时还调控柑橘的生长发育过程。甘蔗中 SPS 基因的 A 和 C 亚家族成员调控叶片的蔗糖合成, 而 B 亚家族基因主要参与蔗糖在茎秆中的积累和利用 (杨翠芳 等, 2012; Huang et al., 2017)。不同柑橘果实中的糖分积累有较大差异。分析表明 2 种金柑果皮中 4 个 *CsSPS* 基因在果实发育过程中均差异表达, 暗示可能参与金柑果实成熟过程中蔗糖的积累和分配。Vimolmangkang 等 (2016) 研究表明桃果实中 *SPS3* 的表达量最高, 其次是 *SPS4*, 而 *SPS2* 和 *SPS1* 表达量较低, *SPS3* 与蔗糖和总糖含量呈正相关。Komatsu 等 (1999) 研究发现, *CitSPS1* 和 *CitSPS2* 在成熟期温州蜜柑可食部分转录较高, *CitSPS3* 在果实发育期没有转录。但本研究中发现金柑果皮 *CsSPS3* 和 *CsSPS4* 表达量明显高于其他 2 个基因, 表明这 2 个基因与金柑果皮中蔗糖的积累密切相关。导致本结果与前人不同的原因可能在于所用材料不同。此外, 尽管滑皮金柑果肉中蔗糖含量高于融安金柑, 但 SPS 基因的表达量却往往更低, 其原因有待进一步研究。推测金柑果肉中 SPS 基因的表达存在不同的调控机制, 其蔗糖积累也不完全依赖 SPS 酶活性。综合表达分析结果, 推测 *CsSPS4* 是导致 2 种金柑果实蔗糖积累差异的主要基因。

References

- Castleden C K, Aoki N, Gillespie V J, MacRae E A, Quick 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: 1753 - 1764.
- Chen S, Hajirezaei M, Bornke F. 2005. Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology*, 139 (3): 1163 - 1174.
- Huang D L, Qin C X, Gui Y Y, Zhao L H, Lakshmanan P. 2017. Role of the SPS gene families in the regulation of sucrose accumulation in sugarcane. *Sugar Tech*, 19 (2): 1 - 8.
- Jiang S Y, Chi Y H, Wang J Z, Zhou J X, Cheng Y S, Zhang B L, Ma A L, Vanitha J, Ramachandran S. 2015. Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Scientific Reports*, 5: 17583.
- Komatsu A, Takanokura Y, Moriguchi T, Omura M, Akihama T. 1999. Differential expression of three sucrose-phosphate synthase isoforms during sucrose accumulation in citrus fruits (*Citrus unshiu* Marc.). *Plant Science*, 140 (2): 169 - 178.
- 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*, 252 (3): 346 - 351.
- Langenkämper G, Fung R W M, Newcomb R D, Atkinson R G, Gardner R C, Macrae E A. 2002. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *Journal of Molecular Evolution*, 54 (3): 322 - 332.
- Li Fu-peng, Qin Xiao-wei, Wu Bao-duo, Zhao Xi-Zhu, Wang Hua, Zhu Zi-hui, Lai Jian-xiong. 2015. Phylogeny and expression profile of the sucrose phosphate synthase gene family in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Chinese Journal of Tropical Crops*, 36 (9): 1608 - 1613. (in Chinese)
- 李付鹏, 秦晓威, 伍宝朵, 赵溪竹, 王 华, 朱自慧, 赖剑雄. 2015. 可可蔗糖磷酸合成酶基因家族进化及组织表达分析. *热带作物学报*, 36 (9): 1608 - 1613.

- Li Hui-xia, Zhu Ling-cheng, Ma Feng-wang, Li Ming-jun. 2017. Expression analysis of apple sucrose phosphate synthase gene family and their relationship with sucrose accumulation in apple. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 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.
- 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 Ling-xiao, Shen Fa-fu, Lu He-quan, Han Qing-dian, Liu Yun-guo. 2005. Research advance on sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism. *Molecular Plant Breeding*, 3 (2): 275 - 281. (in Chinese)
- 刘凌霄, 沈法富, 卢合全, 韩庆点, 刘云国. 2005. 蔗糖代谢中蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 的研究进展. *分子植物育种*, 3 (2): 275 - 281.
- Lunn J E. 2003. Sucrose-phosphatase gene families in plants. *Gene*, 303 (1): 187 - 196.
- Lutfiyya L L, Xu N F, D'Ordine R L, Morrell J A, Miller P W, Duff S M G. 2007. Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *Journal of Plant Physiology*, 164 (7): 923 - 933.
- Lü Jia-hong, Wang Ying-zhen, Cheng Rui, Wang Guo-ming, Zhang Shao-ling, Wu Jun, Zhang Hu-ping. 2018. Genome-wide identification and expression analysis of sucrose synthase (SUS) and sucrose phosphate synthase (SPS) gene families in pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (3): 421 - 435. (in Chinese)
- 吕佳红, 王英珍, 程 瑞, 国 明, 张绍铃, 吴 俊, 张虎平. 2018. 梨蔗糖合成相关酶 SUS 和 SPS 基因家族的鉴定与表达分析. *园艺学报*, 45 (3): 421 - 435.
- Ma Zhang-zheng, Ma Qiao-li, Gu Qing-qing, Le Si, Lei Chang-yu, Wei Qing-jiang. 2019. Comparative study of fruit appearance, flavors and nutritional components in Huapi and Rong'an kumquat. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 31 (4): 954 - 660. (in Chinese)
- 马张正, 马巧利, 辜青青, 勒 思, 雷常玉, 魏清江. 2019. 滑皮金柑和融安金柑外观、风味及营养成分比. *浙江农业学报*, 31 (4): 954 - 660.
- Okamura M, Aoki N, Hirose T, onekura M, Ohto C, Ohsugi R. 2011. Tissue specificity and diurnal change in gene expression of the sucrose phosphate synthase gene family in rice. *Plant Science*, 181 (2): 159-166.
- Patrick W J, Botha F C, Birch R G. 2013. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 11 (2): 142 - 156.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57 (1): 675 - 709.
- Solis-Guzmán M G, Argüello-Astorga G, López-Bucio J, Ruiz-Herrer L F, López-Meza J. 2017. *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (SPS) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene Expression Patterns*, 25 - 26: 92 - 101.
- Taneja D, Das N. 2014. Molecular cloning, sequence analyses, and expression studies of sucrose-phosphate synthase in the potato (*Solanum Tuberosum* L.) cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (8): 2253 - 2269.
- Tian Hong-mei. 2001. Function analysis of muskmelon sucrose phosphate synthase encoding gene [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 田红梅. 2011. 甜瓜蔗糖磷酸合成酶基因的功能鉴定与分析 [博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Vimolmangkang S, Zheng H, Peng Q, Jiang Q, Wang H, Fang T, Liao L, Lu W, He H P, Han Y P. 2016. Assessment of sugar components and genes involved in the regulation of sucrose accumulation in peach fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 6723 - 6729.
- Wang D, Zhao J T, Hu B, Li J Q, Qin Y Q, Chen L H, Qin Y H, Hu G B. 2018. Identification and expression profile analysis of the sucrose phosphate synthase gene family in *Litchi chinensis* Sonn. *Peer J*, 6 (3): e4379.

- Wang L, Cui N, Zhang K Y, Fan H Y, Li T L. 2013. Research advance of sucrose phosphate synthase (SPS) in higher plant. *International Journal of Agriculture & Biology*, 15 (6): 1221 - 1226.
- Worrell A C, Bruneau J M, Summerfelt K Boersig M, Voelker T A. 1991. Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *The Plant Cell*, 3: 1121 - 1130.
- Yang Cui-fang, Huang Cheng-mei, PanYou-qiang, Wei Yuan-wen, Deng Zhi-nian, Qin Xin-min, Li Yang-rui. 2012. Preliminary studies on expression of sucrose-phosphate synthase III gene in sugarcane. *Journal of Southern Agriculture*, 43 (6): 723 - 726. (in Chinese)
- 杨翠芳, 黄诚梅, 潘有强, 魏源文, 邓智年, 秦新民, 李杨瑞. 2012. 甘蔗蔗糖磷酸合成酶 SPS III 基因表达的初步研究. *南方农业学报*, 43 (6): 723 - 726.
- Zhang Li, Jian Hong-ju, Yang Bo, Zhang Ao-xiang, Zhang Chao, Yang Hong, Zhang Li-yuan, Liu Lie-zhao, Xu Xin-fu, Lu Kun, Li Jia-na. 2018. Genome-wide analysis and expression profiling of SPS gene family in *Brassica napus* L. *Acta Agronomica Sinica*, 44 (2): 197 - 207. (in Chinese)
- 张莉, 荐红举, 杨博, 张翱翔, 张超, 杨鸿, 张立源, 刘列钊, 徐新福, 卢坤, 李加纳. 2018. 甘蓝型油菜蔗糖磷酸合酶 (SPS) 基因家族成员鉴定及表达分析. *作物学报*, 44 (2): 197 - 207.
- 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.
- Zhang X M, Wang W, Du L Q, Xie J H, Yao Y L, Sun G M. 2012. Expression patterns, activities and carbohydrate-metabolizing regulation of sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in pineapple fruit during development and ripening. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (12): 9460 - 9477.