

萱草 3 种蔗糖转化酶基因的分离及对低温和渗透胁迫响应的分析

白露, 张志国, 张世杰, 黄东梅, 秦巧平*

(上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海 201418)

摘要: 从 ‘Athlone’ 萱草 (*Hemerocallis fulva*) 中克隆了细胞质、细胞壁和液泡蔗糖转化酶基因各 1 个, 命名为 *HfCIN3*、*HfCWIN1* 和 *HfVIN1*, 其 ORF 分别为 1 941、1 701、1 920 bp, 编码 646、566 和 639 个氨基酸, 氨基酸序列相似性为 18.81%~41.86%。*HfCIN3* 与石斛、野香蕉等的氨基酸序列相似性为 75.16%~82.79%, *HfCWIN1* 与芦笋、油棕榈等的相似性为 58.95%~68.88%, *HfVIN1* 与龙舌兰相似性为 73.4%。*HfCIN3* 具有信号肽和典型的 β -fructofuranosidase domain、glycoside hydrolase family 100 结构域, 而 *HfCWIN1* 和 *HfVIN1* 有 glycosyl hydrolases family 32 特征结构域, *HfCWIN1* 还含有 72 个氨基酸与细胞壁糖分子识别有关的 Malectin domain, *HfVIN1* 含有可能的液泡识别 motif “ILPD”, 并在 N 端有典型跨膜结构。*HfCWIN1* 和 *HfVIN1* 同时存在 N-糖基化位点和 O- β -GlcNAc 糖基化位点, *HfCIN3* 仅有 O- β -GlcNAc 糖基化位点。系统进化分析显示, 在不同类型转化酶分支里, 可以较清楚地区分单子叶和双子叶植物, *CWIN* 和 *VIN* 之间的亲缘关系较近, *HfCIN3*、*HfCWIN1*、*HfVIN1* 聚于单子叶植物分支。瞬时表达分析显示, 35S:*HfCIN3*-GFP 在叶绿体中表达, 35S:*HfVIN1*-GFP 在液泡中表达, 35S:*HfCWIN1*-YFP 在细胞壁、保卫细胞中均有明显表达。*HfCIN3*、*HfCWIN1*、*HfVIN1* 在萱草叶片中的表达水平显著高于根和花组织, 在叶片中表达水平 *HfVIN1* > *HfCWIN1* > *HfCIN3*。0 °C 处理 24 h 后, *HfVIN1* 的表达水平较 5 °C 上调 2.2 倍, *HfCWIN1* 的表达也显著上调, *HfCIN3* 的表达水平峰值出现在 5 °C, 其他两个基因表达峰值出现在 0 °C。5%或 10% PEG 处理 24 h 后, *HfCIN3* 和 *HfVIN1* 的表达水平与对照差异不显著, *HfCWIN1* 显著低于对照。在不同组织中 CIN 酶活性与基因表达结果基本一致, 而其他两种酶与基因表达不一致; 随着温度降低, 叶片中 CIN 酶活性整体呈下降趋势, *CWIN* 先升高后降低, *VIN* 先下降后升高再下降; PEG 可以诱导 *VIN* 活性上升。低温和渗透胁迫处理后酶活性与基因表达存在不同步现象, 推测基因转录后修饰和翻译后修饰对转化酶活性起着重要作用。本结果证实萱草 3 种转化酶的亚细胞定位明显不同, 不同组织间基因表达有较大差异, *HfVIN1* 响应低温胁迫, *HfCWIN1* 响应渗透胁迫。

关键词: 萱草; 蔗糖; 转化酶; 非生物胁迫; 基因表达

中图分类号: S 682.1⁺9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 02-0300-13

Isolation of Three Types of Invertase Genes from *Hemerocallis fulva* and Their Responses to Low Temperature and Osmotic Stress

BAI Lu, ZHANG Zhiguo, ZHANG Shijie, HUANG Dongmei, and QIN Qiaoping*

(School of Ecological Technology and Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

收稿日期: 2020-07-27; **修回日期:** 2020-12-07

基金项目: 上海市农委科技兴农项目 (2019-02-08-00-08-F01107)

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

Abstract: In this study, three invertase genes were cloned from *Hemerocallis fulva* 'Athlone', named *HfCIN3*, *HfCWIN1* and *HfVIN1*. The ORFs of the three invertase genes were 1 941, 1 701, 1 920 bp, encoding 646, 566 and 639 amino acids, respectively, with the similarity of 18.81% - 41.86%. The amino acid sequence of *HfCIN3* was 75.16% - 82.79% similar to those of dendrobium and wild banana, *HfCWIN1* was 58.95% - 68.88% similar to asparagus and oil palm, and *HfVIN1* was 73.4% similar to agave. *HfCIN3* had a signal peptide and typical glycoside hydrolases family 100 domain, *HfCWIN1* and *HfVIN1* had glycosyl hydrolases family 32 domain. *HfCWIN1* also contained a 72 amino acid Malectin domain related to cell wall sugar recognition. *HfVIN1* contained a possible vacuolar motif "ILPD" and had a typical transmembrane domain at the N terminus. Both *HfCWIN1* and *HfVIN1* possessed the *N*-glycosylation and *O*- β -GlcNAc sites, whereas *HfCIN3* only had the *O*- β -GlcNAc sites. Phylogenetic analysis showed that monocotyledons and dicotyledons could clearly be distinguished regarding different types of invertase; CWIN and VIN were closely related, and *HfCIN3*, *HfCWIN1* and *HfVIN1* were clustered in monocots. Transient expression analysis showed 35S:*HfCIN3*-GFP was expressed in chloroplasts; 35S:*HfVIN1*-GFP was expressed in vacuoles; and 35S:*HfCWIN1*-YFP was detected in cell walls and guard cells. The expression levels of *HfCIN3*, *HfCWIN1* and *HfVIN1* were significantly higher in leaves than that of the root and flower tissues; the expression levels in leaves were *HfVIN1* > *HfCWIN1* > *HfCIN3*. After 24 h treatment at 0 °C, the expression of *HfVIN1* was increased by 2.2 times compared with 5 °C, and the expression level of *HfCWIN1* was increased significantly at 0 °C compared with the other temperatures. The highest expression of *HfVIN3* was recorded at 0 °C. After 24 h treatment with 5% or 10% PEG, the expression levels of *HfCIN3* and *HfVIN1* were not significantly different from the control, but that of *HfCWIN1* was significantly lower than the control. The CIN activity and gene expression were similar in different tissues, but CWIN and VIN were not consistent with the gene expression. As temperature decreased, CIN declined, CWIN increased at first and then decreased, and VIN decreased at first then increased, and then decreased; PEG induced VIN activity. The enzyme activity and gene expression were not synchronized after the low temperature and osmotic stress treatment, possibly because the gene post-transcriptional modifications played an important role in invertase activity. The results of this study established the differences in subcellular localizations, gene expression patterns and the responses to abiotic stresses among the three various types of *Hemerocallis fulva* invertase, *HfVIN1* responded to low temperature, whereas *HfCWIN1* responded to osmotic stress.

Keywords: *Hemerocallis fulva*; sucrose; invertase; abiotic stress; gene expression

蔗糖是植物光合作用的主要产物, 也是储藏、积累和运输糖分的主要形式。蔗糖在源器官中合成, 通过韧皮部转运到库组织储藏或被水解利用。蔗糖主要依靠蔗糖合酶 (sucrose synthase, EC 2.4.1.13, SuSy) 或转化酶 (invertase, 也称为 β -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) 水解, 蔗糖水解后的产物——葡萄糖和果糖, 是植物生长、产量形成和逆境反应的营养物质、能量来源和信号分子 (Ruan, 2012, 2014; Wan et al., 2018; 魏清江 等, 2020)。研究表明, 不同组织、不同发育时期蔗糖水解的主导酶不同。蔗糖合酶活性与库强度关联较大, 在发育中的种子和果实中较叶片中活性高许多 (Ruan, 2014)。转化酶参与植物生长发育及对生物和非生物胁迫的应答 (Wan et al., 2018)。转化酶依据其亚细胞定位可分为 3 种——细胞质转化酶 (cytoplasmic invertase, CIN)、细胞壁转化

酶 (cell wall invertase, CWIN) 和液泡转化酶 (vacuolar invertase, VIN)。其中 CIN 是中性/碱性转化酶 (最适 pH 7.0 ~ 7.8), CWIN 和 VIN 是酸性转化酶 (最适 pH 4.5 ~ 5.5)。VIN 起着调节植物组织中糖的积累和液泡中蔗糖利用的作用; CWIN 主要参与韧皮部质外体卸载时蔗糖的分解, 以保持库—源之间蔗糖浓度梯度; CIN 活性较低, 但可维持细胞质糖动态平衡; VIN、CWIN 与植物产量及抗冷性直接相关 (Ruan, 2014; Ru et al., 2017; Xu et al., 2017; Qian et al., 2018; Wan et al., 2018; Morey et al., 2019; Yan et al., 2019)。低温胁迫可抑制番茄幼苗 *INVINHI* (细胞壁转化酶抑制子) 基因的表达, 增加 CWIN 基因 (*Lin6* 和 *Lin8*) 的表达水平, 导致葡萄糖和果糖水平升高, 提高植株的耐冷性, 相反, 过量表达 *INVINHI* 的转基因番茄 CWIN 活性降低, 对冷胁迫更敏感 (Xu et al., 2017)。在长期中度热胁迫下, CWIN 通过抑制程序性细胞死亡增强蔗糖输入和代谢、增加热休克蛋白 HSP 的表达及生长素的响应和生物合成, 进而促进番茄坐果 (Liu et al., 2016)。CWIN 和 VIN 可通过调控糖及活性氧水平来应答干旱、高温等逆境胁迫 (Ruan et al., 2010)。

萱草 (*Hemerocallis fulva*) 是百合科多年生宿根草本花卉, 是典型的半常绿 (也称为半落叶, semi-deciduous/semi-evergreen) 植物——在温度适宜地区叶片周年常绿并可持续生长、温度寒冷时叶片枯萎呈休眠状态 (高晋 等, 2020; Li et al., 2020)。美国萱草协会根据萱草地上部分冬季的表现型, 将萱草分为落叶型 (休眠型)、半常绿型、常绿型。其中常绿型萱草 ‘Athlone’ 在上海冬季叶片保持常绿且可再开花, 叶片耐寒性较强, 糖代谢与植物抗逆能力有较大关联, 耐干旱能力也较强。预试验显示, ‘Athlone’ 叶片中蔗糖分解以转化酶占主导。本研究中从 ‘Athlone’ 萱草叶片中克隆了 CIN、CWIN、VIN 转化酶基因, 在序列对比和编码氨基酸分析的基础上, 明确了其亚细胞定位, 研究在不同组织、不同温度及渗透胁迫下的表达响应, 旨在为深入研究萱草逆境胁迫生理及分子响应机理奠定基础, 为新品种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其处理

以上海应用技术大学植物园种植的 5 年生萱草 ‘Athlone’ 为试验材料, ‘Athlone’ 为引自美国的二倍体萱草品种, 平均株高 1.2 m, 花径 11 cm, 喜光, 喜肥沃土壤, 耐干旱, 耐高温, 抗叶枯病, 夏季开花, 为单瓣品种, 有再开花能力, 在上海地区连续多年观察评价其表现为常绿、抗病。选取长势良好、无病虫害的盆栽植株, 正常水肥管理, 采集根、叶和花组织, 液氮迅速冷冻后在 -80 °C 超低温冰箱保存用于基因的组织特异性分析。

低温处理预试验显示, ‘Athlone’ 植株在 -5 °C 培养箱中放置 2 h 即出现明显冻伤, 叶片呈水渍状, 0 °C 下叶片出现胁迫但是没有明显冻伤。选长势一致的盆栽萱草移入 DRXM 型低温人工气候箱中, 15 °C 预培养 3 d, 光周期为 12 h/12 h, 相对湿度 80%, 再分别以 15、10、5、0 °C 处理, 不同温度处理时间均为 24 h, 取样部位为完全展开的功能叶片。试验设置 3 次生物学重复。

选择长势一致的萱草苗, 从栽培基质中连根移出去除土壤后, 置入不含蔗糖和琼脂的 1/2MS 液体培养液中预培养 3 d, 之后分别在培养液中按比例加入聚乙二醇 (PEG-6000) 使其终浓度分别为 5%、10% 和 15%, 对照不加 PEG。预试验显示, 1/2MS 液体培养基中添加 10% PEG 后 ‘Athlone’ 出现轻微渗透胁迫, 15% PEG 可使其出现明显渗透胁迫症状。因此采集对照 (不加 PEG)、5% PEG 和 10% PEG 处理 24 h 后的叶片材料进行基因定量表达分析。试验设置 3 次生物学重复。

1.2 试验方法

1.2.1 转化酶基因的克隆

采用改良 CTAB 法提取 ‘Athlone’ 叶片总 RNA (Gasic et al., 2004), 用超微量分光光度计 (NanoDrop One, Thermo Scientific) 和凝胶电泳检测 RNA 的浓度、纯度和完整性, 检测合格的 RNA 采用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行第一链 cDNA 的合成 (生工生物)。通过查找本课题组的三代转录组数据库找到可能的目的基因序列, 在序列两端设计 PCR 引物, 以第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 符合片段大小的扩增产物克隆到 pUCm-T Vector, 经筛选确认重组后送上海生工测序。所用的 PCR 引物见表 1。大肠杆菌 DH5 α 菌种由本实验室保存。

表 1 本研究中所用的 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences used in this study

用途 Application	引物名称 Primer	引物序列 (5' - 3') Sequence
cDNA 克隆 cDNA clone	HfVIN1-F1/R1	ATGGTACCGGACCAATGGTA/CAAGTTGGGGAAGTGAAGGTGT
	HfCWIN1-F1/ R1	ATGGCTGCTGGTTCATTGCT/TTAGCTAATTATCGCTTTTGCCA
qPCR	HfCIN3-F1/ R1	ATGGGAGTTTGTGATTTATC/TCATACGATATATGTCTTCTTCA
	HfVIN1-F2/R2	CTCCTCCTCCCTCCGATTC/CGGGCTTCATTAGTGTGGG
	HfCWIN1-F2/R2	TGGTTCCGTGACCCCTTCTAC/AAGTCCGGACATTCCCACAT
pBI221-GFP 载体构建 Construction of PBI221-GFP vector	HfCIN3-F2/R2	TGGCAACTACACAGCAATCG/AGGCCAAGAACCCTCATTGT
	HfCIN3-F3/R3	<u>gaggatctcgagcggctctaga</u> ATGGGAGTTTGTGATTTATC/ <u>agcggccgctgtacaggtacc</u> TACGATATATGTCTTCTTCA
	HfVIN1-F3/R3	<u>gaggatctcgagcggctctaga</u> ATGGGGTCACGTGACTTGGA/ <u>agcggccgctgtacaggtacc</u> CAAGTTGGGGAAGTGAAGG
pC131-YFP 载体构建 Construction of pC131-YFP vector	HfCWIN1-F3/R3	<u>gaggatctcgagcggctctaga</u> ATGGCTGCTGGTTCATTGCT/ <u>agcggccgctgtacaggtacc</u> GCTAATTATCGCTTTTGCCA
	HfCWIN1-F4/R4	<u>gaggatctcgagcgggaattc</u> ATGGCTGCTGGTTCATTGCT/ <u>agcggccgctgtacaactagct</u> GCTAATTATCGCTTTTGCCA
qPCR 内参 qRT-PCR reference gene	HfUBQ-F/R	AACGTGAAGCCAAGATAC/AGACGGAGCACCAGGTGGA

注: 小写字母为保护碱基和酶切位点, 酶切位点用下划线标出。

Note: The lowercase letters indicate protected bases and restriction sites, and the restriction sites are underlined.

1.2.2 生物信息分析

蛋白质理化性质分析采用 ProtParam 在线工具 (<http://web.expasy.org/protparam>) 和 NCBI 蛋白质结构分析网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、MEME (<http://alternate.memesuite.org/tools/me-me>)。蛋白质亲/疏水性分析采用 ProtScale 工具。通过 <http://www.dabi.temple.edu/disphos/> 进行磷酸化位点的预测, <http://www.cbs.dtu.dk> 进行糖基化位点预测。在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找并下载不同物种的转化酶编码氨基酸序列, 利用 ClustalW 对下载的序列进行比对分析, MEGA7 采用最大似然法 (Maximum likelihood) 构建系统发育进化树, 校验参数为 1 000 次重复, 进化距离用泊松校正 (Tamura et al., 2011)。

1.2.3 基因的定量表达分析

提取不同组织 (叶、根、花) 及不同处理材料的总 RNA, 取 1 μ g 总 RNA 反转录获得 cDNA, 利用 GenScript 在线软件 (<https://www.genscript.com>) 设计 qPCR 引物 (表 1)。qPCR 采用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme Biotech) 进行。20 μ L 反应液中含 2 \times AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10 μ L; 上、下游引物各 0.4 μ L; 模板 cDNA 1 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 循环 40 次; 融解曲线采集程序为 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。采

用本课题组筛选的 *UBQ* 基因作为内参。试验重复 3 次。定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 计算分析。

1.2.4 表达载体构建及亚细胞定位

在基因的 ORF 两端(不含终止密码子)分别设计带酶切位点的引物,以 1.2.1 中亚克隆的 pUCm-T 质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增 (引物见表 1), 扩增产物经纯化后再次亚克隆到 T 载体中并用 *Xba* I/*Kpn* I 双酶切, 回收酶切产物并与经过相同双酶切的 pBI221-GFP 载体进行连接, 得到重组载体 35S:HfCIN3-GFP、35S:HfCWIN1-GFP 和 35S:HfVIN1-GFP 并进行测序确认。采用酶解法提取野生型拟南芥原生质体, 原生质体镜检合格后将构建的重组表达载体质粒 DNA 通过 PEG 介导转化原生质体, 空载体质粒 DNA 为对照, 借助激光共聚焦显微镜进行荧光信号观察 (Yoo et al., 2007)。设计两端带 *Eco*R I *Spe* I 酶切位点的 *HfCWIN1* 基因特异引物, 采用同样方法以 pC131-YFP 载体骨架构建 35S:HfCWIN1-YFP 表达载体, 经测序确认序列无误后通过电击转化将其导入农杆菌 GV3101 (GV3101 菌种由本实验室保存), 培养农杆菌并注射烟草, 黑暗培养 48 h 后在激光共聚焦显微镜下观察烟草叶片细胞中荧光的分布 (Sparkes et al., 2006)。

1.2.5 酶活性测定

转化酶活性测定参考 Zhu 等 (2018) 的方法进行。酶提取液催化蔗糖降解的产物与 3,5 - 二硝基水杨酸反应生成在 540 nm 有特征吸收峰的棕红色物质, 通过测定 540 nm 处吸光值变化计算转化酶的活性。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 萱草 3 种转化酶基因的克隆及序列分析

从 ‘Athlone’ 萱草叶片组织中克隆获得了细胞质转化酶、细胞壁转化酶和液泡转化酶基因各 1 个, 分别命名为 *HfCIN3*、*HfCWIN1* 和 *HfVIN1*, 序列已提交至 GenBank, 登录号:

MT379656 ~ MT379658。 *HfCIN3* 开放阅读框 (ORF) 为 1 941 bp, 编码 646 个氨基酸; *HfCWIN1* 的 ORF 为 1 701 bp, 编码 566 个氨基酸; *HfVIN1* 的 ORF 为 1 920 bp, 编码 639 个氨基酸 (图 1)。3 个基因的 ORF 区核苷酸序列相似性为 48.91% ~ 56.80%, 氨基酸序列相似性为 18.81% ~ 41.86%。

HfVIN1 和 *HfCWIN1* 氨基酸序列相似性为 41.86%, 而 *HfCIN3* 与其他两个氨基酸序列相似性最高仅为 19.6%。NCBI 序列比对显示, *HfCIN3* 核苷酸序列与芦笋、油棕榈、石斛、野香蕉、榴莲的相似性分别为 88.18%、83.39%、81.75%、81.83%和 80.55%; *HfCWIN1* 与杜鹃、石斛、小兰屿蝴蝶兰、小桐树、亚麻芥相似性分别为 77.86%、66.4%、64.85%、62.14%和 57.23%; *HfVIN1* 与豇豆、油橄榄、茶树相似性分别为 75.93%、78%、78%。氨基酸序列相似性比对显示, *HfCIN3* 与野香蕉、椰枣、石斛、深圳拟兰的相似性分别为 82.79%、81.48%、80.42%和 75.16%; *HfCWIN1* 与芦笋、油棕榈、野香蕉序列相似性分别为 68.88%、58.96%和 58.95%; *HfVIN1* 与龙舌兰、石榴和石斛的相似性分别为 73.4%、63.9%和 58.0%。

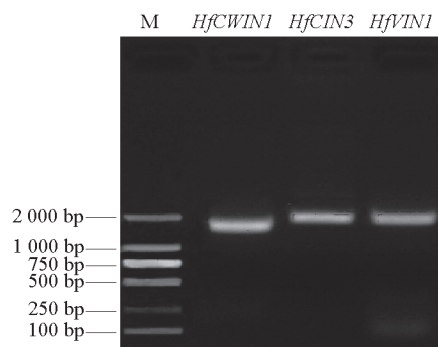


图 1 萱草 ‘Athlone’ 转化酶基因的克隆
Fig. 1 Cloning of invertase genes from ‘Athlone’ daylily

2.2 萱草转化酶基因编码蛋白质的理化性质与系统进化分析

HfCIN3、HfCWIN1 和 HfVIN1 的分子量分别为 74.840、63.496、71.340 kD (表 2), 3 个蛋白的 motif 结构相差较大 (图 2)。HfCIN3 具有信号肽和典型的 β -fructofuranosidase domain、glycoside hydrolase family 100 (GH100) 结构域。HfCWIN1 含有信号肽、 β -fructosidase motif、glycosyl hydrolases family 32 (GH32) 特征结构域、催化位点 (catalytic site), 还含有 1 个 72 个氨基酸的与细胞壁糖分子识别有关的 Malectin domain (248 ~ 319)。HfVIN1 除含有与 HfCWIN1 相似的结构域之外, 与其他植物的 VIN 相似, 还含有 1 个可能的液泡识别 motif“ILPD”, 并在 N 端有典型跨膜结构(34 ~ 53)。HfCWIN1 和 HfVIN1 在靠近 N 端具有特征保守氨基酸基序 β -fructosidase motif “NDPNG/A”, “FRDP”。HfCWIN1 和 HfVIN1 均具有保守催化位点, 但相差 1 个氨基酸残基, HfCWIN1 为 “WECPD”, HfVIN1 为 “WECVD” (图 2)。

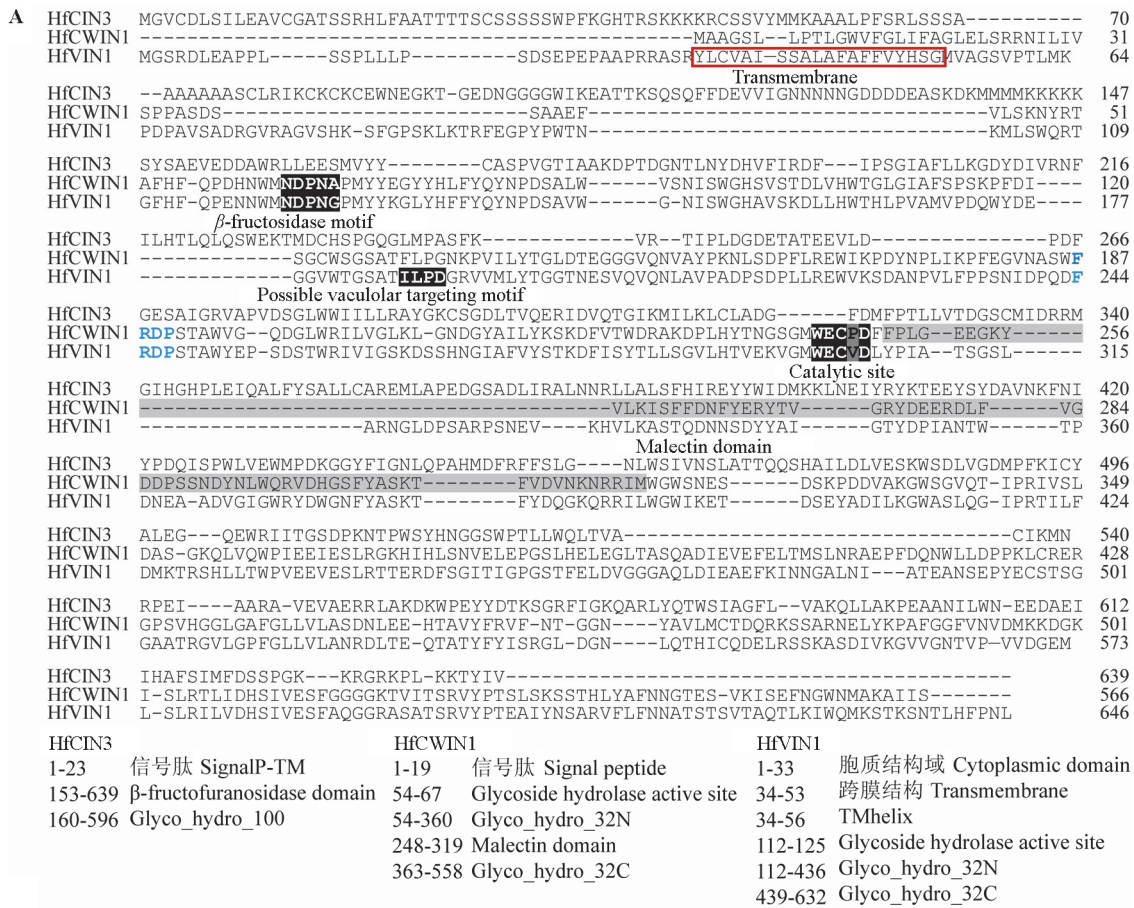


图 2 萱草 3 种转化酶基因编码的氨基酸序列比对

A: Clustal 序列比对, TMHMM 和 NCBI domain 预测; B: MEME motif 预测。

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences encoded by three types of invertase from daylily

A: Clustal alignment, domain prediction by TMHMM and NCBI; B: Motif Prediction by MEME.

Glyco_hydro_100: Glycosyl hydrolases family 100; Glyco_hydro_32N: Glycosyl hydrolases family 32 N terminal domain;

Glyco_hydro_32C: Glycosyl hydrolases family 32 C terminal domain.

3种转化酶预测蛋白均为亲水性蛋白,HfCIN3不稳定,而HfCWIN1和HfVIN1较稳定。HfCIN3、HfVIN1分别有5个和6个磷酸化位点,而HfCWIN1没有磷酸化位点。HfCWIN1和HfVIN1同时存在N-糖基化位点和O-β-GlcNAc糖基化位点;未从HfCIN3检测到N-糖基化位点,但可以检测到O-β-GlcNAc糖基化位点(表2)。

表2 萱草3种转化酶基因编码蛋白质的理化性质

Table 2 Predicted physical and chemical characteristics of three types of invertase from daylily

理化性质 Characteristics	分子量/kD Molecular weight	pI	不稳定性指数 Instability index	亲水性平均系数 Grand average of hydropathicity	磷酸化位点 Phosphorylation sites	糖基化位点 Glycosylation site	
						N-Glycosylation	O-β-GlcNAc
HfCIN3	74.840	6.35	46.98 (不稳定 Unstable)	-0.275	5	-	✓
HfCWIN1	63.496	5.38	38.66 (稳定 Stable)	-0.326	0	✓	✓
HfVIN1	71.340	5.33	37.42 (稳定 Stable)	-0.312	6	✓	✓

从NCBI中选取不同植物的3种转化酶基因编码氨基酸序列,构建系统进化树(图3)所示,CIN、CWIN和VIN分别聚在不同的分支,而CWIN和VIN之间的亲缘关系较近,与CIN相距较远,与其氨基酸序列相似性一致。在不同转化酶的分支里可以比较清楚地地区分单子叶和双子叶植物。HfCIN3与兰花、石斛亲缘关系较近,其次是菠萝、野香蕉、油棕榈。HfCWIN1与芦笋位于同一分

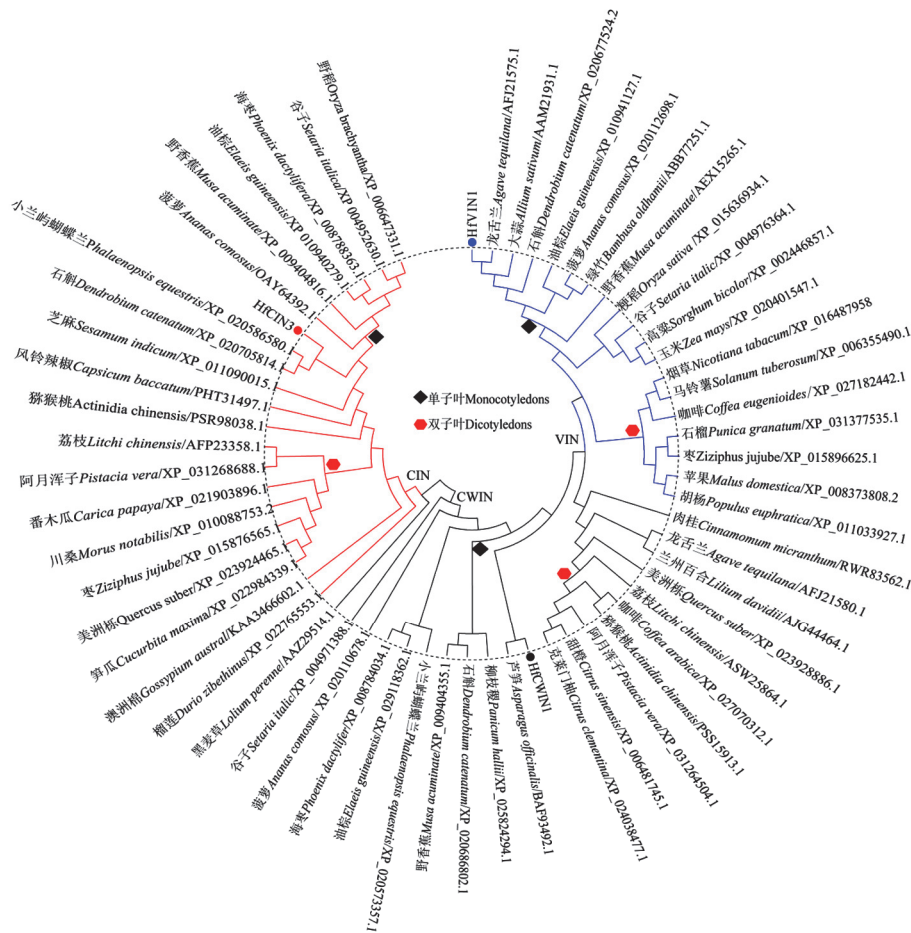


图3 植物不同类型转化酶的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of three types of invertase from different plants

支, 其次是石斛、野香蕉、黍、兰花等物种。HfVIN1 与龙舌兰聚在同一分支, 其次是大蒜、石斛、油棕榈、菠萝等植物。

2.3 转化酶基因的亚细胞定位

GFP 融合蛋白在原生质体中的瞬时表达 (图 4) 显示, 35S:HfCIN3-GFP 在叶绿体中表达, 进一步选用叶绿体细胞器 marker (图 4 Chl-mCherry), 可以清晰地看到 35S:HfCIN3-GFP 在叶绿体中高表达。35S:HfVIN1-GFP 在液泡中表达, 但是信号较弱。

35S:HfCWIN1-GFP 在细胞核中不表达, 在其他部位可以检测到信号; 进一步构建 YFP 二元表达载体通过农杆菌注射烟草叶片表皮细胞, 可清晰看到 35S:HfCWIN1-YFP 在细胞壁上信号最强, 此外在保卫细胞中也观察到明显高表达信号。

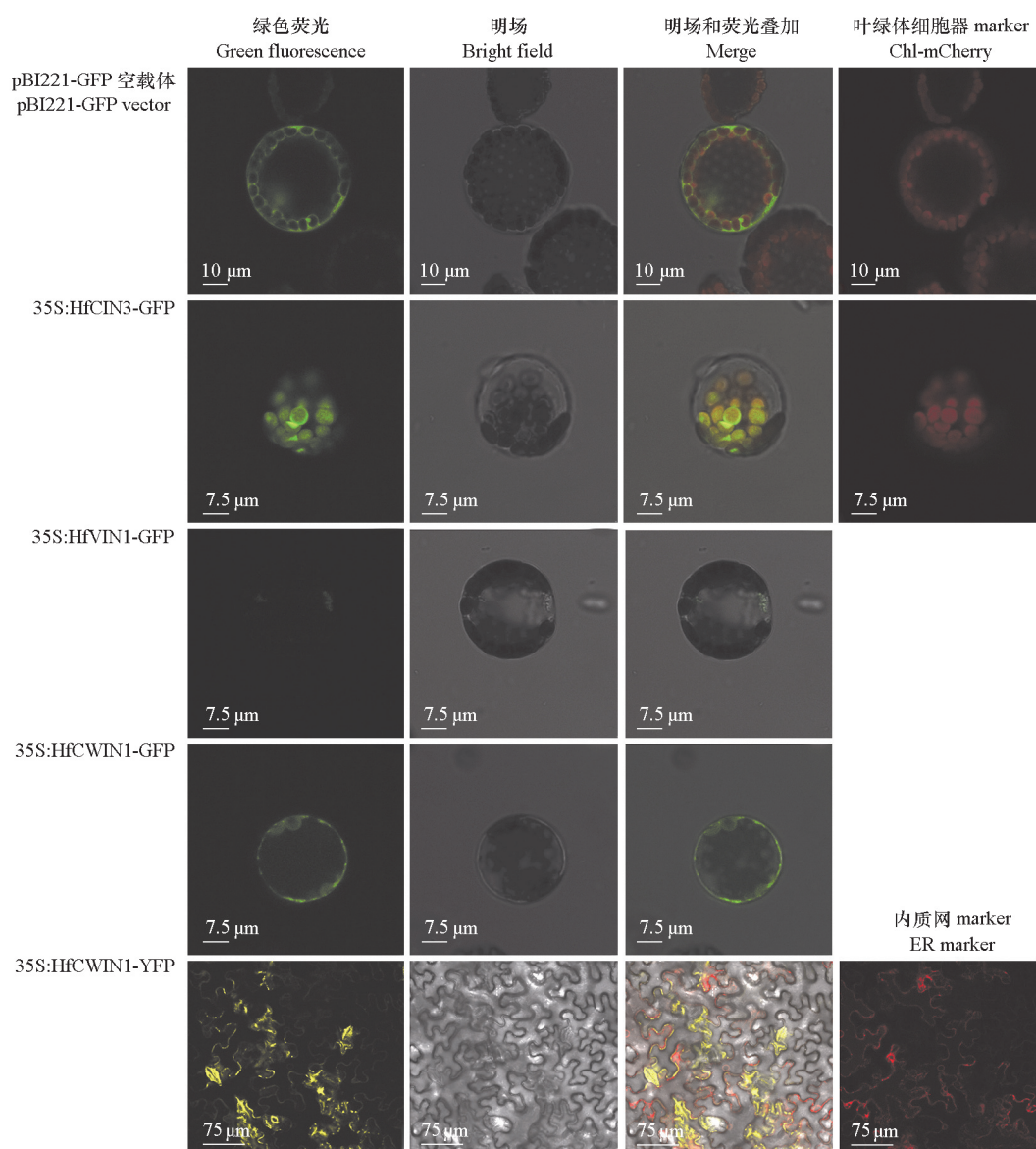


图 4 萱草转化酶 GFP/YFP 融合蛋白的表达

Fig. 4 Expression of fusion proteins of daylily invertases with GFP/YFP

2.4 转化酶基因在不同组织中的表达及不同温度和渗透胁迫下的表达变化

荧光定量分析显示, *HfCIN3*、*HfCW1N1*、*HfVIN1* 在叶片中的表达量极显著高于根和花组织, 在根和花中仅检测到较低水平的表达。在叶片组织中, *HfVIN1* 的相对表达量较高, *HfCW1N1*、*HfCIN3* 表达水平较低 (图 5, A)。

从 15 到 0 °C, 随着温度降低, *HfCIN3* 的相对表达呈现先升高后下降, 其中 5 °C 表达水平显著高于其他温度, 10 和 0 °C 表达水平显著高于 15 °C。*HfCW1N1* 的相对表达量最低值出现在 10 °C, 最高值出现在 0 °C。*HfVIN1* 在 0 °C 表达水平分别是 15、10 和 5 °C 的 2.8 倍、5.7 倍和 2.2 倍 (图 5, B)。

5%或 10% PEG6000 处理 24 h 后, *HfCIN3*、*HfVIN1* 的表达水平与对照差异不显著。*HfCW1N1* 的表达水平显著低于对照 (图 5, C)。

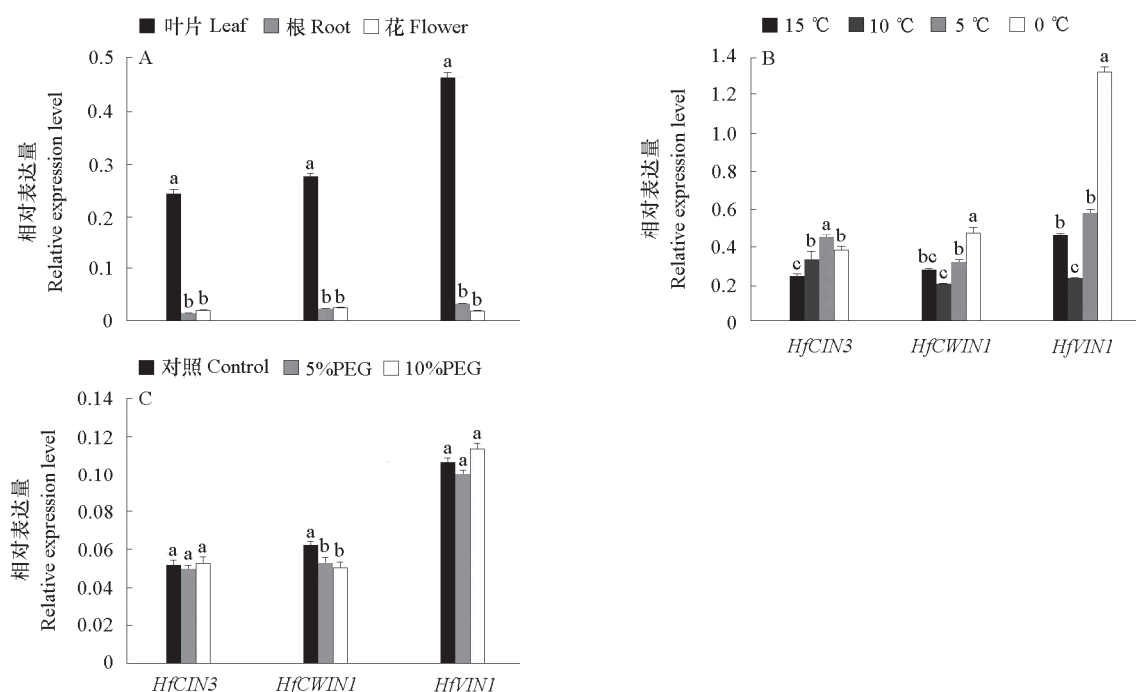


图 5 萱草转化酶在不同组织和低温及渗透胁迫下的基因表达变化

不同小写字母表示相同基因不同处理间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Expression of daylily invertase genes in different tissues and under low temperature or osmotic stress. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments for the same gene ($P < 0.05$).

2.5 不同组织和不同处理后转化酶活性的变化

根中 CWIN 和 VIN 的活性均显著低于叶片和花; 叶片中 CIN 活性显著高于花和根, 而花中 CWIN 和 VIN 显著高于叶片和根 (图 6, A)。随着温度降低, 叶片中 CIN 整体呈下降趋势, CWIN 先升高后降低, 而 VIN 先下降后升高再下降 (图 6, B)。5%PEG 或 10%PEG 处理后, VIN 活性显著上升, CWIN、CIN 活性变化不大 (图 6, C)。

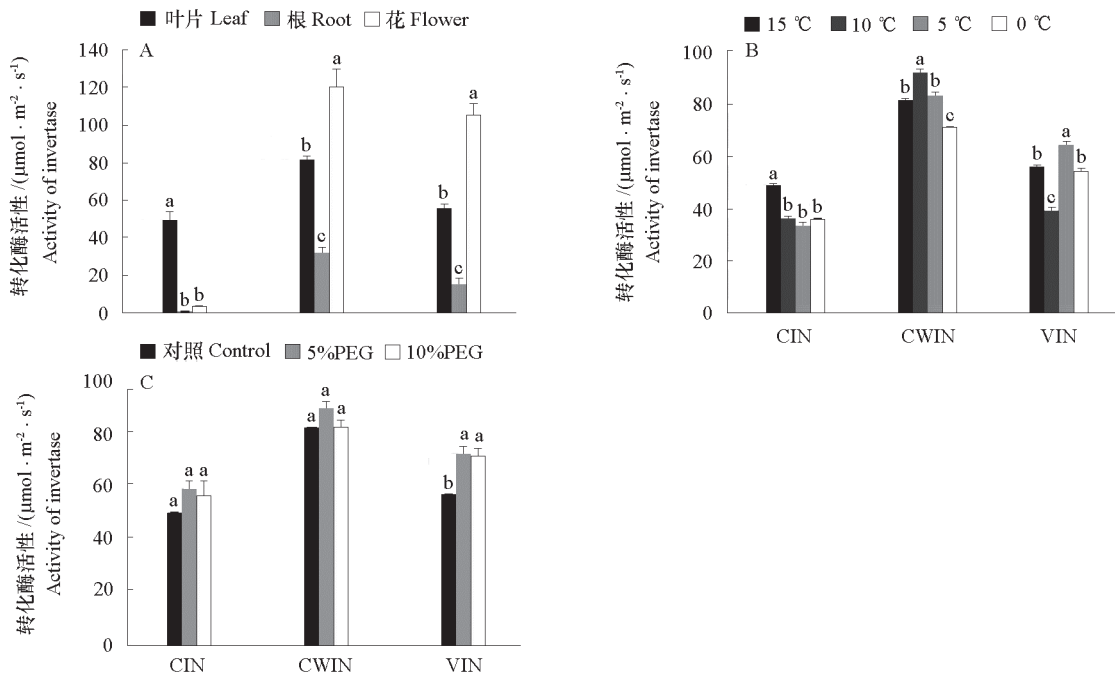


图 6 萱草转化酶在不同组织和低温及渗透胁迫下的酶活性变化

不同小写字母表示相同酶不同处理间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Enzyme activities in different tissues and under low temperature or osmotic stress

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments for the same enzyme ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究中从‘Athlone’萱草叶片中分离到 3 种类型的转化酶基因 *HfCIN3*、*HfCWIN1*、*HfVIN1*，序列分析显示，其编码蛋白氨基酸序列相似性只有 18.81% ~ 41.86%，其中，*HfCIN3* 与其他两个基因相似性均较低，在系统进化分析中也显示 *HfCIN3* 编码蛋白与其他两类转化酶相距较远。Wan 等 (2018) 分析认为 CIN 和其他两种转化酶的结构上不相关，可能在进化过程中经历了不同模式。CWIN、VIN 均为酸性转化酶，研究显示，VIN 很有可能是从 CWIN 进化而来的，N 端信号肽的改变使其靶向信号发生改变从而导致亚细胞定位和功能的不同 (Ji et al., 2005; Wan et al., 2018)。本研究结果也显示了相似的进化关系，在系统进化树的分支中，CWIN 和 VIN 属于同一个分支下，而与 CIN 在不同分支，也证实了同一物种中不同类型的转化酶氨基酸序列差异较大，而不同物种同种类型的转化酶序列具有较高的保守性 (Ruan, 2014)。

植物酸性转化酶属于 GH32 家族，中性/碱性转化酶属于 GH100 家族，本研究中克隆到的‘Athlone’萱草 3 种类型转化酶与其他植物转化酶相似，具有典型的多个相对保守结构域或特征 motif (如酸性转化酶特征序列 NDPNG、FRDP) (Farci et al., 2016)。HfCWIN1 含有 1 个与细胞壁糖分子识别有关的 Malectin 结构域，其可识别细胞壁相关多糖 (Xiao et al., 2019)。HfCIN3 蛋白质含有 β -fructofuranosidase 结构域，可以水解末端非还原 β -D-呋喃果糖苷。HfVIN1 含有 1 个典型的跨膜结构 (34 ~ 53)，该结构可以协助蛋白质固定在液泡膜上 (Farci et al., 2016)。研究表明，CWIN 和 VIN (酸性转化酶) 属于糖基化蛋白，具有相似的酶学特性，能催化水解蔗糖、水苏糖和棉子糖等，而中性/碱性转化酶是单纯蛋白质，特异水解蔗糖 (Wan et al., 2018)。糖基化对蛋白起

重要的修饰作用，可通过糖基化调节蛋白质功能，SDS-PAGE 和糖蛋白染色分析显示蔷薇液泡转化酶 RhVII 具有糖基化表征 (Farci et al., 2016)。本研究中 HfCWIN1 和 HfVIN1 同时存在 *N*-糖基化位点和 *O*- β -GlcNAc 糖基化位点，而 HfCIN3 仅有 *O*- β -GlcNAc 糖基化位点。*N*-糖基化参与蛋白质的稳定性和溶解性，对细胞膜和液泡膜的跨膜运输过程起重要作用，而 *O*- β -GlcNAc 糖基化参与蛋白质的稳定性和折叠，HfCIN3 缺少 *N*-糖基化位点也在一定程度上解释了其稳定性较另外两种转化酶低的原因。

不同类型转化酶独特的亚细胞定位与其生理作用有关。韧皮部卸载的蔗糖通过质外体途径或胞间连丝进入库细胞中，被以离子键形式结合于细胞壁上的 CWIN 水解成葡萄糖和果糖 (CWIN 可以协调韧皮部到质外体的蔗糖浓度梯度)，葡萄糖和果糖通过己糖转运蛋白进入细胞质；而以胞间连丝进入细胞的蔗糖由 CIN 或蔗糖合成酶水解；进入液泡的蔗糖则由 VIN 水解 (Wan et al., 2018)。本研究也证实了萱草 3 种类型转化酶亚细胞定位的差异，为进一步研究其功能及作用机制奠定了基础。HfCWIN1 在细胞壁和次生壁上均有表达，且在保卫细胞中也观察到明显表达信号。蔗糖在保卫细胞中具有渗透调节作用，转录组表达分析显示，与叶肉细胞相比较，保卫细胞中存在高表达蔗糖和己糖转运蛋白以及 SuSy、转化酶，蔗糖磷酸合成酶等基因 (Daloso et al., 2016)。本研究中首次通过亚细胞定位找到了转化酶在保卫细胞中表达的直接证据，为进一步研究蔗糖在保卫细胞中的功能和气孔开闭中的调节作用奠定了基础。保卫细胞与蒸腾作用直接相关，保卫细胞中碳水化合物的变化也显著影响细胞膨压的变化，HfCWIN1 在保卫细胞中的高表达提示蔗糖的水解与蒸腾作用也直接相关，为抗旱研究提供了启示。HfCIN3 主要在叶绿体中表达，与拟南芥等的研究结果一致，可能与碳水化合物的平衡有关 (Vargas et al., 2007)。HfVIN1 在液泡中表达，VIN 起着调节植物组织中糖的积累和液泡中蔗糖利用的作用。

不同类型转化酶在根、花、果实、种子等不同组织中有时空特性，VIN 可能通过渗透压调节来调节细胞扩张因此在快速生长组织中通常有较高 VIN 水平；在库组织中 CWIN 将蔗糖水解为己糖，胞外己糖的进入作为信号分子调控细胞的分裂和分化；CIN 在根或花粉组织中活性较高，但是不同植物中的表达情况存在差异 (Ruan, 2014; Dahro et al., 2016; Wan et al., 2018)。本研究中，‘Athlone’萱草 HfCIN3、HfCWIN1、HfVIN1 在叶片中的表达量显著高于根和花，叶片中 HfVIN1 的表达显著高于其他两个基因，而在不同组织中 CIN 酶活性与 HfCIN3 基因表达结果基本一致，其他两种酶与基因表达不同步，CWIN 和 VIN 在花中的酶活性显著高于叶片和根。叶片是光合作用的主要场所，不仅需要保持自身的生长还要为其他器官提供碳源，较高转化酶表达水平调节细胞内的糖水平并维持细胞渗透压有助于维持其代谢水平。花是库组织，需要消耗较多能量物质，较高的酸性转化酶活性为其提供可溶性糖维持呼吸消耗和渗透压。本研究只涉及 3 种类型转化酶中的一个成员，不同类型转化酶基因可能有多个成员，不同成员的时空表达特性及其对酶活性的贡献、翻译后调节机制对其酶活性的影响有待进一步研究比较。

CIN 是中性或碱性转化酶，位于细胞质中。茶树叶片在低温、盐或 15% PEG 处理 1 d 后，中性/碱性转化酶基因 *CsINV10* 的表达量高于对照，并随处理时间延长逐渐升高 (钱文俊 等, 2016)。甘蔗叶中中性/碱性转化酶基因 *SoNINI* 表达量在 15% PEG 处理 24 h 内出现先下降 (6 h) 后升高 (12 h) 之后又下降到较低水平 (24 h)，而根中 *SoNINI* 表达量则持续上升 (牛俊奇 等, 2014)。本研究中，随着温度降低萱草叶片中 CIN 酶活性整体呈下降趋势，而 HfCIN3 基因表达则先上升后下降，PEG 处理 (24 h) 对 CIN 活性和基因表达均无显著影响。萱草中的研究结果与甘蔗或茶树不一致，且酶活性变化明显滞后于基因表达。植物 CIN 较不稳定，可能在植物发育过程中起作用，也可能参与生

物胁迫响应, 但是其机制尚不清楚 (Ruan, 2014)。本研究中 CIN 在低温时基因表达先上升后下降而酶活性下调且对渗透胁迫不响应, 是否与渗透压、糖水平或糖信号有关需要进一步研究。

CWIN 是不溶性蛋白, 以离子键形式结合于细胞壁上, 不可逆催化质外体途径中的蔗糖水解, 以保证韧皮部到质外体的蔗糖浓度梯度。本研究中, 随着温度降低 ‘Athlone’ 萱草 *HfCWINI* 基因表达先下降后升高, 而 CWIN 酶活性先升高后降低; PEG 处理后 *HfCWINI* 基因表达下降, 而 CWIN 酶活性无显著变化。甘蔗 CWIN 酶活性在低温和 PEG 处理后均下降, 而 6 个 CWIN 基因中的 4 个成员在低温或 PEG 处理后表达上升、2 个 CWIN 基因表达下降 (Wang et al., 2017)。本研究中 PEG 处理后 *HfCWINI* 表达下调可能与其在特定亚细胞分布有关, 通过调节细胞内的蔗糖浓度并与糖信号相互联系以适应渗透胁迫。

VIN 与 CWIN 具有相似的酶学特性, 也是酸性转化酶, 特异水解进入液泡中的蔗糖。在拟南芥中过量表达茶树液泡转化酶基因 *CsINV5*, 可调节渗透势, 从而提高了转基因植株的耐寒性 (Xu et al., 2017; Qian et al., 2018)。本研究中, 随着温度降低 *HfVINI* 基因表达及 VIN 酶活性先下降后升高, PEG 可以诱导 VIN 酶活性上升但是对 *HfVINI* 表达无显著影响。从本研究的结果可初步推断 VIN 在低温响应中起主导作用。低温下植物需要更多的转化酶来将蔗糖分解成己糖, 从而为细胞提供更多的能量来维持增加的呼吸消耗, 并增强对低温胁迫的抵抗力, VIN 可水解液泡中贮存的蔗糖供组织利用, 基因表达上调可以应对胁迫下蔗糖分解的需要。

本研究的结果显示, 低温和渗透胁迫处理后酶活性与基因表达有相似趋势但也有不一致, 推测基因转录水平及转录后修饰和翻译后修饰对其功能起重要作用。近几年的研究发现, 转录因子参与糖代谢酶的调控 (Chen et al., 2016; Liu et al., 2019), 如 *MeABL5* (bZIP 转录因子家族) 是细胞壁转化酶 *MeCWININV3* 的正调控因子, *MeABL5* 可以与 *MeCWININV3* 启动子区域 ABRE *cis* 反式作用元件特异结合; 过量表达 *MeABL5* 上调了木薯 *MeCWININV3* 基因表达及相应的酶活性, 并显著响应胁迫 (Liu et al., 2019)。进一步研究转化酶基因转录水平和转录后水平调控机制将为揭示糖代谢提供更多理论依据, 为深入研究萱草逆境胁迫生理及分子机理奠定基础。

References

- Chen Y S, Chao Y C, Tseng T W, Huang C K, Lo P C, Lu C A. 2016. Two MYB-related transcription factors play opposite roles in sugar signaling in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 93 (3): 299 - 311.
- Dahro B, Wang F, Peng T, Liu J H. 2016. *PtraNINV*, 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.
- Daloso D M, dos Anjos L, Fernie A R. 2016. Roles of sucrose in guard cell regulation. *New Phytologist*, 211 (3): 809 - 818.
- Farci D, Collu G, Kirkpatrick J, Esposito F, Piano D. 2016. RhVII is a membrane-anchored vacuolar invertase highly expressed in *Rosa hybrida* L. petals. *Journal of Experimental Botany*, 67 (11): 3303 - 3312.
- Gao Jin, Zeng Guiping, Song Lisha, Zhao Zhi, Li Zhong. 2020. Identification and biological characteristics of pathogen causing leaf spot disease of *Hemerocallis fulva*. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (1): 169 - 178. (in Chinese)
- 高晋, 曾桂萍, 宋莉莎, 赵致, 李忠. 2020. 萱草叶斑病的病原鉴定及其生物学特性. *园艺学报*, 47 (1): 169 - 178.
- Gasic K, Hernandez A, Korban S S. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22 (4): 437 - 438.
- Ji X, Van den Ende W, Van Laere A, Cheng S, Bennett J. 2005. Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice. *Journal of Molecular Evolution*, 60 (5): 615 - 634.
- Li D, Xia Y, Lou J, Zhang D, Wang X, Zhang J. 2020. A comparative study between evergreen and deciduous daylily species reveals the potential contributions of winter shoot growth and leaf freezing tolerance to foliar habits. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39 (3): 1030 - 1045.
- Liu Y H, Offler C E, Ruan Y L. 2016. Cell wall invertase promotes fruit set under heat stress by suppressing ROS-independent cell death. *Plant*

- Physiology, 172: 163 - 180.
- Liu J, Chen X, Wang S, Wang Y, Ouyang Y, Yao Y, Li R, Fu S, Hu X, Guo J. 2019. *MeABL5*, an ABA insensitive 5-like basic leucine zipper transcription factor, positively regulates *MeCWINV3* in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Frontiers in Plant Science*, 10: 772.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Morey S R, Hirose T, Hashida Y, Miyao A, Hirochika H, Ohsugi R, Yamagishi J, Aoki N. 2019. Characterisation of a rice vacuolar invertase isoform, *OsINV2*, for growth and yield-related traits. *Functional Plant Biology*, 46 (8): 777 - 785.
- 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 *SoNINI*. *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 *SoNINI* 的克隆和表达分析. *作物学报*, 40 (2): 253 - 263.
- 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.
- Qian W, Xiao B, Wang L, Hao X, Yue C, Cao H, Wang Y, Li N, Yu Y, Zeng J, Yang Y, Wang X. 2018. *CsINV5*, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 18: 228.
- Ru L, Osorio S, Wang L, Fernie A R, Patrick J W, Ruan Y L. 2017. Transcriptomic and metabolomics responses to elevated cell wall invertase activity during tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany*, 68 (15): 4263 - 4279.
- Ruan Y L, Jin Y, Yang Y J, Li G J, Boyer J S. 2010. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, 3, 942 - 955.
- Ruan Y L. 2012. Signaling role of sucrose metabolism in development. *Molecular Plant*, 5: 763 - 765.
- Ruan Y L. 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65 (1): 33 - 67.
- Sparkes I A, Runions J, Kearns A, Hawes C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, 1 (4): 2019 - 2025.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology & Evolution*, 28 (10): 2731 - 2739.
- Vargas W A, Pontis H G, Salerno G L. 2007. Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves. *Planta*, 226 (6): 1535 - 1545.
- Wan H, Wu L, Yang Y, Zhou G, Ruan Y L. 2018. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond. *Trends in Plant Science*, 23 (2): 163 - 177.
- Wang L, Zheng Y, Ding S, Zhang Q, Chen Y, Zhang J. 2017. Molecular cloning, structure, phylogeny and expression analysis of the invertase gene family in sugarcane. *BMC Plant Biology*, 17 (1): 109.
- Wei Qingjiang, Ma Zhangzheng, Le Si, Lei Changyu, Ma Qiaoli, Gu Qingqing. 2020. Identification and expression analysis of sucrose-phosphate synthase (SPS) genes in citrus. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (2): 334 - 344. (in Chinese)
魏清江, 马张正, 勒思, 雷常玉, 马巧利, 辜青青. 2020. 柑橘磷酸蔗糖合酶基因 *CsSPS* 的鉴定和表达. *园艺学报*, 47 (2): 334 - 344.
- Xiao Y, Stegmann M, Han Z, DeFalco TA, Parys K, Xu L, Belkhadir Y, Zipfel C, Chai J. 2019. Mechanisms of RALF peptide perception by a heterotypic receptor complex. *Nature*, 572: 270 - 274.
- Xu X X, Hu Q, Yang W N, Jin Y. 2017. The roles of cell wall invertase inhibitor in regulating chilling tolerance in tomato. *BMC Plant Biology*, 17: 195.
- Yan W, Wu X, Li Y, Liu G, Cui Z, Jiang T, Ma Q, Luo L, Zhang P. 2019. Cell Wall Invertase 3 affects cassava productivity via regulating sugar allocation from source to sink. *Frontiers in Plant Science*, 10: 541.
- Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2: 1565 - 1572.
- Zhu J, Qi J, Fang Y, Xiao X, Li J, Lan J, Tang C. 2018. Characterization of sugar contents and sucrose metabolizing enzymes in developing leaves of *Hevea brasiliensis*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 58.