

• 农业生物技术 •

甘薯蔗糖转运蛋白的功能分析

刘怡然^{1,2}, 吴正丹^{1,2,4}, 吴维泰^{1,2}, 杨朝彬^{1,2}, 陈才睿^{1,2}, 张凯^{1,2,3*}

1 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715

2 薯类生物学与遗传育种重庆市重点实验室, 重庆 400715

3 南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400715

4 广西壮族自治区农业科学院经济作物研究所, 广西 南宁 530007

刘怡然, 吴正丹, 吴维泰, 杨朝彬, 陈才睿, 张凯. 甘薯蔗糖转运蛋白的功能分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2772-2793.

LIU Yiran, WU Zhengdan, WU Weitai, YANG Chaobin, CHEN Cairui, ZHANG Kai. Functional analysis on sucrose transporters in sweet potato[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2772-2793.

摘 要: 甘薯(*Ipomoea batatas*)是重要的粮食和工业加工原料作物。蔗糖是植物体内碳水化合物长距离转运的主要形式, 蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, SUT)在植物的生长代谢中调控蔗糖的跨膜运输和分配, 在韧皮部介导的源-库蔗糖运输和为库组织供应蔗糖的生理活动中起关键作用。本研究根据不同淀粉性状甘薯块根中差异表达的 2 个 SUT 基因转录本, 进行 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆, 获得 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 的全长 cDNA 序列; 通过系统发育分析明确其分类; 通过在本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)中瞬时表达明确其亚细胞定位; 通过酵母功能互补系统鉴定 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 是否具有吸收、转运蔗糖和己糖的能力。通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)分析 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 在甘薯各器官中的表达特征; 通过蘸花法得到外源表达 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 基因的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株, 比较与野生型拟南芥的淀粉和糖含量的差异。结果表明, *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 分别编码 505 个和 521 个氨基酸的 SUT 蛋白, 均属于 SUT1 亚家族。*IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 均定位于细胞膜, 在酵母系统中具有转运蔗糖、葡萄糖和果糖的能力。此外, *IbSUT₆₂₇₈₈* 还具有转运甘露糖的能力。*IbSUT₆₂₇₈₈* 在甘薯叶片、侧枝和茎中的表达量更高, *IbSUT₈₁₆₁₆* 在侧枝、茎和块根中表达量更高。*IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 在拟南芥中异源表达后, 植株可以正常生长, 但生物量增加。*IbSUT₆₂₇₈₈* 的异源表达增加了拟南芥植株叶片可溶性糖含量、叶片大小和种子千粒重; *IbSUT₈₁₆₁₆* 的异源表达增加了拟南芥植株叶片、根尖的淀粉积累量和种子千粒

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD1000705, 2018YFD1000700); 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2020B032, XDJK2021F001); 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(cstc2021jscx-gksbX0022); 西南大学种质创制专项研究项目
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD1000705, 2018YFD1000700), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2020B032, XDJK2021F001), the Technology Innovation Fund of Chongqing (cstc2021jscx-gksbX0022), and the Germplasm Creation Research Program of Southwest University.

*Corresponding author. E-mail: zhangkai2010s@163.com

Received: 2022-12-06; Accepted: 2023-02-14; Published online: 2023-02-16

重,但减少了可溶性糖含量。本研究结果表明,*IbSUT*₆₂₇₈₈和*IbSUT*₈₁₆₁₆可能是调控甘薯蔗糖和糖含量性状的重要基因,在细胞膜上进行着蔗糖的跨膜运输、蔗糖进出库组织、韧皮部蔗糖的运输与卸载等生理功能,在拟南芥中异源表达造成的性状改变说明其在提高其他植物或作物产量中的应用潜力。本研究为揭示甘薯淀粉和糖代谢及重要品质性状形成机制提供了重要信息。

关键词:甘薯;蔗糖转运蛋白;可溶性糖;淀粉

Functional analysis on sucrose transporters in sweet potato

LIU Yiran^{1,2}, WU Zhengdan^{1,2,4}, WU Weitai^{1,2}, YANG Chaobin^{1,2}, CHEN Cairui^{1,2}, ZHANG Kai^{1,2,3*}

1 College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Key Laboratory of Biology and Genetic Breeding for Tuber and Root Crops, Chongqing 400715, China

3 Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Chongqing 400715, China

4 Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: Sweet potato is an important food crop that can also be used as an industrial raw material. Sucrose is the main form of long-distance carbohydrate transport in plants, and sucrose transporter (SUT) regulates the transmembrane transport and distribution of sucrose during plant growth and metabolism. Moreover, SUT plays a key role in phloem mediated source-to-sink sucrose transport and physiological activities, supplying sucrose for the sink tissues. In this study, the full-length cDNA sequences of *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) cloning according to the transcripts of the two SUT coding genes which were differentially expressed in sweet potato storage roots with different starch properties. Phylogenetic analysis was performed to clarify the classification of *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆. The subcellular localization of *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ was determined by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. The function of *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ in sucrose and hexose absorption and transport was identified using yeast functional complementarity system. The expression pattern of *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ in sweet potato organs were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). *Arabidopsis* plants heterologous expressing *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ genes were obtained using floral dip method. The differences in starch and sugar contents between transgenic and wild-type *Arabidopsis* were compared. The results showed *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ encoded SUT proteins with a length of 505 and 521 amino acids, respectively, and both proteins belonged to the SUT1 subfamily. *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ were located in the cell membrane and were able to transport sucrose, glucose and fructose in the yeast system. In addition, *IbSUT*₆₂₇₈₈ was also able to transport mannose. The expression of *IbSUT*₆₂₇₈₈ was higher in leaves, lateral branches and main stems, and the expression of *IbSUT*₈₁₆₁₆ was higher in lateral branches, stems and storage roots. After *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ were heterologously expressed in *Arabidopsis*, the plants grew normally, but the biomass increased. The heterologous expression of *IbSUT*₆₂₇₈₈ increased the soluble sugar content, leaf size and 1 000-seed weight of *Arabidopsis* plants. Heterologous

expression of *IbSUT*₈₁₆₁₆ increased starch accumulation in leaves and root tips and 1 000-seed weight of seeds, but decreased soluble sugar content. The results obtained in this study showed that *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ might be important genes regulating sucrose and sugar content traits in sweet potato. They might carry out physiological functions on cell membrane, such as transmembrane transport of sucrose, sucrose into and out of sink tissue, as well as transport and unloading of sucrose into phloem. The changes in traits result from their heterologous expression in *Arabidopsis* indicates their potential in improving the yield of other plants or crops. The results obtained in this study provide important information for revealing the functions of *IbSUT*₆₂₇₈₈ and *IbSUT*₈₁₆₁₆ in starch and glucose metabolism and formation mechanism of important quality traits in sweet potato.

Keywords: sweet potato (*Ipomoea batatas*); sucrose transporter; soluble sugar; starch

甘薯(*Ipomoea batatas*)又名地瓜、红薯等,富含多种营养成分,且具有耐旱、耐贫瘠、适应性广、抗逆性强、高产等优点,是重要的粮食、蔬菜、饲料和加工原料作物^[1]。近年来,随着加工水平的提高,薯块、粉条、紫薯粉、紫薯糕点等多种特色甘薯加工产品被开发出来,大大提高了甘薯的经济价值。甘薯块根富含淀粉,使其成为重要的食品工业和淀粉加工工业的重要原料,以及燃料乙醇工业的重要原料和生物能源发展的优势作物,也是当前我国最具开发前景的能源作物之一^[2-3]。淀粉含量是决定其品质和加工属性的重要因素之一,是评价甘薯品质的重要指标之一^[4]。可溶性糖是反映生薯甜度和熟薯食味的重要指标,是影响甘薯块根食用品质及加工性能的重要组分^[5]。但是迄今为止,甘薯淀粉和糖性状的形成和调控机制尚不明确。

在高等植物中,淀粉积累受到蔗糖转运、蔗糖和淀粉的转化、淀粉的合成和分解等途径的影响。蔗糖是光合作用产生的主要产物^[6],除了部分维持光合组织自身的代谢外,大部分通过韧皮部长距离运输到其他组织进行代谢或储存^[7]。蔗糖是植物储藏、积累和运输糖分的主要形式^[8],为植物生长发育提供碳架与能量,同时还参与植物对逆境(如寒害和干旱等)的应答防御、生长发育、信号转导等多个生理过程,作为信号分子参

与调控植物体内同化产物的转运效率与分配^[9]。

蔗糖由源向库的长距离运输是通过韧皮部进行的,韧皮部内伴胞和筛管分子是完成有机物输送的主要细胞结构。蔗糖进入筛管分子是一个逆浓度梯度进行的过程^[10],这种逆浓度梯度的运输主要通过共质体途径、质外体途径两种途径进行。质外体转运途径由细胞膜和液泡膜上的特异载体-蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, SUT)介导和能量驱动^[11]。SUT作为植物所特有的一类载体蛋白,在蔗糖进出韧皮部、库组织蔗糖供给、蔗糖贮藏、蔗糖转运调控以及其他小分子物质转运等多种生理功能中发挥重要作用^[12]。因此,对甘薯中SUT进行功能研究,对于揭示甘薯淀粉积累和糖代谢的分子机理,加速甘薯淀粉和糖性状品质改良与分子育种至关重要。

植物SUT属于典型的跨膜结合蛋白^[11],含有12个结构保守的跨膜结构域;序列中部,亲水胞质环将整个蛋白分为各含6个跨膜结构域的两部分^[13]。亲水胞质环面向胞质,同时伸展的N端序列也定位于胞质^[14]。植物SUT属于易化扩散载体超家族(major facilitator superfamily, MFS)糖转运家族的一个亚家族^[15]。MFS家族是一个古老的基因家族^[16],在植物体中,MFS家族有100多个成员,编码各种代谢物和糖类的共

转运载体^[12]；其主要定位在细胞膜和液泡膜上，主要负责介导蔗糖在植物体内的跨膜运输。人们分离并得到的第一个 SUT 编码基因是从菠菜(*Spinacia oleracea*)中分离的^[17]，现在已经有越来越多的 SUT 基因被分离并进行功能鉴定。Bürkle 等^[18]在烟草中发现了 *NtSUT1*，该基因在成熟叶片中高度表达，而在其他组织中的表达量较低。洪海强^[19]发现 *OsSUT2* 和 *OsSUT5* 对水稻(*Oryza sativa*)灌浆等具有不同的调控功能。张雅文等^[20]发现 *OsSUT5* 在水稻花粉发育甚至受精过程中可能发挥重要作用，敲除 *OsSUT5* 对水稻的结实率、籽粒的形态和品质有明显影响，从而推断 *OsSUT5* 在水稻开花结实中的作用与其蔗糖运输功能密切相关。Milne 等^[21]研究表明，在高粱(*Sorghum bicolor*)中，*SbSUT1* 在源和库中都能被检测到，*SbSUT2* 存在于所有组织中，*SbSUT4* 存在于成熟的叶子中，*SbSUT5* 在茎中表达，*SbSUT6* 在植株生长时期的叶片的源和库中表达。甘薯中，Li 等^[6]揭示了 2 种甘薯 *IbSUT2* 蛋白(*IbSUT2x* 和 *IbSUT2y*)在酿酒酵母中表现出蔗糖摄取活性，而 2 种 *IbSUT1* 蛋白(*IbSUT1x* 和 *IbSUT1y*)未表现这种活性；*IbSUT1* 主要在库叶中表达，而 *IbSUT2* 在源叶中表达最强。王丹丹^[22]揭示了甘薯 *IbSUT3* 基因编码有功能的蔗糖转运蛋白，亚细胞定位在烟草原生质体膜上，且 *IbSUT3* 基因在甘薯不同组织中均有表达。

目前对于甘薯 SUT 的研究仍较少，甘薯 SUT 编码基因在淀粉积累和糖转运中的功能尚不清楚。前期研究发现，2 个蔗糖转运蛋白编码基因在不同淀粉和糖性状的甘薯品种之间存在差异表达，可能参与甘薯块根淀粉和糖性状的调控^[23]。本研究对这 2 个基因进行了克隆和表达模式分析，对其编码蛋白的亚细胞定位和糖转运功能进行了分析，并通过在拟南芥中的异

源表达，试图揭示 2 个 SUT 编码基因在甘薯块根淀粉积累和糖转运中的功能，为植物蔗糖转运蛋白的功能挖掘及利用奠定基础。研究结果可为揭示甘薯淀粉和糖性状的形成和调控机制，培育高产、优质甘薯新种质提供信息。

1 材料与方法

1.1 植物材料

高淀粉含量甘薯(*Ipomoea batatas*)品种渝薯 33，中淀粉含量品种徐薯 22、绵粉 1 号，低淀粉含量甘薯品种豫薯 10 号种植于重庆市北碚区西南大学农学与生物科技学院甘薯实验基地温室中；野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Col-0、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种植于薯类生物学与遗传育种重庆市重点实验室恒温植物培养室。

1.2 方法

1.2.1 甘薯 SUT 基因的克隆

(1) 甘薯材料总 RNA 的提取。取甘薯品种徐薯 22 移栽后 65、80、95、110 和 125 d 的块根、叶、主茎、侧枝等组织器官，液氮速冻，-80 °C 保存。甘薯块根 RNA 提取方法参照天根生化科技(北京)有限公司 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒说明书进行，甘薯叶、侧枝、主茎 RNA 提取方法参照 RNAlplant Plus 植物总 RNA 提取试剂说明书进行。

(2) 引物设计。根据 RNA-seq 筛选获得的在不同淀粉和糖性状的甘薯品种发育过程中的块根中有差异表达的候选 SUT 编码基因 unigene 序列 comp62788_c0_seq1 (本研究中命名为 *IbSUT₆₂₇₈₈*)和 comp81616_c0_seq1 (本研究中命名为 *IbSUT₈₁₆₁₆*)^[23]，结合在甘薯基因组和转录组数据中的筛查结果，使用 Primer Premier 7.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 特异引物和巢扩引物。本研究所用引物信息如表 1 所示。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
62788-5-1	TAAAGGGGCGGCGGCGACCGAAACG	25
62788-5-2	GGACGCCACCATTACTATCTTCC	23
62788-3-1	GCTGGCGCTGGACAAGGCCTCTCCT	25
62788-3-2	CGAAGGTTGAGCTATCTGGTGGT	23
81616-5-1	GCTCGCTGACCGTGCTCAAGGCC	23
81616-5-2	AGAGCCGCGGAGATGAAGAAA	21
81616-3-1	CCAGTAGCACCGGCTCCGGCCAAGGT	26
81616-3-2	ATTTGGGGGTGGGAATTTGCCAG	23
C62788-5	ATACAATGTTGGTTCTCTATATATT	25
C62788-3	CAAAATCATATCCCTTTTG	19
C81616-5	CCACAAAATCCTCTCACTACACTTTGTATG	30
C81616-3	TGCTTTGCTTGAAATAAGTTAACATCTCAC	30
SC62788-Fwd	GGTACCATGGAGAGAGACTCCG	22
SC62788-Rev	TCTAGAGTGGAAACCACCACCAG	23
SC81616-Fwd	GGTACCATGGAGAACGGTGCCATG	24
SC81616-Rev	TCTAGAATGGAAAGCAGCCACAGG	24
SI62788-Fwd	TCGACTAGTGGATCCATGGAGAGAGACTCCGTAA	35
SI62788-Rev	TCCAAAGCTGGATCCGTGGAAACCACCACCAGATA	35
SI81616-Fwd	TCGACTAGTGGATCCATGGAGAACGGTGCCATGAA	35
SI81616-Rev	TCCAAAGCTGGATCCATGGAAAGCAGCCACAGGGA	35
TSUT62788-Fwd	CACCATGGAGAGAGACTCCGTAA	24
TSUT62788-Rev	GTGGAAACCACCACCAGATAGCT	23
TSUT81616-Fwd	CACCATGGAGAACGGTGCCATGA	23
TSUT81616-Rev	ATGGAAAGCAGCCACAGGGAC	21
IbH2B-QF	GTGCCGAGACAAGAAGAAG	20
IbH2B-QR	CTTGCTGGAGATTCCGATGT	20
IbUBI-QF	CTTGCTGGAGATTCCGATGT	20
IbUBI-QR	CTTGATCTTCTTCGGCTTGG	20
AtACTIN-QF	ACACTGTGCCAATCTACGAGGGTT	24
AtACTIN-QR	ACAATTTCCTCGCTCTGCTGTTGTG	24
QIbSUT62788-Fwd	AGGGCGACGAGATGAAGAAGCA	23
QIbSUT62788-Rev	AATGCGAGCGTCAAACGCACTCT	23
QIbSUT81616-Fwd	GTTTTTCGTCGCCGGCTTCTGGAT	23
QIbSUT81616-Rev	GTCGCAGGCTTTCGTCTTCGTGA	23
Fbar	CGACATCCGCCGTGCCACCGA	21
Rbar	GTACCGGCAGGCTGAAGTCCAGC	23

(3) RACE 扩增候选基因。以提取的甘薯叶、侧枝、主茎、块根总 RNA 为模板, 根据 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书操作反转录合成 RACE cDNA 第一链。以 RACE cDNA 为模板, 分别扩增候选基因的完整 cDNA 的 5'端和 3'端未知序列。使用引物 62788-5-1 和 62788-5-2 扩增 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因的 5'末端, 使用引物 62788-3-1 和 62788-3-2 扩增 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因的 3'末端。PCR 反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。使用同样方法扩增 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因。

回收目的片段, 并将目的片段连接至 pEASY-T5 Zero Cloning Vector, 其中 T 载体 (pEASY-T5 Zero Cloning Kit) 购自北京全式金生物技术有限公司。将目的片段转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

(4) 候选基因全长 cDNA 序列扩增。分析上述 RACE 测序结果, 使用 Primer Premier 7.0 软件设计各基因的全长引物。以甘薯品种徐薯 22 叶、侧枝、主茎、块根总 RNA 为模板, 按实验 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书操作, 反转录生成 cDNA。以甘薯总 cDNA 为模板, 使用引物组合 C62788-5 和 C62788-3, 以及引物组合 C81616-5 和 C81616-3, 扩增各候选基因的全长 cDNA 序列。PCR 扩增的反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。回收目的片段, 连接 pEASY-T5 Zero 载体并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 生物信息学分析

利用软件 Geneious 4.8.5 分析 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因的开放阅读框。通过软件

DNAMAN 进行蛋白序列比对, 计算基因、蛋白间序列一致程度。采用 MEGA 7.0 软件进行蛋白多序列比对, 并通过邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树。通过 NCBI 数据库的 BLASTP 工具对 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 全长 cDNA 序列编码的氨基酸序列进行结构分析, 然后通过 TMHMM 2.0 网站进行 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 蛋白跨膜结构域的预测。

1.2.3 亚细胞定位

根据 pCAMBIA1300-GFP 载体的多克隆位点和 *IbSUT*₆₂₇₈₈、*IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因的编码序列 (coding sequence, CDS) 序列, 使用 Primer Premier 7.0 软件设计包含酶切位点的引物。以绵粉 1 号移栽后 95 d 块根 cDNA 为模板, 分别使用引物组合 SCSUT₆₂₇₈₈-Fwd 和 SCSUT₆₂₇₈₈-Rev, 以及引物组合 SCSUT₈₁₆₁₆-Fwd 和 SCSUT₈₁₆₁₆-Rev, 分别扩增 2 个基因的 CDS 序列。然后连接 pEASY-T5 Zero 载体并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选 pEASY-T5 Zero-gene 载体转化阳性克隆。以 *Sac* I 和 *Bam* H I 作为双酶切位点, 采取无缝克隆法构建融合表达载体 pCAMBIA1300-*IbSUT*₆₂₇₈₈-GFP 和 pCAMBIA1300-*IbSUT*₈₁₆₁₆-GFP。将构建好的融合表达载体质粒转化农杆菌菌株 GV3101 感受态细胞。

将上述载体和 pCAMBIA1300-GFP 空载体的农杆菌细胞悬浮液分别与融合了 mCherry 的质膜定位标记基因共注射本氏烟草, 在蔡司 LSM800 激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。GFP 激发光波长 488 nm, 发射光波长 505–530 nm, RFP 激发光波长 543 nm, 发射光波长 560–615 nm^[24]。

1.2.4 表达模式分析

为了鉴定 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因的组织表达模式, 分别取甘薯品种徐薯 22、豫薯 10 号和渝薯 33 移栽后 65–125 d 的叶、主茎、侧枝和块根, 在荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96™

Optics Module, 785BR06729)上进行实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测。内参基因选用甘薯泛素(UBI)和组蛋白(H2B)编码基因^[25], 引物组合分别为 IbH2B-Fwd 和 IbH2B-Rev、引物组合 IbUBI-Fwd 和 IbUBI-Rev。使用引物组合 QIbSUT₆₂₇₈₈-Fwd 和 QIbSUT₆₂₇₈₈-Rev、引物组合 QIbSUT₈₁₆₁₆-Fwd 和 QIbSUT₈₁₆₁₆-Rev 分别检测 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因的表达量, 根据北京全式金生物技术有限公司 TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒(AQ131-01)说明书配制反应液, 进行 RT-qPCR 实验。PCR 扩增各基因的反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 57 °C 30 s, 共 40 个循环, 熔解曲线 60–95 °C, 增量 0.5 °C。通过熔解温度分析和琼脂糖凝胶电泳检测, 并将 RT-qPCR 产物测序, 以验证 RT-qPCR 产物的特异性。基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析^[26]。每个组织取 3 个生物学重复, 并进行 3 次独立重复试验。

1.2.5 SEY2102/ura3 酵母互补实验

根据 pDR196 载体的多克隆位点和 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 的 CDS 序列, 使用 Primer Premier 7.0 软件设计 5'端包含 *Bam*H I 酶切位点的引物。以绵粉 1 号移栽后 95 d 块根 cDNA 为模板, 分别使用引物组合 SISUT₆₂₇₈₈-Fwd 和 SISUT₆₂₇₈₈-Rev, 以及引物组合 SISUT₈₁₆₁₆-Fwd 和 SISUT₈₁₆₁₆-Rev, 分别扩增 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因完整的编码序列。扩增产物连入空白酵母异源表达载体 pDR196。鉴定并挑选测序正确的阳性克隆质粒命名为 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈ 和 pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆。采用 PEG/LiAc 法将分别将 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈、pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆、pDR196 空载和 pDR196-StSUT1 阳性载体分别转入酵母蔗糖酶缺失突变体 SEY2102/ura3 中。挑选阳性酵母单

克隆分别对应点斑于以蔗糖或葡萄糖为唯一碳源的 SD/-Ura 固体培养基上, 30 °C 培养 3–5 d, 验证 IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 是否具有蔗糖转运功能^[27]。

1.2.6 EB.YVW4000 酵母突变体互补实验

将 1.2.5 节中已构建好阳性克隆质粒 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈、pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆、pDR196 空载与 pDR196-ScHXT5^[28]阳性对照载体分别转化己糖运输缺陷型酵母 EB.YVW4000^[29]菌株, 采用高婧芳等^[30]的方法, 验证 IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 是否具有己糖转运功能。

1.2.7 候选基因在拟南芥的异源表达

以绵粉 1 号移栽后 95 d 的块根 cDNA 为模板, 根据 Gateway 技术引物设计原则和 *IbSUT*₆₂₇₈₈、*IbSUT*₈₁₆₁₆ 的 CDS 序列, 使用 Primer Premier 7.0 软件设计引物组合 TSUT₆₂₇₈₈-Fwd 和 TSUT₆₂₇₈₈-Rev 和引物组合 TSUT₈₁₆₁₆-Fwd 和 TSUT₈₁₆₁₆-Rev, 分别扩增 2 个 *IbSUT* 基因的 CDS 序列。

连接 pENTRTM-TOPO[®] 载体, 并转化 DH5 α 感受态, 分别提取各基因的入门载体和 pEarleyGate101 超量表达载体的质粒。通过 LR 反应连接 pEarleyGate 101 质粒和各基因入门载体质粒, 参考 GatewayTM LR ClonaseTM II Enzyme Mix 说明书进行。转化 Trans-T10 感受态细胞, 阳性重组载体分别命名为 pEarleyGate101-IbSUT₆₂₇₈₈ 和 pEarleyGate101-IbSUT₈₁₆₁₆。

分别将 2 个基因的重组载体质粒转化农杆菌 MP90 感受态细胞, 采用蘸花法转化拟南芥 Col-0^[31]。使用 0.01% Basta 筛选拟南芥转基因植株。移栽初步筛选出的拟南芥转基因阳性苗, 使用 CTAB 法提取其叶片 DNA^[32], 采用引物组合 Fbar 和 Rbar, 通过 PCR 法筛选阳性植株。从 T₂ 代中各筛选 3 个纯合阳性转基因株系用于后续实验。

1.2.8 转基因拟南芥中 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因的表达量测定

每个纯合转基因株系中选取 3 个单株,每个单株取 3 个叶片提取 RNA,方法同前文甘薯材料总 RNA 的提取,使用 PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa)试剂盒在 20 μ L 体系中进行逆转录。在 Bio-Rad CFX96 Touch PCR 仪上,根据 SsoAdvanced PreAmp Supermix 试剂盒说明书配制反应液,以拟南芥 *ACTIN* 基因为内参基因,分别使用引物组合 Q*IbSUT*₆₂₇₈₈-Fwd 和 Q*IbSUT*₆₂₇₈₈-Rev、引物组合 Q*IbSUT*₈₁₆₁₆-Fwd 和 Q*IbSUT*₈₁₆₁₆-Rev、引物组合 At*ACTIN*-Fwd 和 At*ACTIN*-Rev 进行 RT-qPCR 实验。基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析^[26]。每个株系取 3 个生物学重复,并进行 3 次独立重复试验。

1.2.9 转基因拟南芥表型观察、碘染和淀粉、可溶性糖含量、千粒重的测定

从每个纯合转基因株系中随机取 10 个单株和 20 片叶片进行表型观察和叶片长度测量。每个株系取 3 个单株和 10 片叶片,取播种 3 周的幼苗叶片和根尖用 KI-I₂ 溶液(2% KI, 1% I₂)进行碘染,观察拍照。进行测定,每个拟南芥叶子中的可溶性糖含量根据 Kunz 等^[33]报道的方法进行测定。采用淀粉含量检测试剂盒(Solarbio)对转基因拟南芥和对照拟南芥叶片的淀粉含量进行测定。每个株系取 3 个生物学重复,并进行 3 次独立重复试验。每个转基因纯合株系分别测量千粒重,取 4 个生物学重复,并进行 4 次独立重复试验。

2 结果与分析

2.1 甘薯 *IbSUTs* 基因的克隆和序列分析

为了获取 2 个 *IbSUTs* 编码基因的全长 mRNA 序列,本研究采用 RACE 方法分别扩增获得长度为 248 bp 和 330 bp 的 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因 5'

和 3'序列;分别获得长度为 835 bp 和 509 bp 的 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 的 5'端和 3'端序列。进一步对其全长 mRNA 序列进行扩增,获得长度分别为 1 872 和 1 911 bp 的 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因全长 mRNA 序列,分别含有长度为 1 538 bp 和 1 566 bp 的编码区(CDS)序列,编码 505 aa 和 521 aa 的蛋白序列。

通过比对发现,克隆获得的 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因与已报道的甘薯 *IbSUT3* (MN233361) CDS 序列相似性为 98.57%,编码蛋白序列一致性为 99.6%。*IbSUT*₈₁₆₁₆ 与已报道的甘薯 *IbSUT2y* (GQ979980) CDS 序列相似性为 97.19%,编码蛋白序列一致性为 99.42%。推测 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 分别为已报道 *IbSUT3* 和 *IbSUT2y* 基因的等位基因或同源基因。

2.2 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 与 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 属于 SUT1 蛋白亚家族

为了明确 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 和 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 编码蛋白的性质和分类,将 2 个基因编码蛋白序列与已报道的植物 SUT,包括拟南芥、烟草、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、豌豆 (*Pisum sativum*)、玉米 (*Zea mays*) 等植物 SUT 基因编码的蛋白,进行进化树分析(图 1)。根据前人研究报道,植物 SUT 家族可分 5 个亚家族,SUT1 亚家族为双子叶植物所特有。SUT2 和 SUT4 亚家族既存在于单子叶植物中,也存在于双子叶植物中。SUT3 和 SUT5 亚家族蛋白为单子叶植物所特有,单子叶植物和双子叶植物的蔗糖转运蛋白在进化上可能存在着某种先后进化关系^[7]。本研究通过对植物中 42 个 SUT 蛋白的氨基酸序列对比和系统进化树分析,推测 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 与 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 蛋白均属于 SUT1 亚家族,可能具有 SUT1 亚家族类似的特性。

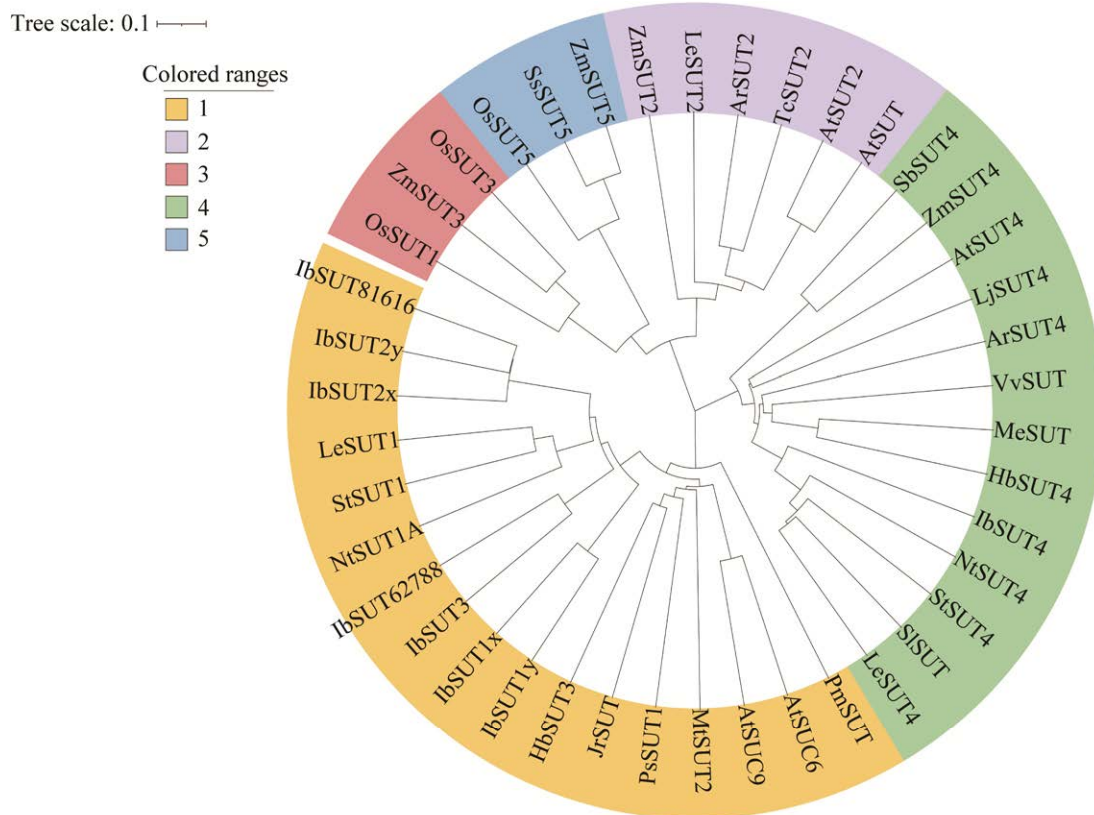


图1 SUT蛋白系统进化树分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of SUT proteins. ArSUT2 accession number is GFY88434 (*A. rufa*), ArSUT4 accession number is GFY85932 (*A. rufa*), AtSUT accession number is CAB92307 (*A. thaliana*), AtSUT2 accession number is NP_178389 (*A. thaliana*), AtSUT4 accession number is NP_172467 (*A. thaliana*), AtSUC6 accession number is NP_199174 (*A. thaliana*), AtSUC9 accession number is NP_196235 (*A. thaliana*), HbSUT3 accession number is ABK60190 (*H. brasiliensis*), HbSUT4 accession number is ABK60191 (*H. brasiliensis*), IbSUT1x accession number is ADL63119 (*I. batatas*), IbSUT1y accession number is ADK62516 (*I. batatas*), IbSUT2x accession number is ADL63120 (*I. batatas*), IbSUT2y accession number is ADL63121 (*I. batatas*), IbSUT3 accession number is QGW08804 (*I. batatas*), IbSUT4 accession number is QGW08803 (*I. batatas*), JrSUT accession number is AAU11810 (*J. regia*), LeSUT1 accession number is CAA57726 (*L. esculentum*), LeSUT2 accession number is AAG12987 (*L. esculentum*), LeSUT4 accession number is AAG09270 (*L. esculentum*), LjSUT4 accession number is CAD61275 (*L. japonicus*), MeSUT accession number is ANZ54938 (*M. esculenta*), MtSUT2 accession number is KEH32639 (*M. truncatula*), NtSUT1A accession number is CAA57727 (*N. tabacum*), NtSUT4 accession number is BBN23601 (*N. tabacum*), OsSUT1 accession number is AAF90181 (*O. sativa*), OsSUT3 accession number is BAB68368 (*O. sativa*), OsSUT5 accession number is BAC67165 (*O. sativa*), PmSUT accession number is CAI59556 (*P. major*), PsSUT1 accession number is AAD41024 (*P. sativum*), SbSUT4 accession number is ACX71839 (*S. bicolor*), SisSUT accession number is NP_001234344 (*S. lycopersicum*), SsSUT5 accession number is ALS46600 (*S. spontaneum*), StSUT1 accession number is CAA48915 (*S. tuberosum*), StSUT4 accession number is NP_001275070 (*S. tuberosum*), TcSUT2 accession number is EOY01998 (*T. cacao*), VvSUT accession number is AAD55269 (*V. vinifera*), ZmSUT2 accession number is AAS91375 (*Z. mays*), ZmSUT3 accession number is ACF86653 (*Z. mays*), ZmSUT4 accession number is AAT51689 (*Z. mays*), ZmSUT5 accession number is ACF85284 (*Z. mays*).

2.3 IbSUT₆₂₇₈₈ 与 IbSUT₈₁₆₁₆ 的蛋白结构分析

通过 NCBI 的 BLASTP 工具对 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 全长 cDNA 序列编码的氨基酸序列进行了结构分析, 结果表明, *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 基因编码的产物均有 MFS 的保守结构域, 它涉及营养吸收, 抗逆胁迫抗体的泵入。*IbSUT₆₂₇₈₈* 该保守结构域的区段包括从第 28 个到第 487 个氨基酸(图 2A), *IbSUT₈₁₆₁₆* 该保守结构域的区段包括从第 30 个到第 201 个氨基酸(图 2B)。

通过 TMHMM 2.0 网站进行 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 蛋白跨膜结构域的预测, 预测结果表明, *IbSUT₆₂₇₈₈* 蛋白和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 蛋白均具有 12 个

跨膜结构域(图 2C、2D)。

2.4 IbSUT₆₂₇₈₈ 与 IbSUT₈₁₆₁₆ 定位于细胞膜

为了确定 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 编码蛋白的亚细胞定位, 构建了 pCAMBIA1300-IbSUT₆₂₇₈₈-GFP 和 pCAMBIA1300-IbSUT₈₁₆₁₆-GFP 瞬时表达载体, 注射本氏烟草叶片中进行瞬时表达荧光信号分析, 激光共聚焦显微镜观察其亚细胞定位。结果如图, 表明 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 均定位于细胞膜(图 3B、3C)。此外, 还可以发现 *IbSUT₈₁₆₁₆* 基因编码蛋白还定位于细胞膜上的多个点状位点(图 3C), 推测其属于一种分泌中的膜系统的组成蛋白^[34]。

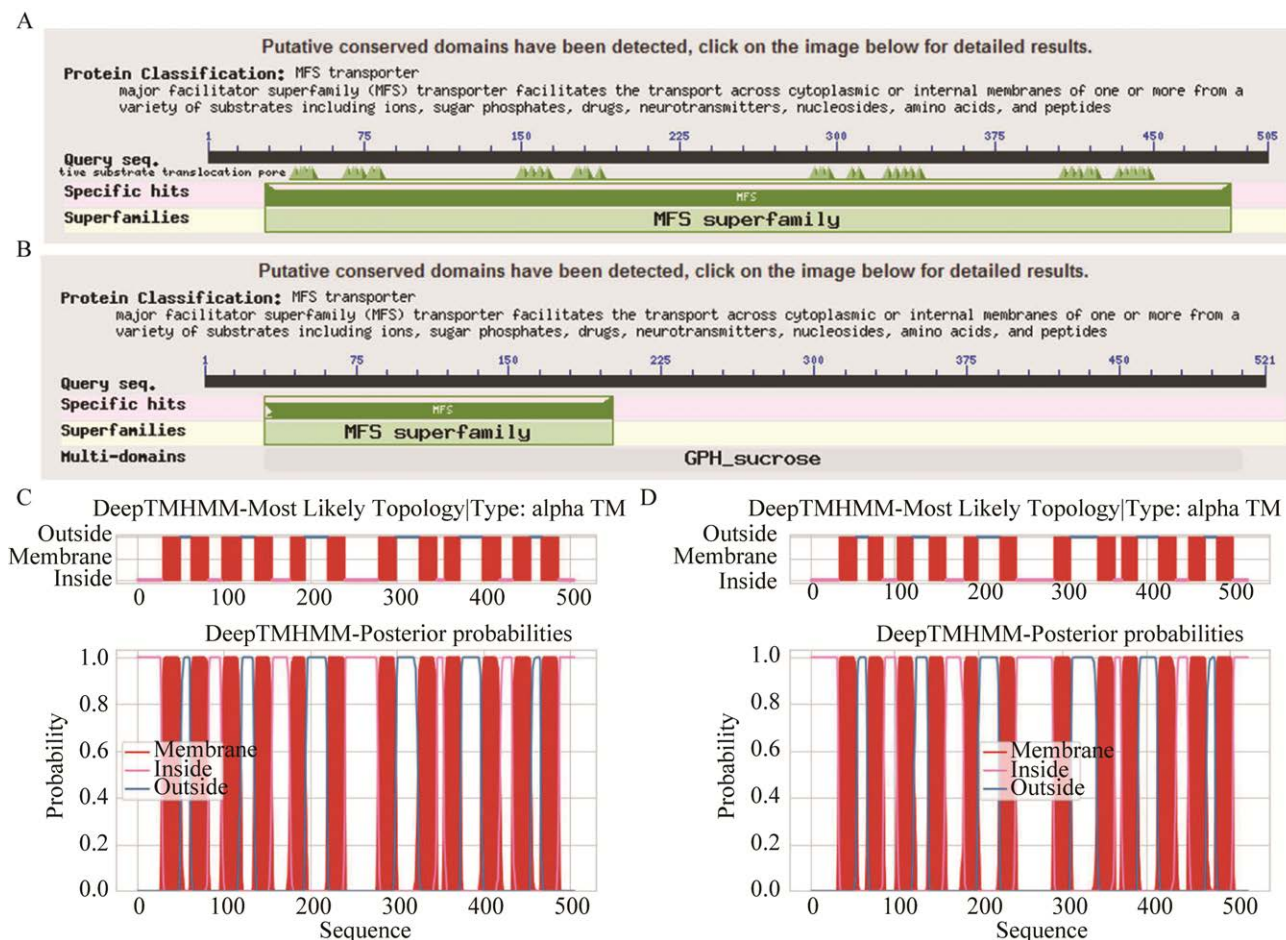


图2 IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 的蛋白结构分析 A: IbSUT₈₁₆₁₆ 蛋白的 BLASTP 搜索结果. B: IbSUT₆₂₇₈₈ 蛋白的 BLASTP 搜索结果. C: IbSUT₈₁₆₁₆ 蛋白的跨膜结构域预测结果. D: IbSUT₆₂₇₈₈ 蛋白的跨膜结构域预测结果

Figure 2 Protein structure analysis of IbSUT₆₂₇₈₈ and IbSUT₈₁₆₁₆. BLASTP search results of IbSUT₆₂₇₈₈ (A) and IbSUT₈₁₆₁₆ (B). Prediction result of transmembrane domain of IbSUT₆₂₇₈₈ (C) and IbSUT₈₁₆₁₆ (D).

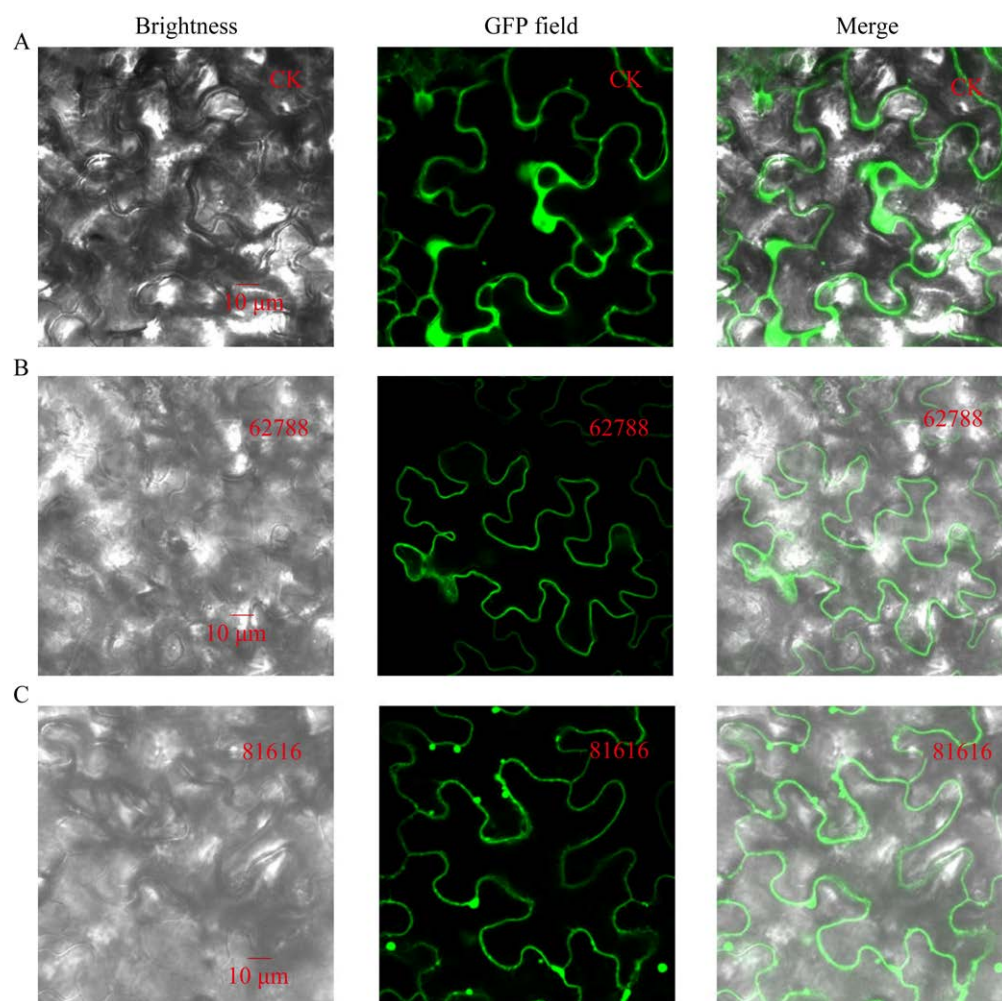


图 3 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 编码蛋白的亚细胞定位 A: pCambia1300-GFP 的亚细胞定位. B: *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因编码蛋白的亚细胞定位. C: *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因编码蛋白的亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of pCambia1300-GFP (A) and the proteins encoded by *IbSUT*₆₂₇₈₈ (B) and *IbSUT*₈₁₆₁₆ (C).

2.5 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 在甘薯中的表达模式分析

分别提取 3 个高、中、低淀粉含量的甘薯品种渝薯 33、徐薯 22、豫薯 10 号移栽后 65、80、95、110 和 125 d 的叶、叶柄、茎和块根的 RNA，并反转录为 cDNA。以甘薯 *IbH2B* 和 *IbUBI* 为双内参，以徐薯 22 移栽后 110 d 的块根为对照组，对甘薯 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 和 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 在不同甘薯品种、器官、发育时期进行表达量分析。RT-qPCR 结果表明，大多数块根发育时期，*IbSUT*₆₂₇₈₈ 在低淀粉品种豫薯 10 号中的表达量高于其在中淀粉

品种徐薯 22 和高淀粉品种渝薯 33 中的表达量，*IbSUT*₈₁₆₁₆ 在低淀粉品种豫薯 10 号和中淀粉品种徐薯 22 中的表达量较高，高于其在中淀粉品种渝薯 33 中的表达量，但是在部分器官和发育时期中有不同的变化趋势。*IbSUT*₈₁₆₁₆ 和 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 在不同器官中具有不同的表达模式。在供试 3 个品种中，*IbSUT*₆₂₇₈₈ 在地上部器官叶片、侧枝、茎中的表达量相比块根中的表达量高。*IbSUT*₈₁₆₁₆ 在侧枝、茎和块根中的表达量比叶片中的更高，尤其是在块根中有较高的表达量 (图 4)。

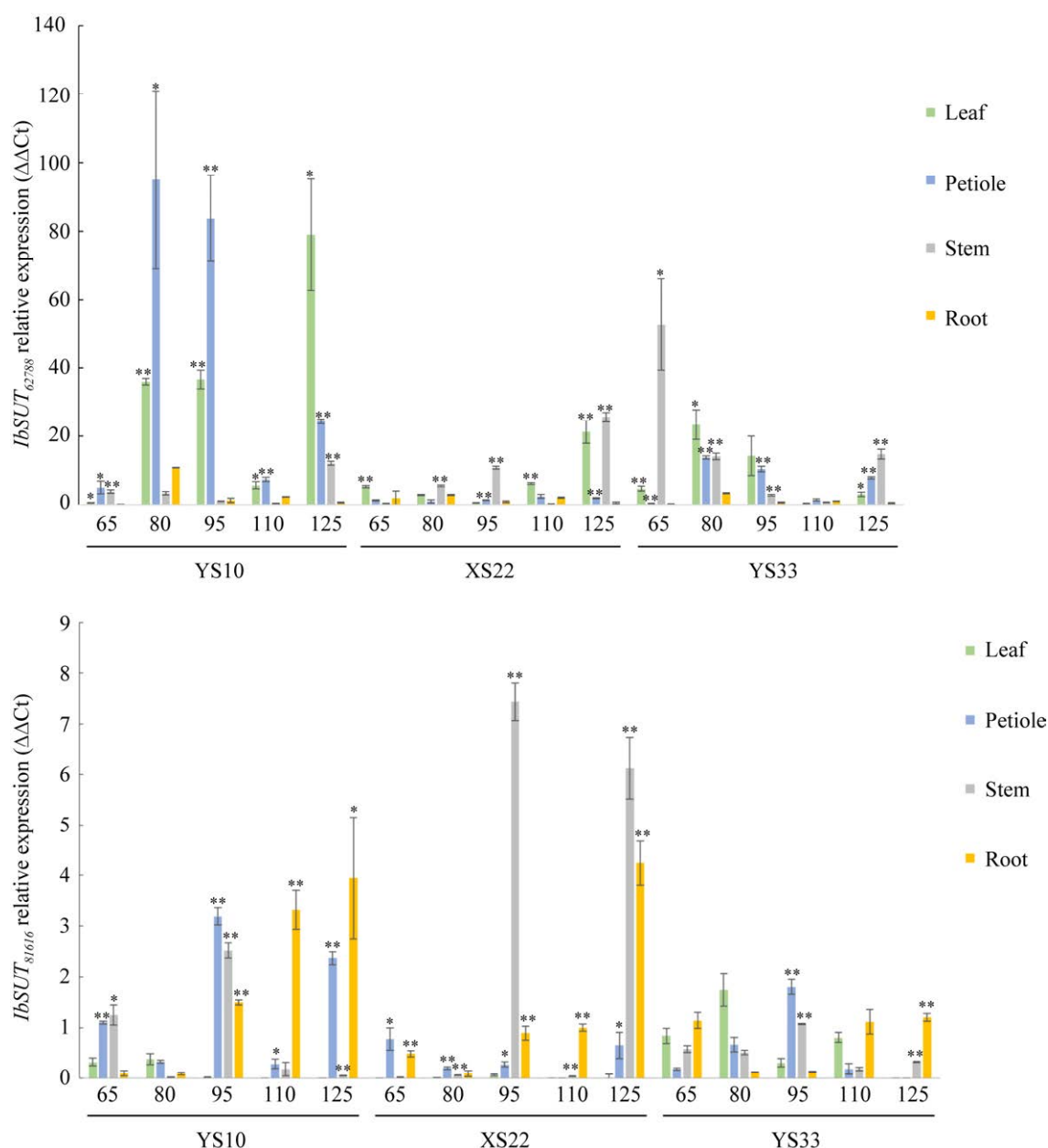


图 4 RT-qPCR 分析 $IbSUTs$ 基因的表达模式 YS10, XS22 和 YS33: 甘薯品种豫薯 10 号、徐薯 22 和渝薯 33. 65, 80, 95, 110 和 125: 栽插后 65 d, 80 d, 95 d, 110 d 和 125 d. *, ** 分别表示在 0.05/0.01 水平上差异显著, 其中 $IbSUT_{62788}$ 基因以块根表达量为对照组进行 t 检验, $IbSUT_{81616}$ 基因以叶片表达量为对照组进行 t 检验

Figure 4 RT-qPCR analysis of the expression patterns of genes encoding $IbSUTs$. YS10, XS22 and YS33: Sweet potato varieties Yushu 10, Xushu 22 and Yushu 33. 65, 80, 95, 110 and 125: 65, 80, 95, 110 and 125 days after transplanting. * and ** mean significant difference at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. The expression of $IbSUT_{62788}$ in root tuber was used as the control group for t -test, and the expression of $IbSUT_{81616}$ in leaf was used as the control group for t -test.

2.6 IbSUTs 可以回补蔗糖转运体缺失酵母突变体表型

为了验证获得 IbSUTs 的功能, 本实验通过酿酒酵母蔗糖转化酶缺失突变体菌株 SEY2102/ura3, 利用酵母互补实验探究与分析其蔗糖转运功能。结果表明, 在以蔗糖为碳源的培养基上, 转入 pDR196 空载的酵母突变株生长异常, 转入 pDR196-StSUT1 阳性对照的酵母突变株生长正常。通过与空载和阳性对照的对比, 发现转入 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈ 的酵母突变株生长发育正常, 而转入 pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆ 的酵母突变株生长较慢(图 5)。证明 IbSUT₆₂₇₈₈ 可能具有较好的蔗糖转运能力, 能够将蔗糖转运入酵母细胞作为碳源, 而 IbSUT₈₁₆₁₆ 的蔗糖转运能力弱于 IbSUT₆₂₇₈₈ 和阳性对照 StSUT1。

2.7 IbSUTs 具有不同程度的转运己糖的能力

为了进一步鉴定 IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 是否有转运己糖的功能, 将 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈ 和 pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆ 转入缺失了己糖转运蛋白的酿酒酵母菌株 EBY.VW4000 观察其在不同己糖碳源培养基上的生长情况。

结果表明, 在以对照麦芽糖、己糖果糖为考察碳源的固体 SD/-Ura 培养基上, 阴性对照空载 pDR196、pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈、pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆ 和阳性对照 pDR196-ScHXT5 载体转化的 EBY.VW4000/ura3 酵母菌株都能够正常生长, 但是 pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆ 载体转化的 EBY.VW4000

酵母菌株生长能力相对较弱。在以葡萄糖为考察碳源的培养基上, 转入 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈ 的 EBY.VW4000 突变株能够生长正常, 转入 pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆ 的突变株也生长, 但比转入阳性对照和 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈ 的突变株相比生长较慢。在以半乳糖为考察碳源的培养基上, 与对照相比, 转入 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈ 和 pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆ 的突变株均不能正常生长; 而在以甘露糖为碳源的培养基上, 转入 pDR196-IbSUT₆₂₇₈₈ 的突变株能够生长, 但长势弱于阳性对照。转入 pDR196-IbSUT₈₁₆₁₆ 的突变株生长状况与阴性对照类似(图 6)。上述结果表明, IbSUT₆₂₇₈₈ 可能具有转运葡萄糖、甘露糖和果糖等己糖的功能, 但不具有转运半乳糖的

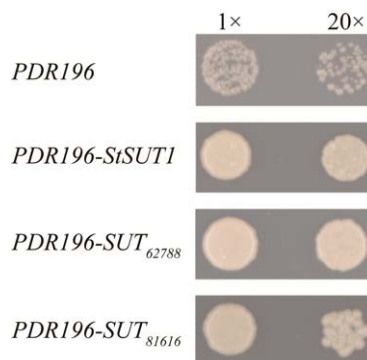


图 5 酵母蔗糖酶突变体 SEY2101/ura3 体内蔗糖功能验证 1×、20× 分别表示稀释了 1 倍、20 倍
Figure 5 Verification of sucrose transport function in yeast sucrose mutant SEY2101/ura3. 1×, 20× means that the dilution were 1 times and 20 times, respectively.

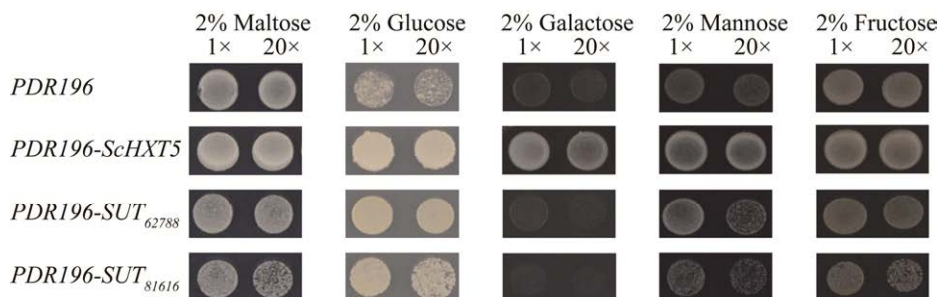


图 6 酵母己糖酶突变体 EBY.VW4000/ura3 体内己糖功能验证 1×和 20× 分别表示稀释了 1 倍和 20 倍
Figure 6 Verification of hexose transport function in yeast hexose transporter null mutant EBY.VW4000/ura3. 1×, 20× means that the dilution were 1 times and 20 times, respectively.

功能。*IbSUT*₈₁₆₁₆可能具有转运葡萄糖和果糖的功能,但其转运功能弱于*IbSUT*₆₂₇₈₈;可能不具有转运半乳糖和甘露糖的功能。

2.8 野生型拟南芥的遗传转化

2.8.1 遗传转化拟南芥的表型分析和叶片表达量分析

为鉴定*IbSUT*₆₂₇₈₈和*IbSUT*₈₁₆₁₆基因的功能,采用蘸花法载体转化拟南芥野生型 Col-0。从 T₂ 代转基因株系中分别筛选获得每个基因异源表

达的 3 个纯合转基因株系,*IbSUT*₆₂₇₈₈-2、*IbSUT*₆₂₇₈₈-3、*IbSUT*₆₂₇₈₈-9 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆-361、*IbSUT*₈₁₆₁₆-426、*IbSUT*₈₁₆₁₆-382。RT-qPCR 结果表明,*IbSUT*₈₁₆₁₆和*IbSUT*₆₂₇₈₈基因在拟南芥中正常表达,其中*IbSUT*₆₂₇₈₈转基因株系 *IbSUT*₆₂₇₈₈-3 中的 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因表达量最高,*IbSUT*₆₂₇₈₈-9 中次之,这 2 个株系中 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 的表达量均与野生型拟南芥有极显著性差异,*IbSUT*₆₂₇₈₈-2 中最低(图 7A)。*IbSUT*₈₁₆₁₆转基因株系 *IbSUT*₈₁₆₁₆-

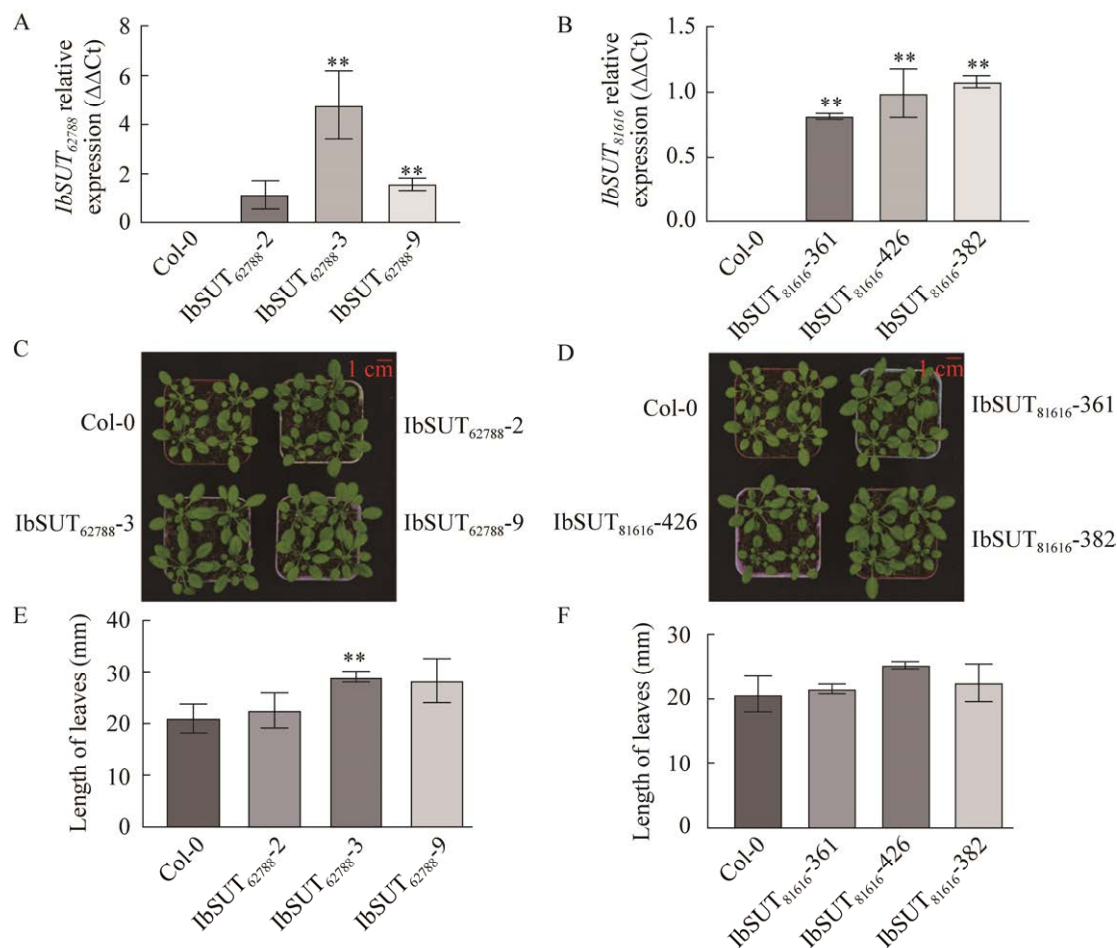


图7 甘薯 *IbSUT*₈₁₆₁₆和*IbSUT*₆₂₇₈₈异源表达拟南芥植株表型观察和叶片相对表达量 A: *IbSUT*₆₂₇₈₈转基因拟南芥叶片相对表达量. B: *IbSUT*₈₁₆₁₆转基因拟南芥叶片相对表达量. C: *IbSUT*₆₂₇₈₈转基因拟南芥表型. D: *IbSUT*₈₁₆₁₆转基因拟南芥表型. E: *IbSUT*₆₂₇₈₈转基因拟南芥叶片大小. F: *IbSUT*₈₁₆₁₆转基因拟南芥叶片大小, 其中每个株系取 20 个叶片进行叶长测量. **表示在 0.01 水平上差异显著

Figure 7 Expression of *IbSUT*₈₁₆₁₆ and *IbSUT*₆₂₇₈₈ in *Arabidopsis* and phenotype observation of transgenic plants. Expression of *IbSUT*₆₂₇₈₈ (A) and *IbSUT*₈₁₆₁₆ (B) in leaves of transgenic *Arabidopsis*. Phenotype of *Arabidopsis* expressing *IbSUT*₆₂₇₈₈ (C) and *IbSUT*₈₁₆₁₆ (D). Length of leaves in *Arabidopsis* expressing *IbSUT*₆₂₇₈₈ (E) and *IbSUT*₈₁₆₁₆ (F). For each transgenic line, the length of leaves was the mean value of lengths measured using 20 leaves. ** means significant difference at the 0.01 probability levels.

426 中 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因的表达式最高, *IbSUT*₈₁₆₁₆₋₃₈₂ 中次之, *IbSUT*₈₁₆₁₆₋₃₆₁ 中最低, 均与野生型拟南芥有极显著性差异(图 7B)。在整个植株生长发育期间, 从每个纯合转基因株系中随机取 10 个单株和 20 片叶片, 对转基因植株与 Col-0 野生型植株的表型进行观察, 发现各异源表达转基因株系可以正常生长发育, 异源表达 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 的拟南芥植株生长略快于对照野生型植株(图 7C、7D), 植株及叶片大小略大于野生型植株, 其中株系 *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₃ 叶片长度显著高于野生型对照(图 7E), 可见 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 的异源表

达对转基因拟南芥的生长发育可能造成一定影响; 而 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 和转基因株系的叶长与对照相比无显著差异(图 7F)。

2.8.2 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 异源表达拟南芥植株中淀粉和可溶性糖含量变化

KI-I₂ 叶片和根尖染色结果显示, 异源表达 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 拟南芥的叶片染色结果与对照相比无明显差异(图 8A), 而根尖染色比野生型深(图 8B)。叶片淀粉和可溶性糖检测结果表明, 异源表达 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 拟南芥的叶片淀粉含量与野生型对照相比无显著差异(图 8C), 株系 *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₂

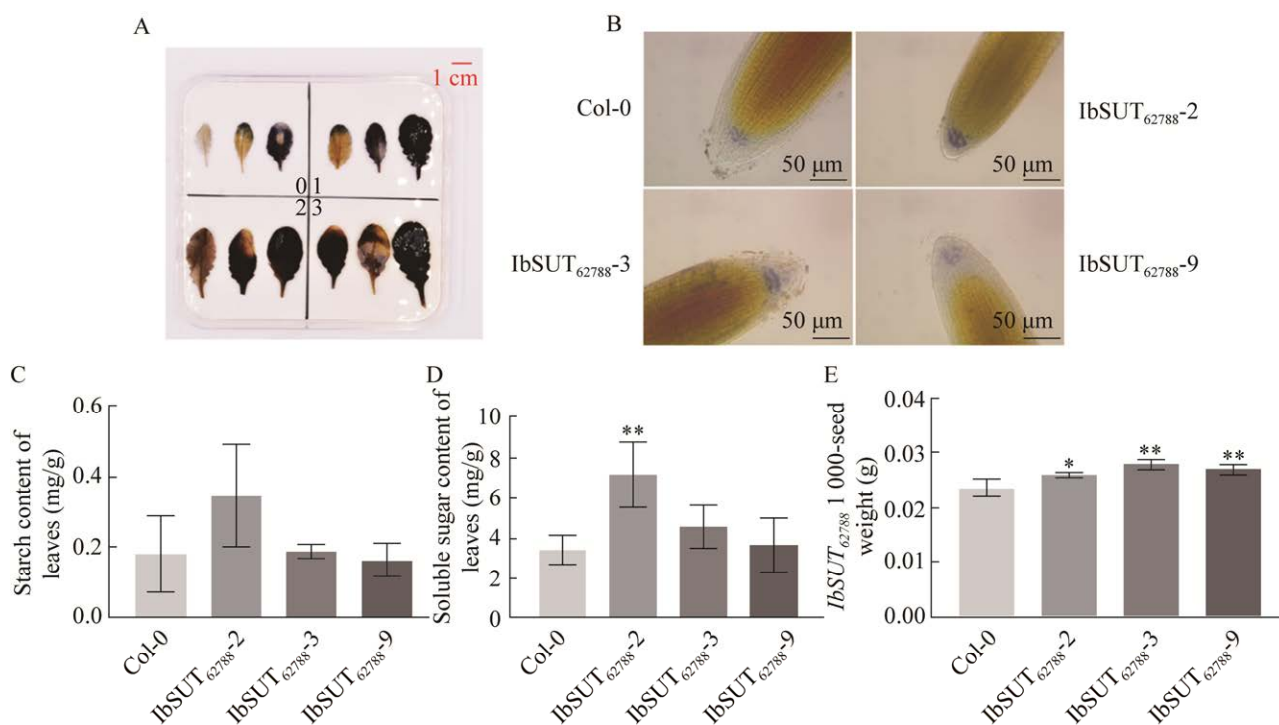


图 8 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 的异源表达改变了拟南芥淀粉和可溶性糖的含量 A: 拟南芥叶片碘染. 0: Col-0; 1: *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₂; 2: *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₃; 3: *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₉. B: 拟南芥根尖碘染. C: 拟南芥叶片淀粉含量. D: 拟南芥叶片可溶性糖含量. 每个株系取 3 个生物学重复, 并进行 3 次独立重复试验. E: 拟南芥种子千粒重. 每个株系取 4 个生物学重复, 并进行 4 次独立重复试验. * 和 ** 分别表示在 0.05/0.01 水平上差异显著
 Figure 8 Heterogenous expression of *IbSUT*₆₂₇₈₈ altered the starch and soluble sugar content in *Arabidopsis*. Iodine staining (A) in *Arabidopsis* leaves. 0: Col-0; 1: *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₂; 2: *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₃; 3: *IbSUT*₆₂₇₈₈₋₉. Iodine staining (B) of *Arabidopsis* root tip. Starch content (C) and soluble sugar content (D) in *Arabidopsis* leaves. For each transgenic line, three independent biological replications were performed. 1 000-seed weight (E) of *Arabidopsis*. Four independent biological replications were performed for each line. * and ** mean significant difference at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

叶片可溶性糖含量与对照相比有极显著增加(图 8D)。种子千粒重的测定结果表明, 3 个转基因株系的种子千粒重与对照相比均显著增加(图 8E)。综上结果表明, *IbSUT*₆₂₇₈₈ 可能参与了根部淀粉含量、叶片可溶性糖含量以及种子重量的调节。

2.8.3 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 异源表达拟南芥植株中淀粉和可溶性糖含量变化

KI-I₂ 叶片和根尖染色结果表明, 异源表达 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 拟南芥的叶片和根尖中淀粉含量较野

生型拟南芥明显增多(图 9A、9B)。叶片淀粉和可溶性糖检测结果表明, 异源表达 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 拟南芥植株叶片中淀粉含量显著高于野生型对照(图 9C), 可溶性糖含量低于对照, 其中株系 *IbSUT*₈₁₆₁₆-361 叶片中可溶性糖含量与对照相比极显著降低(图 9D)。种子千粒重的测定结果表明, 转基因拟南芥种子千粒重与对照相比极显著增加(图 9E)。综上结果表明, *IbSUT*₆₂₇₈₈ 也可能参与了可溶性糖、淀粉含量以及种子重量的调节。

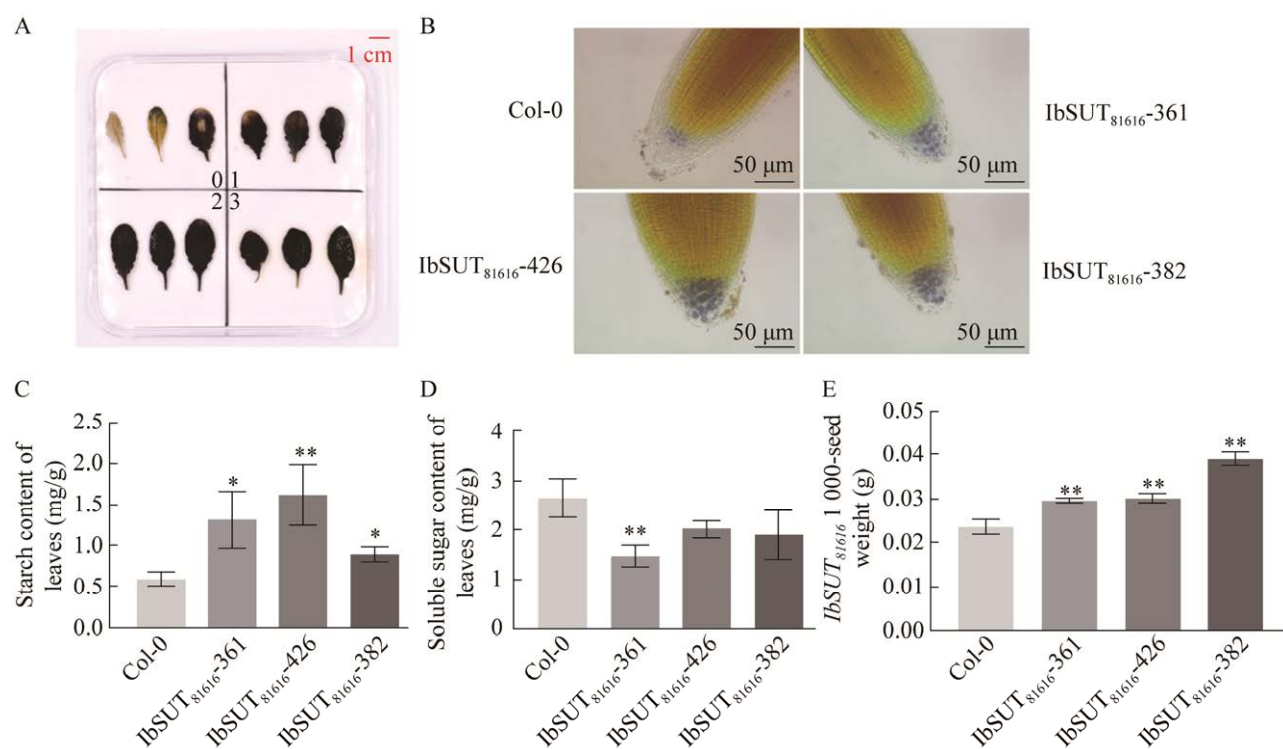


图 9 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 的异源表达改变了拟南芥淀粉和可溶性糖的含量 A: 拟南芥叶片碘染. 0: Col-0; 1: *IbSUT*₈₁₆₁₆-361; 2: *IbSUT*₈₁₆₁₆-426; 3: *IbSUT*₈₁₆₁₆-382. B: 拟南芥根尖碘染. C: 拟南芥叶片淀粉含量. D: 拟南芥叶片可溶性糖含量. 每个株系取 3 个生物学重复, 并进行 3 次独立重复试验. E: 拟南芥种子千粒重. 每个株系取 4 个生物学重复, 并进行 4 次独立重复试验. * 和 ** 分别表示在 0.05/0.01 水平上差异显著

Figure 9 Heterogenous expression of *IbSUT*₈₁₆₁₆ altered the starch and soluble sugar content in *Arabidopsis*. Iodine staining (A) in *Arabidopsis* leaves. 0: Col-0; 1: *IbSUT*₈₁₆₁₆-361; 2: *IbSUT*₈₁₆₁₆-426; 3: *IbSUT*₈₁₆₁₆-382; Iodine staining (B) of *Arabidopsis* root tip; Starch content (C) and soluble sugar content (D) in *Arabidopsis* leaves. For each transgenic line, three independent biological replications were performed. 1 000-seed weight (E) of *Arabidopsis*. Four independent biological replications were performed for each line. * and ** mean significant difference at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

3 讨论

蔗糖是植物体内糖分储藏、积累和运输的主要形式,其代谢和转运对于植物生命活动至关重要。SUT 作为易化扩散载体主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)成员之一^[35],可分 5 个亚家族,主要负责植物光合产物蔗糖的跨膜运输,在韧皮部介导的源-库蔗糖运输和库器官的蔗糖供给中起着关键作用^[8]。MFS 家族为孔状立体结构,SUT 可能具有此结构,介导蔗糖从该孔进出细胞^[36]。本研究系统发育分析表明,IbSUT₆₂₇₈₈ 与 IbSUT₈₁₆₁₆ 均属于 SUT1 亚家族,可能具有其亚家族特点,包括高亲和性、低转运能力、负责蔗糖的韧皮部转载和回收在长距离转运过程中从维管组织泄露出的蔗糖^[12]。质外体途径中蔗糖分子从韧皮部薄壁细胞流出,进入到筛管伴胞复合体中的过程需要 SWEET (sugars will eventually be exported transporters)蛋白和 SUT 蛋白共同来完成^[37],由此推测 IbSUT 蛋白可能与甘薯中的 SWEET 蛋白协同作用于甘薯中蔗糖的韧皮部装载和运输。

植物蔗糖转运蛋白属于典型的跨膜结合蛋白,也是相对分子量约为 55 kDa 的高疏水性蛋白^[11]。基于已有研究表明,在植物体中,SUT 所属的 MFS 家族成员编码蛋白主要定位在细胞膜和液泡膜上,负责介导蔗糖在植物体内的跨膜运输。本研究亚细胞定位结果表明,IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 定位于细胞膜,未在液泡膜检测到其定位。在其他关于甘薯 SUT 的研究中,IbSUT1x^[38]、IbSUT1、IbSUT2 和 IbSUT3 都定位于细胞膜上,IbSUT4 定位于质膜和液泡膜^[22]。在其他植物中,烟草、马铃薯、番茄筛管中的 SUT1 蛋白在质膜中高水平表达^[39],小麦 *TaSUT1* 基因、绿竹 *BoSUT2* 基因表达蛋白定位在细胞膜上^[40-41];而大麦 HvSUT2、拟南芥

AtSUT4 等蛋白在液泡中表达^[42-43],百脉根 (*Lotus japonicus*) LjSUT4 和烟草 NtSUT4 蛋白也定位于液泡膜^[44-45]。综合以上分析推测,SUT 在细胞中定位的不同可能是不同的植物种类或亚家族的差异性导致的,此外,IbSUT₈₁₆₁₆ 除定位于细胞膜外,还可能是在分泌中的膜系统的组成蛋白,其在细胞膜系统构成过程中的功能有待进一步研究。

SUT 家族在植物中最典型的功能是将蔗糖转运到韧皮部中,以实现光合同化物的长距离运输。该家族是主要的次级膜转运蛋白超家族,其转运底物的多样性使其在细胞物质交换和能量代谢过程中发挥重要作用。王丹丹^[22]利用酵母表达体系 SUSY7/ura3 证明 IbSUT3 (本研究中的 IbSUT₆₂₇₈₈ 的同源或等位基因)编码有功能的蔗糖转运蛋白,Li 等^[6]也通过 SUSY7/ura3 证明 IbSUT2x 和 IbSUT2y (本研究中的 IbSUT₈₁₆₁₆ 的同源或等位基因)表现出蔗糖转运功能,而 IbSUT1x 和 IbSUT1y 未表现出蔗糖摄取活性。本研究对 IbSUT₈₁₆₁₆ 和 IbSUT₆₂₇₈₈ 的糖转运功能进行探究与分析,结果表明 IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 均具有转运蔗糖、葡萄糖和果糖的能力,而与 IbSUT₈₁₆₁₆ 相比,IbSUT₆₂₇₈₈ 的糖转运功能更强。两者均不具有转运半乳糖的能力,这可能是因为基因编码蛋白本身不具备这种能力,也可能是因为酵母异源表达所导致其无法正确结合酵母细胞膜,或缺乏必要的蛋白修饰^[46]。此外,IbSUT₆₂₇₈₈ 还具备转运甘露糖的能力,而 IbSUT₈₁₆₁₆ 却不具备这种能力,说明甘薯 SUT 之间糖转运功能并不完全相同,存在一定的功能差异。

虽然 IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 均预测到含有 12 个跨膜结构域,且位置相似,但是通过酵母互补实验、异源表达拟南芥的指标测定可知,甘薯 IbSUT₆₂₇₈₈ 和 IbSUT₈₁₆₁₆ 的糖转运能力和转运糖的种类并不完全相同。推断 IbSUT₆₂₇₈₈ 转运

功能强于 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 原因可能是由于 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 蛋白涉及营养吸收、抗逆胁迫的 MFS 保守结构域区段更长, 约为 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 的 2.67 倍。此外, SUT 家族不同成员之间往往形成一个具有增强蔗糖转运能力的复合体, 在糖转运过程中共同作用。这些复合体之间在底物的亲和性、底物特异性、结构功能等方面均具有较大差异。SUT 通过寡聚化形成同源二聚体、异源二聚体、四聚体等来调节转运速率, 聚合物的不同表达强度会造成它在不同组织中的转运能力不同^[39]。综上所述, *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 具有不同的底物特异性和结构、功能特点, 且可能与拟南芥中的蔗糖转运蛋白形成了不同的复合体, 在其表达组织中发挥不同的转运能力。

光合产物蔗糖运输和分配在植物的生长发育过程中至关重要, 甘薯蔗糖转运体调控着糖化合物的转运和分配, 严重影响甘薯的生长发育。多数植物体内都含有不止一种蔗糖转运蛋白基因来协调不同组织中糖的转运^[11], SUT1 亚族的蔗糖转运蛋白主要功能是从源叶装载蔗糖到韧皮部^[39], 通常在源组织中表达量高^[42]。本研究结果表明, *IbSUT*₆₂₇₈₈ 在叶片、侧枝、茎中的表达量较高, 这与王丹丹^[22]关于 *IbSUT3* (*IbSUT*₆₂₇₈₈ 同源或等位基因)在源叶中表达较高的结果相符, 但与 *IbSUT3* 在茎中表达最低的结果不相符。*IbSUT*₈₁₆₁₆ 在侧枝、茎和块根中的表达量相比叶中的更高, 不符合 SUT1 亚家族在源组织中表达量更高和 Li 等^[6]报道 *IbSUT2* 在源叶中表达最强的规律。推测 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 编码蛋白可能主要参与地上部光合器官中合成的蔗糖在韧皮部的装载, *IbSUT*₈₁₆₁₆ 编码蛋白可能参与光合产物的源-库间运输, 以及将甘薯叶片合成的蔗糖运输至块根中。本研究与之前王丹丹^[22]关于 *IbSUT3* 和 Li 等^[6]关于 *IbSUT2y* 的报道存在差异, 可能是由于蔗糖转运蛋白在转录水平上受

到基因的严格调控, 其表达具有较强的组织特异性^[47], 而 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 分别为已报道的 *IbSUT3*、*IbSUT2y* 基因的同源基因, 在表达模式或功能上与 *IbSUT2y* 基因有所分化。

蔗糖转运蛋白通过调节蔗糖在源-库-流中的运输影响作物品质和产量^[48]。本研究结果表明, *IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因在高、中、低淀粉甘薯品种不同发育时期的块根中均有差异表达, 可能参与块根淀粉性状的调控, 这与前期研究结果相吻合^[23]。*IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因在高、中、低淀粉含量甘薯品种的地上部器官中也具有差异表达, 且 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 在地上部器官中的表达量高于其在地下部块根中的表达量, 可能主要通过调控地上部光合产物经韧皮部从源到库的运输而参与块根淀粉性状的调控; 而 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 在块根中表达量较高, 除调控光合产物转运外, 还可能通过直接参与库组织的蔗糖供给而参与块根淀粉性状的调控^[12]。然而, 植物中光合产物的跨膜转运调控是一个非常复杂的过程, 除 SUT 外, 还有其他转运蛋白参与; 且 SUT 自身的表达和功能受到植物生长发育状态、外部环境、体内蔗糖浓度和激素水平等因素的影响^[48], 且其调控网络极其复杂, 除受到转录因子的调节、泛素化、磷酸化等翻译后水平的调节外, 还可能通过与其他蛋白互动, 共同参与光合产物运输、分配及性状的调控^[48-49]。*IbSUT*₆₂₇₈₈ 和 *IbSUT*₈₁₆₁₆ 基因在甘薯块根淀粉性状中的调控作用有待进一步揭示。

本研究获得的 2 个 *IbSUTs* 基因在拟南芥中异源表达后, 一定程度上影响了拟南芥的生长发育。在拟南芥中异源表达 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因, 叶片中可溶性糖含量、种子千粒重均显著增加, 说明甘薯 *IbSUT*₆₂₇₈₈ 基因可能促进叶片中可溶性糖的积累以及库组织中物质的积累。同时转基因拟南芥叶片大小也显著变大, 可能是由于蔗

糖信号和吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、乙烯和细胞分裂素等激素信号途径有交叉,其含量改变引发了植物整体信号途径的改变,从而影响了拟南芥的生长发育^[50]。而在拟南芥中异源表达 *IbSUT₈₁₆₁₆* 基因,叶片和根尖淀粉含量、种子千粒重均显著增加,但叶片中可溶性糖减少,说明 *IbSUT₈₁₆₁₆* 基因的表达可能促进了植株中糖的转运和淀粉在源、库器官中的合成与积累,从而导致可溶性糖含量的减少。不同种类和不同亚家族的 SUT 蛋白对于淀粉和糖转运具体功能并不完全相同。在甘薯中, *IbSUT4* 正常环境下的转基因拟南芥蔗糖含量低于野生型,但在胁迫处理下,过表达 *IbSUTs* 基因促进了蔗糖在库器官的积累^[22]。在其他植物中,菠菜 *SoSUT1* 基因在马铃薯植株中过表达发现叶片中蔗糖含量降低,同时块茎形状也发生了改变^[51]。马铃薯 *StSUT1* 在豌豆子叶存储的薄壁组织细胞中过表达,发现子叶的蔗糖吸收能力增强,子叶的增长率也得到提高^[52]。张引鹤^[48]的研究表明,受盐和盐碱胁迫后,超表达大豆 *GmSUT4* 基因的拟南芥植株中有高浓度的可溶性糖产生和积累,蔗糖、葡萄糖、果糖和淀粉含量均高于野生型,提高了转基因拟南芥的抗逆性。本研究结果表明,甘薯 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 可能在细胞膜上进行蔗糖的跨膜运输、蔗糖进出库组织并积累等生理功能,参与韧皮部蔗糖的运输与卸载,影响植株中糖的分配,且 2 个 SUT 之间的功能可能存在一定差异。

4 结论

本研究成功克隆获得 2 个甘薯 SUT 编码基因 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆*, 分别编码 505 aa 和 521 aa 的 SUT 蛋白,且均属于 SUT1 亚家族。*IbSUT₆₂₇₈₈*、*IbSUT₈₁₆₁₆* 均定位于细胞膜,在酵母系统中具有蔗糖转运和一定的己糖转运功能,在

拟南芥中的异源表达改变了淀粉和糖的分配与积累—*IbSUT₆₂₇₈₈* 基因可以促进库器官的可溶性糖累积, *IbSUT₈₁₆₁₆* 基因可以促进植株中淀粉的累积从而导致可溶性糖含量的减少,且 2 个基因异源表达拟南芥的种子千粒重均显著增加。推测 *IbSUT₆₂₇₈₈* 和 *IbSUT₈₁₆₁₆* 在淀粉和蔗糖代谢中发挥调控作用,可能是控制甘薯淀粉性状的重要基因,对其功能的进一步挖掘将有助于阐明甘薯淀粉和糖相关性状的遗传基础和调控机制。此外,本研究 2 个 *IbSUTs* 在拟南芥中的异源表达不仅不会影响拟南芥的正常生长进程,而且具有改变淀粉积累和糖性状、促进库器官物质积累的作用,具有应用于其他作物品质改良的潜力。

REFERENCES

- [1] 张凯, 罗小敏, 王季春, 唐道彬, 吴正丹, 叶爽, 王莉. 甘薯淀粉产量及相关性状的遗传多样性和关联度分析[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(3): 365-374. ZHANG K, LUO XM, WANG JC, TANG DB, WU ZD, YE S, WANG L. Genetic diversity and correlation analysis of starch yield-related traits in sweet potato[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(3): 365-374 (in Chinese).
- [2] ZHOU WZ, YANG J, HONG Y, LIU GL, ZHENG JL, GU ZB, ZHANG P. Impact of amylose content on starch physicochemical properties in transgenic sweet potato[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 122: 417-427.
- [3] REN ZT, HE SZ, ZHAO N, ZHAI H, LIU QC. A sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 gene, *IbSnRK1*, improves starch content, composition, granule size, degree of crystallinity and gelatinization in transgenic sweet potato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(1): 21-32.
- [4] 王璐璐. 甘薯淀粉品质的影响因素及其与块根食用品质的相关性研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2021. WANG LL. Study on the influencing factors of sweet potato starch quality and its correlation with the edible quality of storage roots[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2021 (in Chinese).
- [5] 沈升法, 项超, 吴列洪, 李兵, 罗志高. 甘薯块根可溶性糖组分特征及其与食味的关联分析[J]. 中国农业科学, 2021, 54(1): 34-45.

- SHEN SF, XIANG C, WU LH, LI B, LUO ZG. Analysis on the characteristics of soluble sugar components in sweet potato storage root and its relationship with taste[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(1): 34-45 (in Chinese).
- [6] LI Y, GU YH, QIN H, ZHANG YZ. Two pairs of sucrose transporters in *Ipomoea batatas* (L.) Lam are predominantly expressed in sink leaves and source leaves respectively[J]. *Plant Science*, 2010, 179(3): 250-256.
- [7] 张清, 胡伟长, 张积森. 植物蔗糖转运蛋白研究进展[J]. *热带作物学报*, 2016, 37(1): 193-202.
- ZHANG Q, HU WC, ZHANG JS. Sucrose transporters in plants[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(1): 193-202 (in Chinese).
- [8] 高蕾, 肖文芳, 李文燕, 彭昌操. 拟南芥蔗糖转运蛋白(SUTs)的功能研究进展[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(2): 251-255.
- GAO L, XIAO WF, LI WY, PENG CC. Progress on functions of sucrose transporters (SUTs) in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(2): 251-255 (in Chinese).
- [9] SMEEKENS S. Sugar-induced signal transduction in plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, 51: 49-81.
- [10] REINDERS A, SCHULZE W, KÜHN C, BARKER L, SCHULZ A, WARD JM, FROMMER WB. Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(7): 1567-1577.
- [11] 涂文睿, 蔡昱萌, 颜婧, 卢江, 张雅丽. 植物蔗糖转运蛋白及其生理功能的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(4): 1-7.
- TU WR, CAI YM, YAN J, LU J, ZHANG YL. Research progresses on plant sucrose transporters and physiological functions[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(4): 1-7 (in Chinese).
- [12] 戚继艳, 阳江华, 唐朝荣. 植物蔗糖转运蛋白的基因与功能[J]. *植物学通报*, 2007, 24(4): 532-543.
- QI JY, YANG JH, TANG ZR. Sucrose transporter genes and their functions in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, 24(4): 532-543 (in Chinese).
- [13] BARKER L, KUHN C, WEISE A, SCHULZ A, GEBHARDT C, HIRNER B, HELLMANN H, SCHULZE W, WARD JM, FROMMER WB. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(7): 1153.
- [14] 李晶晶, 王英, 高和琼, 李开绵, 庄南生. 木薯蔗糖转运蛋白(SUT)家族基因的染色体物理定位[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(4): 794-802.
- LI JJ, WANG Y, GAO HQ, LI KM, ZHUANG NS. The chromosome physical location of the SUT family genes in cassava[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(4): 794-802 (in Chinese).
- [15] LEMOINE R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, 1465(1/2): 246-262.
- [16] REINDERS A, PANSHYSHYN JA, WARD JM. Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog AtPLT5[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(2): 1594-1602.
- [17] RIESMEIER JW, WILLMITZER L, FROMMER WB. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast[J]. *The EMBO Journal*, 1992, 11(13): 4705-4713.
- [18] BÜRKLE L, HIBBERD JM, QUICK WP, KÜHN C, HIRNER B, FROMMER WB. The H^{+} -sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves1[J]. *Plant Physiology*, 1998, 118(1): 59-68.
- [19] 洪海强. 过表达OsSUT2和OsSUT5籼稻的灌浆生理[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2008.
- HONG HQ. Physiological traits of transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.) with over-expressed OsSUT2/OsSUT5 during grain filling period[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2008 (in Chinese).
- [20] 张雅文, 包淑慧, 唐振家, 王小文, 杨芳, 张德春, 胡一兵. 蔗糖转运蛋白 OsSUT5 在水稻花粉发育及结实中的作用[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(16): 3369-3385.
- ZHANG YW, BAO SH, TANG ZJ, WANG XW, YANG F, ZHANG DC, HU YB. Function of sucrose transporter OsSUT5 in rice pollen development and seed setting[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(16): 3369-3385 (in Chinese).
- [21] MILNE RJ, BYRT CS, PATRICK JW, GROF CPL. Are sucrose transporter expression profiles linked with patterns of biomass partitioning in *Sorghum* phenotypes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 223.
- [22] 王丹丹. 甘薯蔗糖转运蛋白基因的克隆及功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2020.
- WANG DD. Cloning and functional analysis of sweet potato sucrose transporter genes[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese).

- [23] ZHANG K, WU ZD, TANG DB, LUO K, LU HX, LIU YY, DONG J, WANG X, LV CW, WANG JC, LU K. Comparative transcriptome analysis reveals critical function of sucrose metabolism related-enzymes in starch accumulation in the storage root of sweet potato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 914.
- [24] CHEN L, LIU XH, HUANG XJ, LUO W, LONG YM, GREINER S, RAUSCH T, ZHAO HB. Functional characterization of a drought-responsive invertase inhibitor from maize (*Zea mays* L.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(17): 4081.
- [25] PARK SC, KIM YH, JI CY, PARK S, JEONG JC, LEE HS, KWAK SS. Stable internal reference genes for the normalization of real-time PCR in different sweet potato cultivars subjected to abiotic stress conditions[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51502.
- [26] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [27] 胡梅珍. 木薯叶片蔗糖质外体装载模式[D]. 海口: 海南大学博士学位论文, 2016.
- HU MZ. Sucrose apoplastic loading pattern in cassava leaf[D]. Haikou: Doctoral Dissertation of Hainan University, 2016 (in Chinese).
- [28] VERWAAL R, PAALMAN JW, HOGENKAMP A, VERKLEIJ AJ, VERRIPS CT, BOONSTRA J. *HXT5* expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2002, 19(12): 1029-1038.
- [29] WIECZORKE R, KRAMPE S, WEIERSTALL T, FREIDEL K, HOLLENBERG CP, BOLES E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Letters*, 1999, 464(3): 123-128.
- [30] 高婧芳, 王邦, 韩晓云, 田朝光. 全基因组水平扫描鉴定粗糙脉孢菌糖转运蛋白及其在酿酒酵母已糖发酵中的评价[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(1): 79-89.
- GAO JF, WANG B, HAN XY, TIAN CG. Genome-wide screening of predicted sugar transporters in *Neurospora crassa* and the application in hexose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(1): 79-89 (in Chinese).
- [31] ZHANG XR, HENRIQUES R, LIN SS, NIU QW, CHUA NH. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 641-646.
- [32] 闫庆祥, 黄东益, 李开绵, 叶剑秋. 利用改良 CTAB 法提取木薯基因组 DNA[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(4): 30-32.
- YAN QX, HUANG DY, LI KM, YE JQ. Genomic DNA extraction in cassava by modified CTAB method[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(4): 30-32 (in Chinese).
- [33] KUNZ HH, HÄUSLER RE, FETTKKE J, HERBST K, NIEWIADOMSKI P, GIERTH M, BELL K, STEUP M, FLÜGGE UI, SCHNEIDER A. The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis[J]. *Plant Biology*, 2010, 12: 115-128.
- [34] PAN T, WANG YH, JING RN, WANG YF, WEI ZY, ZHANG BL, LEI CL, QI YZ, WANG F, BAO XH, YAN MY, ZHANG Y, ZHANG PC, YU MZ, WAN GX, CHEN Y, YANG WK, ZHU JP, ZHU Y, ZHU SS, et al. Post-Golgi trafficking of rice storage proteins requires the small GTPase Rab7 activation complex MON1-CCZ1[J]. *Plant Physiology*, 2021, 187(4): 2174-2191.
- [35] YAN N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(3): 151-159.
- [36] 齐素坤. 甘薯蔗糖转运蛋白家族基因的克隆与功能初探[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2016.
- QI SK. Gene clone and function research of sucrose transporters gene family in sweet potato (*Ipomoea batatas*(L.) lam)[D]. Ji'nan: Master's Thesis of Shandong University, 2016 (in Chinese).
- [37] CHEN LQ, QU XQ, HOU BH, SOSSO D, OSORIO S, FERNIE AR, FROMMER WB. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport[J]. *Science*, 2012, 335(6065): 207-211.
- [38] 李岩, 王海燕, 张义正. 甘薯蔗糖转运蛋白 IbSUT1x 在酵母细胞中的定位[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(6): 798-802.
- LI Y, WANG HY, ZHANG YZ. Localization of IbSUT1x protein from *Ipomoea batatas* (L.) lam in yeast cells[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2010, 16(6): 798-802 (in Chinese).
- [39] KUHN C, QUICK WP, SCHULZ A, RIESMEIER JW, SONNEWALD U, FROMMER WB. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1[J]. *Plant, Cell and Environment*, 1996, 19(10): 1115-1123.
- [40] 庞建周. 小麦干旱胁迫应答基因 *TaSUT1* 的克隆、表

- 达与基因转化研究[D]. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 2011.
- PANG JZ. Cloning, expression and transformation of *TaSUT1*, a responsive gene in *Triticum aestivum* to drought stress[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2011 (in Chinese).
- [41] 高志民, 杨学文, 彭镇华, 李雪平, 牟少华, 马艳军. 绿竹 *BoSUT2* 基因的分子特征与亚细胞定位[J]. 林业科学, 2010, 46(2): 45-50.
- GAO ZM, YANG XW, PENG ZH, LI XP, MU SH, MA YJ. Molecular characterization and subcellular localization of *BoSUT2* from *Bambusa oldhamii*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2010, 46(2): 45-50 (in Chinese).
- [42] ENDLER A, MEYER S, SCHELBERT S, SCHNEIDER T, WESCHKE W, PETERS SW, KELLER F, BAGINSKY S, MARTINOIA E, SCHMIDT UG. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis mesophyll* cells by a tonoplast proteomic approach[J]. Plant Physiology, 2006, 141(1): 196-207.
- [43] SIVITZ AB, REINDERS A, JOHNSON ME, KRENTZ AD, GROF CPL, PERROUX JM, WARD JM. *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC9. high-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype[J]. Plant Physiology, 2007, 143(1): 188-198.
- [44] REINDERS A, SIVITZ AB, STARKER CG, STEPHEN GANTT J, WARD JM. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 68(3): 289-299.
- [45] OKUBO-KURIHARA E, HIGAKI T, KURIHARA Y, KUTSUNA N, YAMAGUCHI J, HASEZAWA S. Sucrose transporter NtSUT4 from tobacco BY-2 involved in plant cell shape during miniprotoplast culture[J]. Journal of Plant Research, 2011, 124(3): 395-403.
- [46] SCHNEIDER S, HULPKE S, SCHULZ A, YARON I, HÖLL J, IMLAU A, SCHMITT B, BATZ S, WOLF S, HEDRICH R, SAUER N. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters[J]. Plant Biology, 2012, 14(2): 325-336.
- [47] 吴转娣, 咎逢刚, 张树珍, 王俊刚, 唐建平. 蔗糖转运蛋白的调节[J]. 生物技术通报, 2009(7): 12-16, 26.
- WU ZD, ZAN FG, ZHANG SZ, WANG JG, TANG JP. The regulation of sucrose transporters[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(7): 12-16, 26 (in Chinese).
- [48] 张引鹤. 大豆蔗糖转运蛋白 GmSUT4 基因的克隆及抗逆性功能研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2021.
- ZHANG YH. Cloning and stress resistance function analysis of GmSUT4 in soybean[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [49] 王洁, 蔡昱萌, 张楠, 张雅丽. 植物蔗糖转运蛋白表达的调控因素与分子机制[J]. 生物技术通报, 2021, 37(3): 115-124.
- WANG J, CAI YM, ZHANG N, ZHANG YL. Regulatory factors and molecular mechanism of sucrose transporters' expressions in plant[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(3): 115-124 (in Chinese).
- [50] 石永春, 王旭, 王潇然, 金维环, 田园, 于海东. 蔗糖信号调控植物生长和发育的研究进展[J]. 植物生理学报, 2019, 55(11): 1579-1586.
- SHI YC, WANG X, WANG XR, JIN WH, TIAN Y, YU HD. The regulatory role of sucrose as a signal in plant growth and development[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(11): 1579-1586 (in Chinese).
- [51] LEGGEWIE G, KOLBE A, LEMOINE R, ROESSNER U, LYTOVCHENKO A, ZUTHER E, KEHR J, FROMMER WB, RIESMEIER JW, WILLMITZER L, FERNIE AR. Overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology[J]. Planta, 2003, 217(1): 158-167.
- [52] ROSCHE E, BLACKMORE D, TEGEDER M, RICHARDSON T, SCHROEDER H, HIGGINS TJV, FROMMER WB, OFFLER CE, PATRICK JW. Seed-specific overexpression of a potato sucrose transporter increases sucrose uptake and growth rates of developing pea cotyledons[J]. The Plant Journal, 2002, 30(2): 165-175.

(本文责编 陈宏宇)