DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94173

研究简报

甘薯蔗糖转运蛋白基因 *IbSUT3* 的克隆及功能分析

王丹丹^{1,**} 柳洪鹃^{1,**} 王红霞² 张 鹏^{2,*} 史春余^{1,*}

¹ 山东农业大学农学院, 山东泰安 271018; ² 中国科学院分子植物科学卓越创新中心 / 植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

摘 要: 蔗糖作为光合产物的主要运输形式, 其跨膜运输主要由蔗糖转运蛋白介导。本研究采用 RACE 技术, 从甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 中克隆得到甘薯蔗糖转运蛋白基因 *IbSUT3* (GenBank 登录号为 MN233361)。 *IbSUT3* 基因全长 1607 bp, 开放阅读框为 1518 bp, 编码 505 个氨基酸。 *IbSUT3* 蛋白预测分子量为 53.82 kD, 等电点(pI)为 9.19, 含有 12 个跨膜结构域。序列比对表明, *IbSUT3* 属于 Group I 亚族, 与其他物种的 SUTs 蛋白高度相似, 但与 Group IV 亚族的蔗糖转运蛋白在进化上具有明显差别。利用酵母表达体系 SUSY7/ura3 证明 *IbSUT3* 编码有功能的蔗糖转运蛋白。亚细胞定位发现, *IbSUT3* 蛋白定位在烟草原生质体膜上。实时荧光定量 PCR 结果表明, *IbSUT3* 基因在甘薯不同组织中均有表达, 但在叶片中表达最高; 非生物胁迫(低温、高盐、干旱)和外源脱落酸均可诱导 *IbSUT3* 基因在叶片中的表达, 表明该基因响应多种非生物胁迫, 参与植物对脱落酸的响应。

关键词: 蔗糖转运蛋白; *IbSUT3* 基因; 亚细胞定位; 功能分析; 逆境胁迫

Cloning and functional analysis of the sweet potato sucrose transporter *IbSUT3*

WANG Dan-Dan^{1,**}, LIU Hong-Juan^{1,**}, WANG Hong-Xia², ZHANG Peng^{2,*}, and SHI Chun-Yu^{1,*}

¹ College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China; ² National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: Sucrose, as the main transporter of photosynthate, is transported by sucrose transporters. In this study, we cloned *IbSUT3* gene from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam. GenBank accession number MN233361), by RACE technique. The full-length sequence of the gene is 1607 bp and the complete open reading frame is 1518 bp, encoding 505 amino acids. The predicted protein has the molecular weight of 53.82 kD and isoelectric point of 9.19, containing 12 transmembrane domains. Multiple sequence alignment analysis indicated the protein, belonging to Group I, was significantly different from Group IV in evolution and shared high similarities with SUTs from other plant species. *IbSUT3* had the function of transporting sucrose verified by SUSY7/ura3 system. Subcellular localization showed that *IbSUT3* protein was located in the tobacco protoplasts plasma membrane. The qRT-PCR results showed that *IbSUT3* highly expressed in leaves and induced by drought, high salt, low temperature and exogenous abscisic acid, suggesting that *IbSUT3* is involved in response to various abiotic stresses, including abscisic acid.

Keywords: sucrose transporters; *IbSUT3* gene; subcellular localization; function analysis; adversity stresses

在高等植物中, 光合同化物从源器官到库器官的长距离运输以蔗糖为主要形式^[1]。蔗糖不仅可以作为碳源为植物生长发育提供营养物质, 而且可以作为信号物质参与植物体内的信号转导过程^[2]。在源器官中, 蔗糖以共质体或质外体的途径被装载到韧皮部细胞, 通过筛管运输后再以共质体或质外体途径卸载到库器官中^[3]。在质外体

的装载或卸载过程中, 蔗糖转运蛋白(sucrose transporters or carriers, SUTs or SUCs)起重要作用^[4]。

蔗糖转运蛋白是一种典型的膜结合蛋白, 属于 MFS 家族, 具有 12 个典型的跨膜结构域, 存在于植物的组织或细胞中, 利用胞内外的 H^+ 浓度对蔗糖进行跨膜运输^[5]。迄今为止, 已经发现拟南芥、水稻、马铃薯、玉米等多种

本研究由国家自然科学基金青年基金项目(31701357)和山东省薯类产业创新团队首席专家项目(SDAIT-16-01)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Fund (31701357) and the Shandong Agriculture Innovation Team (SDAIT-16-01).

* 通信作者(Corresponding authors): 史春余, E-mail: scyu@sdau.edu.cn; 张鹏, E-mail: zhangpeng@cemps.ac.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 王丹丹, E-mail: wdd201712@126.com; 柳洪鹃, E-mail: liumei0535@126.com

Received (收稿日期): 2019-11-11; Accepted (接受日期): 2020-03-24; Published online (网络出版日期): 2020-04-03.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200402.2004.002.html>

植物蔗糖转运蛋白基因^[6-9]。反义抑制 *PtaSUT4*、*StSUT4*、*NtSUT1* 的转基因植株表现出生长受阻,源叶中蔗糖含量升高,库器官中蔗糖含量降低,生物量下降^[10-12]。*AtSUC2* 和 *AtSUC4* 突变体的种子和幼苗对干旱、高盐、冷胁迫和 ABA 处理超敏感,并且叶片中的蔗糖含量较高,而根中的蔗糖含量较低^[13]。目前,关于蔗糖转运蛋白的研究主要集中于其如何介导蔗糖在源库间的运输与分配以及如何参与逆境、糖信号的响应。

甘薯作为以地下器官为产品的双子叶作物,其产量形成与光合产物的运输密切相关,因此弄清关键性膜蛋白的运输机制对提高甘薯产量至关重要。李岩从甘薯中分离出 *IbSUT1* 和 *IbSUT2*,并在酵母中验证其转运功能,免疫定位发现 *IbSUT2* 定位于筛管伴胞复合体;同时发现 *IbSUT1x* 编码的蛋白定位于酵母细胞膜且不具有蔗糖转运功能^[14-15]。上述报道指出,虽然甘薯蔗糖转运蛋白的研究已取得部分进展,但仍有大量信息值得深入挖掘。本研究首先采用 RT-PCR 结合 RACE 技术,从甘薯中克隆得到 *IbSUT3* 基因,并对其进行生物信息学分析;利用酵母突变菌株 SUSY7/ura3 对其转运功能进行验证;利用烟草原生质体进行亚细胞定位分析;通过实时荧光定量 PCR,研究 *IbSUT3* 组织表达模式以及在非生物胁迫(干旱、高盐、低温)和外源 ABA 处理下的表达特性,研究其在胁迫处理下的响应机制,为深入研究 *IbSUT3* 基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 选用“泰中 6 号(鉴定编号为国品鉴 2013003)”为甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 试验材料。将甘薯组培苗单节点扩繁后种于组培瓶中,每瓶 3 棵,置光照培养箱中培养,16 h 光照/8 h 黑暗,温度 25℃,光照强度 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,用于胁迫处理。用于亚细胞定位的烟草为本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana* Domin),种子撒播于花盆中,待烟草生长 1 个半月后,用于原生质体的提取。

1.1.2 菌种与质粒 大肠杆菌 DH5 α 购自北京全式金生物有限公司。酵母菌株 SUSY7/ura3、酵母表达载体 P416、GFP 表达载体 PUC18 均由中国科学院植物生理研究所张鹏老师实验室提供。

1.1.3 试剂 RNA 提取试剂盒 RNAprep Pure plant Kit 购自 TIANGEN 公司(中国);SMARTer-RACE 试剂盒购自 Clontech 公司;逆转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 购自 TOYOBO 公司;pMD18T 载体、Marker、SYBR Premix Ex Tap 荧光定量试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。脱落酸(ABA)购自 Sigma 公司(美国)。

1.2 材料处理

选择生长 3 个月且长势一致的大田甘薯植株 5 株,分别取叶片(leaf, L; 即第 3 片展开叶)、叶柄(petiole, B)、茎

(stem, J)、白须根(white root, WR)、发育根(developmental root, DR; 即指刚开始膨大的块根)和成熟根(mature root, MR; 即指膨大时间较长的块根),用于荧光定量 PCR 的测定,研究 *IbSUT3* 基因在不同组织中的表达情况。将甘薯组培苗培养到株高 4 cm,分别进行低温(4℃)、高盐(200 mmol L⁻¹ NaCl)、干旱(300 mmol L⁻¹ Mannitol)以及脱落酸(25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA)胁迫处理,分别于胁迫处理 9、12 和 24 h 取样,每个时间点取 3 株植株地上部叶片,液氮速冻。

1.3 *IbSUT3* 基因的克隆

从 4 cm 高的组培苗取约 100 mg 叶片,液氮研磨至粉末状,转至 1.5 mL 离心管中,利用试剂盒提取总 RNA。根据植物 SUT 基因的保守序列设计简并引物 E3-F 和 E3-R (表 1),扩增 *IbSUT3* 基因的 EST 序列并测序。根据测序结果设计 3'和 5'端特异性引物(Sp-R1,2 和 Sp-F1,2)(表 1),参照 RACE 试剂盒 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)说明书进行 *IbSUT3* 基因的 3'端和 5'端扩增并测序。序列拼接并设计扩增全长的引物 *IbSUT3*-F 和 *IbSUT3*-R (表 1),以叶片 cDNA 为模版进行 PCR 扩增,程序为 98℃ 预变性 5 min; 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 15 s, 32 个循环; 72℃ 延伸 10 min。以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.4 *IbSUT3* 基因的生物信息学分析

经测序所得的氨基酸序列,利用 NCBI 的 ORF Finder,参照 Kozak 法则分析该基因的开放阅读框。采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析蛋白质的理化性质、亲疏水性以及跨膜结构;DNAMAN 进行氨基酸多序列比对;MEG5.2 的 NJ 算法进行系统进化树的构建,设 bootstrap 值为 1000。

1.5 qRT-PCR 分析

胁迫处理前后的样品,加液氮迅速研磨成粉末,根据试剂盒的操作步骤提取组织 RNA,反转录为 cDNA (统一浓度为 100 ng μL^{-1})。运用 Primers3Plus 设计 *IbSUT3* 基因的实时荧光定量 PCR 引物(表 1)。以甘薯 *Actin* 为内参基因,每个样品 3 个平行,3 次生物学重复,采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法分析试验结果。所用操作软件为 Bio-Rad CFX Manager,反应程序为 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 39 个循环;溶解曲线,65℃ 到 95℃,每 5 s 增加 0.5℃。

1.6 酵母功能验证

前人常使用酿酒酵母突变株 SUSY7/ura3 对蔗糖转运功能进行验证,该菌株只能够利用胞内蔗糖而不能利用胞外蔗糖,只有在导入具有蔗糖转运功能的外源蛋白的情况下才能在以蔗糖为唯一碳源的培养基上正常生长^[16]。运用 PrimerPrimer 5.0 设计带有酶切位点(*Cal I* 和 *Sma I*)的引物 *SUT3*m-F 和 *SUT3*m-R (表 1),通过 PCR 扩增得到带有酶切位点的 *IbSUT3* 基因的开放阅读框(ORF)区。构建酵母表达载体 P416-*IbSUT3*,转化酵母菌株 SUSY7/ura3。挑取正确表达的单克隆菌斑,用 0.9% NaCl 调制 OD~1,然后稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 和 10⁻⁴,取 10 μL

分别点于含 2%蔗糖和 2%葡萄糖的酵母培养基中。培养基配方为 1.7 g L⁻¹ 酵母基础培养基 YNB (Difco), 2%蔗糖 (Difco)或 2%葡萄糖(Difco), 5 g L⁻¹ 硫酸铵, 20 mg L⁻¹ 色氨酸和 1.5%琼脂糖, 用 HCl 调节至 pH 为 5.0。30℃培养 3 d 后, 观察菌斑生长情况。

1.7 亚细胞定位分析

运用 PrimerPrimer 5.0 设计带有酶切位点(*Sal*I 和 *Spe*I)的引物 *SUT3*g-F 和 *SUT3*g-R (表 1), 通过 PCR 扩增得到带有酶切位点且不含有终止密码子的 *IbSUT3* 基因的 ORF 区。构建 GFP 表达载体 CaMV35S:*IbSUT3*-GFP (PUC18), 转化烟草叶片原生质体。提取烟草叶片原生质体参考

Drechsel 的方法^[17]; 采用 PEG 介导法, 将 GFP 融合蛋白转入原生质体参照 Abel 的方法^[18]。

用配备 603/1.2 NA UPLSAPO 油镜(Olympus)的 Olympus FV1000 共聚焦扫描显微镜观察烟草叶片原生质体。通过用 473 nm 激光激发并在 487 nm 和 521 nm 之间发射, 观察到 GFP 荧光。通过用 559 nm 激光激发并在 606 nm 至 673 nm 之间发射, 观察到叶绿体自发荧光。

1.8 数据处理

所有试验数据均由 3 次重复试验获得, 应用 DPSS 软件分析差异显著性, 运用最小显著性差数法(LSD)进行单因素方差分析, 差异显著性水平均为 $P<0.005$ 。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	目的 Purpose
E3-F	AGATAGTAATGGTGGCCTCCATTGC	EST 序列扩增
E3-R	GCGAAGCCAATGAGGAAGACAGC	EST sequence amplification
Sp-F1	AGATAGTAATGGTGGCGTCCATTGC	3'端和 5'端 RACE 扩增
Sp-F2	GCGTCCTTTATGTGGCTTTGTGG	3' and 5'-RACE amplification
Sp-R1	TGAGATTGGCGCAGTAAACG	
Sp-R2	GCGGCGAAGCCAATGAGGAA	
<i>IbSUT3</i> -F	CCATTCAGGCTGCGCAACT	<i>IbSUT3</i> 全长扩增
<i>IbSUT3</i> -R	TTAAGAAATTAATTCCAAGGTCCAT	<i>IbSUT3</i> full-length amplification
<i>SUT3</i> Q-F	CGGAAAATCCTCCTTGCAAGTG	荧光定量 PCR
<i>SUT3</i> Q-R	GACGCCACCATTACTATCTTCC	Real-time PCR
<i>Actin</i> -F	CTGGTGTTATGGTTGGGATGG	
<i>Actin</i> -R	GGGGTGCCTCGGTAAGAAG	
<i>SUT3</i> m-F	CATCGATATGGAGAGAGACTCCGTTAACG	酵母功能验证
<i>SUT3</i> m-R	CCCCGGGTCAGTGGAAACCACCACCAGAT	Yeast function verification
<i>SUT3</i> g-F	ACGCGTCGACATGGAGAGAGACTCCGTTAACGGAA	亚细胞定位
<i>SUT3</i> g-R	GGACTAGTACGTGGAAACCACCACCAGATAGCTCA	Subcellular localization

2 结果与分析

2.1 *IbSUT3* 基因的获得及序列分析

2.1.1 *IbSUT3* 基因的克隆 为了分析甘薯蔗糖转运蛋白的功能, 本研究克隆了一个基因(GenBank 登录号为 MN233361)并命名为 *IbSUT3*。通过简并引物扩增得到 *IbSUT3* 基因的 EST 序列, 长度为 267 bp。再根据 NCBI 和 PrimerPrimer 5.0 软件设计 3'-RACE 和 5'-RACE 的基因特异性引物, 进行 5'-DNA 和 3'-DNA 克隆, 得到的片段长度分别为 426 bp 和 1425 bp, 拼接两者得到 *IbSUT3* 基因的全长。根据拼接序列设计引物扩增全长, 得到 1607 bp 的序列片段(图 1)。

2.1.2 *IbSUT3* 基因编码蛋白的理化性质 ORF 大小为

1518 bp, 编码的蛋白质有 505 个氨基酸。该蛋白的分子量为 53.82 kD, 等电点(pI)为 9.19; 正电荷残基(Asp + Glu)有 31 个, 负电荷残基(Arg + Lys)有 41 个; 总的亲水性平均系数为 0.572, 预测 *IbSUT3* 基因编码的蛋白为疏水性蛋白。TMHMM 软件预测蛋白跨膜结构域显示, *IbSUT3* 基因编码的蛋白具有 12 个跨膜结构域(图 2)。

2.1.3 *IbSUT3* 序列比对和进化树分析 将 *IbSUT3* 编码的氨基酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) 3 个代表性物种中的 *SUTs* 编码氨基酸进行序列多重比对(图 3)显示, 该基因编码的蛋白与其他物种的 *SUTs* 蛋白的氨基酸序列具有较高同源性, 保守区域分析发现 *IbSUT3* 基因所编码的蛋白同属于 MFS 蛋白家族, 暗示其功能的高度保守。

图 1 *IbSUT3* 基因扩增结果Fig. 1 PCR amplified products of *IbSUT3*

A: *IbSUT3* 基因 EST 序列扩增结果; B: *IbSUT3* 3'-RACE, 5'-RACE 扩增结果; C: *IbSUT3* 全长扩增结果。

A: the EST sequences amplification of *IbSUT3*; B: the 3'-RACE and 5'-RACE amplification of *IbSUT3*; C: the full length amplification of *IbSUT3*.

图 2 *IbSUT3* 蛋白跨膜区预测Fig. 2 Putative transmembrane predication of *IbSUT3*

IbSUT3.txt	...MERDSVNGK...SSLQVEKAEFAA...TPI...KTIWMVASIAAGVQFGWALQSLTTPYVQLLGIPHK	61
StSUT.txt	...MENGTKREGLGKLTVSSSLQVEQP...LAPSKLMKTIWVASIAAGVQFGWALQSLTTPYVQLLGIPHK	66
AtSUT2.txt	MVSHPMKKAANGA...SALETGTGELDQP...ERL...RKLTISVSSIAAGVQFGWALQSLTTPYVQLLGIPHK	65
IbSUT1y.txt	...MEGASSSSSG...GAPGVQQQDYSGEGPAGETPL...WKMMVWSAIAAGVQFGWALQSLTTPYVQLLGIPHK	69
NtSUT1.txt	...MENG...KKLNVSLLAVEQP...LPSKLMKTIWVASIAAGVQFGWALQSLTTPYVQLLGIPHK	60
Consensus	g k v ia gvfqgwalqsltltpyqlilgiphk	
IbSUT3.txt	FASFWLWCGPISGMIVQPLVGYSDNCISRFGRRRPFTIAGALVIFAVELIGAAADIGHAAGERLKTTKRAVTVFVV	141
StSUT.txt	FASFIWLCGPISGMIVQPVVGYSDNCSSRFGRRRPFTIAGALVMIAVELIGAAADIGHASGDTLCKGKKERLAVEVV	146
AtSUT2.txt	WASLIWLCGPISGMIVQPIVGYHSIROCSRFGRRRPFTIAGASLVTAVELIGAAADIGHSMGLDLPKPKTRATVAFAL	145
IbSUT1y.txt	FSSLIWLCGPISGLIVQPLVGYSDNCINRFGRRRPFTIAGALVIFAVELIGAAADIGHSTGDTLCKESKBRATVIFIV	149
NtSUT1.txt	FASFIWLCGPISGMIVQPVVGYSDNCISRFGRRRPFTIAGALVITAVELIGAAADIGHSSGDTLCKGSKERLAVEVV	140
Consensus	s wlcgp sg vqp vgy sd c rfgrrrpfli ga lv av lig aad gh gd l k k ra f	
IbSUT3.txt	GFWLDVANNMLQGPCRALADLSEGSADKMRASNALFSFFMAVGNILGYAAGSYSHLKKVPEPSKTKACDVCANLKSC	221
StSUT.txt	GFWLDVANNMLQGPCRALADLSEGSGRMRTANAFSFFMAVGNILGYAAGSYSHLKKVPEPSKTKACDVCANLKSC	226
AtSUT2.txt	GFWLDVANNMLQGPCRALADLSEGNAKKTRTANAFSFFMAVGNILGYAAGSYRNLMKKVPEPTMESCDLYCANLKTC	225
IbSUT1y.txt	GFWLDVANNMLQGPCRALADLSEGGGKTRTANALFSFFMAVGNILGYAAGAQPTLKKSPFTTHDADCDVCANLKSC	229
NtSUT1.txt	GFWLDVANNMLQGPCRALADLSEGGKAGRMRTANAFSFFMAVGNILGYAAGSYSRILKKIPPSKTPACDVCANLKSC	220
Consensus	gfw ldvann lqgpcra ladls egs g r na fsffmavgn gyaag l k pf t cd ycanlk c	
IbSUT3.txt	FFISAVLLITVITMALTFVREQLKDAADGG...EKAQKGK...VPFFGEIFGAKKLERPMWILLVITLNWIAWFPPFL	297
StSUT.txt	FFIAIFLLISLTITALTIVRENELPEKDEQIDEKLAGAGSKVPFFGEIFGAKKLERPMWILLVITLNWIAWFPPFL	306
AtSUT2.txt	FFISITLLIVFVSLCYVKE...KPWTPEP...TADGKASN...VPFFGEIFGAKKLERPMWILLVITLNWIAWFPPFL	298
IbSUT1y.txt	FFISAVLLITVITAAVTCVCEIPYTK...KKMEGGG...VPFFGEIFGAKKLERPMWILLVITLNWIAWFPPFL	299
NtSUT1.txt	FFIAVFLLSLTITALTIVRENELPEKDEQIDEKAAAGGSKVPFFGEIFGAKKLERPMWILLVITLNWIAWFPPFL	300
Consensus	f 111 t v e vpffge fga k l rpm ll vt lnwIAWfpf l	

(图 3)

图 3 *IbSUT3* 编码的氨基酸序列与其他物种 SUTs 的多重比对
Fig. 3 Multiple alignment of the amino acid sequences of *IbSUT3* with other species

为进一步了解 *IbSUT3* 与其他物种基因之间的进化关系, 选取不同物种的 SUT 蛋白序列, 使用 MEGA5.2 软件, 采用 Neighbor-Joining 原理构建系统进化树(图 4)。分析发现, *IbSUT3* 编码的蛋白属于 Group I 亚族, 并且 *IbSUT3*、*IbSUT1y*、*IbSUT2y*、*NtSUT1* 以及 *NtSUT3* 处在同一进化支上, 说明它们的亲缘关系较近。

2.2 *IbSUT3* 酵母功能验证

为确认 *IbSUT3* 基因编码的蛋白是否具有转运蔗糖的

功能, 构建酵母菌株表达载体, 并转化酵母。结果表明, 在含有 2%蔗糖作为唯一碳源的培养基上, *IbSUT3* 转化的 SUSY7/ura3 酵母菌株相比空载体转化的酵母菌株能更好地生长(图 5-A); 但在含有 2%葡萄糖为唯一碳源的培养基上, *IbSUT3* 及空载体转化的 SUSY7/ura3 酵母菌株生长情况没有差异(图 5-B)。*IbSUT3* 的表达使 SUSY7/ura3 酵母菌株能够在蔗糖为唯一碳源的培养基上生长, 说明 *IbSUT3* 编码了一种具有转运蔗糖功能的蛋白。

图 4 *IbSUT3* 与其他植物 SUTs 蛋白的系统发生分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis between *IbSUT3* and SUTs proteins from other plants species
Nt: *Nicotiana tabacum*; St: *Solanum tuberosum*; Ib: *Ipomoea batatas*; Md: *Malus domestica*; Le: *Solanum lycopersicum*.

图 5 *IbSUT3* 功能分析
Fig. 5 *IbSUT3* function analysis
A: 转化的酵母菌株在含 2%蔗糖培养基上的生长情况; B: 转化的酵母菌株在含 2%葡萄糖培养基上生长情况。
A: growth of transformed yeast strain on media of 2% sucrose; B: growth of transformed yeast strain on media of 2% glucose.

2.3 *IbSUT3* 蛋白亚细胞定位

为探索 *IbSUT3* 蛋白在植物亚细胞结构中的分布, 构建了 *IbSUT3* 基因的 GFP 表达载体 CaMV35S::IbSUT3-GFP。将载体转化到烟草原生质体中, 借助绿色荧光蛋白信号确定目标蛋白在原生质体内的分布。PEG 介导原生

质体转化 18 h 后, 通过共聚焦激光扫描显微镜观察显示, 转 CaMV35S-GFP 载体的烟草原生质体内绿色荧光分布在整个原生质体膜、胞质和细胞核中, 转 CaMV35S::IbSUT3-GFP(图 6)载体的烟草原生质体内绿色荧光蛋白均匀分布于质膜, 说明 *IbSUT3* 蛋白分布于质膜上。

图 6 *IbSUT3* 亚细胞定位分析

Fig. 6 Analysis of *IbSUT3* subcellular localization

2.4 *IbSUT3* 基因的表达模式分析

2.4.1 *IbSUT3* 基因在不同组织中的表达 分别提取甘薯植株不同部位的 RNA 进行 qRT-PCR 检测, 分析 *IbSUT3* 基因在不同组织中的表达模式表明, *IbSUT3* 基因在整株植物中具有相对较高的表达, 其中在 L (叶片) 中相对表达最高, 在 J (茎) 中相对表达量最低(图 7)。

2.4.2 *IbSUT3* 基因在非生物胁迫及外源 ABA 处理下的表达模式 低温(4°C)、高盐($200\text{ mmol L}^{-1}\text{ NaCl}$)、干旱($300\text{ mmol L}^{-1}\text{ Mannitol}$)以及脱落酸($25\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}\text{ ABA}$)处理均可诱导 *IbSUT3* 基因的表达(图 8)。与对照处理(0 h)相比, 胁迫处理 9~24 h 时 *IbSUT3* 基因的表达均呈现上升的趋势, 仅在干旱处理 12 h 时出现下降趋势, 但下降不显著。在低温、高盐

及干旱处理条件下, 与 9 h 和 24 h 相比, 处理 12 h 时 *IbSUT3* 基因的表达量较低, 这可能与该取样时间在夜间有关。

3 讨论

由于蔗糖是光合作用的主要产物, 是植物贮藏、运输和利用糖分的主要形式, 其运输和分配的结果将直接影响作物的产量和品质^[19], 所以分离、鉴定甘薯中的蔗糖转运蛋白, 深入了解其功能, 不仅有助于了解甘薯体内光合产物的运输、分配过程, 而且可以分析其对产量和品质的影响, 进而为实现甘薯高产优质提供理论依据。本研究填补了甘薯蔗糖转运蛋白研究的空缺, 首次成功克隆了甘薯 *IbSUT3* 基因, 该基因编码的蛋白属于 Group I 亚族, 定位于质膜且具有转运蔗糖的功能。 *IbSUT3* 基因在叶片中

图 7 *IbSUT3* 基因在不同组织中的表达

Fig. 7 Expression of *IbSUT3* in different tissues

L: 叶片; B: 柄; J: 茎; WR: 白须根; DR: 发育根; MR: 成熟根。图柱上不同小写字母表示在 0.05 水平上显著差异。
L: leaf; B: petiole; J: stem; WR: white root; DR: developmental root; MR: mature root. Bars indexed with different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

图 8 *IbSUT3* 在胁迫处理下的表达模式

Fig. 8 Expression profiles of *IbSUT3* under stresses

图柱上不同小写字母表示在 0.05 水平上显著差异。
Bars indexed with different lowercase letters are significantly different at the 0.05 probability level.

高表达且响应多种胁迫处理, 暗示 *IbSUT3* 可能参与蔗糖装载过程、参与植物抗逆反应。

3.1 *IbSUT3* 具有蔗糖转运功能

SUTs 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。因此对于 SUTs 的研究, 首先需要分析其是否具有转运功能。本研究从甘薯品种“泰中 6 号”中克隆得到的 *IbSUT3* 基因, 其编码的蛋白通过在缺陷酵母中进行异源表达, 发现可以互补缺陷酵母的蔗糖吸收, 说明其编码的蛋白具有蔗糖转运的功能(图 5)。拟南芥 *AtSUC4* 和小麦的 *TaSUT2A*、*TaSUT2B* 和 *TaSUT2D* 等均通过此试验验证了蛋白的转运功能^[20-21]。

3.2 *IbSUT3* 基因在叶片中表达较高

已有研究指出 Group I 亚族的蔗糖转运蛋白主要在源器官中表达, 并且对蔗糖的韧皮部装载和长距离运输起着非常关键的作用^[22-24]。在反义抑制 *StSUT1* 的马铃薯植株中, *SUT1* 基因的表达式下降, 植株生长迟缓, 而且在叶片中积累大量的可溶性糖和淀粉, 最终导致块茎产量降低^[22]。反义抑制 *NtSUT1* 的烟草植株表现出植株生长减缓, 叶片中蔗糖的输出速率大大降低, 导致蔗糖在叶片中大量积累^[25]。本研究发现, *IbSUT3* 基因编码的蛋白属于 Group I 亚族(图 4)且在源叶中高表达(图 7), 这暗示着该基因编码的蛋白参与了蔗糖在韧皮部的装载。源叶中的蔗糖能够及时高效地装载到韧皮部, 对光合产物从源器官到库器官的运输至关重要, 对甘薯产量的形成意义重大。

3.3 *IbSUT3* 基因响应多种非生物胁迫

Xu 等^[26]通过分析 5 种双子叶植物(*Arabidopsis thaliana*、*Glycine max*、*Solanum tuberosum*、*Solanum lycopersicum*、*Populus* spp.)和 4 种单子叶植物(*Zea mays*、*Oryza sativa*、*Triticum aestivum*、*Hordeum vulgare*)中 SUTs 对逆境处理的响应情况, 证明 SUTs 在植物抵抗逆境过程中发挥重要作用。在盐胁迫下, 所有芹菜组织中的 *AgSUT1* 基因的表达均降低, 根系中降低更为显著, 这可能表明在盐胁迫下根系对蔗糖代谢需求降低^[27]。*AtSUC2* 和 *AtSUC4* 在低温、高盐、干旱及外源 ABA 处理下基因的表达发生明显变化, 且通过 ABA-依赖的信号通路抵抗胁迫^[13]。上述研究均证实 SUTs 作为重要的调控因子参与逆境响应, 但是关于甘薯 *IbSUT3* 基因是否参与逆境响应尚未明确。本研究发现非生物胁迫均可诱导 *IbSUT3* 基因的表达发生显著变化, 且在低温、高盐及干旱处理下的表达模式呈现相同规律(图 8), 这意味着 *IbSUT3* 可能以相同的机制响应这 3 种胁迫处理。*IbSUT3* 基因在非生物胁迫下的诱导表达, 表明该基因在甘薯抗逆中发挥重要作用。

References

[1] Lalonde S, Wipf D, Frommer W B. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 341–372.

[2] Durand M, Mainson D, Porcheron B, Mauroussat L, Lemoine R, Pourtau N. Carbon source-sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta*, 2018, 247: 587–611.

[3] Peng C C, Zhao X L. Function and regulation of plant sucrose transporter. *Plant Physiol Commun*, 2010, 46: 317–324.

[4] Liesche J, Krügel U, He H, Chincinska I, Hackel A, Kühn C. Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 1426–1433.

[5] Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38: 151–159.

[6] 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. *分子植物育种*, 2011, 9: 251–255.

Gao L, Xiao W F, Li W Y, Peng C C. Research progress on the function of *Arabidopsis* sucrose transporter (SUTs). *Mol Plant Breed*, 2011, 9: 251–255 (in Chinese with English abstract).

[7] 孙学武, 谭炎宁, 孙志忠, 袁定阳, 段美娟. 水稻蔗糖转运蛋白研究进展. *生命科学研究*, 2014, 18: 157–161.

Sun X W, Tan Y N, Sun Z Z, Yuan D Y, Duan M J. Research progress on rice sucrose transporter. *Life Sci Res*, 2014, 18: 157–161 (in Chinese with English abstract).

[8] Chincinska I A, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C. Sucrose transporter *StSUT4* from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiol*, 2008, 146: 515–528.

[9] 贺红霞, 陈亮, 康爽. 玉米 *ZmSUT4-J* 基因的克隆与植物表达载体构建. *东北农业科学*, 2015, 40(3): 18–22.

He H X, Chen L, Kang S. Cloning of maize *ZmSUT4-J* gene and construction of plant expression vector. *Northeast Agric Sci*, 2015, 40(3): 18–22 (in Chinese with English abstract).

[10] Payyavula R S, Tay K H, Tsai C J. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast *PtaSUT4* to biomass and carbon partitioning. *Plant J*, 2015, 65: 757–770.

[11] Chincinska I, Gier K, Krügel U, Liesche J, He H, Grimm B, Harren F J, Cristescu S M, Kühn C. Photoperiodic regulation of the sucrose transporter *StSUT4* affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 26.

[12] Bürkle L, Hibberd J M, Quick W P, Kuhn C, Hirner B, Frommer W B. The H⁺-sucrose cotransporter *NtSUT1* is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol*, 1998, 118: 59–68.

[13] Gong X, Liu M, Ruan Y, Ding R, Ji Y, Zhang N, Zhang S, Farmer J, Wang C. *Arabidopsis AtSUC2* and *AtSUC4*, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. *Physiol Plant*, 2014, 153: 119–136.

[14] Yan L, Gu Y, Hua Q, Zhang Y Z. Two pairs of sucrose transporters in *Ipomoea batatas* (L.) Lam are predominantly expressed in sink leaves and source leaves respectively. *Plant Sci*, 2010, 179: 250–256.

[15] 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. *应用与环境生物学报*, 2010, 16: 798–802.

Li Y, Wang H Y, Zhang Y Z. Localization of sweet potato sucrose transporter *IbSUT1x* in yeast cells. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, 16: 798–802 (in Chinese with English abstract).

- [16] Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J*, 1992, 11: 4705–4713.
- [17] Drechsel G, Bergler J, Wippel K, Sauer N, Vogelmann K, Hoth S. C-terminal armadillo repeats are essential and sufficient for association of the plant U-box armadillo E3 ubiquitin ligase SAUL1 with the plasma membrane. *Exp Bot*, 2011, 62: 775–785.
- [18] Abel S, Theologis A. Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J*, 1994, 5: 421–427.
- [19] 伍宝朵, 周蓉, 陈海峰. 蔗糖载体调控作物“源、库”分配的研究进展. *中国农学通报*, 2012, 28(6): 26–30.
Wu B D, Zhou R, Chen H F. The progress about sucrose transporters mediate crop sucrose from source to sink. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, 28(6): 26–30 (in Chinese with English abstract).
- [20] Weise A, Barker L, Kühn C, Buschmann H, Frommer W B, Ward J M. A new subfamily of sucrose transporters, *SUT4*, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell*, 2000, 12: 1345–1355.
- [21] Deol K. Molecular Cloning and Functional Characterization of a New Sucrose Transporter in Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.). PhD Dissertation of the University of Manitoba, Manitoba, Canada, 2012.
- [22] Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. Antisense repression of the sucrose transporter affects assimilate partitioning in transgenic potato plants. *EMBO J*, 1994, 13: 1–7.
- [23] Kühn C, Fernie A R, Roessner-Tunali U. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol*, 2003, 131: 102–113.
- [24] Gottwald J R, Krysan P J, Young J C, Evert R F, Sussman M R. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 97: 13979–13984.
- [25] Burkle L. The H^+ -sucrose cotransporter *NtSUT1* is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol*, 1998, 118: 59–68.
- [26] Xu Q, Chen S, Yun J R. Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. *Plant Physiol*, 2018, 17: 930–945.
- [27] Noiraud N. The sucrose transporter of *Celery* identification and expression during salt stress. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1447–1456.