

马俊红,李军营,马二登,等. 烤烟不同生育期蔗糖代谢关键酶基因的表达[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):32-34.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.009

# 烤烟不同生育期蔗糖代谢关键酶基因的表达

马俊红,李军营,马二登,卢秀萍

(云南省烟草农业科学研究院,昆明云南 650031)

**摘要:**为了研究烤烟不同生育期蔗糖代谢的分子特点,采用 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 法对云烟 87 在不同生育期的 3 种蔗糖代谢关键酶基因——转化酶(invertase,Inv)、蔗糖合成酶(sucrose synthase,SuSy)和蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,SPS)基因的表达水平进行分析。结果表明:在烟叶发育前期(团棵期、旺长期)Inv 酶基因的表达量较高;SuSy 酶基因的在烤烟不同生育期的表达量变化呈单峰曲线,在打顶后表达量最高,之后又降低。SPS 酶基因的表达量在烤烟生长发育后期较高,说明烤烟蔗糖的累积主要在发育后期进行。

**关键词:**烤烟;生育期;蔗糖代谢;转化酶;蔗糖合成酶;蔗糖磷酸合成酶;基因表达

**中图分类号:**S572.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)05-0032-03

烤烟是世界上一种重要的经济作物,烟叶的品质与其糖含量密切相关,水溶性糖与氨基酸发生梅拉德反应可以产生多种香气物质<sup>[1-2]</sup>。蔗糖是主要的水溶性糖之一,也是烟草光合作用的主要产物,可以为烟草的生长提供碳源和能量<sup>[3-5]</sup>,同时也是细胞代谢的调控因子,可调节转运蛋白、贮藏蛋白和编码酶的基因的表达<sup>[6-7]</sup>。与蔗糖代谢密切相关的酶主要有转化酶(invertase,Inv)、蔗糖合成酶(sucrose synthase,SuSy)和蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,SPS)。SPS 是调控植物蔗糖合成的关键酶之一,其活力直接

影响光合产物的分配,研究表明其与蔗糖形成呈正相关<sup>[8-10]</sup>。SuSy 是一种可逆酶,既可催化蔗糖的合成,又可催化蔗糖的分解,通常认为,它主要起分解蔗糖的作用,能为细胞壁提供合成底物和合成淀粉<sup>[11-12]</sup>。Inv 酶与植物体内形成蔗糖梯度相关<sup>[12-13]</sup>,Bachelier 等研究表明,处在细胞壁中的转化酶能调节蔗糖从韧皮部卸出,并且控制蔗糖吸收速度,而在液泡中的转化酶则可以调节蔗糖和己糖的贮存<sup>[14]</sup>。

本研究通过对烤烟品种云 87 在团棵期、旺长期、现蕾期、打顶后、成熟期 5 个生育期的蔗糖含量,Inv 酶、SuSy 酶、SPS 酶活性以及 3 个酶基因的表达情况进行测定,从而明确不同生育期蔗糖代谢主要酶活性及酶基因的变化特点,揭示烤烟不同生育期蔗糖代谢的分子特点,并为改善烤烟品质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验地点设在云南省玉溪研和基地,在移栽后第 20 天(团

收稿日期:2014-05-27

基金项目:中国烟草总公司云南省公司资助项目“云南清香型特色优质烟叶开发项目”(编号:2011YN02);中国烟草总公司资助项目“清香型特色优质烟叶开发项目”[编号:110201101003(TS-03)]。

作者简介:马俊红(1976—),女,山西晋中人,博士,副教授,主要从事特色优质烟叶开发和烟草病害分子诊断等研究。Tel:(0871)65106539;E-mail:majunhong.china@gmail.com。

[4]徐善金,虞德兵,杜文兴. 肌苷酸及其相关酶的研究进展[J]. 生物技术通报,2011(3):44-53.

[5]余春林. 鸡肌苷酸合成酶系相关基因表达水平变化与肌苷酸含量的关联性研究[D]. 成都:西南民族大学,2010.

[6]Aimi J, Qiu H, Williams J, et al. De novo purine nucleotide biosynthesis: cloning of human and avian cDNAs encoding the trifunctional glycinamide ribonucleotide synthetase - aminoimidazole ribonucleotide synthetase - glycinamide ribonucleotide transformylase by functional complementation in *E. coli* [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22):6665-6672.

[7]季从亮. 鸡肉 IMP 含量相关候选基因 SNP 筛查及其用于地方鸡种群体遗传结构分析的研究[D]. 扬州:扬州大学,2005.

[8]金红. 优质肉鸡肌苷酸与肌内脂肪含量相关基因聚合效应研究[D]. 成都:西南民族大学,2012.

[9]常山,李小成,徐亚欧,等. 优质肉鸡腺苷琥珀酸裂解酶基因第 2 和第 9 外显子单核苷酸多态性分析[J]. 四川畜牧兽医,2008,35(6):25-28.

[10]陈国宏,侯水生,吴信生,等. 中国部分地方鸡肌肉肌苷酸含量研究[J]. 畜牧兽医学报,2000,31(3):211-215.

[11]陈继兰. 鸡肉肌苷酸和肌内脂肪含量遗传规律及相关候选基因的研究[D]. 北京:中国农业大学,2004.

[12]张学余,束婧婷,季从亮,等. 鸡 *ADSL* 基因外显子 9 单核苷酸多态性及其与鸡肉肌苷酸含量的相关分析[C]//中国畜牧兽医学. 第十次全国畜禽遗传标记研讨会论文集. 北京:中国畜牧兽医学,2006:116-200.

[13]龚琳琳. 鸡 *ADSL* 和 *GARS-AIRS-GART* 基因遗传变异、表达及其与肌苷酸的相关分析[D]. 扬州:扬州大学,2011.

[14]束婧婷,吉文林,包文斌,等. 鸡 *ADSL* 基因和 *GARS-AIRS-GART* 基因对鸡肉肌苷酸(IMP)含量的影响[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(8):786-791.

[15]韩威,张学余,李慧芳,等. *ADSL* 和 *GARS-AIRS-GART* 基因多态位点及聚合基因型对白耳鸡胸肌肌苷酸(IMP)含量的效应分析[J]. 农业生物技术学报,2009,17(4):577-581.

棵期)、第 40 天(旺长期)、第 60 天(现蕾期)、第 80 天(打顶后)、第 100 天(成熟期)采集云烟 87 的第 12 张叶(自下而上),将新鲜烟叶 1g 放入液氮罐冷冻后,置于 -80 ℃ 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 总 RNA 提取按照 RNAiso Plus 和 RNAiso - mate for Plant Tissue 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]说明书进行。用核酸蛋白紫外分析仪检测  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  的比值以鉴定 RNA 抽提质量,  $1.8 \leq D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} \leq 2.0$ , 表明总 RNA 质量较好,同时测定其标本总 RNA 浓度。

1.2.2 总 RNA 的反转录 反转录反应应用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]进行,具体方法参照试剂盒说明书。

1.2.3 引物设计 选择内参基因 Actin 以及 3 个关键酶基因(蔗糖合成酶基因、蔗糖磷酸合成酶基因以及蔗糖转化酶基因),按照实时荧光定量 PCR 扩增的引物设计原则,避免引物 3'端互补,以及“发卡”结构,引物的长度为 18 ~ 22 bp,注意碱基的随机分配,GC 含量在 40% ~ 60% 之间,扩增片段小于 200 bp。并应用 Primer3 (v. 0. 4. 0) 软件设计相应的扩增引物。引物合成由 Invitrogen 公司完成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基 因	引物	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
Inv	Inv - F	CTTGCGAGGGATAGGGTG	166
	Inv - R	TGGTTGGAAGGGATTGAG	
SPS	SPS - F2	GGTGGTTTTCTGGTGAGAAA	164
	SPS - R2	CATTAGGGCTGTCTGAATGGT	
SS	SS - F5	TTCACGATGCCTGGATTGTA	133
	SS - R5	ATGCTGTCAATCGCTTTTCC	
$\beta$ - actin	actin - F	CACTGAGAGAGGTTACAT	90
	actin - R	TAGTCAAGAGCCACATAA	

1.2.4 实时荧光定量 RT - PCR 分析 以受试材料叶片反转录 cDNA 为模板, Real - time qPCR 扩增反应试剂 SYBR ® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 来自宝生物工程(大连)有限公司。Real - time qPCR 扩增和分析在 Mx3005P ® QPCR System 荧光定量 PCR 仪(Stratagene)上进行,采用 96 孔反应模块。反应体系:2 × SYBR Premix 12.5 μL, Forward Primer 0. 4 μmol/L, Reverse Primer 0. 4 μmol/L, Rox 1 μmol/L, 补充至 25 μL。扩增反应条件:95 ℃ 30 s, 1 个循环;95 ℃ 5 s, 58 ℃ 30 s, 45 个循环;95 ℃ 30 s, 58 ℃ 1 min, 95 ℃ 1 min, 1 个循环。PCR 反应结束后, 65 ~ 95 ℃ 产生溶解曲线, 阈值线由 Mx Pro 软件自动设定。每个样品重复 3 次, 不同时期样品的表达量检测均在相同的 real - time PCR 循环中进行, 以保证标准样品和处理样品扩增条件一致。

1.2.5 数据分析 试验结果最少是 3 次试验的平均值。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的方法计算待测基因的相对表达水平。其中, 各基因在对照情况下的相对表达量设定为 1.0。采用 Excel 2003 进行数据处理与作图, 采用 SPSS 13.0 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 烤烟不同生育期蔗糖转化酶基因的表达分析

蔗糖转化酶(Inv)的活性标志着植物叶片对光合产物利

用的强度,也是碳代谢的重要标志之一<sup>[15-16]</sup>。从图 1 中可以看出, 烤烟蔗糖转化酶基因的表达随着烤烟的生长发育从团棵期到成熟期逐渐减弱, 在团棵期 Inv 酶基因的表达最强, 从旺长到现蕾期 Inv 酶基因的表达量急剧降低, 从现蕾期至成熟期表达量维持在较低水平, 且相对比较稳定。说明在烟叶发育早期主要由 Inv 酶催化蔗糖的水解, 且在发育的早期烟株对光合产物利用的强度最大。而后期 Inv 酶基因的表达量降低有助于烟叶蔗糖的累积。

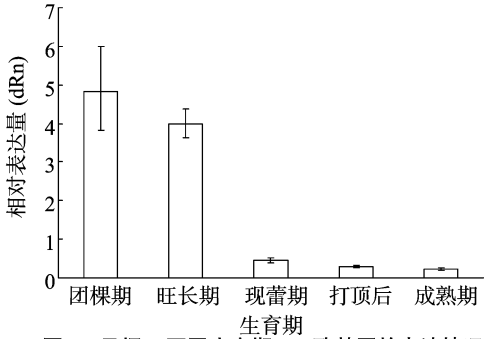


图 1 云烟87不同生育期 Inv 酶基因的表达情况

2.2 烤烟不同生育期蔗糖合成酶基因的表达分析

蔗糖合成酶是促使蔗糖进入各种代谢途径的关键酶之一。从图 2 可以看出, 云烟 87 蔗糖合成酶基因的表达量呈先升高后降低的趋势, 从团棵期、旺长期到现蕾期逐渐升高, 在打顶后蔗糖合成酶基因的表达量急剧升高, 同时达到最大值, 到成熟期表达量则急剧下降, 说明在烟叶生长后期, 蔗糖降解主要通过蔗糖合成酶途径来完成的, 而成熟期烟叶需要累积蔗糖, 因而 SuSy 酶基因的表达量下降, 有助于烟叶适时成熟。

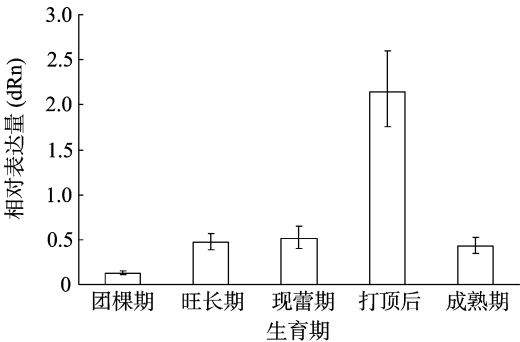


图2 云烟 87 不同生育期 SuSy 酶基因的表达情况

2.3 烤烟不同生育期蔗糖磷酸合成酶基因的表达分析

蔗糖磷酸合成酶(SPS)是植物体内控制蔗糖合成的关键酶。植物体内蔗糖的积累与 SPS 活性正相关, SPS 还参与植物的生长和产量形成, 并在植物的抗逆过程中起重要作用<sup>[8-10]</sup>。从图 3 可以看出, 云烟 87 在团棵期、旺长期、现蕾期 3 个时期的蔗糖磷酸合成酶基因表达量均较低, 而打顶后和成熟期的 SPS 基因表达量较高, 且远高于烟株生长发育前 3 个时期的表达量, 说明烤烟蔗糖的累积主要在烤烟生长发育后期进行。

3 结论与讨论

蔗糖是高等植物光合作用的主要产物, 参与蔗糖代谢和

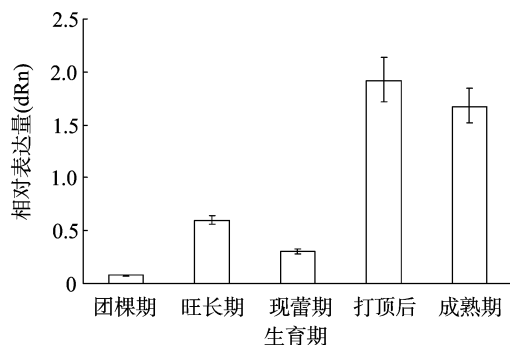


图3 云烟 87 不同生育期 SPS 酶基因的表达情况

积累的酶主要包括蔗糖转化酶、蔗糖磷酸合成酶和蔗糖合成酶。本研究首次应用实时荧光定量 RT-PCR 的方法,对云南烤烟不同生育期蔗糖代谢和积累过程中的 3 种主要酶基因的表达情况进行了分析。蔗糖是触发衰老的因子,糖分的积累会抑制光合基因的表达,从而引起烟叶的早衰<sup>[16]</sup>。Huber 曾指出 SPS 酶活力越高,蔗糖积累的越多<sup>[17]</sup>。同样,本试验的研究结果也表明,SPS 基因表达量在烤烟生长发育前期较低,蔗糖积累相应较少,不会导致烟叶早熟,而在后期表达量较高,蔗糖积累量较多,有利于烟叶适时成熟。

蔗糖转化酶基因的表达随植物生长发育时期的不同而改变,存在时间和空间的差异。Inv 被认为参与了植物的生长和器官建成。许多研究表明,一般在植物的分生组织和快速生长的幼嫩的组织和器官中(如幼嫩的叶片、茎、花芽、根尖、幼嫩的果实等)Inv 活性较高<sup>[18-21]</sup>。同样,本研究也证实了这一结论,Inv 酶基因的表达在团棵期和旺长期最强,即在烤烟生长发育的前期,此时烟叶幼嫩,而到后期则该基因的表达量下降。

在烟叶发育早期主要由 Inv 酶催化蔗糖的水解,到生长后期,蔗糖降解主要通过蔗糖合成酶催化的途径来完成。本研究显示,云烟 87 在打顶后 SuSy 酶基因的表达量最高,而这一生育期的 Inv 酶基因的表达量则较低,说明打顶后蔗糖降解的主要途径通过蔗糖合成酶催化来完成的。而在成熟期 Inv 和 SuSy 酶基因的表达量均较低,可能是因为在成熟期烟叶需要累积蔗糖,从而达到适时成熟。

但是,由于蔗糖代谢过程中还涉及到众多的其他酶,同时,人们对基因表达与酶活性的之间对应关系了解的也并不透彻,因此,蔗糖的积累与 Inv 酶、SPS 酶、SuSy 酶基因表达以及酶活性的精确关系还有待于进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 张槐苓,葛翠英,穆怀静,等. 烟草分析与检验[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1994:103-111.
- [2] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京:中国农业出版社,2003:42-43.

- [3] 云南省烟草科学研究所,中国烟草育种研究(南方)中心. 云南烟草栽培学[M]. 北京:科学出版社,2007:38-39.
- [4] Farrar J, Pollock C, Gallagher J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants[J]. Plant Sci, 2000, 154:1-11.
- [5] Jang J C, Sheen J. Sugar sensing in higher plants[J]. Plant Cell, 1994, 6(1):1665-1679.
- [6] Vaughn M W, Harrington G N, Bush D R. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:10876-10880.
- [7] Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, et al. Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression[J]. Plant J, 2002, 30:489-497.
- [8] 王宁宁,朱建新,王淑芳,等. 苦参碱对小麦旗叶中蔗糖磷酸合成酶活性的调节[J]. 南开大学学报:自然科学版, 2000, 33(1):19-22.
- [9] 张玉,陈昆松,张上隆,等. 猕猴桃果实采后成熟过程中糖代谢及其调节[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(3):317-324.
- [10] 黄东亮,李双喜,廖青,等. 植物蔗糖磷酸合成酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(6):109-119.
- [11] McCollum T G, Huber D J, and Cantliffe D J. Soluble sugar accumulation and activity of related enzymes during musk melon fruit development[J]. Amer Soc Hort Sci, 1988, 113:399-403.
- [12] 张明方,李志凌. 高等植物中与蔗糖代谢相关的酶[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3):289-295.
- [13] Roitsch T, Tanner W. Cell wall invertase: bridging the gap[J]. Botanica Acta, 1996, 109(2):90-93.
- [14] Bachelier C, Granam J, Manoir J du, et al. Integration of an invertase gene to control sucrose metabolism in strawberry cultivars[J]. Acta Horticult, 1997, 439:161-163.
- [15] 李玉潜,谢九生,谭中文. 甘蔗叶片碳、氮代谢与产量、品质关系研究初探[J]. 中国农业科学, 1995, 28(4):46-53.
- [16] 魏庆华,杜铮,刘卫群,等. 河南不同地区烤烟蔗糖含量及其代谢关键酶之间的关系分析[J]. 江西农业学报, 2011, 23(1):6-8, 13.
- [17] Huber S C. Role of sucrose-phosphate synthase in partitioning of carbon in leaves[J]. Plant Physiol, 1983, 71:818-821.
- [18] Estruch J J, Beltrán J P. Changes in invertase activities precede ovary growth induced by gibberellic acid in *Pisum sativum*[J]. Physiol Plant, 1991, 81:319-326.
- [19] Ricardo C P P, Apreses T. Invertase activity during the development of carrot roots[J]. Phytochemistry, 1970, 9:239-247.
- [20] Schaffer A A. Invertase in young and mature leaves of *Citrus sinensis*[J]. Phytochemistry, 1986, 25:2275-2277.
- [21] Xu D P, Sun S J S, Black C C. Sucrose metabolism in lima bean seeds[J]. Plant Physiol, 1989, 89:1106-1116.