

曹辉庆,黄诚梅,蒋胜理,等. 甘蔗 *SPSB* 基因 5'侧翼序列的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):94-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.022

甘蔗 *SPSB* 基因 5'侧翼序列的克隆及生物信息学分析

曹辉庆¹,黄诚梅¹,蒋胜理¹,罗海斌¹,邓智年²,吴凯朝²,徐林²,魏源文¹

(1. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室,广西南宁 530007;2. 广西农业科学院甘蔗研究所,广西南宁 530007)

摘要:蔗糖磷酸合成酶(SPS)是蔗糖合成途径的关键限速酶,对蔗糖的合成和碳水化合物的分配具有重要的调控作用。采用染色体步移法技术克隆获得了甘蔗 *SPSB* 基因 5'端侧翼序列,并对其序列进行生物信息学分析。分离获得了 4 399 bp 的 5'侧翼序列,该序列除具有启动子核心序列 TATA-box 和增强子元件 CAAT-box 等典型的真核生物启动子基本元件外,还含有多种光应答元件、激素响应元件,以及与缺氧、干旱、低温诱导有关的顺式作用元件和一些组织调控表达有关的顺式调控元件,表明 *ScSPSB* 启动子可能具有逆境应答、激素应答及组织特异表达特性,值得开展进一步的功能研究。

关键词:甘蔗; *ScSPSB* 基因;侧翼序列;生物信息学分析

中图分类号: S566.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0094-05

甘蔗属高光合效率 C_4 植物,是我国主要的糖料作物,其蔗糖产量占我国食糖总量的 90% 以上。甘蔗蔗糖积累过程是甘蔗生长发育中最重要的代谢途径,与甘蔗产量和品质形成密切相关。蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,简称 SPS)作为蔗糖代谢途径中的关键限速酶,其活性不仅能影响蔗糖的合成能力,还影响光合产物的分配和糖分积

累^[1-6]。因此,研究甘蔗 *SPS* 基因的表达调控机制对提高甘蔗产量及蔗糖含量具有重要意义。

目前,已从拟南芥^[7]、荔枝^[8]、水稻^[9]、玉米^[10]、甘蔗^[11]、狼尾草^[12]等多种作物中克隆到 *SPS* 基因,并进行了 *SPS* 基因家族的基因组鉴定和表达分析^[7-12]。前期研究发现,植物 *SPS* 基因可分为 4 个家族共 5 种类型:*SPSA*(Ⅱ类)、*SPSB*(Ⅴ类)、*SPSC*(Ⅰ类)、*SPSD*(Ⅲ类和Ⅳ类)^[13-15],且不同植物体内不同家族的 *SPS* 基因表现出不同的表达模式和功能差异^[16-21]。至今,在甘蔗中已经鉴定出 5 个 *SPS* 基因家族,桂意云等对其中的 4 个家族 *SPS* 基因进行了时空表达特性分析^[18]。研究表明,在甘蔗伸长期、蔗糖积累前期和蔗糖积累后期,*SPSD*Ⅲ基因在所有甘蔗品种的未成熟叶片、成熟叶片和茎中均高水平稳定表达;*SPSB* 基因在成熟叶片中几乎不表达,而以茎中表达量最高;在蔗糖积累后期,*SPSA* 和 *SPSC* 基

收稿日期:2019-05-05

基金项目:广西农业科学院基本科研业务专项(编号:桂农科 2017YM35、2015YT96)。

作者简介:曹辉庆(1975—),女,广西全州人,硕士,助理研究员,主要从事作物栽培学与分子生物学研究工作。E-mail:1034403583@qq.com。

通信作者:魏源文,博士,研究员,主要从事植物分子生物学与分子病理学研究。E-mail:yw-wei@126.com。

[4]王宇恒,郭薇,王欣,等. *Fc* 融合蛋白在药学领域的研究进展[J]. 药学进展,2014,38(6):419-425.

[5]陈沁韵,万延民,张晓燕. *IgG-Fc* 融合蛋白的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2015,28(11):1223-1227.

[6]冀丽军,白乌仁图雅,柴琳,等. *TACI-Fc* 融合蛋白的基因构建、原核表达及生物活性鉴定[J]. 生物技术,2013,23(3):24-28.

[7]白乌仁图雅,赵亚聪,朱燕锋,等. *sTACI-Fc-Myc* 重组质粒的构建、原核表达及活性鉴定[J]. 现代生物医学进展,2015,15(2):217-220.

[8]Jefferis R, Lund J, Pound J D. *IgG-Fc* - mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation[J]. Immunological Reviews, 1998, 163: 59-76.

[9]Morgan E L, Thoman M L, Weigle W O. Enhancement of T lymphocyte functions by *Fc* fragments of immunoglobulins. I. Augmentation of allogeneic mixed lymphocyte culture reactions requires I-A - or I-B - subregion differences between effector and stimulator cell populations [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1981, 153: 1161-1172.

[10]Gupta S, Gach J S, Becerra J C, et al. The neonatal *Fc* receptor

(*FcRn*) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(11):e1003776.

[11]de Groot A S, Moise L, Memury J A, et al. Activation of natural regulatory T cells by *IgG-Fc* - derived peptide "Tregitopes" [J]. Blood, 2008, 112(8):3303-3311.

[12]罗岚,刘洪洪,李祥,等. 含人 *Fc* 重组凋亡融合蛋白体内外抗肿瘤活性初步研究[J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(1):18-23.

[13]张晓光,杨韧,王娇,等. 埃博拉病毒重组膜蛋白 *Gp-Fc* 表达及免疫原性研究[J]. 病毒学报, 2016, 32(1):8-13.

[14]Liu Z H, Liu Y K, Zhang Y Y, et al. Surface displaying of swine *IgG1-Fc* enhances baculovirus - vectored vaccine efficacy by facilitating viral complement escape and mammalian cell transduction [J]. Veterinary Research, 2017, 48(1):29.

[15]Dong W W, Zhang H, Huang H, et al. Chicken *IgY-Fc* linked to *Bordetella avium* ompA and Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharide adjuvant enhances macrophage function and specific immune responses [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7:1708.

因在不同组织中的表达量比蔗糖积累前期均有所下降。Verma 等采用半定量 RT-PCR 技术,测定了不同发育阶段的高、低糖甘蔗品种的节间 SPS 活性及转录表达水平,发现成熟节间中 SPS 活性和转录表达均高于未成熟节间;与低糖品种相比,高糖品种在所有发育阶段均表现出更高的 SPS 转录表达和酶活性,SPS 活性与蔗糖呈正相关关系,与己糖呈负相关关系^[19]。目前认为 SPS 的活性受到植物生长发育^[18-19]、光照^[7,22-23]、温度^[24-25]、代谢产物^[26]、外源物质如激素^[27]等多种因素的复杂调控,但对于 SPS 基因的调控机制和功能特性尚未有清楚的解析,还有待进一步深入研究。

基因的表达受转录水平、翻译水平及蛋白质加工水平等不同调节因素的控制,其中转录水平的调控是主要的。位于基因 5'上游的启动子被认为是调节基因转录的主要因素,对转录效率起到直接的调控作用。本研究以甘蔗新台糖 22 (ROC22) 为试验材料,在前期获得甘蔗 *SPSB* 基因的基础上,首次克隆了甘蔗 *SPSB* 基因 (*ScSPSB*) 5'侧翼序列,并进行了启动子区域分析,为进一步研究 *SPSB* 启动子的生物学功能提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 栽培品种新台糖 22 (ROC22) 为广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室基地种植。菌种与质粒:克隆载体 pMDTM19T 和大肠杆菌感受态细胞 JM109 均购于宝生物工程(大连)有限公司。主要试剂:TaKaRa Tks Gflex DNA Polymerase、TaKaRa Genome Walking kit、DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 甘蔗 *SPSB* DNA 序列的克隆

以甘蔗 ROC22 *SPSB* 基因 mRNA 序列 (JN584485.1) 作为参考序列,甘蔗基因组 DNA 为模板,设计了 2 对特异性引物扩增 *SPSB* DNA 序列。其中正反向引物:F1:5'-GGGAACGAGTGGATCAATGG-3';R1:5'-GTCAGACCAGACGCTAAGGT-3'。F2:5'-AATGGGTACCTGGAGGCGAT-3';R2:5'-TGACAGATCCTCGGCCAGGT-3'。使用 50 μL 反应体系,各反应物配比参照 TaKaRa Tks Gflex DNA Polymerase 说明书。PCR 反应程序:94℃ 预变性 1 min;98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 15 s,68℃ 延伸 60 s,30 个循环。反应结束后,扩增产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

采用胶回收试剂盒 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 对 PCR 产物进行回收和纯化。纯化回收目的片段与 pMD19-T 载体连接,将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞。挑取阳性菌落,提取质粒,由宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.3 *SPSB* 基因 5'侧翼序列的克隆

采用染色体步移法技术 PCR 扩增甘蔗 *SPSB* 基因 5'端未知侧翼序列,具体操作方法参照 TaKaRa Genome Walking kit 说明书。根据已经过验证的序列设计 3 个特异性引物 SP1 (5'-CAAGCAGCGAGAGATTAACCGA-3')、SP2 (5'-GCCAGATCCGCCAGCACATGTT-3') 和 SP3 (5'-CCTCCTCGACGAAGTAGTGC GA-3') 作为下游引物;试剂盒提供兼并引

物 AP1、AP2 和 AP3 作为上游引物,甘蔗基因组 DNA 为模板,进行巢式 PCR 反应。取第一、二、三次的 PCR 产物 5 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

采用 TaKaRa 公司的胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收和纯化。胶回收产物与 pMD19-T 载体连接,将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞。挑取阳性菌落,提取质粒,由宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.4 侧翼获取序列验证

根据获取的侧翼序列,设计引物 F3:5'-CCGCGTGTGAATCGTAGAAG-3',作为上游引物。SP1 作为下游引物,进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:94℃ 预变性 1 min;98℃ 变性 10 s,55℃ 15 s,68℃ 60 s,30 个循环。反应结束后,扩增产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

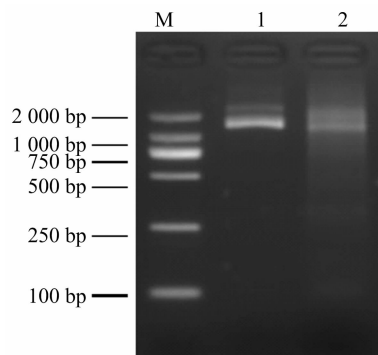
1.5 序列分析

采用 NCBI 的 Blastn 在线软件进行序列比对分析;采用在线启动子分析软件 Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl) 进行核心启动子和转录起始位点预测;采用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子区域包含的启动子区的核心元件。PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 对启动子区域进行分析。

2 结果与分析

2.1 甘蔗 *SPSB* DNA 序列的克隆

电泳结果(图 1)显示,可以明显扩增到 G1-PCR 产物条带。切胶回收 G1 扩增产物条带,纯化目的条带连接 T 载体,筛选克隆测序,测序结果显示片段大小 1 388 bp,可以找到扩增引物 F1 和 R1,以及测序引物 P1 的反向互补序列。将片段进行 BLASTn 比对,发现该序列与已知序列的部分区域具有 96.79% 相似性,表明所克隆片段为甘蔗 *SPSB* DNA 片段。



M—DL2000DNA 标记;1—G1-PCR 产物(F1/R1);
2—G2-PCR 产物(F2/R2)

图1 PCR 扩增甘蔗 *SPSB* DNA 片段

2.2 染色体步移法 PCR 扩增甘蔗 *SPSB* 基因 5'侧翼序列

采用染色体步移法技术 PCR 扩增克隆甘蔗 *SPSB* 基因 5'端未知侧翼序列(图 2)。切胶回收第 2 次巢式 PCR 反应产物 AP3 大小约 700 bp 和 600 bp 的扩增产物条带;第 3 次巢式 PCR 反应产物 AP3 大小约 5 000 bp 的扩增产物条带;第 3 次 PCR 反应产物 AP4 大小约 1 200 bp 的扩增产物条带,分别使用引物 SP2、SP3 纯化产物进行测序。根据测序结果,将与

已知序列有相关性的扩增片段回收,连接 pMD™19T 载体并转化大肠杆菌感受态细胞 JM109,筛选阳性菌落,提取质粒,进行克隆测序。测序结果显示片段大小为 4 367 bp 和 4 368 bp,可以找到扩增引物 SP3,并且测序结果的 3' 端具有引物 SP3 上

游 *SPSB* 基因组序列,说明该片段是 *ScSPSB* 5' 端上游特异目的片段。将该片段进行 BLASTn 比对,发现其与已知甘蔗 ROC22 *SPSB* 基因 mRNA 序列部分区域具有 97.80% 相似性,表明 5' 端获得的未知序列是根据已知序列得到的。

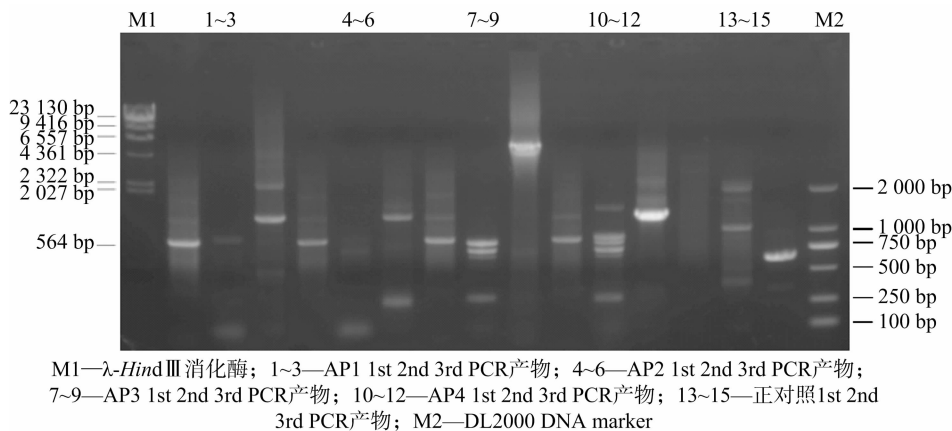


图2 染色体步移法分离 *SPSB* 基因 5' 侧翼序列

2.3 侧翼获取序列验证及序列分析

电泳检测结果表明,可以明显扩增到与预计长度大小一致的目的片段(图3)。所扩增片段的 3' 端与前述克隆的甘蔗 *SPSB* 基因 DNA 片段 5' 端序列是连续存在的。采用染色体步移法分离到了甘蔗 *SPSB* 基因 5' 侧翼序列,序列提交 GenBank,查询登录号 MH074882,为公共数据库首次提交的甘蔗 *SPSB* 基因 5' 侧翼序列。

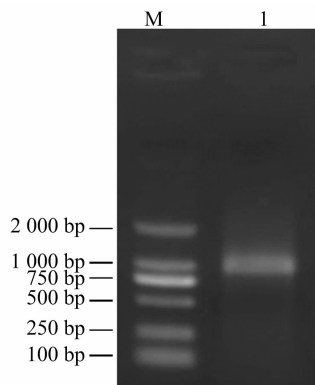


图3 侧翼获取序列 PCR 验证

利用 http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl 进行核心启动子和转录起始位点预测。结果发现在序列 270 ~ 320 bp、2 458 ~ 2 508 bp、2 466 ~ 2 516 bp、3 201 ~ 3 251 bp、3 853 ~ 3 903 bp、3 990 ~ 4 040 bp、4 252 ~ 4 302 bp 处,预测值分别为 0.97、0.84、0.98、1.00、1.00、0.97、0.84,预测的转录起始位点的碱基分别是 A、C、T、C、G、A、G,3 201 ~ 3 251 bp、3 853 ~ 3 903 bp 处为最有可能的转录起始位点。

使用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行甘蔗 *SPSB* 基因启动子区域分析,结果见图4。预测结果显示甘蔗 *SPSB* 启动子除包含核心启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box 外,还含有多种光应答元件 Sp1、MNF1、TCCC-motif、G-Box,多种激素响应元件

TGACC-motif、CGTCA-motif、ABRE,与缺氧诱导有关的顺式作用元件 GC-motif,低温响应元件 LIR,种子特异性调控的顺式调控元件 RY-element,此外还包含干旱诱导 MYB 和 MYBHv1 结合位点。

3 讨论与结论

蔗糖磷酸合成酶是植物体内控制蔗糖生物合成的关键酶,起着调节蔗糖生物合成的作用。启动子作为基因编码区域上游的非编码 DNA 序列,在植物基因表达调控过程中起着重要作用^[28-29]。本研究采用染色体步移法首次分离克隆了甘蔗 *SPSB* 基因 5' 侧翼序列,通过对 *SPS* 启动子区域分析,确定甘蔗 *SPSB* 启动子除包含核心启动子元件 TATA-box 和增强子元件 CAAT-box 外,还含有光应答元件 GT1-motif、MNF1、Sp1、TCCC-motif、G-Box,多种激素响应元件 ABRE、P-box、CGTCA-motif、TGACC-motif、TCA-element,以及与缺氧、干旱、低温诱导有关的顺式作用元件和一些组织调控表达有关的顺式调控元件。

目前, *SPS* 启动子已在拟南芥^[7,16]、水稻^[30-31]、甘蔗^[32-33]、番茄^[34]、棉花^[35]等植物中被分离并进行功能研究。研究表明,植物 *SPS* 启动子上存在多种顺式调控元件,如 ACE、AE-box、G-Box、AT1-motif、I-box、TGACC-motif、GT1-motif 和 MBS 等,位于 *SPS* 启动子区的特异调控元件调控基因的转录表达。如 *SPS* 启动子上存在 I-box 和 G-box,这是光调控基因启动子所必需的重要功能调控元件^[36]。拟南芥 *SPS* 启动子研究表明光照对 *SPS* 基因的表达以及转录后调控至关重要^[30]。与干旱诱导有关的 MYB 结合位点 (MBS) 也存在于 *SPS* 启动子中,这在拟南芥渗透胁迫诱导 *SPS* 基因研究中已有报道^[16]。番茄 *SPS* 启动子区域预测存在多种顺式调控元件:光响应元件 ACE、G-box、AE-box、as-2-box,参与防御和应激反应的顺式作用元件 TC-rich repeats、HSE,激素反应元件 ABRE、GARE-motif 等,通过启动子活性的瞬时表达分析,发现该启动子在番茄的所有组织中均有表达,并受光照、应激和激素反应的调控^[34]。

CGTCA-motif TATA-box TCCC-motif CAAT-box
 -1347 ACGACGTCAC AGTATATACT TCTCTCCCTG TACGGCTGTA CGCAGGAACA TGTACAATAC AGTGGTACCG
 -1277 ATAAGTACAG GTCAGTATTT GCTGTGTGAG GATGAGAGAT CCTGTCTGTAG AAAAAAATG TACCGACCGG

TATA-box MNF1
 -1207 AATATATATG CGGCGAATAT TCCGTGCGAC AGCGCAGCGC ATCGAGTGCC CGATCGGTAC GCGCTCGACC

SP1 G-box SP1 CCAAT-box CAAT-box
 -1137 GGAGACGAGG GCGGAGCACG ACGCGCCGGC GAGCGGTTTG TCCCCACCCG CAACGGGGC CAATGAACGCG

CAAT-box SP1 TATA-box
 -1067 CCGCCGTGTC GTCCACACCA ATCCCACCCA TCTATCGTCG GCCCGTTTCG GCTGAAATTA TAAGCAGGCT

TATA-box AAGAA-motif
 -997 GAAAAACACT GTTGCCGAT TTTTTATGAA AGAAAAATAC TGTTCGGCT AAAAAATAA GCTGAATAAG

TATA-box CGTCA-motif A-box TATA-box TATA-box
 -927 ACGGATTATA AGCAGACGAA CAGGATCGTC ATTTCCCGTC CCCTATATAC TACTAATACT ACGGCTACGG

ABRE A-box TATA-box
 -857 AGTACGTGCC ACACGCGACG CCCATGGCCC GTCCGTGGAT ATACTATGCG GTGGAGTCGT GCACCCAGGG

CGTCA-motif
 -787 TTTGGATCGC GTCACTGCCG CCAGGACATG CGTTCGGCTC TCGGCGGCCA GCCGGAGCCG CAGGCTGCAT

RY-element TGACG-motif
 -717 GCATGGGACA TGGGTGGCTG CGGAAAGGAT TCCTGCGGGT GACGCAGCGC GTCCACATAC GTAAGCATCA

SP1
 -647 TGAATCATGA CCACCACCAA GCACGACGA GCGTGCGACC CGTAACCGCG TGTGAATCGT AGAAGCGAAA

CCAAT-box GC-motif
 -577 TCCGTACTAC CCAACGGACG CGCAACTCAA AAAGCGCGGG GCCCGGGGCT CGTCGGCTCG CTGACCCCGC

G-box
 -507 GGGCCGACG GAGCCGGGG TCCACCACCT AGCCACGTTT CGGCAGGGCC GCGGCTTTCT CATCCAGCT

A-box CCAAT-box MBS
 -437 CCGTCGGTGG CAACGGAAGG CCCCTACAAC TGCGGCCGCC GCTGCAACCG CATGCACGGC ACGATCCTTT

TGACG-motif
 -367 CCCTTCTTCT TTTCTCAAAA ATTCTCTCC GATGCCGCGG TGACGCGTGG TGCCTGCGCG CGCGCCTTTT

A-box
 -297 CCCCTGCCG TCCTCTCCCG ACCGGTTCCA GTTAACGCTC GCAGCCCGCG AGTGCCACG CCGGGACGGG

CCAAT-box
 -227 CGCGCTTTCT CGCTGCCGCG CCAAAGCAGG AAACCAAGCA ACGGTCAGGA AGGACTAGGG GTCACGCGCG

SP1 GT1-motif SP1
 -157 AGGCGAAAG CGGCGGGGG TAGGAGAAGC GTGGGTGCCT GGGTTAATGC TCCTGTAGTC GCGTAGCGGG

SP1
 -87 CGGCGGAGCG ATCTGAGAGC GGTAGAGGTA GAGGCCGGG GGAAGAAGAC AAGTCAGGGG ATCCGATGGC

-17 GGGGAACGAG TGGATCAATG GCTACCTGGA GCGGATCCTA GACAGCCGCA CCTCGGCGGG GGGAGGGGGA

+54 GGAGGAGGCG GCGGCGGGGA CCCCAGGTCG CCGACGAAGG CGGCGAGCCC CCGCGGCCCG CACATGAACT

+124 TCAACCCCTC GCACTACTTC GTCGAGGAG

方框内为预测的为顺式作用元件；粗体字为 *SPSB* 基因编码框；下划线为翻译起始密码子 ATG，定义翻译起始密码子中的 A 为 +1，其他数字为相对于起始密码 ATG 的位置

图4 甘蔗 *SPSB* 侧翼序列

SPS 是一个多基因家族,植物体内不同家族 *SPS* 基因的表达模式和调控模式各不相同^[20-21,37]。关于甘蔗 *SPS* 基因启动子研究主要集中于 *SPS III* (A 家族)启动子的研究。在甘蔗 *SPS III* (A 家族)启动子研究中发现 *SPS III* 启动子区上除了存在典型启动子结构外,还存在多种光响应元件ATCT-motif、ACE、AE-box、G-Box 和一些与分生组织、芽组织特异性表达相关的顺式调控元件 CAT-box、as-2-box,但未见本研究 *SPSB* 启动子所包含的激素响应元件和干旱、低温诱导有关的顺式作用元件^[32-33]。这可能在一定程度上诠释了同一植物不同家族 *SPS* 基因表达模式及调控机制不同。

本研究首次分离克隆了甘蔗 *SPSB* 基因 5'侧翼序列,并进行了启动子区域分析。分析表明甘蔗 *SPSB* 基因 5'侧翼序列含有典型的启动子核心元件和多种顺式调控元件。结合已有研究基础,根据分析结果推测甘蔗 *SPSB* 基因的转录表达可能在一定程度上受组织生长发育、光照、激素、逆境胁迫等多种因素调控。要弄清 *SPSB* 基因的调控机制和功能,还须进一步研究论证。

参考文献:

- [1] Hashida Y, Hirose T, Okamura M, et al. A reduction of sucrose phosphate synthase (SPS) activity affects sucrose/starch ratio in leaves but does not inhibit normal plant growth in rice [J]. Plant science, 2016, 253: 40-49.
- [2] Winter H, Huber S C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes [J]. Plant Sciences, 2000, 19(1): 31-67.
- [3] Seger M, Gebril S, Tabilona J, et al. Impact of concurrent overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS₁) and sucrose phosphate synthase (SPS) on growth and development in transgenic tobacco [J]. Planta, 2015, 241(1): 69-81.
- [4] Batta S K, Thind D K, Singh P, et al. Variability in activities of sucrose metabolizing enzymes in relation to sucrose accumulation among parents and their progenies of sugarcane [J]. Sugar Tech, 2011, 13(2): 114-122.
- [5] Sachdeva M, Bhatia S, Batta S K. Sucrose accumulation in sugarcane:

- a potential target for crop improvement [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(5): 1571–1583.
- [6] 潘有强, 罗海玲, 李杨瑞. 甘蔗节间蔗糖含量与和蔗糖代谢相关的 4 种酶活性之间的关系剖析[J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(5): 861–864.
- [7] Volkert K, Debast S, Voll L M, et al. Loss of the two major leaf isoforms of sucrose – phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis[J]. *Journal of experimental botany*, 2014, 65(18): 5217–5229.
- [8] Wang D, Zhao J T, Hu B, et al. Identification and expression profile analysis of the sucrose phosphate synthase gene family in *Litchi chinensis* Sonn[J]. *PeerJ*, 2018, 6: 1–16.
- [9] Valdez – Alarcon J J, Ferrando M, Salerno G, et al. Characterization of a rice sucrose – phosphate synthase – encoding gene[J]. *Gene*, 1996, 170(2): 217–222.
- [10] 李莹, 刘宝辉, 张中男, 等. 玉米蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 基因的克隆及表达载体的构建[J]. *生物信息学*, 2005(2): 66–68, 72.
- [11] Sugiharto B, Sakakibara H, Sumadi, et al. Differential expression of two genes for sucrose – phosphate synthase in sugarcane; Molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1997, 38(8): 961–965.
- [12] Li H C, Lu H B, Yang F Y, et al. Cloning and sequence analysis of sucrose phosphate synthase gene from varieties of *Pennisetum* species [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 2799–2808.
- [13] Castleden C K, Aoki N, Gillespie V J, et al. Evolution and function of the sucrose – phosphate synthase gene families in wheat and other grasses[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(3): 1753–1764.
- [14] Langenkamper G, Fung R W, Newcomb R D, et al. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 54(3): 322–332.
- [15] 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.
- [16] Solis – Guzman M G, Arguello – Astorg G, Lopez – Bucio J, et al. *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (SPS) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress[J]. *Gene Expression Patterns*, 2017, 25–26: 92–101.
- [17] Reimholz R, Geiger M, Haake V, et al. Potato plants contain multiple forms of sucrose phosphate synthase, which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their responses to low temperature [J]. *Plant Cell and Environment*, 1997, 20(3): 291–305.
- [18] 桂意云, 汪森, 秦翠鲜, 等. 甘蔗各家族 SPS 基因表达特性分析[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(2): 174–179.
- [19] Verma A K, Upadhyay S K, Verma P C, et al. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars[J]. *Plant Biology*, 2011, 13(2): 325–332.
- [20] 陈兰平, 陈由强, 方静平, 等. 甘蔗 SPS 基因家族成员表达与糖分积累关系解析[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(7): 1354–1361.
- [21] ElSayed A I, Boulila M, Rafudeen M S. Investigation into the expression of sucrose transporters and sucrose phosphate synthase mRNA in different plant species[J]. *Agricultural Research*, 2013, 2(1): 31–42.
- [22] Sicher R C, Kremer D F. Changes of sucrose – phosphate synthase activity in barley primary leaves during light/dark transitions[J]. *Plant Physiology*, 1984, 76(4): 910–912.
- [23] Chen S, Hajirezaei M, Bornke F. Differential expression of sucrose – phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark – governed starch mobilization in source leaves[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(3): 1163–1174.
- [24] Guy C L, Huber J L A, Huber S C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature [J]. *Plant physiology*, 1992, 100(1): 502–508.
- [25] Itai A, Hatanaka R, Irie H, et al. Effects of storage temperature on fruit quality and expression of sucrose phosphate synthase and acid invertase genes in Japanese pear[J]. *Horticulture Journal*, 2015, 84(3): 227–232.
- [26] Doehrlert D C, Huber S C. Spinach leaf sucrose phosphate synthase [J]. *FEBS Letters*, 1983, 153(2): 293–297.
- [27] Sakalo V D, Kurchii V M. Hormonal control of sucrose phosphate synthase and sucrose synthase in sugar beet[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2004, 51(2): 183–188.
- [28] Dare A P, Schaffer R J, Lin – Wang K, et al. Identification of a cis – regulatory element by transient analysis of co – ordinally regulated genes[J]. *Plant Methods*, 2008, 4(17): 1–10.
- [29] 王旭明, 赵夏夏, 陈景阳, 等. 盐胁迫下水稻孕穗期 SS 和 SPS 活性与糖积累的响应及其相关性分析[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(3): 481–486.
- [30] Hirose T, Hashida Y, Aoki N, et al. Analysis of gene – disruption mutants of a sucrose phosphate synthase gene in rice, *OsSPSI*, shows the importance of sucrose synthesis in pollen germination[J]. *Plant Science*, 2014, 225: 102–106.
- [31] Yonekura M, Aoki N, Hirose T, et al. The promoter activities of sucrose phosphate synthase genes in rice, *OsSPSI* and *OsSPSII*, are controlled by light and circadian clock, but not by sucrose [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013(4): 31.
- [32] 张积森, 郑月霞, 方静平, 等. 甘蔗 SPS III 基因启动子 5' 侧翼缺失的 GUS 表达载体构建[J]. *福建教育学院学报*, 2012(3): 118–121.
- [33] 高玉娜, 林荣华, 周平, 等. 甘蔗蔗糖磷酸合成酶基因启动子遗传转化烟草的研究[J]. *福建师范大学学报 (自然科学版)*, 2010, 26(1): 100–102, 119.
- [34] Naqvi R Z, Mubeen, H, et al. Identification, isolation and evaluation of a constitutive sucrose phosphate synthase gene promoter from tomato[J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2017, 49(3): 1105–1112.
- [35] Nadia I, Muhammad A, Amara M, et al. Isolation and characterization of sucrose phosphate synthase promoter from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2017, 11(6): 668–675.
- [36] Arguello – Astorga G R, Herrera – Estrella L R. Ancestral multipartite units in light – responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways [J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 1151–1166.
- [37] 张莉, 荐红举, 杨博, 等. 甘蓝型油菜蔗糖磷酸合酶 (SPS) 基因家族成员鉴定及表达分析[J]. *作物学报*, 2018(2): 1–11.