

张 伟,余方伟,李建斌,等. 甘蓝蔗糖合成酶基因家族鉴定及响应低温胁迫表达模式分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(2):24-32.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.02.005

甘蓝蔗糖合成酶基因家族鉴定及 响应低温胁迫表达模式分析

张 伟,余方伟,李建斌,王神云

(江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物改良重点实验室,江苏南京 20014)

摘要:蔗糖合成酶(SUS)是植物蔗糖代谢的关键酶之一,它不仅影响植物的产量和品质,还在植物抵御逆境胁迫中起重要作用。基于已经公布的甘蓝全基因组数据信息,利用生物信息学方法对甘蓝 *BoSUS* 基因家族成员进行鉴定,分析其系统进化关系、染色体定位、基因结构、启动子顺式作用元件和低温胁迫下的表达模式。结果表明,甘蓝全基因组共鉴定到 7 个 *BoSUS* 基因成员,系统进化分析分成 3 个亚组(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ)。BoSUS 蛋白氨基酸长度范围为 805 (BoSUS1a)~940 (BoSUS6b) 个,均是亲水性蛋白。在芸薹族特异的全基因组 3 倍化事件后,与拟南芥 *AtSUS4* 共线性的甘蓝 *BoSUS4* 基因发生了丢失,与 *AtSUS1*、*AtSUS6* 共线性的 *BoSUS1* 和 *BoSUS6* 基因均发生了扩张,出现了双拷贝(*BoSUS1a*、*BoSUS1b* 和 *BoSUS6a*、*BoSUS6b*)。表达模式分析表明,*BoSUS1a*、*BoSUS1b* 和 *BoSUS3* 基因在甘蓝不同器官/组织尤其在花器官的蔗糖代谢中起着重要作用,为库器官(花)的发育提供能量和物质。耐冷甘蓝 CT-923 叶片中 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 基因表达水平在低温处理 6、24 h 后相比对照急剧升高,BoSUS1a 和 BoSUS1b 酶活性增强,为甘蓝产生保护性反馈机制提供能量,使得耐冷甘蓝 CT-923 耐寒性增强。综上所述,本研究为解析甘蓝 *BoSUS* 基因响应低温胁迫的分子机制和指导甘蓝耐寒种质资源创新具有重要意义。

关键词:甘蓝;低温胁迫;蔗糖合成酶;表达模式

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)02-0024-09

蔗糖合成酶(sucrose synthase, SUS, EC 2.4.1.13)通常被认为是一种胞质可溶性酶,分布在细胞质基质中,也广泛存在于膜系统和细胞壁。在大多数植物中,蔗糖是光合作用的主要产物之一,储存在库器官中的蔗糖不能被直接利用,须要通过 SUS 或蔗糖转化酶(invertase, INV, EC3.2.1.26)分解。SUS 催化蔗糖和尿苷二磷酸(UDP)产生尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和果糖,此反应可逆^[1],水解的六碳糖参与细胞结构组成、物质贮藏和细胞新陈代谢等^[2-3]。SUS 还参与植物生长的多个代谢过程,包括蔗糖转运、淀粉与纤维素合成、生物及非生物逆境响应等^[4-5]。

低温对蔬菜的危害一方面影响植物的外部形

态,另一方面引发植物生理生化的强烈变化,导致减产和品质下降^[6-7]。甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)属于十字花科芸薹属甘蓝种中顶芽能形成叶球的变种,是我国一种重要的十字花科蔬菜,其营养丰富,适应性及抗逆性均较强,在全国各地普遍种植,在蔬菜供应中具有举足轻重的地位^[8]。15~20℃为甘蓝最适宜结球的温度,但其生长受温度影响较大,早春易发生倒春寒现象,造成甘蓝的先期抽薹,或是温度低到超过甘蓝的耐受程度,幼苗直接冻死或叶球冻伤,严重影响甘蓝的产量。

在低温胁迫下,植物可溶性糖含量明显增加,作为渗透调节物质的可溶性糖主要有蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖等,其含量与植物抗寒性之间呈正相关。Sasaki 等提出甘蓝叶片中的可溶性糖含量与甘蓝的耐寒性密切相关^[9]。王磊等的研究表明,在感受低温胁迫后,抗冻性强的甘蓝品种中可溶性糖含量上升幅度高于抗冻性差的品种;感受冻害低温后,可溶性糖含量下降,但抗冻性强的品种下降幅度小于抗冻性差的品种^[10]。蔡青等的研究表明,在-1℃低温条件下处理 6 h,耐寒性强的甘蓝品种

收稿日期:2020-09-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31902009);国家大宗蔬菜产业技术体系建设专项(编号:CARS-23-G42);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(18)2006]。

作者简介:张 伟(1989—),男,安徽安庆人,博士,副研究员,主要从事甘蓝耐寒机理及育种研究。E-mail:zhangwei@jaas.ac.cn。

通信作者:王神云,硕士,研究员,主要从事甘蓝抗病、抗逆机理及遗传育种研究。E-mail:wangshenyun@jaas.ac.cn。

与耐寒性弱的品种叶片中可溶性糖含量存在显著性差异,且抗寒性强的品种可溶性糖含量上升幅度较大^[11]。由此可见,经过低温锻炼的植株体内可溶性糖含量的增加使得作物耐寒能力增强,且在适应温度范围内耐寒性强的材料比耐寒性弱的材料含量高。

随着越来越多物种基因组测序的完成,SUS 家族成员已经在拟南芥^[12]、水稻^[13]、玉米^[14]、杨树^[15]、大豆^[16]等物种中被鉴定。不同物种的 SUS 家族成员存在较大差异,但蛋白序列保守性比较高,均具有蔗糖合成酶结构域和糖基转移酶结构域。研究表明,在低氧胁迫下,玉米根^[1]和马铃薯块茎^[17]中一些 SUS 亚型的表达被诱导或增强。抑制 SUS 基因的表达,会导致玉米^[1]和棉花^[18]的种子萎缩,马铃薯块茎^[19]中淀粉积累减少。SUS 家族成员间不同的表达模式表明它们在植物生长发育及胁迫响应中具有不同的生理功能。但是 *BoSUS* 基因在甘蓝中的全基因组鉴定以及如何响应低温胁迫均尚未可知。因此,鉴定分析甘蓝 *BoSUS* 家族成员具有重要意义。本研究对甘蓝进行全基因组 *BoSUS* 基因家族的鉴定,分析甘蓝 *BoSUS* 蛋白的进化历程、结构特征以及表达模式,探究甘蓝 *BoSUS* 基因在低温胁迫响应中的作用。

1 材料与方法

1.1 甘蓝 *BoSUS* 基因家族的鉴定

根据前人的报道从拟南芥 TAIR 数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>) 下载了 6 条 SUS 蛋白序列(*AtSUS1* ~ *AtSUS6*)^[12]。大白菜和甘蓝全基因组序列分别从 BRAD 数据库 (<http://brassicadb.org/brad/>) 和甘蓝基因组数据库 (Bolbase, <http://ocri-genomics.org/bolbase/>)^[20-21] 下载获得。

为了在全基因组鉴定出甘蓝和白菜中的 *SUS* 基因序列,通过 Pfam 31.0 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 获取蔗糖合成酶结构域 (Sucrose_synth, PF00862) 和糖基转移酶结构域 (Glycos_transf_1, PF00534) 的隐马尔科夫模型 (HMM),利用 hmmer (<http://www.hmmer.org/>) 软件在全基因组数据库中搜索含有该结构域的序列,将仅含有 PF00862 和 PF00534 结构域的蛋白序列作为候选 *SUS* 基因家族候选序列。利用在线 Pfam 31.0 数据库、SMART 数据库 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 Conserved Domain 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi/>) 进一步验证 *SUS* 候选序列的保守结构域,最终确定目的 *SUS* 基因。

甘蓝 *BoSUS* 和大白菜 *BrSUS* 基因的命名根据其与其 *AtSUS1* ~ *AtSUS6* 序列的同源性及其共线性关系并添加后缀 (a、b、...) 来命名。

1.2 甘蓝 *BoSUS* 蛋白特征预测、系统发育和进化树分析

利用在线 ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对获得的甘蓝 *SUS* 蛋白质序列分子量、理论等电点、不稳定指数、脂肪族指数和亲水性平均系数进行分析。使用 CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 和 BaCelLo (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/index.htm>) 进行亚细胞定位预测。利用 Gene Structure Display Server (GSDS 2.0, <http://gsds.gao-lab.org/>) 根据每个 *BoSUS* 基因组序列和相应的 CDS 序列绘制基因结构图^[22]。利用 MEGA 7.0 对甘蓝 *BoSUS*、拟南芥 *AtSUS* 和大白菜 *BrSUS* 蛋白质序列绘制系统进化树,采用邻接法 (neighbor-joining, NJ), 设置 Bootstrap 值为 1 000,其他参数保持默认值^[23]。

1.3 *BoSUS* 基因的染色体定位、共线性及进化约束值 (K_a/K_s) 分析

根据甘蓝 *BoSUSs* 基因在染色体上的物理位置,使用 MapChart 2.30^[24] 对 *BoSUSs* 基因进行染色体定位。利用 BRAD 数据库分析甘蓝和拟南芥之间的直系和旁系同源基因关系,利用 TBtools^[25] 绘制共线性图。通过使用 DnaSP 6 计算同义替换率 (K_s)、非同义替换率 (K_a) 和进化约束值 (K_a/K_s)。使用公式 $T = K_s/2r$ 计算同源基因之间的分化时间,双子叶植物中每个位点每年的同义替换率 $r = 1.5 \times 10^{-8}$ ^[26]。

1.4 甘蓝 *BoSUS* 基因启动子区域的顺式作用元件分析

利用在线软件 New PLACE (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/>) 分析 *BoSUS* 成员起始密码子上游 1 500 bp 序列中 ABRE (ABA-响应元)、ARE (厌氧诱导的顺式作用元件)、CGTCA-motif、GARE-motif、LTRE (低温响应元件)、TCA-元件和 TGACG-motif 等顺式作用元件。

1.5 甘蓝 *BoSUS* 基因在不同器官/组织以及低温胁迫下的表达模式分析

为了分析甘蓝不同器官/组织中 *BoSUS* 基因的表达水平,在 NCBI 的 GEO 数据库下载甘蓝不同器

官/组织(愈伤组织、根、茎、叶、芽、花和角果)转录组数据(登录号为 GSE42891),以 *BoSUS* 基因的 FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads)值来表示甘蓝 *BoSUS* 在不同器官/组织中的表达水平,并绘制柱形图。

耐冷甘蓝 923(CT-923)和冷敏甘蓝 D9(CS-D9)的种子发芽后播种在无菌基质中,放在人工气候室中进行生长,环境条件设定为:白天 25 ℃/夜晚 18 ℃,光照 14 h/黑暗 10 h。为了开展低温胁迫处理,将 5 叶 1 心期的幼苗转移至春化室(4 ℃)处理,作为对照的幼苗仍处于正常条件下。在处理 6、24 h 后,分别对春化室和人工气候室的幼苗同时进行取样。对于每个甘蓝材料每个时间点的取样,至少选取 18 株幼苗,随机选取 6 株作为 1 个生物学重复(3 个生物学重复),每株材料取顶部第 3 张完全展开叶,剪碎后放进锡箔纸在液氮中冷冻并储存在 -80 ℃ 冰箱中。利用 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)提取样品的总 RNA,将获得的高纯度和完整性好的 RNA 用于 RNA-Seq 文库构建。构建好的 24 个

RNA-Seq 文库在 Illumina HiSeq™ 2500 平台上进行测序。根据 RNA-Seq 数据中获取的每个 *BoSUS* 基因的 FPKM 值来绘制柱形图。

2 结果与分析

2.1 甘蓝 *BoSUS* 基因家族的鉴定、系统发育和蛋白特征分析

通过对全基因组蛋白数据库的鉴定和结构域验证,在甘蓝和大白菜基因组中分别鉴定到 7 个 *BoSUS* 蛋白和 7 个 *BrSUS* 蛋白。根据命名规则,将这些蛋白分别命名为 *BoSUS*1 ~ *BoSUS*6 和 *BrSUS*1 ~ *BrSUS*6。将甘蓝、大白菜和拟南芥的 20 个 *SUS* 蛋白序列构建了邻接法(NJ)无根系统进化树,从而来阐明它们的进化关系(图 1)。系统发育分析表明,这些 *SUS* 蛋白成员根据聚类被分为 3 个不同的亚组(I ~ III)。亚组 I、II、III 分别包含 6、6、8 个 *SUS* 成员。其中亚组 I 包括 *BoSUS*1a 和 *BoSUS*1b,亚组 II 包括 *BoSUS*2 和 *BoSUS*3,亚组 III 包括 *BoSUS*5、*BoSUS*6a 和 *BoSUS*6b。

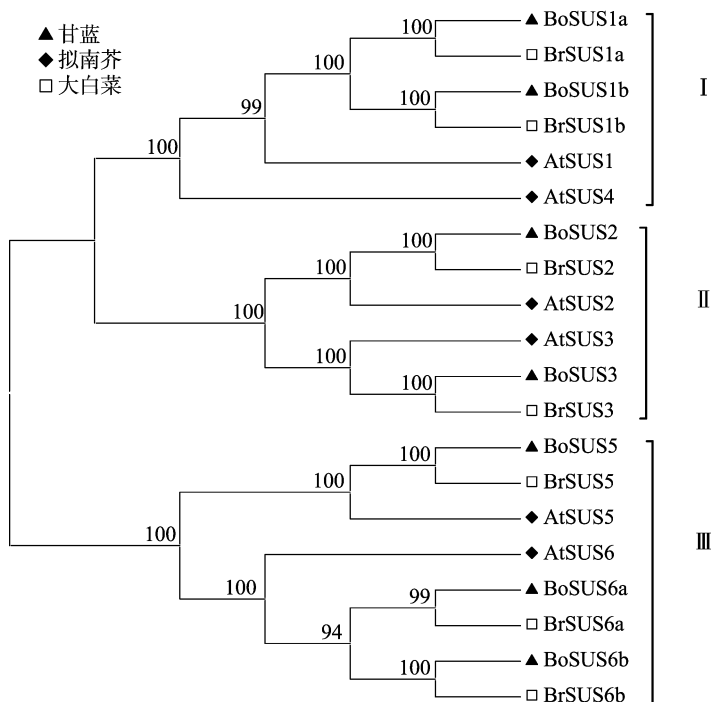


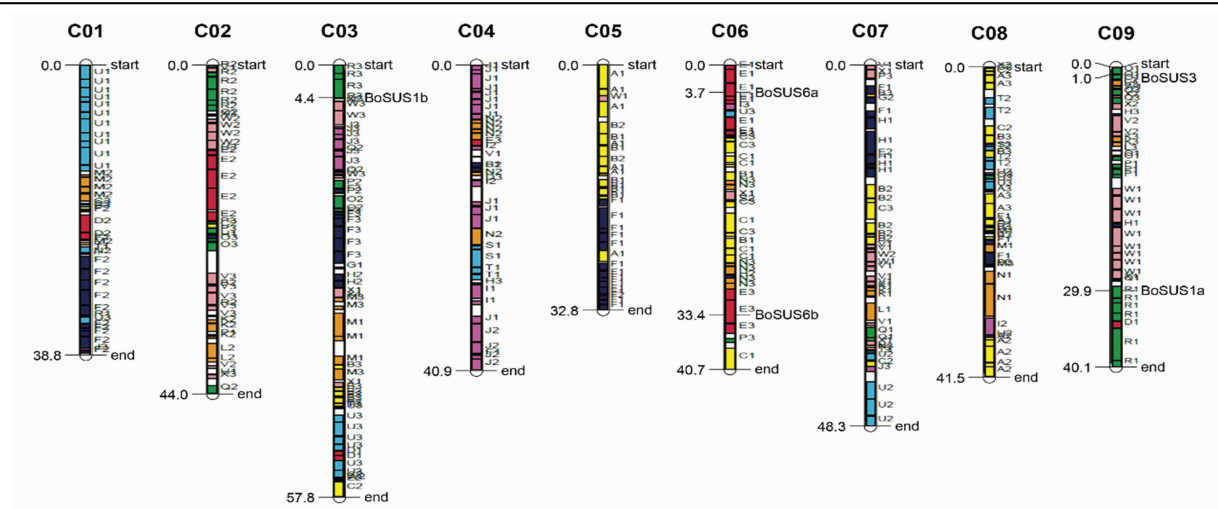
图1 甘蓝、拟南芥、大白菜 *SUS* 蛋白的系统进化分析

通过在线 ProtParam 工具预测了 *BoSUS* 蛋白的物理和化学特征。*BoSUS* 蛋白的氨基酸长度范围为 805(*BoSUS*1a) ~ 940(*BoSUS*6b) 个,相对应的开放阅读框(ORF)分布为 2 418 ~ 2 823 bp(表 1)。*BoSUS* 蛋白的分子量分布为 92.1(*BoSUS*2) ~ 106.5

(*BoSUS*6b) ku, 理论等电点(pI)范围为 5.67(*BoSUS*1b) ~ 7.20(*BoSUS*6b)(表 1)。除了 *BoSUS*6b,其余所有的 *BoSUS* 家族成员的 pI 均小于 7,这说明甘蓝 *BoSUS* 蛋白主要是弱酸性蛋白。*BoSUS* 蛋白的不稳定指数范围为 34.41(*BoSUS*1b) ~

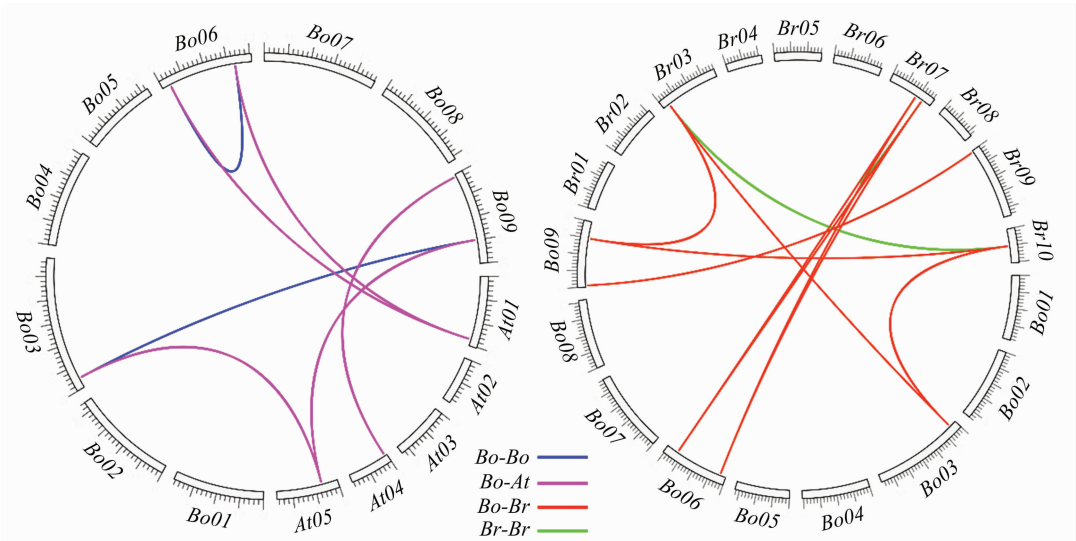
表1 甘蓝和拟南芥对应 SUS 基因家族成员的注释信息

分组	iPCK 核型	拟南芥				甘蓝				总平均 亲水性							
		共线性 区块	基因名称	基因编号	开放阅读 读框(bp)	蛋白序列 长度(个)	基因名称	基因编号	染色体		亚基因组	开放阅读 框(bp)	蛋白序列 长度PL(个)	分子量 (ku)	pI	不稳定 指数	脂肪族氨 基酸指数
I	tPCK5	R	<i>AtSUS1</i>	AT5G20830	2 427	808	<i>BoSUS1a</i>	BoI035789	C09	LF	2 418	805	92.3	5.77	36.34	94.09	-0.296
II	tPCK6	M	<i>AtSUS4</i>	AT3G43190	2 427	808	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	tPCK7	Wa	<i>AtSUS2</i>	AT5G49190	2 424	807	<i>BoSUS2</i>	BoI016589	Scaffold000153	LF	2 424	807	92.1	5.99	37.96	91.09	-0.245
	tPCK5	O	<i>AtSUS3</i>	AT4G02280	2 430	809	<i>BoSUS3</i>	BoI006041	C09	LF	2 436	811	92.4	5.85	41.52	88.69	-0.281
III	tPCK4	S	<i>AtSUS5</i>	AT5G37180	2 511	836	<i>BoSUS5</i>	BoI024735	Scaffold000091	MFI	2 514	837	95.1	6.18	34.90	87.84	-0.334
	tPCK6	E	<i>AtSUS6</i>	AT1G73370	2 829	942	<i>BoSUS6a</i>	BoI026267	C06	LF	2 805	934	106.2	6.24	36.96	83.39	-0.363
							<i>BoSUS6b</i>	BoI040009	C06	MF2	2823	940	106.5	7.20	34.42	82.66	-0.382



将染色体上的 24 个保守共线性区块标记为 A~X 以及绘制出 3 套亚基因组^[21]

图2 甘蓝 *BoSUS* 基因在 9 条染色体上的定位分布



蓝线表示甘蓝旁系同源基因对；粉红色和红线均表示直系同源基因对；绿线表示大白菜旁系同源基因对

图3 甘蓝(*Bo*)、拟南芥(*At*)和大白菜(*Br*) *SUS* 基因的共线性关系

表 2 甘蓝和拟南芥之间 *SUS* 直系同源基因对的非同义替换率 (K_a) 和同义替换率 (K_s)

直系同源基因对	K_s	K_a	K_a/K_s	分化时间 ($\times 10^6$ 年)
<i>AtSUS1</i> 、 <i>BoSUS1a</i>	0.034 1	0.396 9	0.085 9	13.2
<i>AtSUS1</i> 、 <i>BoSUS1b</i>	0.034 4	0.443 4	0.077 6	14.8
<i>AtSUS2</i> 、 <i>BoSUS2</i>	0.028 8	0.324 2	0.088 8	10.8
<i>AtSUS3</i> 、 <i>BoSUS3</i>	0.031 4	0.529 7	0.059 3	17.7
<i>AtSUS5</i> 、 <i>BoSUS5</i>	0.039 4	0.401 6	0.098 1	13.4
<i>AtSUS6</i> 、 <i>BoSUS6a</i>	0.047 3	0.373 9	0.126 5	12.5
<i>AtSUS6</i> 、 <i>BoSUS6b</i>	0.045 2	0.348 5	0.129 7	11.6

特异的全基因组 3 倍化时间 ($13 \times 10^6 \sim 17 \times 10^6$ 年) 基本相符^[20,27]。

2.4 甘蓝 *BoSUS* 基因结构和亚细胞定位预测分析

本研究根据甘蓝 *BoSUS* 基因家族成员的 CDS

序列和基因组 DNA 序列,绘制甘蓝 *BoSUS* 基因结构图(图 4)。结果显示,除了 *BoSUS1b* 含有 10 个外显子,*BoSUS5* 含有 13 个外显子,*BoSUS2* 含有 14 个外显子外,其余的 *BoSUS* 基因均含有 12 个外显子,

但是各成员外显子的位置和长度存在较大差异。其中,相比 *BoSUS1a*,旁系同源基因 *BoSUS1b* 发生了可变剪切和内含子插入,导致其丢失第 6、第 11 位

外显子,且第 2、第 6 位内含子长度增长(图 4)。而 *BoSUS6a* 和 *BoSUS6b* 之间外显子、内含子数量以及长度均没有发生明显变化,属于高度保守的。

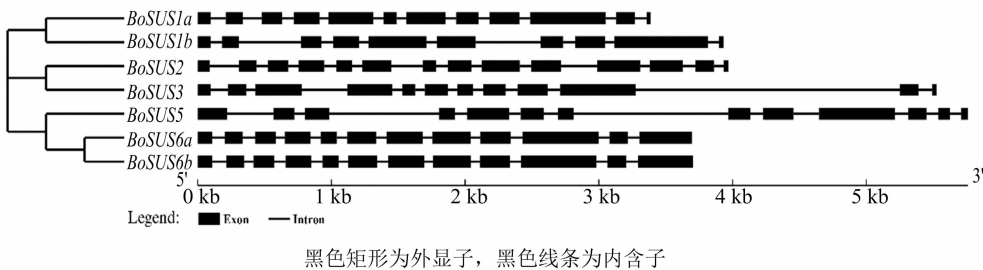


图4 甘蓝 *BoSUS* 基因家族外显子-内含子结构分析

分别通过在线软件 CELLO v2.5 和 BaCelLo 对甘蓝 *BoSUS* 蛋白进行亚细胞定位预测,结果如表 3 所示,2 种软件的预测结果均表明甘蓝 *BoSUS* 蛋白位于细胞质中。

表 3 甘蓝 *BoSUS* 蛋白亚细胞定位预测

蛋白名称	亚细胞定位预测	
	CELLO	BaCelLo
<i>BoSUS1a</i>	细胞质	细胞质
<i>BoSUS1b</i>	细胞质	细胞质
<i>BoSUS2</i>	细胞质	细胞质
<i>BoSUS3</i>	细胞质	细胞质
<i>BoSUS5</i>	细胞质	细胞质
<i>BoSUS6a</i>	细胞质	细胞质
<i>BoSUS6b</i>	细胞质	细胞质

2.5 甘蓝 *BoSUS* 基因启动子的顺式作用元件分析

用 PlantCARE 数据库对甘蓝 *BoSUS* 基因家族成员的上游 1 500 bp 启动子区域进行顺式作用元件的预测(表 4)。预测有 7 个与逆境和激素反应相关的顺式作用元件,包括 ABRE(ABA 响应元件)、ARE(厌氧诱导调控元件)、GARE - motif(赤霉素响应元件)、LTR(低温响应元件)、TCA - element(水杨酸响应元件)、CGTCA - motif、TGACG - motif(茉莉酸甲酯响应元件)。这些顺式作用元件在 5 个 *BoSUS* 基因中均有分布,但是 *BoSUS6b* 基因启动子中没有发现此类调控元件。

2.6 甘蓝 *BoSUS* 基因在不同器官/组织及低温胁迫下表达模式分析

研究 7 个 *BoSUS* 基因在甘蓝愈伤组织、根、茎、

表 4 甘蓝 *BoSUS* 基因启动子中顺式作用元件的种类与数量

基因名称	ABRE	ARE	GARE - motif	LTR	TCA - element	CGTCA - motif	TGACG - motif
<i>BoSUS1a</i>	1	3	0	2	0	0	0
<i>BoSUS1b</i>	3	4	1	1	0	1	1
<i>BoSUS2</i>	2	4	0	1	0	0	0
<i>BoSUS3</i>	4	1	0	0	1	3	3
<i>BoSUS5</i>	3	5	0	1	0	0	0
<i>BoSUS6a</i>	0	1	0	0	1	0	0
<i>BoSUS6b</i>	0	0	0	0	0	0	0

叶、芽、花和角果中的基因表达水平(图 5)。其中, *BoSUS2* 基因在各个器官/组织中均没有表达量(FPKM)(图 5 未列出)。从整体表达水平看, *BoSUS1a*、*BoSUS1b* 和 *BoSUS3* 基因在各个器官/组织中的表达水平(根和叶除外)要高于 *BoSUS5*、*BoSUS6a* 和 *BoSUS6b* 基因。此外, *BoSUS1a*、*BoSUS1b* 和 *BoSUS3* 均在花中高水平表达, *BoSUS1a* 基因在花中的表达量 FPKM 值最大,为 867(图 5)。

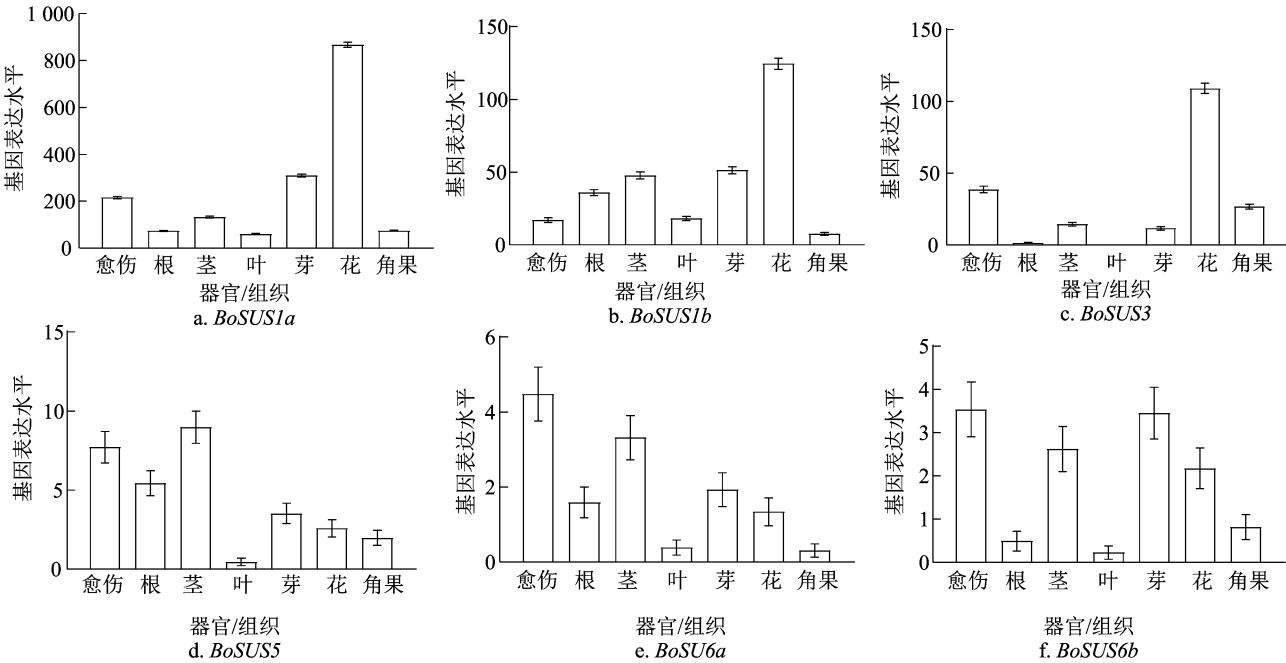
此外,还分析了 *BoSUS* 基因在低温胁迫下不同耐寒性甘蓝材料中的表达模式差异。如图 6 所示,总体而言, *BoSUS1a* 基因低温处理下的整体表达水平远远高于其他几个 *BoSUS* 基因。耐冷甘蓝 CT - 923 叶片中 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 在低温处理 6、24 h 后的表达量相比对照(Mock)急剧升高。冷敏甘蓝 CS - D9 叶片中 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 基因的表达水平在低温处理 6 h 后出现了缓慢的升高,而在低温

处理 24 h 后,处理组的表达量相比对照也是出现了表达量急剧升高。而 *BoSUS3* 基因仅仅在冷敏甘蓝 CS-D9 叶片被低温处理 24 h 后出现了 2.5 倍的上升,其他时期均没有明显变化(图 6)。此外, *BoSUS5*、*BoSUS6a* 和 *BoSUS6b* 整体表达水平很低,这与图 5 的组织表达水平相类似,且低温处理后的

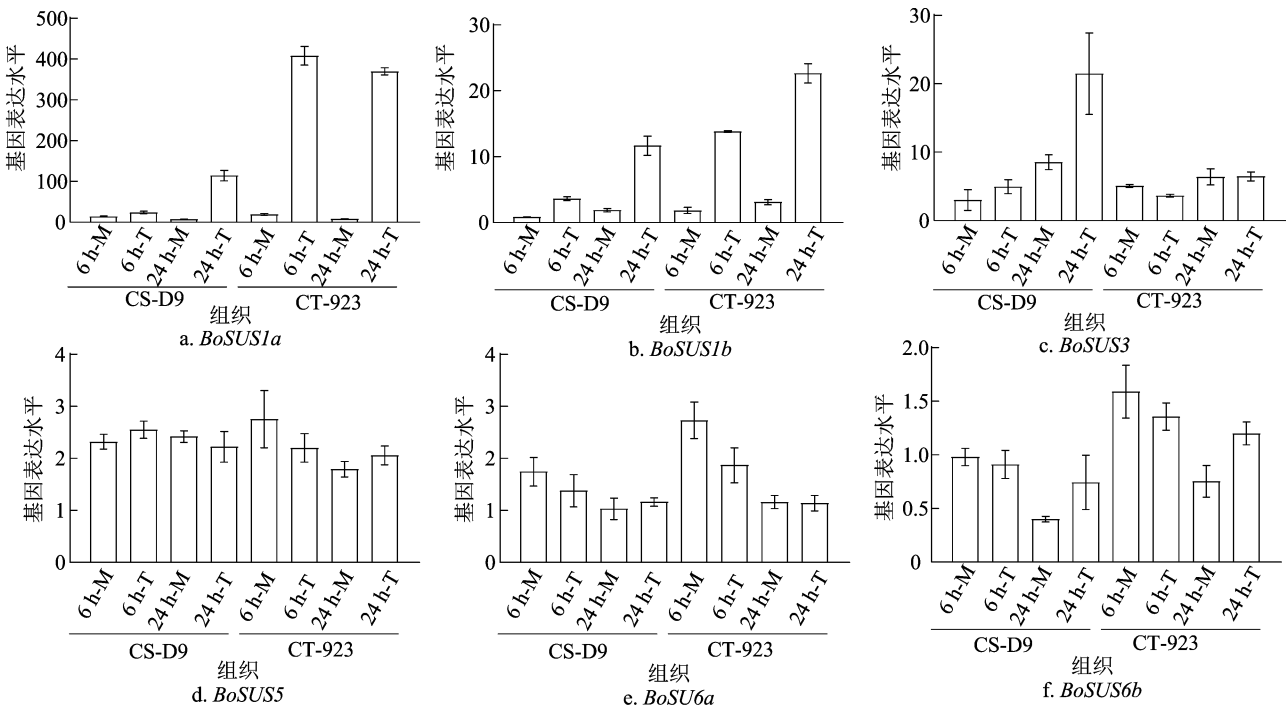
表达量没有发生明显变化。综上所述,*BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 是响应低温胁迫的关键蔗糖合成酶基因。

3 讨论与结论

糖代谢不仅是植物发育的核心,也是非生物胁迫响应的核心,因此了解其潜在的机制对于提高植



BoSUS 基因的表达水平为 RNA-Seq 中的 FPKM 值。图 6 同
图5 *BoSUSs* 基因在甘蓝不同组织/器官中的表达模式



6 h-T—冷处理 6 h 组; 6 h-M—未处理 6 h 对照组; 24 h-T—冷处理 24 h 组; 24 h-M—未处理 24 h 对照组

图6 *BoSUS* 基因在低温胁迫下的表达模式

物对干旱、高温和冷胁迫的耐受性至关重要^[28]。由于蔗糖本身就是一种重要的信号分子,参与到植物的生长发育过程,SUS 参与的蔗糖代谢过程产生的己糖分子也可以作为感知能量和代谢物变化的信号分子^[29],参与到细胞壁信号转导、细胞周期和激素调节等过程中,以此来调控种子的发育过程^[5,30-31]。

SUS 蛋白是一种胞质可溶性酶,有助于淀粉和蛋白质的生物合成以及能量的产生,在植物生长发育中有重要的作用。基于甘蓝基因组,鉴定出 7 个 SUS 家族成员,拟南芥、水稻和桃中也鉴定出 6 个 SUS 基因^[12-13,32],葡萄中鉴定出 5 个 SUS 基因^[33],杨树中鉴定出 4 个 SUS 基因^[15]。外显子-内含子结构被认为在多基因家族的进化中发挥重要作用。本研究发现 *BoSUS* 基因内含子的数目为 9~13 个,其中包含 11 个内含子的 *BoSUS* 基因数目最多,为 4 个,这与大豆和杨树的内含子数目均在 11~14 个之间^[15-16]相符合,这表明 SUS 家族的内含子数目在不同物种间具有高度保守性。此外,旁系同源基因 *BoSUS1a*、*BoSUS1b* 之间发生了部分可变剪切和内含子插入,导致 *BoSUS1a* 与 *BoSUS1b* 基因之间功能的多样性,使得出现了 *BoSUS1a* 与 *BoSUS1b* 基因在不同器官/组织以及响应低温胁迫的基因表达水平的极大差异。通过甘蓝 *BoSUS* 基因在不同器官/组织中的表达水平可以看出,*BoSUS1a*、*BoSUS1b* 和 *BoSUS3* 基因在甘蓝不同器官/组织中蔗糖代谢过程中起着重要作用。此外,*BoSUS1a*、*BoSUS1b* 和 *BoSUS3* 基因均在花器官中表达水平最高,表明花器官作为库器官,在生长发育过程中需要大量的物质和能量,需要蔗糖合成酶将库器官里的蔗糖分解,形成从源到库的蔗糖浓度梯度,为蔗糖由韧皮部向库器官的运输提供压力,保证蔗糖向库中持续供应。

耐冷甘蓝 CT-923 叶片中 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 基因的表达水平在低温处理 6、24 h 后相比对照急剧升高,而冷敏甘蓝 CS-D9 中 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 基因表达水平虽然出现了升高,但表达水平远远低于耐冷甘蓝 CT-923。表明耐冷甘蓝 CT-923 在低温胁迫下,叶片中 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 基因迅速响应,表达量急剧上升,使得 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 酶活性增强,为产生保护性反馈机制提供能量,还增加了细胞内的细胞液浓度,冰点降低,抑制了细胞内冰核的形成,使得耐冷甘蓝 CT-923 耐寒性增强。这与 Fenando 等的“当植

物受到胁迫时,细胞内的可溶性糖含量迅速增加,来维持细胞内蛋白质结构和细胞膜稳定”的结论^[34]相一致。有研究还发现,SUS 促进蔗糖分解所需要的能量相比其他蔗糖代谢需要的更少,所以在逆境胁迫下,植物更倾向于通过 SUS 促进蔗糖分解来提供还原糖维持生长^[35]。Klotz 等研究发现,在低温、干旱、高盐和伤害胁迫下,甜菜 SUS 基因都会被诱导而表达上调^[36]。同样在小麦的研究中发现,遭遇冷害的小麦 SUS 蛋白含量升高了 5~6 倍,这表明 SUS 蛋白可能参与小麦冷驯化的过程,可能是通过调节细胞内可溶性糖的含量以及渗透压的方式来增强耐寒性^[37]。此外,在水稻研究中还发现,水稻种子在受到高温胁迫时,通过过表达 *OsSUS3* 基因可使种子的垩白减少,来降低高温对水稻产量和品质的造成危害^[38]。总之,SUS 蛋白可以参与多个逆境胁迫响应,通过过表达 SUS 基因大多数都能提高植物抵抗逆境胁迫的能力^[39]。本研究发现的耐冷甘蓝 CT-923 叶片中 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 基因在低温胁迫后的表达水平急剧变化,为后续进一步开展 *BoSUS1a* 和 *BoSUS1b* 基因的具体功能研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Koch K E. Carbohydrate - modulated gene expression in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1996, 47(1): 509-540.
- [2] Chourey P S, Talierecio E W, Carlson S J, et al. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis[J]. Molecular & General Genetics, 1998, 259(1): 88-96.
- [3] Lutfiyya L L, Xu N F, D'Ordine R L, et al. Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(7): 923-933.
- [4] Ruan Y L, Jin Y, Yang Y J, et al. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat[J]. Molecular Plant, 2010, 3(6): 942-955.
- [5] Chinnusamy V, Zhu J H, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(10): 444-451.
- [6] Brill E, van Thournout M, White R G, et al. A novel isoform of sucrose synthase is targeted to the cell wall during secondary cell wall synthesis in cotton fiber[J]. Plant Physiology, 2011, 157(1): 40-54.
- [7] Nägele T, Heyer A G. Approximating subcellular organisation of carbohydrate metabolism during cold acclimation in different natural

- accessions of *Arabidopsis thaliana* [J]. The New Phytologist, 2013, 198(3): 777–787.
- [8] 杨丽梅, 方智远, 庄 木, 等. “十二五”我国甘蓝遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 2016(11): 1–6.
- [9] Sasaki H I, Ichimura K A, Oda M A. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings[J]. Annals of Botany, 1996, 78(3): 365–369.
- [10] 王 磊, 李建勇, 张振贤, 等. 冻害低温下越冬甘蓝渗透调节物质的变化和作用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(4): 487–490, 494.
- [11] 蔡 青, 李成琼, 司 军. 结球甘蓝耐寒性研究进展[J]. 长江蔬菜, 2009(2): 1–3.
- [12] Baud S, Vaultier M N, Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(396): 397–409.
- [13] Hirose T, Scofield G N, Terao T. An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice[J]. Plant Science, 2008, 174(5): 534–543.
- [14] Duncan K A, Hardin S C, Huber S C. The three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation[J]. Plant & Cell Physiology, 2006, 47(7): 959–971.
- [15] Zhang D Q, Xu B H, Yang X H, et al. The sucrose synthase gene family in *Populus*: structure, expression, and evolution [J]. Tree Genetics & Genomes, 2011, 7(3): 443–456.
- [16] 晁毛妮, 张自阳, 王润豪, 等. 大豆蔗糖合成酶家族成员的全基因组鉴定及表达分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(2): 232–241.
- [17] Fu H, Park W D. Sink – and vascular – associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato[J]. The Plant Cell, 1995, 7(9): 1369–1385.
- [18] Ruan Y L, Llewellyn D J, Furbank R T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development [J]. The Plant Cell, 2003, 15(4): 952–964.
- [19] Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, et al. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) [J]. The Plant Journal, 1995, 7(1): 97–107.
- [20] Wang X W, Wang H Z, Wang J, et al. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. Nature Genetics, 2011, 43(10): 1035–1039.
- [21] Liu S Y, Liu Y M, Yang X H, et al. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3930.
- [22] Hu B, Jin J P, Guo A Y, et al. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296–1297.
- [23] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [24] Voorrips R E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs [J]. The Journal of Heredity, 2002, 93(1): 77–78.
- [25] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [26] Koch M A, Haubold B, Mitchell – Olds T. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae) [J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(10): 1483–1498.
- [27] Cheng F, Mandáková T, Wu J, et al. Deciphering the diploid ancestral genome of the mesohexaploid *Brassica rapa* [J]. The Plant Cell, 2013, 25(5): 1541–1554.
- [28] Kakumanu A, Ambavaram M M, Klumas C A, et al. Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA – Seq [J]. Plant Physiology, 2012, 160(2): 846–867.
- [29] Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(3): 799–807.
- [30] Ruan Y L. Signaling role of sucrose metabolism in development [J]. Molecular Plant, 2012, 5(4): 763–765.
- [31] Barratt D H, Derbyshire P, Findlay K, et al. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase [J]. PNAS, 2009, 106(31): 13124.
- [32] Zhang C H, Yu M L, Ma R J, et al. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*) [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(4): 81.
- [33] Zhu X D, Wang M Q, Li X P, et al. Genome – wide analysis of the sucrose synthase gene family in grape (*Vitis vinifera*): structure, evolution, and expression profiles [J]. Genes, 2017, 8(4): 111.
- [34] Fenando E P, Boero C, Gallardo M, et al. Effect of NaCl on germination, growth, and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. seeds [J]. Botanical Bulletin – Academia Sinica Taipei, 2000, 41(1): 27–34.
- [35] 房经贵, 朱旭东, 贾海峰, 等. 植物蔗糖合酶生理功能研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(5): 759–768.
- [36] Klotz K L, Haagensohn D M. Wounding, anoxia and cold induce sugarbeet sucrose synthase transcriptional changes that are unrelated to protein expression and activity [J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(4): 423–434.
- [37] Crespi M D, Zabaleta E J, Pontis H G, et al. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat [J]. Plant Physiology, 1991, 96(3): 887–891.
- [38] Takehara K, Murata K, Yamaguchi T, et al. Thermo – responsive allele of sucrose synthase 3 (Sus3) provides high – temperature tolerance during the ripening stage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Breeding Science, 2018, 68(3): 336–342.
- [39] 何艺涛, 王广亚, 范春芬, 等. 植物蔗糖合酶研究进展 [J]. 植物生理学报, 2020, 56(6): 1165–1176.