

一个苹果山梨醇转运子基因家族新成员的克隆及其表达分析

李换桃,梁东,马锋旺

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】克隆一个苹果山梨醇转运子基因(命名为 ST)的全长 cDNA,为进一步研究该基因的功能奠定基础。【方法】利用 RT-PCR 法从苹果叶片中克隆 ST 基因,应用相关软件对其进行生物信息学分析;并采用实时荧光定量 RT-PCR(Real-time RT-PCR)法,分析 ST 在苹果不同组织中以及在果实发育过程中的表达情况。【结果】获得了 1 个包含全长开放阅读框的 ST 基因,该基因 cDNA 全长 1 767 bp,包含长达 1 617 bp 的完整开放阅读框,该基因所编码的蛋白与 GenBank 中已登录的其他植物山梨醇转运子的同源性均在 72% 以上,其中与苹果山梨醇转运子 MdSOT5 的同源性较高,为 81%。Real-time RT-PCR 结果表明,在不同组织中,ST 在韧皮部的相对表达量最高,其次在衰老叶、成熟叶、叶柄中较高,在库器官花、幼叶、果实、果柄、根中表达较低;在果实不同发育时期,ST 基因表达量在果实发育早期很低,花后 30 d 快速升高并达到峰值,在发育中期保持一个较高的表达水平,在果实发育后期相对表达量又降低,之后略呈递增趋势。【结论】从苹果叶片中克隆了 ST 基因,生物信息学分析可知 ST 具有糖转运功能;ST 在韧皮部的表达量最高,说明其负责长距离运输;ST 在果实发育过程中的表达量与山梨醇的含量变化相一致。

[关键词] 苹果;山梨醇转运子;基因克隆;表达分析

[中图分类号] S661.1;Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)09-0073-08

Cloning and expression analysis of a novel member of the sorbitol transporter family from apple (*Malus domestica* Borkh.)

LI Huan-tao, LIANG Dong, MA Feng-wang

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Genes encoding sorbitol transporter (ST) was cloned from apple leaf, which is a member of apple sorbitol transporter family, bioinformatics analysis made and the temporal and spatial expression of ST studied in different tissues and organs of apple, as a basis to further study gene function. 【Method】Using RT-PCR, cloned ST from apple leaves, and bioinformatics analysis was performed with related software; Using Real-time RT-PCR, we analyzed the expression of ST in different organs of apple and fruit development. 【Result】We analyzed and found that ST cDNA contains a full open reading frame. The length of cDNA of ST gene is 1 767 bp, which contains a full open reading frame (1 617 bp). Homology between ST gene and sorbitol transporter of other plants logged in GenBank is over 72%, and the highest homology (81%) with apple sorbitol transporters MdSOT5. Real-time fluorescence quantitative analysis showed that ST has the highest expression in the phloem, high expression in source leaves and lower expression in the sink organs in different tissues. Also in the different developmental stages of fruit, expres-

* [收稿日期] 2010-03-08

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2008AA10Z157);陕西省重大科技专项计划项目(2006kz05-G4)

[作者简介] 李换桃(1983—),女,山西大同人,在读硕士,主要从事果树生物技术研究。E-mail:huantaol@163.com

[通信作者] 马锋旺(1964—),男,山东汶上人,教授,主要从事果树抗性生理与生物技术改良研究。E-mail:fwm64@sina.com

sion of ST is very low in early fruit development, rapidly rises to peak after 30 days of flowering, maintains a high level of expression in the medium-term development, and reduces in late fruit development. 【Conclusion】 We cloned ST from apple leaves, and showed that ST has the function of glucose transporter through bioinformatics analysis. We studied the quantitative expression patterns, and results indicated that the expression of ST is the highest in the phloem, and ST is responsible for long-distance transport. In fruit development, the variation of ST is consistent with that of sorbitol.

Key words: apple; sorbitol transporter; gene cloning; gene expression

山梨醇是大多数蔷薇科植物主要的光合产物、同化运输物质和贮藏物质,不仅参与各种生理代谢,而且与果实的风味有很大关系,起着其他植物中蔗糖的作用。Webb 等^[1]用¹⁴CO₂饲喂苹果叶片,结果发现韧皮部中的放射性物质主要是山梨醇。由此推测,苹果光合产物的主要运输形式是山梨醇,而不是蔗糖或葡萄糖。因此,对大多数蔷薇科植物而言,了解山梨醇转运子(Sorbitol transporters, ST)在光合同化物转运过程中的功能和调控机理,具有十分重要的意义。目前已从苹果、酸樱桃等植物中获得山梨醇转运子基因。如 Junya 等^[2]从苹果源叶片上分离出了 MdSOT3、MdSOT4、MdSOT5 3 种编码山梨醇运输蛋白的基因(cDNA),发现其在叶片中的表达量都很高,且随着叶片的成熟表达量逐渐提高;利用原位杂交发现其在韧皮部的表达量最高。Gao 等^[3]从酸樱桃幼叶和果实中克隆得到酸樱桃山梨醇转运子基因 Pcsot1 和 Pcsot2,通过在酵母中异种表达证实,这 2 个基因是依赖于质子的编码基因,二者的表达产物(山梨醇运输蛋白)与山梨醇具有相似的亲和力;这 2 个基因在叶和果实发育进程中有不同的作用,其中 Pcsot1 在果实和叶中都表达,在果实中的表达高峰发生于果实生长和山梨醇积累速率最快的时期,而在叶片中的表达峰值发生于幼叶中,在成熟叶中表达极低;相反, Pcsot2 只在果实发育早期表达,在叶中没有表达,这表明 Pcsot1 和 Pcsot2 介导的山梨醇运输,在酸樱桃果实生长发育中起不同的作用。这一研究结果为阐明山梨醇在果实中的分配与积累机理提供了分子生物学基础。由此可见,目前虽然对山梨醇运输蛋白进行了一些研究,但关于山梨醇转运子基因的结构功能、表达模式、参与山梨醇转运的方式等尚不清楚。本研究根据对苹果 EST 库中与 ST 同源的 EST 序列进行拼接,获得一个推断的 ST 序列,再根据所拼接序列,在预测的编码框外设计引物,通过 RT-PCR 法,从苹果叶片中得到了 ST 基因,并应用相关软件分析了该基因的生物学功能,然后利用实时荧光定量

RT-PCR 研究 ST 基因在苹果组织不同时空的表达情况,以期为进一步了解山梨醇转运子的代谢机理和功能作用开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物为长势一致的 6 年生“皇家嘎拉”苹果 (*Malus domestica* Borkh. cv. Gala), 取自陕西杨凌西北农林科技大学园艺科研教学基地。

果实取样时,选择阳面外围长势一致的果实,以 2008-04-16 为花后 0 d 开始计时,分别采花后 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 和 120 d 的果实用于研究。以花后 15 和 120 d 的果实分别作为不同组织中的幼果和成熟果。采后立即投入液氮带回实验室,置于 -70 °C 冰箱备用。

其他组织部位于 2009-08-01 取样,在植株上找生长一致的阳面外围当年生枝顶端幼叶及供应果实生长的成熟叶和衰老叶,并采同一时期的枝条,剥其枝条皮层为韧皮部,并挖掘同期的根,采摘叶柄和果柄,采后立即投入液氮带回实验室,置于 -70 °C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 根据 Chang 等^[4]的改良 CTAB-LiCl 法,分别提取不同时期叶片(幼叶、成熟叶、衰老叶),发育过程的果实及其他组织(花、韧皮部、根、叶柄、果柄)的总 RNA。

1.2.2 ST 基因的克隆与序列分析 利用 TaKaRa 公司的 Primescript reverse transcriptase kit,以叶片总 RNA 为模板进行 cDNA 第一链合成。根据 GenBank 中已登录的山梨醇转运子基因序列设计引物 ST1 和 ST2(表 1),以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,回收特异性扩增片段并克隆至 pMD18-T 载体中,挑取阳性克隆进行序列测定。

1.2.3 ST 基因的生物信息学分析 根据所测得的核苷酸序列,利用 DNASTAR 软件中的 EditSe 分

析开放阅读框;利用 BLAST 软件,分析核苷酸和氨基酸的同源性并进行保守功能域的预测;采用 ExPASy 的 ProtParam Tool 分析理化性质;用 TMpred Server 软件预测跨膜结构;通过 ExPASy Proteomics Server 系统中的软件在线预测其功能性位点;用 SignalP 3.0 Server 进行蛋白质序列中信号肽的预测分析;用 Blastn 程序进行同源性比对,从 GenBank 中挑选 7 个来源于不同植物的山梨醇转运子的氨基酸序列,用 DNAMAN 进行多序列比对和进化树构建与分析。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'→3') Sequence of the primers(5'→3')
ST1	CTTCTGCAAATATTAGACACCACAT
ST2	CCAACATCTAAAGAGAAGGACCT
ST3	AGGCAGAACCTAGAAGATATGGAG
ST4	TCATACCACTCTTATTATTGCCATC
Actins	GGACCGAGGACATTCAAC
Actina	CTGACCCATTCCAACCATAACA

1.2.4 ST 基因的定量表达分析 分别提取各生长时期苹果叶片和果实的总 RNA,再提取不同组织器官的总 RNA,反转录利用 Primescript™ RT reagent Kit(TaKaRa)进行。根据测序结果分别设计引物 ST3、ST4 进行实时荧光定量 RT-PCR(Real-time RT-PCR)。实时荧光定量 RT-PCR 仪为 BIORAD 公司生产的 IQ⁵ 型,反应试剂为 SYBR Premix Ex Taq TM II (TaKaRa)。反应循环后作熔解曲线

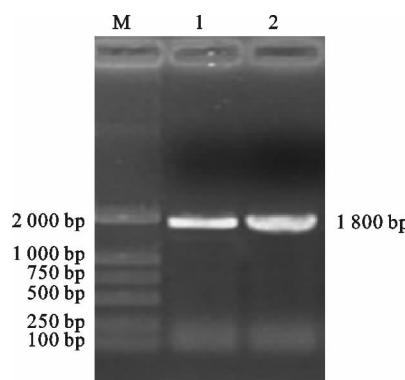


图 1 苹果 ST 基因的 RT-PCR 扩增结果

M. 分子量标准;1,2, ST

Fig. 1 RT-PCR product of ST

M. Marker;1,2, ST

用 ExPASy 的 ProtParam Tool 分析发现,ST 基因编码的氨基酸序列中带正电荷的氨基酸(赖氨酸 Lys 和精氨酸 Arg)有 46 个,带负电荷的氨基酸(天冬氨酸 Asp 和谷氨酸 Glu)有 40 个,分别占编码

以鉴定反应的特异性。选用 Actin 基因作为内参,通过 Real-time RT-PCR 得到的所有数据,经内参基因均一化处理后,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出待测基因的相对表达量,其中 Ct 为每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。所有数据均重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 苹果 ST 基因的克隆与序列分析

以苹果叶片总 RNA 反转录产物为模板进行 RT-PCR 扩增,利用序列拼接和 RT-PCR 法获得了 1 条长度约 1 800 bp 的特异性条带(图 1),将其克隆到 pMD18-T 载体上进行测序。测序结果表明,该片段长 1 767 bp,含有 1 个 1 617 bp 的开放阅读框,编码 538 个氨基酸,该基因所编码蛋白的分子质量为 57.1 ku,等电点为 8.87;同源性分析结果(图 2)表明,其所编码的蛋白与 GenBank 中已登录的植物山梨醇转运子具有较高的同源性,均在 72% 以上,可见该基因是山梨醇转运子基因家族成员。该基因所编码的蛋白与苹果山梨醇转运子 MdSOT5、MdSOT6 的同源性分别为 81%,75%,用 Blastn 软件对该基因序列与其他苹果山梨醇转运子家族成员基因序列的同源性进行比较,结果都低于 81%,且基因序列比对结果显示该基因包含了 5' 端和 3' 端,据此认为,本研究所克隆的基因为苹果品种“皇家嘎啦”的山梨醇转运子基因家族新成员,将其命名为 ST。

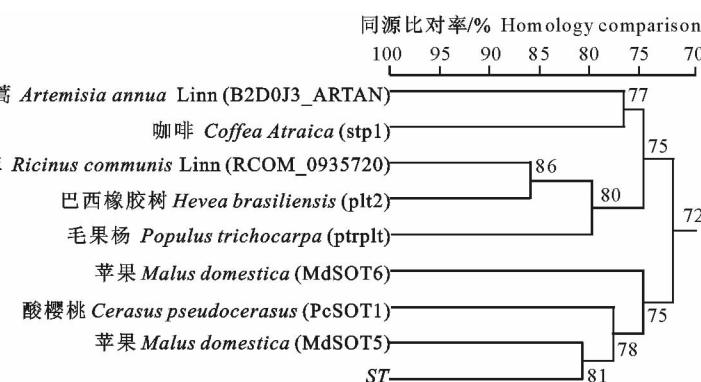


图 2 苹果 ST 与不同植物山梨醇转运子基因所推导氨基酸的聚类分析结果

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of the deduced amino acid sequences homology of apple ST with related plant species 总氨基酸的 8.71% 和 7.5%。Prosite 分析结果(图 3)表明,ST 基因具有如下功能位点:2 个氮端磷酸化位点,1 个蛋白激酶磷酸化位点,5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,1 个 cAMP-and cGMP-依赖蛋白激酶

磷酸化位点,9个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点,3个酰胺化位点,1个酪氨酸激酶磷酸化位点,15个氮端十

四烷酰化位点,3个糖转运蛋白信号位点I和1个糖转运蛋白信号位点II。

```

ATG GCGGGCGGAGACTGAAGATAATGCCCTCAGCAACAA CCGGGAGCAGAGGCCTCCGAATTGACTCCCCAAAG
M A G R R A E D N A L S Q Q P G S R G L S E F D S P K
A A A C C C A A A G A A A C A A G T A T G C C T T G C C A T T T G C C T C A T G A C T C A A T C T G T T A G G T T A T G A C A T T G G T
K P K R N K Y A A F A C A I L A S M T S I L L G Y D I G
G T G A T G A G T G G A G C T G C A A T C T A C A A A G A G G A C C T T A A A T T C C G A C G T C G A A A T T G A G A T C C T A C T C G G T A T T A T A
V M S G A A I Y I K E D L K I S D V E I E I L L G I I
A A C G T C A T T C C C T C A T C G G C T G C G C T G C T G G A A G A A C A T C G C A C A G G A T T G G T C G C G G T A C A C C A T A G T C C T C G C T
N V Y S L I G S A A A G R T S D R I G R R Y T I V L A
G G G G C A T T T C C T C A C G G G A G C T C T T A T G G G A T T C G C C A A A C T A T G T C T T C T A A T G G T A G G C C G G T T T G G G C T
G A I F F T G A L L M G F A T N Y V F L M V G R F V A
G G G A T A G G C A T C G G G T A T G C C C T C A T G A T C G C T C C T G T C T A A C C G C C G A G G T C T C G C C A G C G T C A T C T C G T C G G T T C C T C
G I G I G Y A L M I A P V Y T A E V V S P A S S R G F L
A C A T C T T C C C A G G T C T T G C A A T A T A G G G A T A C T G T G G G C T A C G T C A C T A T G C G T C T C G A A G C T T C C A A C T
T S F P E V F V N I G I L L G Y V S N Y A F S K L P T
C A C T T A G G G T G G C G G T C A T G C T C G G C A T C G G C G C A G T C C C C T C G T T A T T C T C G G C T C G G C G T C T T A G C C A T G C C G G A G
H L G W R L M L G I G A V P S V I L G V G V L A M P E
T C G C C G C G T C G G C T C G T C A T G C A A G G A C G G C T C G G G A C G C G A C A C G T G T T C T C A A C A A A C C T C A G A C T C C A A A G A G G A G
S P R W L V M Q G R L G D A T R V L N K T S D S K E E
T C C T C G T C C G G T T A G G G A G A C T C A G G A A G C T G C A G G A A T C C C A G A G T A C T G C A C C G A C G A C G T C G T C A G G T C G T C A A A
S L L R L G D I R E A A A G I P E Y C T D D D V V Q V V K
C G C A G C C A A G G C C A A G A T G T C T G G A A G A G T G T C C T C C G T C A C G C C G G G T T C G T C A C A T T T A A T C T G C C C G T C
R S Q G Q D V W K E L F L R P T P A V R H I L I C A V
G G T A T C C A C T C T T C A C G C A G G C T C G G G T A T C G A C G C C G T C G T C T G T A C A G C C C A A G A T C T T G A G G A G G C T G G G A T A
G I H F F Q Q A S G I D A V V V L Y S P R I F E E A G I
A C C A A C T C G A C C A A G C T A C T C T G C A C T G T A G C C G T T G A T T G G C C A A G C C A T T T T A T C C T G T C G C C A T G T T T T G
T N S D H K L L C T V A V G L A K T I F I L V A M F L
A T T G A T C G G A T C G G A C G G C G T C C G T C T C A A C C G A T G T G G C G G G A T G T T A T T G C C C T C G G A T C T C T C G C T G T G G G C
I D R I G R R P L L L T S V A G M V L S L G S L A V G
C T T A C G A T C A T C G G A T C G G C A C C A G G G G C T A A G A T G A C G T G G A C T A C C G A T T G T G C C G A T T G G A C C A T G G T A T T A G C G T A C G C T
L T I I D R H Q G A K M T W T A A L C L T M V L A Y A
G C G T T C T T C T A C G G G T T G G G C C C A T C A C G T G G G T T A T A G C T C T G A G A T C T T C C G T T G G G C T A C G G C T C A A G G A
A F F P S I G L G P I T W V Y S S E I F P L G L R A Q G
T G C A G T A C G G G A C T G G G C A T G A A T G G G G T T G A G T G G G G T T C T C A A T G A C G T T T A T T C A T T G T A T A A G G C C A T C A C G
C S I G V A M N G V V S G V L S M T F I S L Y K A I T
A T G G G C G G A G C C T C T T T T T A C G C G G A A T T G C T A C T G T G C A T G G G T G T T C T C T A T A C G A T G C T C C G G A A C A C A A
M G G G A F F F F Y A G I A T V A W F F Y T M L P E T Q
G G T A G A A C C T A G A A G A T T G G A G G T C T G T G G C A A G T T C A T A A G T G G A A A G A G T C A A T G C A C T G C T C G A A A C C A A A
G R T L E D M E V V F G K F H K W K E V N A L L E T K
A C C C A A G T C G A T C A T G G T G G T G A T G C A A T A A T G A G G A T G G T A T G A T C C A A T T A G A A A C A A A A G G T C C T C T C T T T A G C
T Q V D H G G D G N N R S G M I Q L E T K G P S L

```

图3 ST cDNA序列与推导的氨基酸序列

ATG为起始密码子;TAG为终止密码子;预测的蛋白质糖转运位点用黑体阴影标出

Fig. 3 ST cDNA of *Actinidia latifolia Malus domestica* and its deduced amino acid

ATG indicates the start codon; TAG indicates the stop codon; Sugar transporter sites are present in bold-faced font and shade

2.2 苹果ST基因的生物信息学分析

分析,结果见图4。

对ST基因所推导的蛋白质结构进行亲疏水性

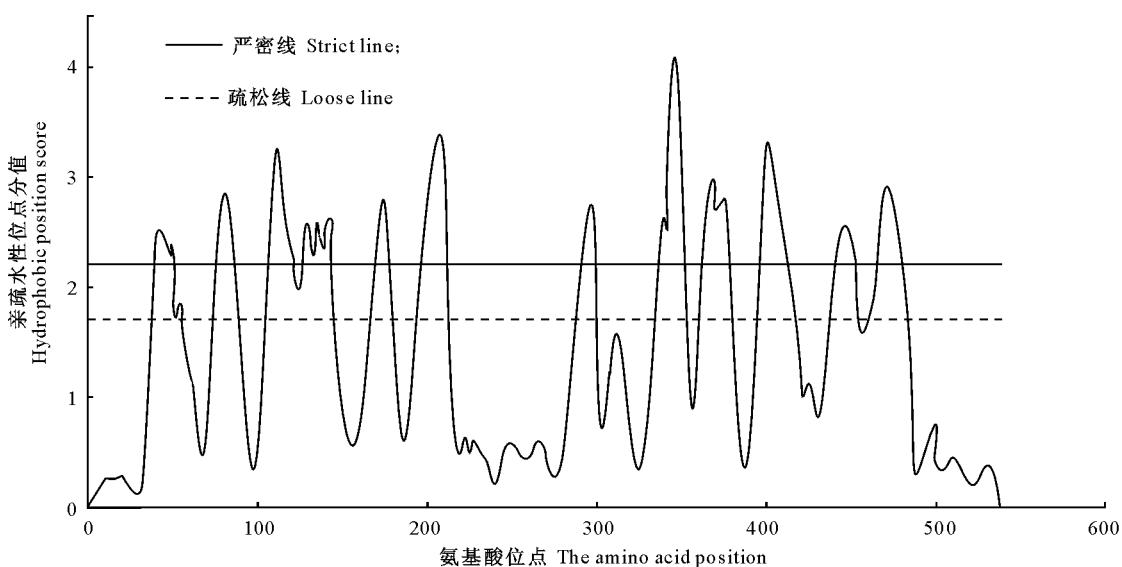


图4 ST基因推导蛋白质的疏水性

Fig. 4 Prediction of hydrophobic analysis of ST

由图4可以看出,平均疏水性分析结果显示,在严密线之上有12个峰值,分别分布于氨基酸残基的38~61,76~93,104~128,133~150,161~180,195~212,292~314,331~351,360~382,395~419,432~454,459~482位处。用TM pred Server软件预测显示(图5),在N末端161~183和331~352位氨基酸处有2个从膜外向膜内的跨膜螺旋结构,总分分别为1128和1866;而在36~53,126~148,292~314和457~479位氨基酸处有4个从膜内向膜外的跨膜螺旋结构,总分分别为1676,

1 919,847 和 2 629 (大于 500 为有意义的跨膜区)。用 HNN secondary structure prediction 预测软件分析 ST 基因所编码蛋白的二级结构,结果表明,整个蛋白由 α -螺旋结构、无规则卷曲和扩展链结构组成,其中 α -螺旋结构有 106 个,占 29.36%;扩展链、无规则卷曲各占 21.61% 和 49.03%,可以确定 ST 是一个混合性蛋白(图 6)。分别用 PROST、Targetp、SingleP 对 ST 基因所编码蛋白进行亚细胞定位,百分率越高表明其所在亚细胞定位越准确,结果表明,ST 主要定位于质外体和细胞质膜、叶绿体膜上(表 2)。

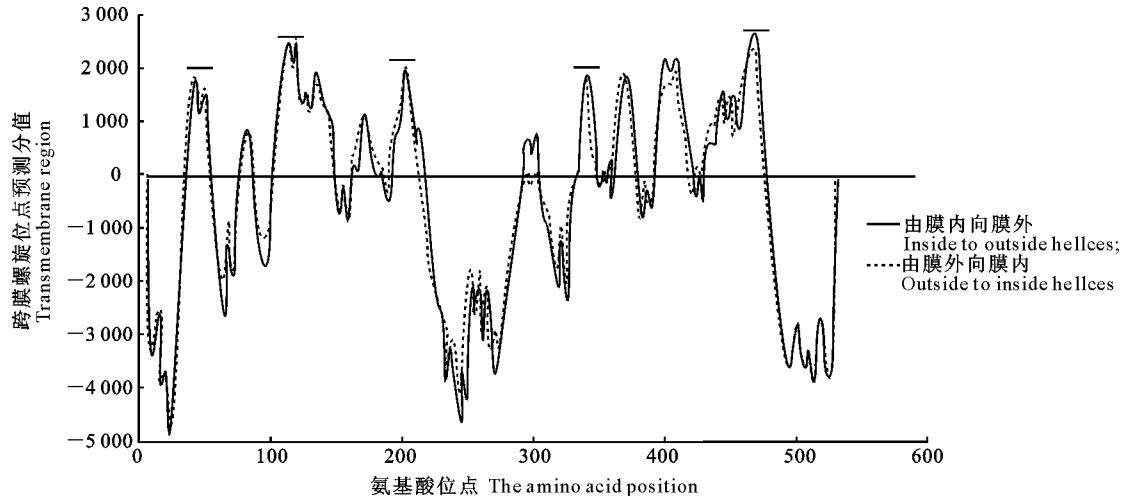


图 5 ST 跨膜结构的预测结果

Fig. 5 Prediction of transmembrane region ST

图 6 ST 蛋白的二级结构预测

h. α -螺旋；e. 扩展链；c. 无规则卷曲

Fig. 6 Secondary structure prediction of the ST protein from apple

h. Represents alpha helix, e. Represents extended strand, c. Represents random coil

表 2 ST 编码蛋白的亚细胞定位预测

Table 2 Predicted subcellular localization of ST

分析软件 Analysis tool	质外体 Apoplast	高尔基体 Golgi apparatus	内质网 Endoplasmic reticulum	叶绿体 Chloroplast	线粒体 Mitochondrial	其他 Other
PSORT	80	40	30	53. 9	—	—
Targetp	65	—	—	19	36. 2	92. 5
SingleP	4	—	—	—	—	84. 08

2.3 苹果 ST 基因的定量表达分析

利用 Real-time RT-PCR 技术,分析了 ST 基因在果实生长过程中和苹果不同组织中的表达情况,为了把握苹果在整个生长时期山梨醇转运子的表达过程,将果实个体发育全期划分为 4 个时期:果实发育始期(花后 0~15 d);早期缓慢生长期(花后 15~30 d);中期快速生长期(花后 30~90 d);后期缓慢生长期(花后 90~120 d)。

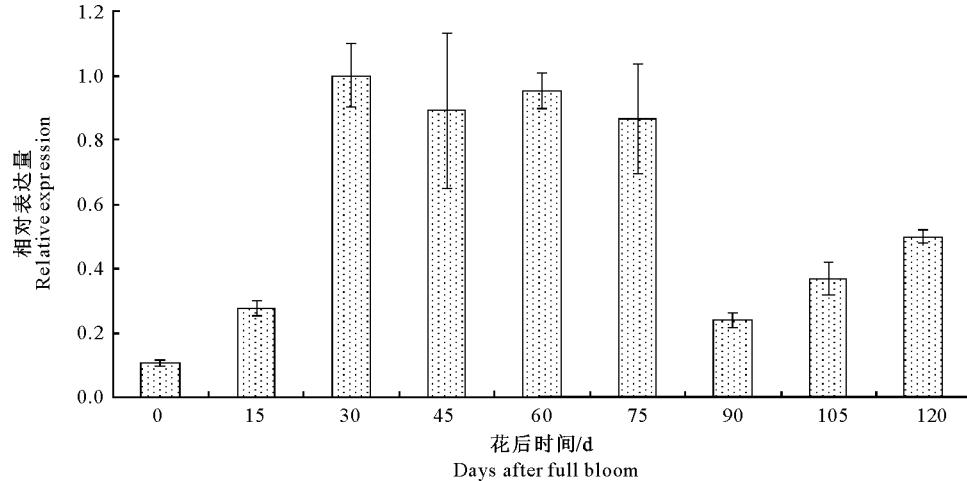


图 7 ST 在苹果果实不同发育时期的表达

Fig. 7 Expression pattern of sorbitol transporter ST from different fruit development periods

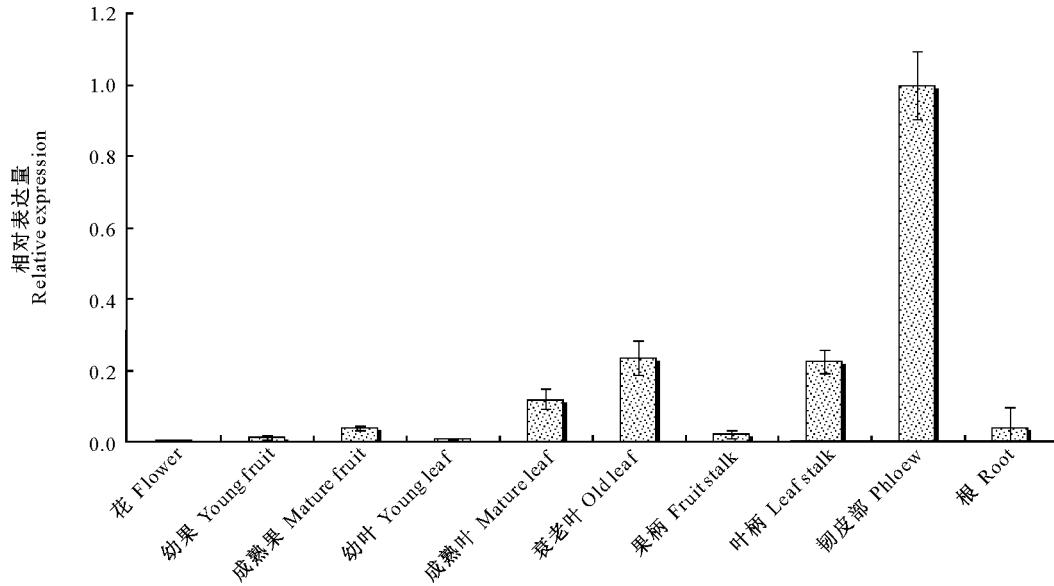


图 8 ST 在苹果不同组织中的表达

Fig. 8 Expression pattern of sorbitol transporter ST from different tissues

3 讨 论

山梨醇是蔷薇科植物中主要的光合产物和有机物运输形式,主要在成熟的叶片中合成,运输到果

由图 7 可以看出,ST 基因相对表达量在果实发育早期快速升高,于花后 30 d 达到峰值;在发育中期保持了一个较高的表达水平,进入果实发育后期相对表达量迅速下降,随后又略呈递增趋势。

由图 8 可以看出,ST 基因在韧皮部的相对表达量最高,其次是衰老叶、叶柄、成熟叶,在成熟果、根中的表达量居中,在花、幼果、幼叶、果柄中的相对表达量均较低。

实、幼叶、根等库器官,与源库相互关系、果实品质、抗逆性等密切相关,因而具有重要的研究价值^[5-8]。而山梨醇运输的关键酶是山梨醇转运子,因此对山梨醇转运子的研究具有十分重要的意义。山梨醇转

运子是运输山梨醇的载体蛋白, 龚晏等^[9]通过克隆山梨醇转运子的一个 cDNA 片段, 对其所编码蛋白的结构功能进行分析发现, 其在光合同化物从源器官装载、韧皮部运输到卸载进入果实贮藏薄壁细胞中起着重要的作用。

Reinders 等^[10]研究发现, 主要易化子超家族 (major facilitator superfamily, MFS) 是一个古老的基因家族, 有 100 多个成员, 主要编码各种代谢物和糖类的共转运载体。糖转运蛋白载体是 MFS 家族中的一个重要分支, 植物糖转运载体蛋白分布于植物细胞膜上, 是含有 12 个疏水性跨膜结构域的活性糖转运子, 有糖转运功能位点。本研究对 ST 进行生物信息学分析发现, ST 基因与 MFS 基因家族的保守区高度吻合, 且所编码蛋白具有 12 个疏水跨膜区和糖转运位点, 说明 ST 编码的蛋白是糖转运载体蛋白, 具有糖转运功能。吴楚等^[11]研究了蔗糖转运蛋白 SUT 基因家族的 3 个亚族后发现, N-端磷酸化决定着蔗糖转运蛋白的亲和力, 直接或间接影响蔗糖转运的活力, 具有信号分子机制, 对 ST 功能位点研究发现其具有 N-端磷酸化位点, 说明 ST 也可能具有信号分子的功能。因此初步可以说明山梨醇转运子 ST 具有载体和信号传感的双重功能。

白宝璋等^[12]发现, 山梨醇主要分布于自由空间, 含量占整个组织的 45%; 在细胞内, 山梨醇则主要集中于液泡, 含量占整个原生质体的 40%。本研究对 ST 进行亚细胞定位发现, ST 主要定位于质外体和叶绿体膜等细胞膜上, 这说明山梨醇转运子 ST 与山梨醇的定位情况基本一致。吕英民等^[13-14]发现, 在植物组织中, 细胞膜上存在糖的载体, 而 ST 定位在叶绿体、线粒体等细胞器膜上, 也为 ST 的转运功能奠定了基础。

Yamaki 等^[15]发现, 山梨醇只在成熟的叶片中合成, 然后运输到幼叶、果实等库器官中, 山梨醇含量从源到库存在着浓度梯度(源>库)。本试验研究了山梨醇转运子基因 ST 在苹果不同组织的定量表达发现, ST 的相对表达量为衰老叶>叶柄>果柄>幼果(或幼叶), 说明山梨醇转运子 ST 的表达量与山梨醇的含量在不同组织中的表现相一致。张立军等^[16]发现, 糖类物质运输的主要通道是韧皮部的筛管, 筛管和伴胞组成的复合体又与韧皮部卸载密切相关, 而长距离运输也与韧皮部的卸载有关。本研究中, ST 在韧皮部的相对表达量极显著高于其他组织部位, 因此山梨醇转运子 ST 可能负责长距离运输。

张凌云^[17]用胶体金免疫电镜定位观测了果实发育过程中己糖载体蛋白的数量变化发现, 从发育前期到发育后期, 筛分子质膜上己糖载体的数量逐渐升高, 发育前期质膜上金颗粒分布较少, 而在中后期观察到较高密度的金颗粒分布。本研究中, ST 在果实发育中期快速生长期的相对表达量很高, 与张凌云^[17]的研究结果正好相符; 在果实发育后期的缓慢生长期, ST 的相对表达量又降低, 可能是由于果实在成熟过程中, 与载体结合的山梨醇转化为果糖, 因此运输山梨醇的载体不断累积在成熟果实中。但实际中, 山梨醇转运子贮存于根等其他库器官中, 而降低了其在成熟果实中的相对含量。

杨爱珍等^[18]发现, 在桃果实发育过程中, 在盛花后 16 d 内, 果实中山梨醇含量维持在较低水平。李春英等^[19]研究客发梨果实发育, 发现在 6 月初之前山梨醇含量很高但之后迅速下降, 到 6 月底已经降至较低水平。本研究中, ST 在花后 15 d 内相对表达量很低, 而在花后 30~45 d 相对表达量迅速升高, 此时正好在 6 月初之前, 表明 ST 的表达量与山梨醇含量变化相一致; 此后 ST 一直保持较高的表达水平, 直到花后 75 d 即 7 月中旬, 而李春英等^[19]发现此时是山梨醇含量增加的另一个高峰。在此时可能是大量的山梨醇转运子载体与这个高峰期的山梨醇结合, 因此相对 ST 相对表达量突然降低; 在果实逐渐成熟过程中 ST 的相对表达量又逐渐升高, 其原因与果实成熟过程中山梨醇转化为果糖密切相关。

4 结 论

本研究从苹果叶片中克隆得到了 ST, 生物信息学分析表明, ST 基因属于 MFS 家族, 其所编码的蛋白具有糖转运位点, 与其他植物中山梨醇转运子基因具有很高的同源性(均在 72% 以上), 通过与苹果山梨醇转运子家族成员的序列比对, 证明 ST 属于山梨醇运子家族且是一个新成员。在不同组织中, ST 基因从源到库的相对表达量逐渐降低, 其在的韧皮部中表达量极显著高于其他部位, 推断 ST 可能负责长距离运输。在果实不同发育时期, ST 基因相对表达量与山梨醇在果实发育过程中的含量变化相一致, 在花后 15 d 内山梨醇含量很低, 可知 ST 的相对表达量也低; 随着 6 月初之前山梨醇含量峰值, ST 的相对表达量也达到峰值; 随着果实成熟, ST 相对表达量又有所降低, ST 表达模式与其功能对应, 为详细深入地了解验证其功能, 还有待进

一步的试验研究。

[参考文献]

- [1] Webb K L, Burley J, William A. Sorbitol translocation in apple [J]. Science, 1962, 137: 766-769.
- [2] Junya W, Yoshihiro K. Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves [J]. Plant Physiology, 2004, 135(8): 1032-1041.
- [3] Gao Z F, Maurouset L. Cloning expression and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues [J]. Plant Physiology, 2003, 131: 1566-1575.
- [4] Chang S J, Jeff P, John C. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 113-116.
- [5] 李嘉瑞, 马锋旺. 蔷薇科果树山梨醇代谢酶的研究 [J]. 果树科学, 1991, 8(2): 111-115.
- Li J R, Ma F W. Study on the sorbitol in Rosaceae family fruit [J]. Journal of Fruit Science, 1991, 8(2): 111-115. (in Chinese)
- [6] 马锋旺, 李嘉瑞. 蔷薇科果树中山梨醇代谢的酶 [J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(3): 88-93.
- Ma F W, Li J R. Enzymes related to sorbitol metabolism in fruit trees of Rosaceae [J]. Acta Universitatis Agriculturales Boreali-occidentalis, 1993, 21(3): 88-93. (in Chinese)
- [7] 梁东, 马锋旺, 管清美, 等. 蔷薇科植物中山梨醇代谢酶的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1362-1366.
- Liang D, Ma F W, Guan Q M, et al. Advances in the research of enzymes related to sorbitol metabolism in plants of Rosaceae [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica, 2004, 24(7): 1362-1366. (in Chinese)
- [8] 胥婷, 任蔷, 李关荣, 等. 水稻蔗糖转运基因家族研究进展 [J]. 生命科学研究, 2006, 10(4): 37-44.
- Xu T, Ren Q, Li G R, et al. Advances in sucrose transporter gene family of *Oryza sativa* L. [J]. Life Science Research, 2006, 10(4): 37-44. (in Chinese)
- [9] 龚晏, 梁东, 苹果山梨醇转运子 cDNA 的克隆及其序列分析 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(23): 9918-9920.
- Gong Y, Liang D. Cloning and sequence analysis of cDNA sorbitol transporter from apple leaf [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2008, 36(23): 9918-9920. (in Chinese)
- [10] Reinders A, Panshyshyn J A, Ward J M. Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog At-PLTS [J]. J Biol Chem, 2005, 280(2): 1594-1602.
- [11] 吴楚, 朱能斌. 植物中糖转运途径糖转运蛋白及其生理功能 [J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(4): 295-301.
- Wu C, Zhu N B. Advances in the research on sugar transporter pathway, sugar transporters and their physiological functions in plants [J]. Journal of Huibe Agricultural College, 2004, 24(4): 295-301. (in Chinese)
- [12] 白宝璋, 孙存华, 田文勋, 等. 蔷薇科果树中山梨醇的概况研究 [J]. 吉林大学学报, 1995, 17(增刊): 57-62.
- Bai B Z, Sun C H, Tian W X, et al. Studying situations of sorbitol in fruit trees of rosaceae [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1995, 17(Suppl.): 57-62. (in Chinese)
- [13] 吕英民, 张大鹏, 严海燕. 苹果果实韧皮部及其周围薄壁细胞的均超微结构观察和功能分析 [J]. 植物学报, 2000, 42(1): 32-42.
- Lü Y M, Zhang D P, Yan H Y. Ultrastructure of phloem and its surrounding parenchyma cells in the developing apple fruit [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(1): 32-42. (in Chinese)
- [14] 吕英民, 张大鹏, 严海燕. 糖在苹果果实中卸载机制的研究 [J]. 园艺学报, 1999, 26(3): 141-146.
- Lü Y M, Zhang D P, Yan H Y. Sugar unloading mechanisms in the developing apple fruit [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26(3): 141-146. (in Chinese)
- [15] Yamaki S, Kanayama Y. Purification and properties of NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple seedlings [J]. Plant Cell Physiology, 1993, 34(6): 819-823.
- [16] 张立军, 李晓宇, 阮燕哗. 植物蔗糖转运蛋白的研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(3): 259-264.
- Zhang L J, Li X Y, Ruan Y H. Advances in the research of sucrose transporters in plants [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2008, 39(3): 259-264. (in Chinese)
- [17] 张凌云. 苹果果实韧皮部质外体卸载的证据 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- Zhang L Y. Evidence for apoplastic phloem unloading pathway in apple fruit [D]. Beijing: China Agricultural University, 2003. (in Chinese)
- [18] 杨爱珍, 张志毅, 孟海玲, 等. 桃果实发育过程中山梨醇及酶活性变化 [J]. 林业科学, 2009, 45(5): 143-147.
- Yang A Z, Zhang Z Y, Meng H L, et al. Changes in sorbitol content and its related enzyme activities during peach fruit development [J]. Scientia Silvae Sinica, 2009, 45(5): 143-147. (in Chinese)
- [19] 李春英, 薛桂新, 李永勋. 苹果梨果生长期山梨糖醇及其他糖变化规律的研究 [J]. 北方果树, 1999(6): 6-8.
- Li C Y, Xue G X, Li Y X. Study on the change pattern of sorbitol and other sugars in Kefafe-pear in growing seam [J]. Northern Fruit, 1999(6): 6-8. (in Chinese)