

蔗糖合成酶 *PavSS1* 调控甜樱桃果实成熟的功能分析

齐希梁, 刘聪利, 宋露露, 李明*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:【目的】明确甜樱桃 *PavSS* 基因家族在果实成熟过程中的功能。【方法】利用 qRT-PCR 技术分析了 7 个蔗糖合成酶基因 *PavSS1*~7 在果实发育过程中的表达情况, 并分析了蔗糖对 *PavSS* 家族基因表达的影响, 利用甜樱桃果实的 VIGS 技术分析了 *PavSS1* 与 *PavSS6* 基因影响果实成熟的功能。【结果】*PavSS1* 和 *PavSS2* 基因在甜樱桃果实发育和成熟过程中均表达, 且 *PavSS1* 基因表达量是 *PavSS2* 基因的 10 倍以上; *PavSS1* 和 *PavSS2* 在果实发育前期表达量逐渐升高, 后期表达量逐渐降低。 *PavSS3* 和 *PavSS5* 基因在整个果实发育期均低表达, 且表达量差异不显著。 *PavSS4* 和 *PavSS7* 基因在果实发育前期表达量高, 后期表达量低。 *PavSS6* 基因在果实发育初期低表达, 随后表达量逐渐升高, 并维持较高水平。外施蔗糖显著下调了 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因的表达, 而 *PavSS2*、*PavSS3*、*PavSS4*、*PavSS5* 和 *PavSS7* 基因的表达变化不显著。沉默甜樱桃果实 *PavSS1* 基因抑制了甜樱桃果实成熟, 包括果实硬度、ABA 含量、花色苷含量和可溶性糖含量发生显著变化以及成熟相关基因的表达量显著下调; 而沉默 *PavSS6* 基因的甜樱桃果实与空载对照相比, 没有显著变化。【结论】*PavSS1* 基因可能是控制甜樱桃果实蔗糖代谢的关键基因, 参与了甜樱桃果实成熟过程的调控。

关键词: 甜樱桃; 蔗糖合成酶; *PavSS1*; *PavSS6*; 果实成熟

中图分类号: S662.5

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)02-0168-11

Functional analysis of sucrose synthase *PavSS1* regulating sweet cherry fruit ripening

QI Xiliang, LIU Congli, SONG Lulu, LI Ming*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is an economically valuable horticultural crop that is widely cultivated in temperate regions. Its fleshy fruits have nutraceutical properties and antioxidant activity. Sucrose synthase (SS), which catalyzes the reversible conversion of sucrose to monosaccharose, is a key enzyme in sucrose metabolism. The functional characteristics and regulation of *PavSS* genes during fruit ripening, however, has not been studied widely. In order to provide a theoretical basis for determining the function of sucrose synthase genes (SS) in sweet cherry during sweet cherry fruit ripening, we characterized the biological function of *PavSS1*, *PavSS2*, *PavSS3*, *PavSS4*, *PavSS5*, *PavSS6* and *PavSS7* genes in sweet cherry. 【Methods】To isolate *PavSS1*, *PavSS2*, *PavSS3*, *PavSS4*, *PavSS5*, *PavSS6* and *PavSS7* orthologs in sweet cherry, the protein sequences of *AtSS1* (AT1G05560), *AtSS2* (AT1G73370), *AtSS3* (AT3G43190), *AtSS4* (AT4G02280), *AtSS5* (AT5G20830), *AtSS6* (AT5G37180) and *AtSS7* (AT5G49190) were used as the query in a BLAST algorithm-based search against the sweet cherry genome (<http://cherry.kazusa.or.jp/map.html>). The fruit ripening, quantitative real-time PCR were used separately to analyze the expression patterns of *PavSS* gene families in fruit tissue obtained in different growth and developmental stages. To verify the effect of sucrose on *PavSS* gene families expression, qRT-PCR was implemented to assess *PavSS* gene families expression levels with sucrose treatment. To determine the functional characterization of sweet cherry *PavSS1* and *PavSS6* during fruit ripening, the tobacco rattle virus-induced gene silencing (TRV-VIGS) technique

收稿日期: 2020-07-15 接受日期: 2020-11-20

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2020-ZFRI), 河南省自然科学基金-青年科学基金(20230041053)

作者简介: 齐希梁, 男, 助理研究员, 博士, 主要从事樱桃分子生物学研究。Tel: 0371-65330965, E-mail: qiliangxi@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371-65330965, E-mail: liming06@caas.cn

was used to knock down expression of the *PavSSI* and *PavSS6* genes in the sweet cherry landrace 'Brooks'. RT-PCR was performed using cDNA samples from infiltrated fruit at 14 dpi to verify whether the *PavSSI* and *PavSS6* gene in 'Brooks' was effectively silenced. To further understand the role of *PavSSI* and *PavSS6* in the regulation of fruit ripening, we analyzed the anthocyanin contents, ABA contents, fruit hardness, soluble sugar contents in the *TRV::PavSSI*- and *PavSS6* infected and control fruits. The transcripts of the ripening-related genes, including *PavNCED1*, *PavPGI*, *PavXYL1*, *PavPL1*, *PavPAL*, *PavCHS*, *PavANS* and *PavDFR* were assessed. **【Results】** Seven putative full-length mRNA [*PavSSI* (*Pav_sc0000129.1_g1710*), *PavSS2* (*Pav_co4071539.1_g010*), *PavSS3* (*Pav_sc0000174.1_g950*), *PavSS4* (*Pav_sc0000130.1_g850*), *PavSS5* (*Pav_sc0000174.1_g960*), *PavSS6* (*Pav_sc0000103.1_g1530*), and *PavSS7* (*Pav_sc0001124.1_g380*)] were obtained for *PavSS* with a start codon ATG and a stop codon TAA in sweet cherry. The expression level of the *PavSSI* was high during the fruit development and ripening. The *PavSSI* expression increased gradually from 7 days after flowering, reached a peak on 21st day after flowering, and then decreased gradually during the later stage of fruit development and ripening. The *PavSS2* expression was low during fruit growth and development, and the expression pattern of the *PavSS2* gene was similar to that of the *PavSSI* gene. Both the *PavSS3* and the *PavSS5* genes expressed during the development and ripening of sweet cherry fruit, but the expression levels were relatively low, and the differences in expression levels were not significant throughout the fruit development and ripening. The expression of the *PavSS4* was high in the early stage of fruit development, reached a peak on the 14th day after flowering, then the *PavSS4* gene expression decreased, and maintained in low expression level. The expression of the *PavSS6* gene was low in the early stage of fruit development and increased in the later stage of fruit development, with the highest expression level 49 days after flowering. The *PavSS7* gene expressed during fruit development, but the expression level was relatively low. In addition, the expression of the *PavSS7* gene showed two peaks on 7th day and 28th day after flowering, and the expression level was relatively low during fruit ripening. Compared with control, the expression of the *PavSSI* and the *PavSS6* gene were up-regulated at 6 h, and then significantly down-regulated at 12, 24, 48 h in sweet cherry fruit after sucrose treatment. However, the *PavSS2*, *PavSS3*, *PavSS4*, *PavSS5* and *PavSS7* genes in sweet cherry fruit did not differ in expression levels from those of the control after sucrose treatment. The expression of *PavSSI* and *PavSS6* was markedly reduced in the *TRV::PavSSI* and the *PavSS6*-infected fruits compared with those of the *TRV::00*-infected fruits, the *PavSSI*-silenced fruits displayed light red or yellow-white or green-yellow at 21 dpi, the control fruits (*TRV::00*) fruits had a red and dark red epidermis. However, the fruit phenotypes for the *PavSS6*-silenced fruits showed no visible defects compared with the control fruits at 21 dpi. Several ripening-related variables in the *PavSSI*- and *PavSS6*-silenced and control fruits were analyzed. The results showed ABA content, anthocyanin content, and sucrose content of the *TRV::PavSSI*-infected fruit were significantly reduced compared with that of the *TRV::00*-infected fruit at 30 dpi. And in PaMADS7-silenced fruits, fruit firmness and fructose were greater than those of the control fruits. Moreover, the qRT-PCR results showed that the expression of the ripening-related genes, *PavNCED1*, *PavPGI*, *PavXYL1*, *PavPL1*, *PavPAL*, *PavCHS*, *PavANS* and *PavDFR* were strongly suppressed in *PavSSI*-silenced fruits compared with the control fruits. However, compared with the controls, the *PavSS6*-silenced sweet cherry fruits had no significant differences in ABA content, anthocyanin content, soluble sugar (sucrose, glucose, and fructose) contents, fruit firmness, and transcript levels for the ripening-related genes. **【Conclusion】** The *PavSSI* is most likely to play a pivotal role in the regulation of strawberry fruit ripening, and its expression could be inhibited by sucrose.

Key words: Sweet cherry; Sucrose synthase; *PavSSI*; *PavSS6*; Fruit ripening

蔗糖是植物光合作用同化产物输出的主要物质,是植物必需的能量物质,同时也是水果中可溶性糖的主要组成部分,在植物胚胎发生、种子萌发和幼苗早期生长、营养生长和生殖生长过程中起着重要作用^[1-2]。蔗糖代谢是果实糖积累过程中重要的代谢途径,直接影响果实甜度,并决定果实风味和品质。蔗糖合酶(sucrose synthase, SS)为蔗糖代谢的关键酶,能够可逆地合成和分解蔗糖,使蔗糖参与到组织构建、物质贮藏和植物细胞新陈代谢等过程中^[3-6],其反应为:蔗糖+尿苷二磷酸(UDP) \leftrightarrow 果糖+尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-G)。目前已在柑橘、草莓、桃、梨、葡萄等树种中鉴定出SS基因,如柑橘鉴定出6个SS基因^[7],草莓鉴定出8个SS基因^[8],桃鉴定出6个SS基因^[9]、葡萄鉴定出5个SS基因^[10],梨鉴定出17个SS基因^[11]。而且柑橘的SS是糖分积累的关键酶,6个*CitSus*基因中,仅*CitSus1*和*CitSus2*在果肉中高表达^[7]。草莓*FaSS1*可调控果实成熟,且*FaSS1*的表达受脱落酸和蔗糖抑制^[8]。在草莓和番茄中,外源蔗糖可作为ABA信号通路的上游信号分子,在番茄和草莓果实的发育和成熟过程中起着重要作用^[12-13]。上述研究暗示蔗糖/蔗糖合酶基因(SS)在果实发育与成熟过程中扮演着极其重要的角色^[8,14]。

欧洲甜樱桃(*Prunus avium* L.)是目前北方落叶果树中栽培效益最好的树种之一,也是我国北方春季上市最早的鲜果,目前已广泛栽植在我国渤海湾沿岸和陇海铁路沿线等区域^[15]。其色泽鲜艳、味道鲜美、营养丰富,且富含多种碳水化合物、蛋白质、维生素、铁、钙、钾等人体必需的营养元素和矿物质等,深受人们喜爱^[16]。开展甜樱桃蔗糖合酶基因的功能鉴定,探明蔗糖合酶基因在甜樱桃果实发育和成熟过程中的作用机制,对于调控蔗糖合成能力及果实发育与成熟具有重要的指导意义,同时为进一步研究甜樱桃果实蔗糖积累、果实品质形成和果实成熟软化的分子机制奠定理论基础。

然而,关于*PavSS*基因在甜樱桃果实发育和成熟过程中的分子机制尚不清楚,且*PavSS*基因在甜樱桃基因组中存在多个家族成员,可能行使不同功能,哪一个(或几个)*PavSS*基因在甜樱桃果实成熟软化过程中起重要作用等问题目前尚未报道。因此,为明确甜樱桃*PavSS*基因家族在果实成熟软化过程中的功能,笔者从甜樱桃基因组数据库中分离了*PavSS*家族基因,研究了它们在甜樱桃果实发育

过程中的表达特性,并分析了外施蔗糖后*PavSS*基因表达量的变化,进一步利用病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术分析了2个*PavSS*基因(*PavSS1*和*PavSS6*)在果实成熟软化过程中的功能,为进一步研究*PavSS*基因在甜樱桃果实成熟软化的分子机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料:欧洲甜樱桃栽培品种‘布鲁克斯’取自中国农业科学院郑州果树研究所樱桃种质资源圃,砧木为‘ZY-1’,树龄8 a(年),树体生长正常。

菌株和TRV病毒载体:VIGS载体烟草脆裂病毒载体(tobacco rattle virus, TRV)pTRV1与pTRV2由清华大学刘玉乐教授惠赠,根癌农杆菌菌株GV3101由本实验室保存。

蔗糖处理:甜樱桃盛花期35 d后,进行外施蔗糖处理(每个果实注射50 mmol·L⁻¹蔗糖1 mL,以注射50 mmol·L⁻¹山梨醇1 mL作为渗透势对照,阴性对照)。

1.2 *PavSS*蛋白的系统进化树分析

基于已经从拟南芥、番茄、桃、葡萄、草莓和柑橘基因组数据库鉴定出的SS家族基因,基因的序列号如下:拟南芥 [*AtSus1* (At5g20830)、*AtSus2* (At5g49190)、*AtSus3* (At4g02280)、*AtSus4* (At3g43190)、*AtSus5* (At5g37180)、*AtSus6* (At1g73370)]、番茄 [*SISS1*(NM_001247726.2)、*SISS3*(NM_001247875.2)、*SISS4* (HM180943.1)、*SISS5* (XM_004243632.4)、*SISS6*(XM_004235340.4)、*SISS7*(XM_004232624.4)]、桃 [*PpSus1* (JQ412752.1)、*PpSus2* (KJ493331.1)、*PpSus3* (KJ493332.1)、*PpSus4* (KJ493333.1)、*PpSus5* (KJ493334.1)、*PpSus6* (KJ493335.1)]、葡萄 [*VvSS1* (XM_010650590.2)、*VvSS2* (XM_002271494.4)、*VvSS3*(XM_002271860.3)、*VvSS4*(XM_010657782.2)、*VvSS5* (XM_019226319.1)]、草莓 [*FaSS1* (XM_011462748.1)、*FaSS2* (XM_011464439.1)、*FaSS3* (XM_004290765.2)、*FaSS4* (XM_004287496.2)、*FaSS5*(XM_004289518.2)、*FaSS6*(XM_004299431.2)、*FaSS7* (XM_004301177.2)]、柑橘 [*CitSus1* (XM_025097291.1)、*CitSus2* (XM_006474620.3)、*CitSus3* (XM_006479940.3)、*CitSus4* (XM_015530185.2)、*CitSus5* (XM_006481888.3)、*CitSus6* (XM_0064889-

70.3)],利用软件MEGA 5.01中的邻接法(Neighbor-joining)绘制甜樱桃及其他物种的SS家族氨基酸序列的系统进化树,Bootstrap值设置为1000。

1.3 实时荧光定量PCR(qPCR)分析甜樱桃果实发育过程中 *PavSS1-6* 基因的表达

分别收集栽培品种‘布鲁克斯’的果实不同发育期的样品,提取总RNA,并反转录成cDNA,设计特异性引物(表1),进行3次独立的荧光定量PCR,分析甜樱桃 *PavSS1-6* 基因的差异表达模式。qPCR反应在ABI7500 PCR热循环仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, United States)上进行,使用TransStart Top Green qPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司,北京,中国)试剂盒进行反应,以甜樱桃的 *Histone2*(*Pav_sc0000671.1*)基因为内参进行分析,并进行3次生物学重复,取平均值。

1.4 VIGS-*PavSS1*、VIGS-*PavSS6* 重组载体的构建及农杆菌转化

pTRV2-*PavSS1* 和 pTRV2-*PavSS6* 重组载体构建采用 In-Fusion Cloning 技术。以甜樱桃果实的总RNA为模板,分别设计带有16个重叠区域(与经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 线性化的 pTRV2 片段互为反向互补的接头)的 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因特异性引物对 *PavSS1*-RNAi-F/R 和 *PavSS6*-RNAi-F/R(表1),扩增靶标基因片段。然后利用 In-FusionTM HD Cloning kit (Clontech, Mount-ain View, CA, United States)分别将 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因的靶标片段连接到经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切线性化的 pTRV2 载体上,构建成重组载体,分别命名为 pTRV2-*PavSS1* 和 pTRV2-*PavSS6*,并转入大肠杆菌 DH5 α 感受态中,挑取阳性菌株,经 PCR 鉴定,双酶切鉴定和测序正确后,分别将 pTRV2-*PavSS1* 和 pTRV2-*PavSS6* 载体转入农杆菌菌种 GV3101 中,-80 °C 保存备用。

1.5 VIGS 技术瞬时转化甜樱桃果实

甜樱桃果实的 VIGS 技术参照齐希梁等^[17]和 Fu 等^[18]的方法进行,选取花后 25 d 的甜樱桃果实,采用注射压迫法将含有 pTRV2、pTRV2-*PavSS1* 或 pTRV2-*PavSS6* 与 pTRV1 的混合菌液从果实柄处注射,看到果实表面颜色改变,表示注射液扩散到果实组织,注射后的甜樱桃果实发育阶段的温度和湿度要相对低,温度不宜超过 25 °C,湿度控制在 30%~70%,同时对注射过的果实进行套袋处理,3 d 后去除果袋。每次选择 1 株健壮的植株,每次每种

表 1 本研究所需的引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequences (5'→3')
PavSS1-F	ATGGCGGATCGTGCCCTTGACCCGT
PavSS1-R	TTACTTCTCAAAAATACGCTGCAAGCC
PavSS2-F	ATGGCGGATCGTGCCCTTGACCCGTG
PavSS2-R	TCACTCCTCCTCGGCAAGAGGAAC
PavSS3-F	ATGCTTTATGTGTCCCTCCTCTCTTC
PavSS3-R	CAGATTTCCGTTACTTGAGAATGTA
PavSS4-F	ATGGCGAACCGTCTTAAGCTAACTC
PavSS4-R	TCACTCCTCACTTGCTGGAGGAACAG
PavSS5-F	ATGAAAAAGTGGATTGAGAACACGC
PavSS5-R	CTATAAGTGTGAAGGGGCACTTGCGCA
PavSS6-F	ATGCCTGATGCACTGAGACAGAGCC
PavSS6-R	TTAGTTGTAGTTGTACATAATCCTTATC
PavSS7-F	ATGGCTTCAGGAGCAGCCATCAAACG
PavSS7-R	CTAGCTAGTAAATATATGTACTCCTG
PavSS1-RNAi-F	AGTAAGTTACCGAATTCACGGCCTGGT-GTTGGGAGTA
PavSS1-RNAi-R	GAGCTCGGTACCGGTACCGAAATAGCCGT-GGGGAGAAAGGAT
PavSS6-RNAi-F	AGTAAGTTACCGAATTCAAATGCAAGACA-GATGGGGACTAT
PavSS6-RNAi-R	GAGCTCGGTACCGGTACCGCTGCTGCT-GTTTCTGCTTCC
Histone2-F	GGTGTGCTTCCGCAGATAA
Histone2-R	TCCTCCTGGGTGGTGAAT
PavSS1-q-F	ACGGCCTGGTGTTTGGGAGTA
PavSS1-q-R	GAAATAGCCGTGGGGAGAAAGGAT
PavSS2-q-F	ACAAGGCAAGCCTGATCTCATC
PavSS2-q-R	GCTCATGTCTGCTCCTGGTGA
PavSS3-q-F	TGATGTGTGGCCGTTACTTGAG
PavSS3-q-R	GAGCCATGTAGAGCAGTAAGT
PavSS4-q-F	GTCCAACCCGGTCTTCATCCAT
PavSS4-q-R	TGCCCGCCAGTGCAGGTAG
PavSS5-q-F	GTCATTGTGTCTCCACATGGCT
PavSS5-q-R	CATGAGCAATATTGCACTGTGT
PavSS6-q-F	GCAAGACAGATGGGGACTAT
PavSS6-q-R	GCTGCTGCTGTTTCTGCTTCTC
PavSS7-q-F	CAACTGGGGGTCAACAAAAAG
PavSS7-q-R	CAGAGTCCGCCAACAGTAAGGT
PaNCED1-F	CATGTCCGAGGACGACTTGCCGT
PaNCED1-R	GCGCCGTCTGGAGAGACGTGGA
PaPG1-F	ATCACCTCCGCATTGCTG
PaPG1-R	TCACCTTAATGTTGTTGGAG
PaXYL1-F	ACAACCTGGAACGGTGTGCGAT
PaXYL1-R	TCCTGGTGTAAATGTTGCTCG
PaPL-1-F	GATGGTCGCTTCTATGTTGTCA
PaPL-1-R	TGAGATGGAGAGCTCCTCACC
PaPAL-F	GCCTCACCAGGCAACAAGAGCA
PaPAL-R	TCTGGCCATCTGGTCCAACAGC
PaCHS-F	GTATGTGCGAGTACATGGCA
PaCHS-R	GCTTAGTGAGCTGATAGTC
PaDFR-F	CTGCACCGGAGTGTCCATGT
PaDFR-R	CTGGTGCTCTTCGACGTTTAC
PaANS-F	ATCTCCGATGAGCTCATGG
PaANS-R	CTCAATGTAATCAGCAGGTG

混合菌液注射 60 个果实以上,并进行 3 次独立的生物学重复。

1.6 半定量 RT-PCR 检测

提取甜樱桃果实样品的总 RNA,并反转录成 cDNA,以甜樱桃的 *Histone2* (Pav_sc0000671.1) 基因为内参,对不同样品的 cDNA 含量进行调节,然后分别利用 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因特异性引物对 *PavSS1*-J-F/R 和 *PavSS6*-J-F/R (表 1) 检测沉默后相关 *PavSS1* 或 *PavSS6* 基因的表达水平。

1.7 TRV 侵染的甜樱桃果实的果实硬度及花青素、可溶性糖和 ABA 含量的测定

果实硬度采用 GY-4 型硬度计测定,单位为 $\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。每次随机选取 5 个果实(不削果皮),每个果实不同部位选 2 个点测定,P/2 柱状探头(直径 1 mm),测前速度为 $0.5 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$,测定速度为 $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$,测后速度为 $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$,穿刺深度为 10 mm,设 3 次重复,取平均值。可溶性固形物含量(% , w)采用手持式糖度仪(PAL-1,爱拓,日本)测定,设 3 次重复,取平均值。

花青素的测定参考 Cheng 等^[19]的方法,用 1% 预冷的盐酸-乙醇溶液在冰上萃取果皮,随后 10 000 g 离心 30 min, 4 °C。利用差异 pH 测定法测定上清液中总花青素含量。结果用每 1 g 鲜质量果实中矢车菊素-3-葡萄糖苷当量表示。

ABA 含量的测定采用高效液相色谱法。准确称取在液氮中研磨成粉末的果肉样品 1 g,加入 80% (φ , 后同) 甲醇溶液 5 mL,静止 10 min, 10 000 g 离心 20 min,上清液过活化后(15 mL 100% 甲醇和 15 mL 0.4% 乙酸预处理过)的 C18 Sep-Pak 固相净化柱(Waters Ltd, Mississauga, ON, Canada),用 15 mL 10% 甲醇-0.4% 乙酸从 Sep-Pak C18 柱上洗脱下 ABA。过 0.22 μm 膜过滤后,用 HPLC(岛津)进行 ABA 含量的测定。测定条件为:柱温:35 °C,流动相为 A(甲醇):B(水,含 1% 乙酸)=4:6;流速:1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。ABA 约在 22 min 出现峰值。

可溶性糖(蔗糖、葡萄糖和果糖)含量的测定参考 Jia 等^[20]的方法,并有所改动。称取 0.5 g 在液氮中充分研磨的樱桃果实粉末,加入 80% 乙醇的溶液 10 mL, 80 °C 水浴浸提 20 min, 10 000 g 离心 10 min,上清液收集到 25 mL 的容量瓶中,剩余沉淀重复上述步骤 1 次。取提取液 2 mL 于 10 000 g 离心 10 min,上清液过 0.45 μm HPLC 尼龙网(MEMBRANA, Germa-

ny)。然后采用高效液相色谱法(HPLC)测定葡萄糖、果糖和蔗糖含量。糖检测条件:色谱柱:6.5 mm \times 300 mm Sugar-Pak TM-1 column(Waters);柱温:60 °C;检测温度:50 °C;流动相:超纯水;流速:0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样体积:20 μL 。

甜樱桃果实中的花青素、ABA 和可溶性糖(蔗糖、葡萄糖和果糖)含量测定,进行 6 次生物学重复,每次生物学重复进行 3 次重复,取平均值。

1.8 数据处理

使用 Microsoft Excel 2010 软件对所获数据处理并绘图;使用 SPSS 17.0 软件进行相关性分析和差异显著性($p < 0.05$)分析。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃 *PavSS* 家族基因的克隆、系统进化树分析和表达模式分析

为了获得甜樱桃果实的 *PavSS* 家族基因成员,分别以拟南芥的 7 个 *SS* 基因(AT1G05560、AT1G73370、AT3G43190、AT4G02280、AT5G20830、AT5G37180 和 AT5G49190)的氨基酸序列为 Query 序列,在甜樱桃基因组数据库(<http://cherry.kazusa.or.jp/map.html>)中进行 BLASP 寻找,获得 7 个 *PavSS* 基因家族成员,分别命名为 *PavSS1* (Pav_sc0000129.1_g1710)、*PavSS2* (Pav_co4071539.1_g010)、*PavSS3* (Pav_sc0000174.1_g950)、*PavSS4* (Pav_sc0000130.1_g850)、*PavSS5* (Pav_sc0000174.1_g960)、*PavSS6* (Pav_sc0000103.1_g1530) 和 *PavSS7* (Pav_sc0001124.1_g380)。

为了确定甜樱桃的 *PavSS* 家族基因成员与其他物种的 *SS* 家族成员的进化关系,构建了系统进化树。结果显示,甜樱桃 7 个 *PavSS* 蛋白被聚类到 3 个亚家族中,其中 *PavSS1* 和 *PavSS2* 属于一个亚家族,且 *PavSS1* 和 *PavSS2* 同源性极高,相似度达 100%; *PavSS3*、*PavSS4* 和 *PavSS5* 属于另外一个亚家族,且 *PavSS3* 和 *PavSS5* 同源性也极高,相似度达 100%; *PavSS6* 和 *PavSS7* 属于第三个亚家族,二者在进化树上位于不同分枝上(图 1)。与其他物种的进化树比较发现, *PavSS1*/*PavSS2* 与 *PpSus1*、*FaSS1*、*CitSus1* 和 *CitSus2* 紧密关联,同源度极高。 *PavSS3*/*PavSS5* 与 *PpSus2*、*PpSus4* 和 *FaSS2* 同源度高, *PavSS4* 与 *PpSus3* 和 *FaSS3* 相似度极高, *PavSS6* 与 *PpSus6*、*FaSS6* 和 *FaSS7* 相似度极高, *PavSS7* 与

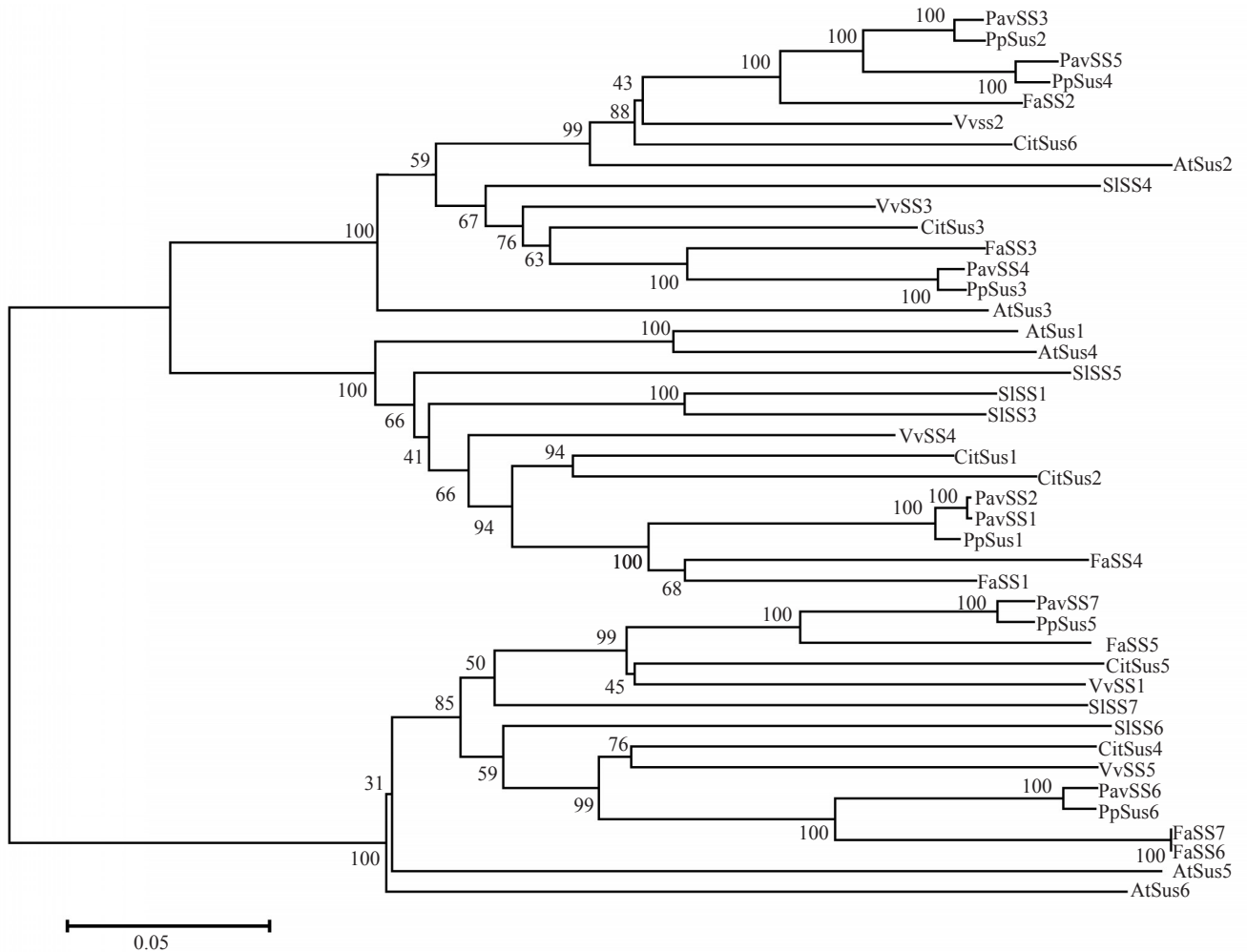


图1 甜樱桃 *PavSS* 与其他植物的 *SS* 家族氨基酸的系统进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the *Prunus avium* *PavSS* proteins and *SS* orthologs in other plant species

PpSus5 和 *FaSS5* 相似度极高(图1)。

利用实时荧光定量(qRT-PCR)分析甜樱桃果实发育与成熟过程中 *PavSSI-7* 基因的表达特征。结果显示, *PavSSI* 基因在甜樱桃整个果实发育和成熟过程中均高表达,从花后7 d开始,表达量逐渐升高,花后21 d表达量有个峰值,随后在果实发育后期和成熟过程中表达量逐渐降低(图2-A)。*PavSS2* 基因表达模式与 *PavSSI* 基因基本类似,表现为前期逐渐升高,后期逐渐降低,但在甜樱桃果实成熟和发育过程中表达量均较低,是 *PavSSI* 基因表达的1/10(图2-B)。*PavSS3* 和 *PavSS5* 基因在甜樱桃果实发育和成熟过程中均表达,但表达量均较低,且在整个果实发育和成熟过程中表达量差异不显著(图2-C,E)。*PavSS4* 基因在果实发育初期表达量较高(0~14 d),在花后14 d表达量最高,在果实发育后期和成熟过程中,表达量都较低,在花后42 d表达量最低(图2-D)。*PavSS6* 基因在果实发育初期表达量较低(0~35 d),

在果实发育后期表达量逐渐升高,花后49 d表达量最高(图2-F)。*PavSS7* 基因在整个果实发育过程中均表达,但表达量均较低,在花后7 d和花后28 d出现两个峰值,果实成熟过程中,表达量较低(图2-G)。综上, *PavSSI*、*PavSS2* 和 *PavSS6* 基因的表达模式与甜樱桃果实的成熟过程较吻合,可能在果实成熟中起重要作用。

2.2 外施蔗糖对甜樱桃 *PavSS* 基因表达模式的影响

前期研究证实外源蔗糖可作为一个信号分子,促进番茄和草莓果实成熟^[12-13]。为了进一步确定哪一个(或几个)*PavSS* 基因影响甜樱桃果实成熟软化,通过外施蔗糖调控甜樱桃果实 *PavSS* 基因的表达进而影响果实的成熟软化。结果显示,与山梨醇处理(阴性对照)的甜樱桃果实相比,蔗糖处理6 h后,甜樱桃果实中 *PavSSI* 的表达上调,是阴性对照的1.4倍;随后蔗糖处理12 h、24 h和48 h后,甜樱桃

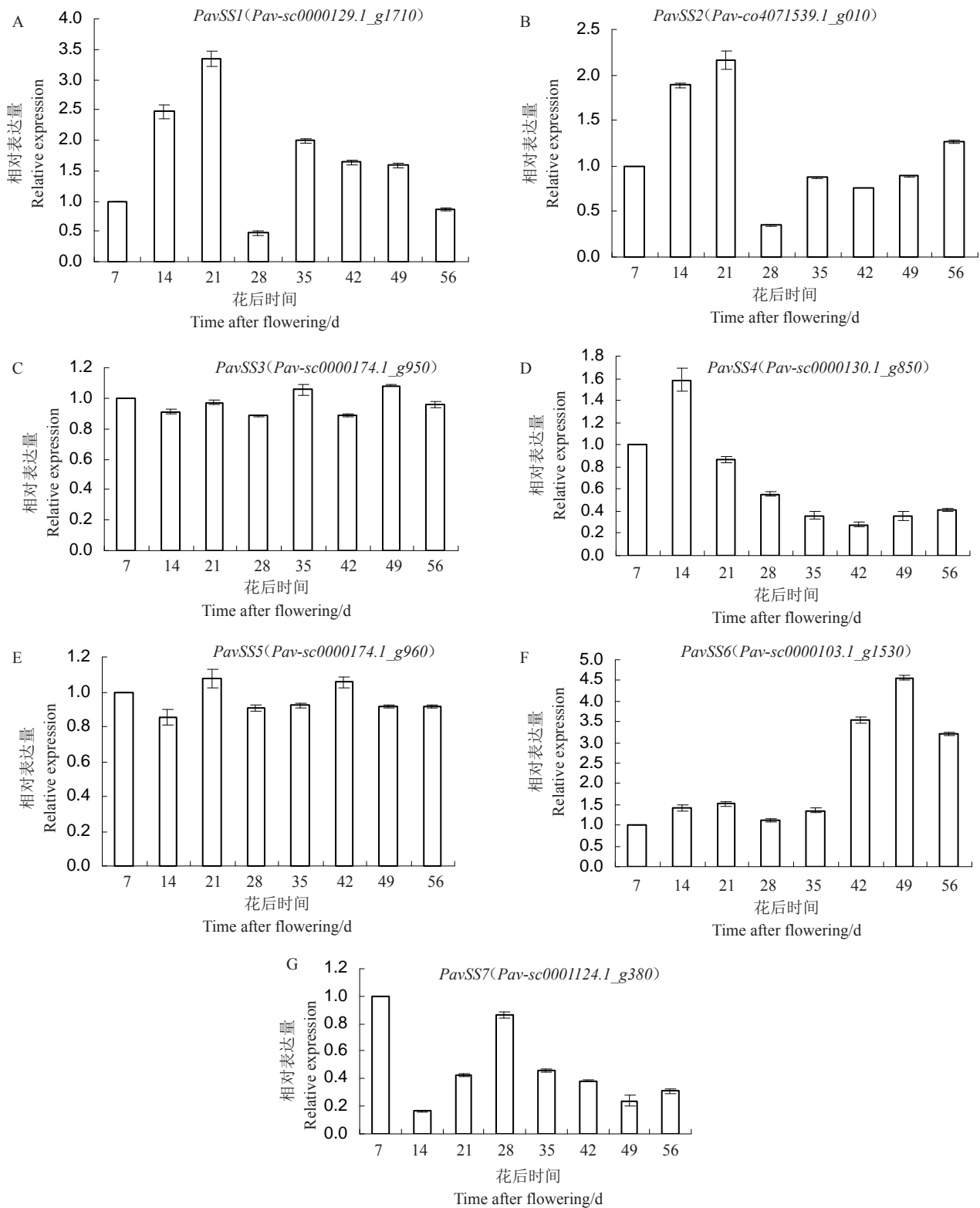


图 2 *PavSS1-7* 基因在果实发育中的表达模式

Fig. 2 Expression profile of *PavSS1-7* during fruit growth and development of sweet cherry

果实中 *PavSS1* 的表达下调,是阴性对照的 70%~80%(图 3)。类似地,蔗糖处理的甜樱桃果实中 *PavSS6* 基因的表达与阴性对照相比,表达趋势也是先上调后下调。而蔗糖处理的甜樱桃果实中

PavSS2、*PavSS3*、*PavSS4*、*PavSS5* 和 *PavSS7* 基因的表达与阴性对照相比,均无变化(图 3)。上述结果表明, *PavSS1*、和 *PavSS6* 基因可能是蔗糖合成过程中的关键基因,或许影响甜樱桃果实成熟。

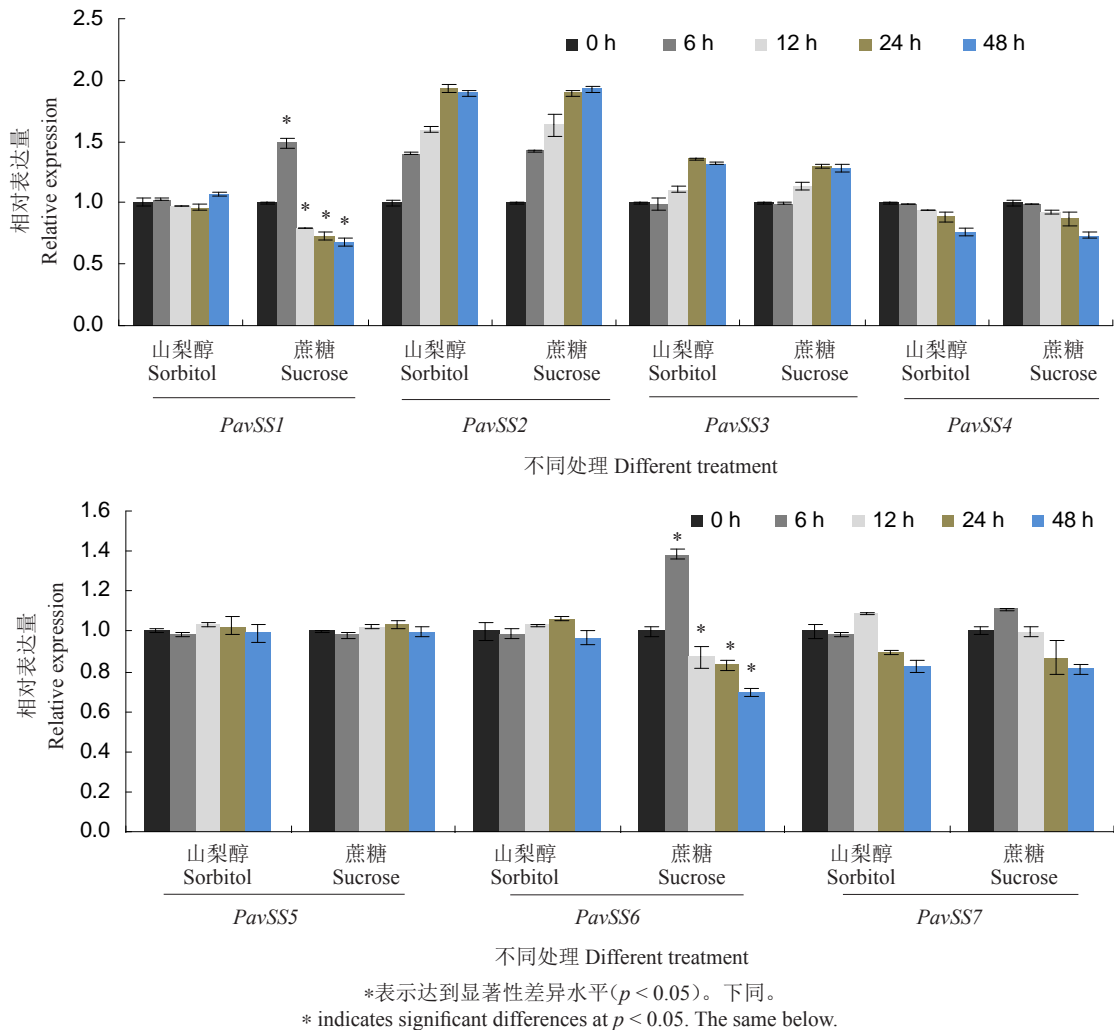


图3 蔗糖对 *PavSS1-7* 家族基因表达的影响
 Fig. 3 Effect of sucrose on the *PavSS1-7* gene expression

2.3 TRV 介导 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因沉默的表型观察

为了确定 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因是否调控甜樱桃果实成熟软化功能,通过病毒诱导基因沉默技术,将含有 *TRV::00*(空白对照)和 *TRV::PavSS1* 和 *TRV::PavSS6* 的农杆菌菌液分别侵染甜樱桃栽培种‘布鲁克斯’。14 d 后提取侵染果实的总 mRNA 进行半定量 PCR 检测。结果发现,与 *TRV::00* 侵染的甜樱桃果实相比,*TRV::PavSS1* 和 *TRV::PavSS6* 侵染甜樱桃果实中 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因的表达量显著降低(图 4-A),基因沉默效率超过 85%,表明 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因分别被有效地沉默。

侵染 21 d,表型观察发现:*TRV::PavSS1* 侵染的甜樱桃果实与对照 *TRV::00* 相比,表皮呈浅红色或者黄白色(黄绿色),*TRV::00* 侵染的果实的表皮颜色呈深红色。而 *TRV::PavSS6* 侵染的甜樱桃果实的表

皮颜色也呈深红色,与对照相比,果实表型没有显著变化(图 4-B)。上述结果表明,沉默 *PavSS1* 基因延迟果实着色和果实成熟,暗示 *PavSS1* 可能调控甜樱桃果实成熟。

2.4 TRV 介导 *PavSS1* 和 *PavSS6* 基因沉默的甜樱桃果实成熟软化的功能分析

为了进一步明确 *PavSS1* 是否调控甜樱桃果实成熟软化,笔者分析了花后 55 d(空载对照侵染的甜樱桃完全成熟),*TRV::PavSS1* 和 *TRV::PavSS6* 侵染的甜樱桃果实成熟软化的特征指标,包括花青素含量、ABA 含量、可溶性糖(果糖、葡萄糖、蔗糖)含量和果实硬度。还评估了与成熟相关的一些基因的表达量变化,包括 ABA 合成与降解的关键基因 *PavNCED1*,影响果实硬度的相关基因 *PavPGI*、*PavXYL1* 和 *PavPL1*,影响花青素合成的相关基因 *PavPAL*、*PavCHS*、*PavANS* 和 *PavDFR*。结果显示,

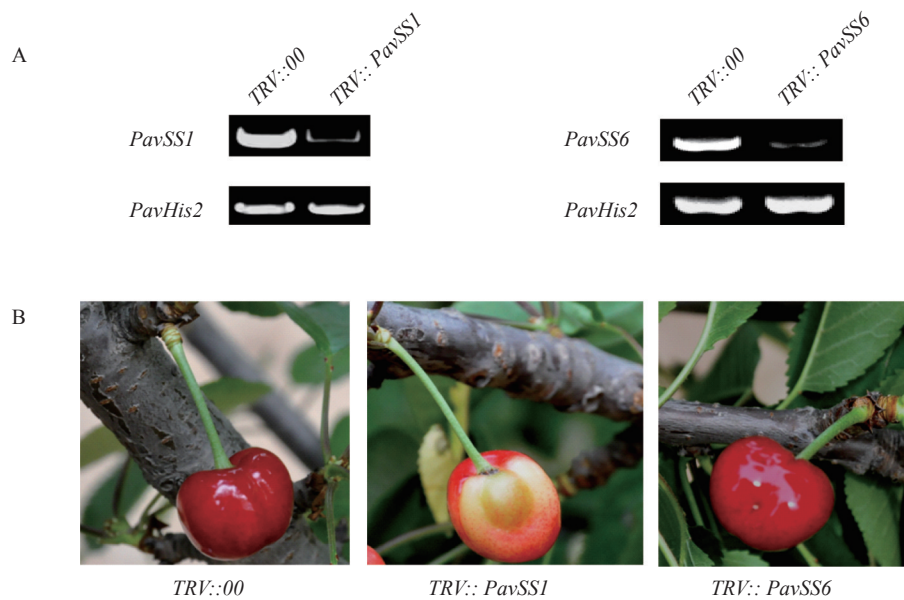


图4 甜樱桃果实 *PavSSI* 和 *PavSS6* 基因相对表达量变化及基因沉默后甜樱桃果实的表型

Fig. 4 Quantify of *PavSSI* and *PavSS6* genes in sweet cherry fruit using semi-quantitative RT-PCR and Phenotype observation of *TRV::00-*, *TRV:: PavSSI-*, and *TRV:: PavSS6-*silenced sweet cherry fruit

与对照 *TRV::00* 相比, *TRV::PavSSI* 侵染的甜樱桃果实中花青素含量与 ABA 含量显著降低(图 5-A~B), 表明 *PavSSI* 基因控制甜樱桃的果皮着色。可溶性糖(果糖、葡萄糖、蔗糖)含量的测定结果表明, 与对照 *TRV::00* 相比, *TRV::PavSSI* 侵染的甜樱桃果实中蔗糖含量显著降低, 相反地, 果糖含量显著提高, 而葡萄糖含量变化不显著(图 5-C), 表明 *PavSSI* 是调控蔗糖合成的关键基因。*TRV::PavSSI* 侵染的甜樱桃果实的果实硬度显著低于空白对照 *TRV::00* 侵染的甜樱桃果实(图 5-D), 表明 *PavSSI* 基因影响甜樱桃果实软化。然而 *TRV::PavSS6* 侵染的甜樱桃果实的花青素含量、ABA 含量、果实硬度以及可溶性糖(果糖、葡萄糖、蔗糖)含量与空白对照 *TRV::00* 侵染的甜樱桃果实相比, 没有显著变化。

与对照 *TRV::00* 相比, *TRV::PavSSI* 侵染的甜樱桃果实中成熟相关的基因 *PavNCED1*、*PavPGI*、*PavXYL1*、*PavPL1*、*PavPAL*、*PavCHS*、*PavANS* 和 *PavDFR* 的表达显著下调, 而 *TRV::PavSS6* 侵染的甜樱桃果实中成熟相关的基因表达没有显著变化(图 5-E)。上述研究结果表明, 甜樱桃 *PavSSI* 调控果实着色和成熟软化。

3 讨 论

甜樱桃果实发育过程中, 可溶性糖含量随果实的生长发育不断增加, 尤其在果实成熟期间增加幅

度更大, 暗示糖积累在果实发育和品质形成过程中起着重要的作用^[13]。笔者分析了蔗糖代谢过程中蔗糖合成的关键酶——蔗糖合成酶(SS)在甜樱桃果实发育与成熟过程中的分子功能。研究结果表明, *PavSSI* 与 *PavSS2* 基因在甜樱桃果实膨大与成熟过程中一直稳定且持续表达, *PavSSI* 基因的表达量是 *PavSS2* 基因的 10 倍以上; *PavSS6* 基因在果实发育后期与成熟过程中高表达, 与甜樱桃果实成熟有较好的关联。而且外源蔗糖可抑制 *PavSSI* 和 *PavSS6* 基因表达, 进一步通过 VIGS 技术沉默甜樱桃果实 *PavSSI* 和 *PavSS6* 基因表达, 仅沉默 *PavSSI* 基因抑制了果实成熟, 包括果实硬度、ABA 含量、花色苷含量和可溶性糖含量发生显著变化以及成熟相关基因的表达量显著下调。由此笔者确定 *PavSSI* 基因是甜樱桃果实蔗糖合酶的关键基因, 调控甜樱桃果实成熟。在草莓和番茄等园艺作物的研究中确定外源蔗糖可通过调控果实中 ABA 信号途径促进果实成熟, 而且明确了多个蔗糖代谢过程中的关键基因影响果实成熟, 如草莓的 *FaSSI*^[8]、*FaSUT1*^[12]、*FaCHLH/ABAR*^[20]和 *FaASR*^[13]基因, 番茄的 *SIVIF*^[21]和 *SIASR1*^[13]等基因。外施蔗糖下调了草莓蔗糖代谢过程中 *FaSSI* 和 *FaSUT1* 基因的表达^[8, 12], 笔者发现外施蔗糖后, 甜樱桃果实中 *PavSSI* 和 *PavSS6* 基因的表达先上调, 然后显著下调, 这可能与蔗糖合酶的双功能酶(合成和分解蔗糖)的属性有关, 外施蔗

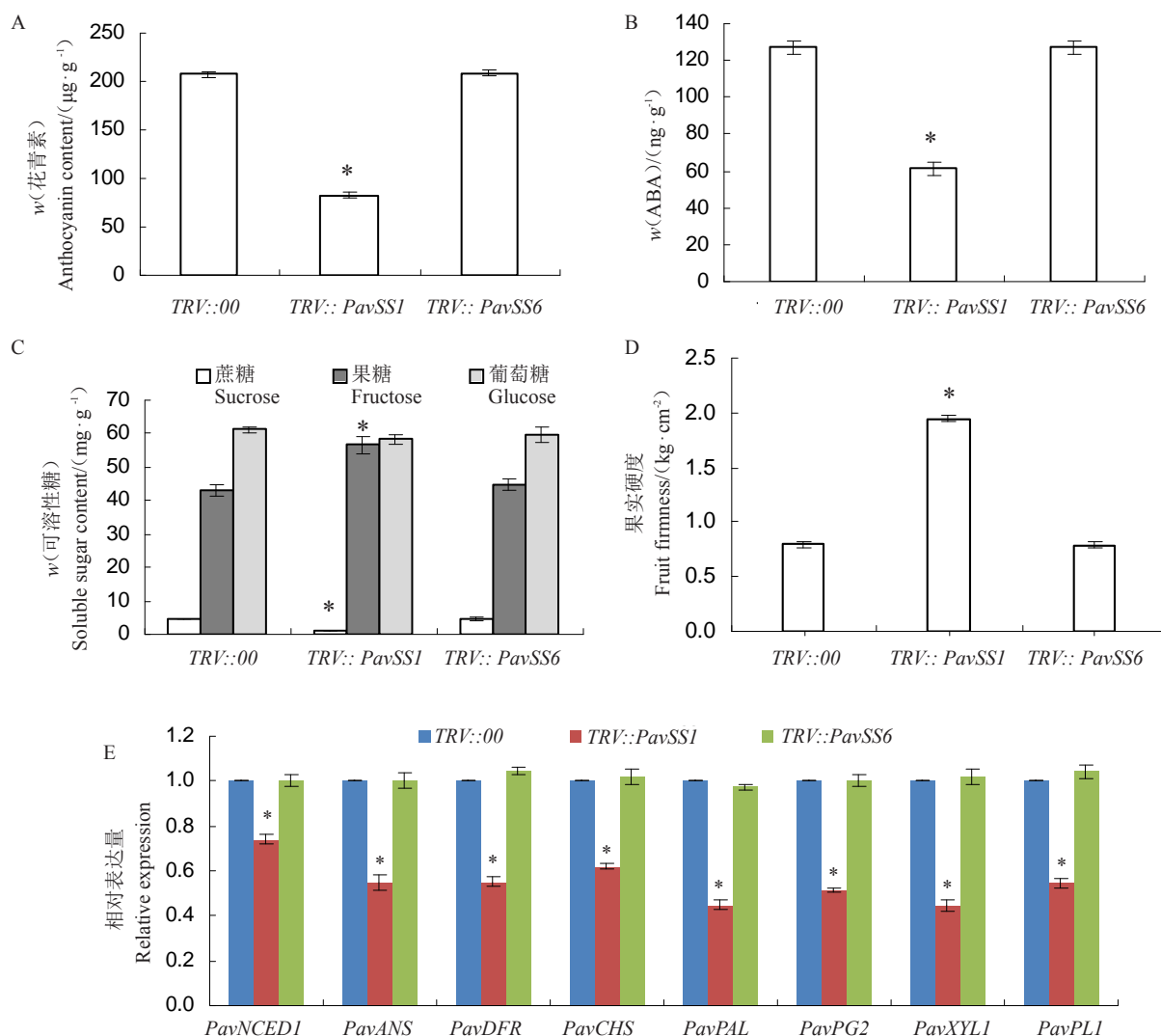


图5 *PavSS1* 和 *PavSS6* 沉默的甜樱桃果实中花青素含量 (A)、ABA 含量 (B)、可溶性糖含量 (C)、果实硬度 (D) 以及成熟相关基因的表达量 (E) 的变化

Fig. 5 Effect of silencing of *PavSS1* and *PavSS6* in sweet cherry fruits on anthocyanin content (A), ABA content (B), soluble sugar content (C), fruit firmness (D) and expression of the ripening-related genes (E) compared with levels in control fruit

糖可能先激活了蔗糖合酶的分解功能,表现为上调表达,随后表现出蔗糖合酶的合成功能,基因下调表达。

植物激素与糖的积累在果实成熟过程中起决定性的作用,且在果实成熟过程中,果实中 ABA 和蔗糖含量逐渐升高^[20, 22-23]。笔者研究发现 *PavSS1* 基因在甜樱桃转色期(花后 30 d)表达急剧下调,随后表达量上调,并维持在较高的表达水平。*PavSS1* 基因急剧下调暗示了 *PavSS1* 基因在果实发育中的重要作用,笔者推测其急剧下调可能与甜樱桃果实中 ABA 和蔗糖含量急速升高有关,因为 *PavSS1* 基因的表达受蔗糖和 ABA 的抑制,同时在沉默 *PavSS1* 基因的甜樱桃果实中,ABA 和蔗糖含量降低,导致了延迟甜樱桃果实成

熟,表明蔗糖或许是调控甜樱桃果实成熟的信号分子。类似地,草莓中 *FaSS1* 基因表达量在果实转白期间也急剧下降,或许与果实中 ABA 和蔗糖含量升高有关。进一步研究确定蔗糖可充当一种信号分子,诱导果实成熟和 ABA 积累,位于 ABA 信号通路的上游,但是蔗糖信号途径仅是辅助 ABA 信号途径调控果实成熟^[12-13, 20]。

4 结论

探明了甜樱桃 *PavSS1* 基因是果实蔗糖合成酶关键基因,其在甜樱桃果实着色和果实成熟软化过程中起极其重要的作用,为研究甜樱桃果实成熟软化的分子机制奠定理论基础。

参考文献 References:

- [1] WIND J, SMEEKENS S, HANSON J. Sucrose: metabolite and signaling molecule[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(14/15): 1610-1614.
- [2] JIANG Y, GUO W, ZHU H, RUAN Y L, ZHANG T. Overexpression of GhSusA1 increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(3): 301-312.
- [3] KOCH K E, WU Y, XU J. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47: 1179-1185.
- [4] RUAN Y L, CHOUREY P S, DELMER D P, PEREZ-GRAU L. The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed [J]. *Plant Physiology*, 1997, 115(2): 375-385.
- [5] HOU J, JIANG Q, HAO C, WANG Y, ZHANG H, ZHANG X. Global selection on sucrose synthase haplotypes during a century of wheat breeding[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164: 1918-1929.
- [6] LI J, BAROJA-FERNÁNDEZ E, BAHAJI A, MUÑOZ F J, OVECKA M, MONTERO M, SESMA M T, ALONSO-CASAJÚS N, ALMAGRO G, SÁNCHEZ-LÓPEZ A M, HIDALGO M, ZAMARBIDE M, POZUETA-ROMERO J. Enhancing sucrose synthase activity results in increased levels of starch and ADP-glucose in maize (*Zea mays* L.) seed endosperms[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54(2): 282-294.
- [7] ISLAM M Z, HU X M, JIN L F, LIU Y Z, PENG S A. Genome-wide identification and expression profile analysis of citrus sucrose synthase genes: investigation of possible roles in the regulation of sugar accumulation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113623.
- [8] ZHAO C, HUA L, LIU X, LI Y, SHEN Y, GUO J. Sucrose synthase FaSS1 plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening[J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, 81(1): 175-181.
- [9] ZHANG C, YU M, MA R, SHEN Z, ZHANG B, KORIR N K. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(4): 81.
- [10] ZHU X, WANG M, LI X, JIU S, WANG C, FANG J. Genome-wide analysis of the sucrose synthase gene family in grape (*Vitis vinifera*): Structure, evolution, and expression profiles[J]. *Genes*, 2017, 8(4): 111.
- [11] 吕佳红, 王英珍, 程瑞, 王国明, 张绍铃, 吴俊, 张虎平. 梨蔗糖合成相关酶 SUS 和 SPS 基因家族的鉴定与表达分析[J]. *园艺学报*, 2018, 45(3): 421-435.
- LÜ Jiahong, WANG Yingzhen, CHENG Rui, WANG Guoming, ZHANG Shaoling, WU Jun, ZHANG Huping. Genome-wide identification and expression analysis of sucrose synthase (SUS) and sucrose phosphate synthase (SPS) gene families in pear[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(3): 421-435.
- [12] JIA H, WANG Y, SUN M, LI B, HAN Y, ZHAO Y, LI X, DING N, LI C, JI W, JIA W. Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening[J]. *New Phytologist*, 2013, 198(2): 453-465.
- [13] JIA H, JIU S, ZHANG C, WANG C, TARIQ P, LIU Z, WANG B, CUI L, FANG J. Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(10): 2045-2065.
- [14] TIAN L, JIA H, LI C, FAN P, XING Y, SHEN Y. Sucrose accumulation during grape berry and strawberry fruit ripening is controlled predominantly by sucrose synthase activity[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2012, 87: 661-667.
- [15] LI B, XIE Z, ZHANG A, XU W, ZHANG C, LIU Q, LIU C, WANG S. Tree growth characteristics and flower bud differentiation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) under different climate conditions in China[J]. *Horticultural Science*, 2010, 37(1): 6-13.
- [16] PRINZI B, NEGRI A S, ESPEN L, PIAGNANI M C. Proteomic comparison of fruit ripening between 'Hedelfinger' sweet cherry (*Prunus avium* L.) and its somaclonal variant 'HS' [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(20): 4171-4181.
- [17] 齐希梁, 李明, 刘聪利, 宋露露. TRV 介导欧洲甜樱桃果实 VIGS 体系的建立[J]. *果树学报*, 2018, 35(11): 1309-1315.
- QI Xiliang, LI Ming, LIU Congli, SONG Lulu. Construction of TRV-mediated virus induced gene silencing (VIGS) system in sweet cherry fruit[J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(11): 1309-1315.
- [18] FU D Q, ZHU B Z, ZHU H L, JIANG W B, LUO Y B. Virus-induced gene silencing in tomato fruit[J]. *The Plant Journal*, 2005, 43(2): 299-308.
- [19] CHENG G W, BREEN P J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (Pal) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1991, 116(5): 865-869.
- [20] JIA H, CHAI Y, LI C, LU D, LUO J, QIN L, SHEN Y. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(1): 188-199.
- [21] QIN G, ZHU Z, WANG W, CAI J, CHEN Y, LI L, TIAN S. A tomato vacuolar invertase inhibitor mediates sucrose metabolism and influences fruit ripening[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(3): 1596-1611.
- [22] CHAI Y, ZHANG Q, TIAN L, LI C, XING Y, QIN L, SHEN Y. Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening[J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, 69: 63-69.
- [23] SUN J, DONG Y, LI C, SHEN Y. Transcription and enzymatic analysis of beta-glucosidase VvBG1 in grape berry ripening[J]. *Plant Growth Regulation*, 2015, 75(1): 67-73.