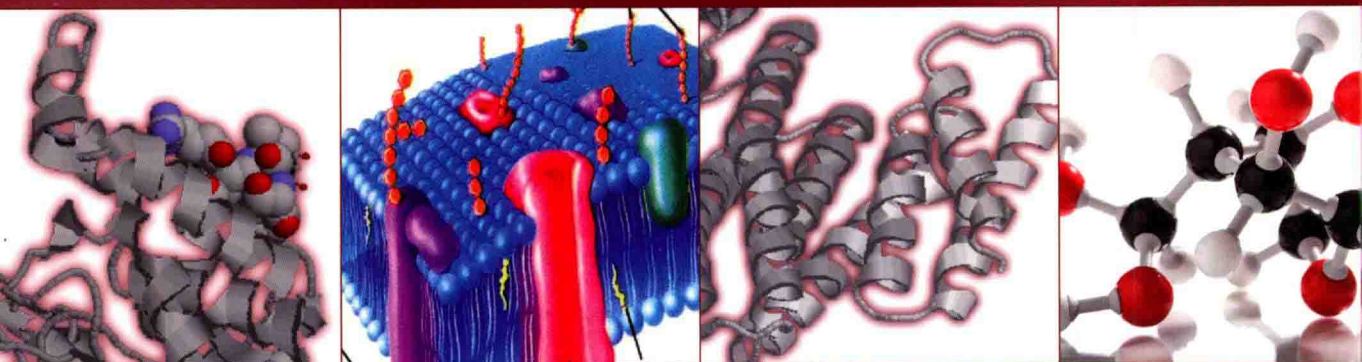


番茄糖代谢调控研究

Regulation of Sucrose Metabolism in

Tomato

崔娜 著



卷外借



科学出版社

番茄糖代谢调控研究

崔娜 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

番茄是世界上最重要的蔬菜作物之一。蔗糖是番茄的光合运转糖，蔗糖代谢直接影响番茄的产量和品质。研究蔗糖的代谢规律及其调控机理，对利用调控手段促进果实糖分积累、改善果实品质具有重要意义。本书主要介绍了番茄果实生长发育过程中蔗糖代谢的时空变化规律、生长素和茉莉酸在番茄糖代谢中的调控作用及内部调控因子 14-3-3 蛋白在糖代谢中的作用，并构建了 14-3-3 基因的过表达和沉默载体，分析遗传转化番茄后对番茄生长发育的初步影响。

本书可供蔬菜学、植物学、植物生理学、生物化学、分子生物学等专业科研工作者、教师和研究生参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

番茄糖代谢调控研究 / 崔娜著. —北京: 科学出版社, 2018.6

ISBN 978-7-03-057920-1

I. ①番… II. ①崔… III. ①番茄-代谢-研究 IV. ①Q945.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 127227 号

责任编辑: 丛楠 张静秋 / 责任校对: 樊雅琼

责任印制: 吴兆东 / 封面设计: 蓝正设计

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018 年 6 月第一次印刷 印张: 11 1/2

字数: 260 000

定价: 79.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

番茄是世界上最重要的蔬菜作物之一。番茄作为一种肉质性果实，是研究果实发育和成熟的理想模式材料。长期以来，植物果实品质的调控一直是研究重点，其中高糖番茄更是品质调控研究的热点。蔗糖是番茄的光合运转糖，蔗糖代谢直接影响番茄的产量和品质。研究蔗糖的代谢规律及其调控机理对利用调控手段促进果实糖分积累、改善果实品质具有重要意义。

本书是作者率领研究团队对番茄糖代谢调控长达 15 年的研究成果总结。全书分为 6 章，第 1 章绪论部分主要介绍了国内外的研究进展，第 2 章介绍了番茄果实发育过程中糖代谢的时空变化规律，第 3 章归纳了生长素在番茄果实糖代谢中的调控作用，第 4 章利用突变体研究了茉莉酸在番茄糖代谢中的调控作用，第 5 章主要介绍了番茄内部调控因子 14-3-3 蛋白对果实糖代谢的调控作用，第 6 章介绍了番茄遗传转化体系的优化，及番茄 14-3-3 基因 *TFT1* 和 *TFT10* 的克隆及遗传转化。

本研究得到了辽宁省公益基金、辽宁省教育厅项目基金、沈阳市科技局项目基金、沈阳农业大学博士后基金、沈阳农业大学青年基金等的大力支持。本研究团队已经在 SCI 期刊和中文核心期刊上发表了与本研究成果相关的论文 47 篇。

参与本研究的有：沈阳农业大学生物科学技术学院范海延和于洋老师，发育生物学和植物学专业的硕士研究生王卫平、郭彩杰、于志海、任婧祺、韩明利、王利、赵晓翠、于广超、王楠、张凯悦、张佳楠、朱伟伟、宋宇、张杨、姚佳羽、张彤彤、商亦聪、庞舒予、仇聪等。值此出版之际，向所引用文献的作者和参加研究工作的同事、研究生一并表示诚挚谢意。

由于研究者水平所限，所取得的成果是有限和初步的，许多方面还有待进行更为系统和深入的研究，不足之处亦必颇多，恳请同行、专家、学者批评指正。

著 者

2017 年 12 月于沈阳

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 研究目的与意义	1
1.2 国内外研究进展	2
1.2.1 植物果实中蔗糖代谢研究进展	2
1.2.2 植物激素对蔗糖代谢调控研究进展	12
1.2.3 植物果实中果糖代谢研究进展	19
第 2 章 番茄糖代谢的时空变化规律	23
2.1 番茄叶片中可溶性糖含量变化规律	23
2.1.1 番茄叶片中糖含量变化规律	23
2.1.2 番茄叶片中糖代谢相关酶活性变化规律	25
2.1.3 番茄叶片中糖含量与相关酶活性的关系	27
2.2 番茄果实中可溶性糖含量变化规律	28
2.2.1 番茄果实糖含量变化规律	28
2.2.2 番茄果实中蔗糖代谢相关酶活性变化规律	30
2.2.3 番茄果实中糖含量与相关酶活性的关系	31
2.3 讨论	32
2.4 本章小结	33
2.4.1 番茄糖含量变化	33
2.4.2 番茄蔗糖代谢相关酶活性变化	34
第 3 章 生长素在番茄果实糖代谢中的调控作用	35
3.1 外源生长素类物质对番茄果实糖含量的影响	35
3.1.1 对不同类型番茄果实糖积累的影响	35
3.1.2 对普通栽培型番茄果实各部位糖积累的影响	39
3.1.3 对普通栽培型番茄果实各部位淀粉含量的影响	45
3.2 外源生长素类物质对番茄果实蔗糖代谢相关酶活性的影响	48
3.2.1 对不同类型番茄果实蔗糖代谢相关酶活性的影响	48
3.2.2 对番茄果实各部位蔗糖代谢相关酶活性的影响	51
3.2.3 可溶性糖及淀粉含量与蔗糖代谢相关酶活性的相关关系	57
3.3 外源生长素类物质对番茄果实蔗糖代谢相关酶基因表达的影响	59
3.3.1 对不同类型番茄果实蔗糖代谢相关酶基因表达的影响	59
3.3.2 对普通栽培型番茄果实内不同部位蔗糖代谢相关酶基因表达的影响	61
3.4 外源生长素类物质对番茄果实果糖激酶的影响	63
3.4.1 对番茄果实果糖代谢中果糖激酶活性的影响	63
3.4.2 番茄果实中可溶性糖及淀粉含量与果糖激酶活性的相关关系	64
3.4.3 花期施用外源生长素类物质对番茄果糖激酶基因表达的影响	65

3.5	讨论	68
3.5.1	外源生长素类物质对不同类型番茄果实糖积累的影响	68
3.5.2	外源生长素类物质对普通栽培型番茄果实不同部位糖含量的影响	69
3.5.3	外源生长素类物质对不同类型番茄果实蔗糖代谢相关酶的影响	71
3.5.4	外源生长素类物质对普通栽培型番茄果实不同部位蔗糖代谢相关酶的影响	72
3.5.5	外源生长素类物质对番茄酸性转化酶基因表达的影响	73
3.5.6	外源生长素类物质对番茄果实蔗糖合成酶基因表达的影响	75
3.5.7	外源生长素类物质对番茄果实果糖激酶活性的影响	76
3.6	本章小结	76
3.6.1	不同类型番茄果实蔗糖代谢的差别	77
3.6.2	外源生长素类物质对不同类型番茄果实蔗糖代谢的影响	77
3.6.3	外源生长素类物质对普通栽培型番茄果实不同部位蔗糖代谢的影响	77
3.6.4	外源生长素类物质对番茄果实果糖代谢的调控	78
第4章	茉莉酸在番茄糖代谢中的调控作用	79
4.1	茉莉酸对番茄叶片蔗糖代谢的影响	79
4.1.1	茉莉酸对番茄叶片糖含量的影响	79
4.1.2	茉莉酸对番茄叶片蔗糖代谢相关酶活性的影响	81
4.1.3	茉莉酸对番茄叶片蔗糖代谢相关酶基因表达的影响	82
4.2	茉莉酸对番茄果实蔗糖代谢的影响	84
4.2.1	茉莉酸对番茄果实糖含量的影响	85
4.2.2	茉莉酸对番茄果实蔗糖代谢相关酶活性的影响	87
4.2.3	茉莉酸对番茄果实蔗糖代谢相关酶基因表达的影响	88
4.3	外源茉莉酸甲酯对番茄蔗糖代谢的调控	90
4.3.1	茉莉酸甲酯对番茄叶片糖代谢的影响	90
4.3.2	茉莉酸甲酯对番茄果实糖代谢的影响	92
4.4	讨论	95
4.4.1	茉莉酸信号通路对番茄叶片糖代谢的影响	95
4.4.2	茉莉酸信号通路对番茄果实糖代谢的影响	97
4.4.3	外源茉莉酸甲酯对番茄糖代谢的影响	98
4.5	本章小结	99
第5章	番茄 14-3-3 蛋白对糖代谢的调控作用	101
5.1	番茄 14-3-3 蛋白与糖代谢的关系	101
5.1.1	番茄 14-3-3 基因家族的生物信息学分析	101
5.1.2	番茄 14-3-3 蛋白与蔗糖磷酸合成酶的互作预测	104
5.1.3	番茄叶中 14-3-3 基因的表达量与糖含量及相关酶活性的关系	109
5.1.4	番茄果实中 14-3-3 基因的表达量与糖含量及相关酶活性的关系	114
5.2	<i>SnRK1</i> 基因与番茄糖代谢的关系	118
5.2.1	番茄叶片中 <i>SnRK1</i> 基因的表达量与糖含量及相关酶活性的关系	120
5.2.2	番茄果实中 <i>SnRK1</i> 基因表达量与糖含量及相关酶活性的关系	123
5.3	14-3-3 蛋白对不同种番茄蔗糖磷酸合成酶调控的效应	126
5.3.1	不同种番茄 14-3-3 蛋白与蔗糖磷酸合成酶的表达量	126

5.3.2	不同种番茄 14-3-3 表达量与蔗糖代谢相关酶活性的关系	129
5.4	讨论	130
5.4.1	TFT1 和 TFT10 最有可能与 SPS 互作	130
5.4.2	番茄糖分积累与相关酶活性和基因表达的关系	131
5.4.3	不同种番茄 14-3-3 蛋白对 SPS 的调控	133
5.5	本章小结	134
5.5.1	14-3-3 蛋白与番茄糖代谢的关系	134
5.5.2	番茄 <i>SnRK1</i> 基因与糖代谢的关系	134
5.5.3	14-3-3 蛋白对两种不同番茄糖代谢的影响	135
第 6 章	番茄 14-3-3 基因 <i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 的克隆及遗传转化	136
6.1	番茄 <i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 基因过表达载体的构建	136
6.1.1	野生型番茄再生体系的建立	136
6.1.2	普通栽培型番茄高效再生体系的优化	139
6.1.3	<i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 基因的植物过表达载体构建	143
6.2	番茄 <i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 基因 RNAi 表达载体构建	145
6.2.1	番茄 <i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 基因克隆	146
6.2.2	番茄 <i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 基因 RNAi 载体构建	147
6.3	番茄 <i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 基因的遗传转化	152
6.3.1	番茄遗传转化体系的优化	152
6.3.2	<i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 的番茄遗传转化及鉴定	159
6.4	讨论	162
6.4.1	RNAi 载体构建的 Gateway 技术	162
6.4.2	高效植物转化体系的优化	163
6.4.3	<i>TFT1</i> 和 <i>TFT10</i> 基因的遗传转化	164
6.5	本章小结	164
	参考文献	166

1.1 研究目的与意义

番茄 (*Solanum lycopersicum*), 又称西红柿、番柿, 起源于热带、亚热带地区, 属茄科 (*Solanaceae*) 茄属 (*Solanum*), 是世界上最重要的蔬菜作物之一。番茄作为一种肉质性果实, 被视为研究果实发育和成熟的理想模式材料。长期以来, 植物果实品质调控一直是研究的重点, 其中高糖番茄更是品质调控研究的热点。提高果实品质不仅具有重要的商业意义, 也是了解果实生长发育过程和营养物质积累、代谢的重要组成部分。

糖积累是果实品质形成的关键, 果实中糖的组成与含量是决定果实品质的重要因子。糖是果实生长发育的物质基础, 与果实发育密切相关。果实中糖的种类及比例也直接关系到果实的甜度和风味。蔗糖代谢是果实糖积累、转化的重要环节。在番茄栽培过程中, 水分胁迫、盐胁迫等逆境可以提高果实的糖含量, 但都以牺牲产量为代价。很多研究发现, 普通栽培型番茄 (*S. lycopersicum*) 果实成熟时蔗糖含量远低于近缘野生种‘克梅留斯基’番茄 (*S. chmielewskii*), 但机理尚不清楚。

高糖浓度可以提高番茄果实的整体口感和风味, 蔗糖的积累对提高番茄果实可溶性固形物有更大的效率。蔗糖是源-库叶片光合同化物的主要运输形式, 其运输和代谢在果实发育和物质积累中起关键作用。

目前已明确有三类关键酶参与蔗糖代谢, 即转化酶 (invertase, Inv)、蔗糖合成酶 (sucrose synthase, SS) 和蔗糖磷酸合成酶 (sucrose phosphate synthase, SPS), Inv 和 SS 主要催化蔗糖的分解, 而 SPS 是蔗糖合成途径中的一个重要控制点, 它的活性直接反映了植物体内蔗糖合成的能力, 并且是植物光合产物向蔗糖和淀粉分配的关键调控点。

调控果实生长发育和糖积累的因子主要有内在的遗传因子、外在的自然因子和栽培措施, 外在因子主要有高温、低温、干旱等逆境, 均能通过影响糖代谢关键酶的活性和基因表达从而影响糖的积累和代谢, 但不能改变果实中糖的组分。

内部因子主要有内源激素、转录因子和“看家蛋白”。与糖积累直接相关的酶 SPS 活性的变化和基因表达也受内外因素的调控, 外界因素主要受环境条件改变的影响, 而内部因素主要受可逆磷酸化修饰的影响。SPS 蛋白普遍存在 3 个磷酸化位点, 分别为 14-3-3 蛋白特异结合位点、光调控位点及渗透胁迫激活位点。其中 14-3-3 蛋白是一种非常重要的小分子调节蛋白, 能够与多种靶蛋白相互作用来调节靶蛋白活性, 也是重要的信号分子。其对细胞的多种生理过程均有重要调节作用, 如可作为碳、氮代谢的重要调控因子, 通过与蔗糖磷酸合成酶、硝酸还原酶等的相互作用来调控糖、氨基酸等物质的生物合成。

研究蔗糖的代谢及其调控机理不仅对人们利用调控手段促进果实糖分积累、改善果

实品质具有重要的理论意义,也为利用基因工程改良调控植物光合产物的分配和积累开拓了新思路,因此,研究糖代谢及调控至关重要。

1.2 国内外研究进展

普通番茄是一种世界性经济作物,也是目前我国设施园艺生产的主要栽培种类之一。

植株通过叶片光合作用制造有机物供给自身生长发育需要。净光合作用形成植物体几乎所有的干物质。光合物质生产能力强,意味着植株有较高的生物产量。从较高的生物产量变成较高的经济产量,其中就存在一个同化产物的运输与分配问题。干物质在植株各器官间进行合理地运输分配,才能保证植株营养生长与生殖生长的平衡,保证果实发育所需要的营养,以获得较高的产量,因此番茄光合物质的生产、分配及代谢对番茄的生产实践非常重要。

番茄果实含糖量是衡量和决定其品质和风味的重要因子,因此果实品质形成的关键在于糖的积累。蔗糖是多数高等植物重要的光合产物,也是碳水化合物贮藏、积累和运输的重要形式,因此糖的积累取决于蔗糖向果实的运输和果实中的蔗糖代谢。而蔗糖向果实的运输与果实的库强密切相关,蔗糖代谢与蔗糖代谢相关酶的变化密切相关。因此研究调控植物果实中的库强,果实中蔗糖积累、代谢及代谢相关酶活性的变化与相关基因的表达,对于调控植物果实品质和产量具有重要意义。

1.2.1 植物果实中蔗糖代谢研究进展

1.2.1.1 植物果实中的主要糖类物质

(1) 植物果实中主要糖的种类

果实品质在很大程度上取决于果实内所含糖的种类和数量,果实的糖分是从源器官(叶)通过韧皮部以蔗糖或山梨糖的形式经过长距离运输而来,在进入果实前或进入后转化成特定形式,一般是葡萄糖和果糖等六碳糖。

成熟番茄果实中全糖含量约占鲜重的 3%或干物质重的 50%,大部分为果糖和葡萄糖,还有部分蔗糖。葡萄糖和果糖二者所占的比例相似,总和最多可占可溶性固形物的 75%,尽管蔗糖是碳水化合物在植物体内进行长距离运输的主要形式,但在成熟番茄果实中所占的比例相当少,一般占干物质重的 5%左右。

不同植物果实中糖的种类和积累不同。葡萄是果实中糖分积累较高的作物,可达鲜重的 25%或干重的 80%左右,大多数成熟葡萄果实中的糖分主要是葡萄糖和果糖,葡萄浆果蔗糖浓度很低,其含量不足总糖的 4%,主要集中在维管束组织区。开始成熟之前,果皮和果肉中央果糖和葡萄糖含量最高,成熟之后果肉中央和周围维管束的下部果糖和葡萄糖含量最高,说明蔗糖离开维管束系统后即被快速分解。果糖和葡萄糖的积累非常快,浆果几乎在一天之内开始软化,果糖和葡萄糖含量迅速上升。荔枝因品种不同果实积累糖的成分也不同,科研人员以‘糯米糍’和‘妃子笑’两个荔枝品种为试验材料研究发现,‘糯米糍’以积累蔗糖为主,蔗糖与还原糖的比值约为 1.5,‘妃子笑’以积累还

原糖为主,蔗糖与还原糖比值约为0.4。苹果果实成熟时主要积累果糖和葡萄糖,其中果糖为果实中可溶性糖的主要成分,占45%~60%。草莓、杏等果实主要积累蔗糖。柑橘果实中以蔗糖为主,其次是果糖和葡萄糖。在柑橘汁胞中,甜橙和宽皮柑橘含1%~2.3%葡萄糖、1%~2.8%果糖和2%~6%蔗糖,葡萄柚含2%~5%还原糖和2%~3%蔗糖,柠檬和来檬含0.8%~0.9%葡萄糖和果糖及2%~3%蔗糖。

同一植物果实不同发育期各种糖的含量比例也有不同。桃果实发育早期含有大量的果糖和葡萄糖,发育后期直至成熟则主要含蔗糖。脐橙幼果期蔗糖含量高于果糖和葡萄糖,但含量都很低,果实膨大期糖含量迅速上升,果实膨大后期还原糖含量增加比蔗糖快,而温州蜜柑果实在细胞膨大期蔗糖显著增加,葡萄糖和果糖没有太大变化,成熟期主要积累蔗糖。

(2) 光合运转糖在库中的卸载

植物叶片产生的光合同化产物,很大部分最终是以蔗糖和/或山梨醇的形式,经韧皮部长途运输后卸载到发育过程中的果实内。糖从叶片合成到进入果实要经历一系列复杂的过程,主要过程如下:叶绿体同化二氧化碳生成磷酸丙糖;磷酸丙糖经磷酸丙糖转运蛋白(triose phosphate translocator, TPT)介导运到叶肉细胞的细胞质中,在细胞质中合成蔗糖;合成的蔗糖经短途运输运到韧皮部装载区;蔗糖装载到韧皮部,在筛管中长途运输,而后从韧皮部卸出;再经韧皮部后运输(postphloem transport)进入果实代谢和贮藏。这些步骤相互关联、互为协调。果实中积累糖分的贮藏薄壁细胞通常位于韧皮部卸出后的非维管区(nonvascular area)。光合产物在韧皮部卸出后非维管区运输急剧减慢,因此,果实中的韧皮部后非维管区运输是果实糖分积累的限速因子。对番茄的研究表明,控制糖分积累的关键步骤位于正在发育的果实内部,而不是源叶输出光合产物的能力或韧皮部运输的效率,果实内部蔗糖从韧皮部卸出、韧皮部后运输速率、库细胞中糖代谢酶的活力及糖的跨膜运输能力将决定果实糖分的积累。

蔗糖经筛管从叶片长途运输到果实后,从筛管伴胞(SE/CC)复合体卸载到果实内一般主要有两条细胞学途径:一是质外体(apoplastic)途径,即蔗糖从SE/CC复合体卸载到质外空间,依赖于特异运输蛋白,将糖从质外体穿膜运入贮藏薄壁细胞中;二是共质体(symplastic)途径,即糖通过SE/CC复合体与周围韧皮部薄壁细胞的胞间连丝运输到库细胞,不离开共质体空间,不经过任何膜运转步骤。在同一植物的同一器官中这两条途径可能会同时存在,或是在不同的发育时期采取不同的途径。番茄在开花后13~14 d主要积累淀粉,筛管和伴胞之间及伴胞和周围韧皮薄壁细胞之间存在大量的胞间连丝,蔗糖的卸载以共质体途径为主,但到开花后23~25 d果实内积累大量高渗透的己糖——果糖和葡萄糖,韧皮薄壁细胞之间的胞间连丝数量下降,胞间隙扩大,质膜的表面积增加,糖的卸载途径以质外体途径为主。

细胞的中央大液泡约占细胞体积的80%~90%,是果实中可溶性糖的主要贮存场所。苹果中的主要糖成分——果糖和葡萄糖几乎都在液泡中积累,蔗糖主要分布于质外空间和胞质中。苹果果实细胞中各个不同区域的可溶性糖浓度为:液泡 888 mmol/L、胞

质 37 mmol/L、质外空间 57 mmol/L。伏令夏橙果实中全部的蔗糖和 75%的果糖和葡萄糖存在于液泡中。番茄果实糖吸收进果肉细胞的液泡中是通过易化扩散的方式,番茄果肉中细胞壁结合型的转化酶水解韧皮部卸出的大部分蔗糖,形成韧皮部卸出过程所需的蔗糖浓度梯度,并且己糖的运输与 H^+ -ATPase 活力相偶联。

1.2.1.2 植物果实中蔗糖代谢相关酶及其基因表达

果实中糖的积累水平是由源-库关系调控的,并且糖对源-库关系也起调控作用,即糖的积累水平是光合产物的生产、运输、分配及在果实中的代谢等一系列过程共同作用的结果。但最终运入果实的同化产物是由其在果实中的代谢决定的,因而,在了解糖的生产、运输及分配之后,掌握糖在果实中的代谢规律及其调控机制将更有助于实现对果实糖含量及组成的科学调控。蔗糖是植物光合产物运输的主要糖,是库代谢的主要基质,也是细胞代谢的调节因子,可能通过影响基因表达发挥作用;蔗糖同时具有信号功能,可以诱导或阻遏某些基因的表达。

(1) 蔗糖代谢循环特点及代谢相关酶

番茄果实糖代谢调控的主要特征包括以下 4 个严格联系在一起的无效循环。①细胞内快速连续地降解和重新合成蔗糖,这一循环中蔗糖的降解由蔗糖合成酶催化,而蔗糖的合成由蔗糖合成酶和蔗糖磷酸合成酶催化。②液泡酸性转化酶催化蔗糖的水解,大部分己糖在液泡中被螯合,还有一些在胞质内重新合成蔗糖。这两个相反的过程主要是增加区室内蔗糖储藏的有效性。表明酸性转化酶主要的生理作用是为蔗糖和己糖在液泡中的平衡提供一个储藏场所。③在质外体中,由细胞壁转化酶催化韧皮部卸出的蔗糖,生成的己糖大部分在胞质中又重新用于合成蔗糖。④在成熟期或早期积累淀粉的果实中,其造粉体中还存在淀粉合成与降解的循环,在这一循环中,合成与降解的相对速率决定淀粉积累的量。上述蔗糖合成与分解代谢循环的协同作用调控了果实糖积累的进程。番茄果实中糖的积累与蔗糖代谢相关酶——转化酶、蔗糖合成酶和蔗糖磷酸合成酶的活性密切相关。

(2) 蔗糖代谢相关酶的作用

1) 转化酶的作用 转化酶 (invertase, Inv, EC3.2.1.26) 又称蔗糖酶或 β -呋喃果糖苷酶 (β -fructofuranosidase), 在蔗糖代谢中催化如下反应: 蔗糖 + H_2O → 果糖 + 葡萄糖。转化酶既存在于植物光合组织中, 又广泛存在于非光合组织中 (如果实、块根、块茎等)。转化酶在高等植物糖代谢中起关键作用。许多研究已发现在高等植物组织中 (包括果实) 存在多种 Inv 同工酶形式。这些同工酶可根据它们的亚细胞定位、溶解性、最适 pH 和等电点来区分。转化酶是分解蔗糖的酶, 根据其最适 pH 可分为酸性转化酶 (acid invertase, AI)、中性转化酶 (neutral invertase, NI) 和碱性转化酶 (alkaline invertase), 也有许多报道将中性转化酶和碱性转化酶看做是同一种酶。AI 的最适 pH 为 3.0~5.0, 又可分为可溶性 AI 和不溶性 AI 两种, 前者分布在液泡或细胞自由空间中, 后者存在于细胞间隙并结合在细胞壁上。NI 的最适 pH 在 7.0 左右, 大多认为是一种胞质酶, 定位

于细胞质中。

研究表明,转化酶在库器官——果实的蔗糖代谢中起重要作用。植物幼果期处于细胞分裂、分化高峰期,需要构建各种细胞器、细胞壁和细胞液成分,高的蔗糖分解酶活力有利于将输入到果实的蔗糖迅速分解生成单糖和UDPG,为果实合成淀粉、纤维素和各种细胞成分,及呼吸消耗等旺盛的生理活动提供能量。在甜瓜中,AI活性的增强可为组织的快速生长提供作为碳源的己糖。细胞壁结合的转化酶通过保持蔗糖和库组织之间的蔗糖浓度梯度而在光合产物的运输中起重要作用,被认为是蔗糖卸载的关键酶。液泡可溶性酸性转化酶在成熟库器官——液泡蔗糖积累中起作用,可以控制番茄果实的糖分组成和含量,可溶性Inv调节冷藏马铃薯的己糖:蔗糖值,通过液泡的蔗糖循环,可能调节蔗糖从叶输入液泡的有效性。有研究认为在细胞中存在一个酸性转化酶活性的阈值,当酸性转化酶活性超过阈值时,蔗糖就不会积累。

转化酶除了在植物果实的蔗糖代谢中起作用,植株中高的转化酶活性还与其他库组织的快速生长有关,一般在植物的分生组织和快速生长的幼嫩组织和器官(如幼嫩的叶、茎、花芽、根尖等)中Inv活性较高。Inv活性强的叶不但截取阳光多,且光合作用能力强,光合作用合成的蔗糖一部分经Inv转化生成还原糖,供给嫩叶生长,另一部分蔗糖运输到茎中贮存积累或供给幼嫩的茎组织生长。

2) 蔗糖合成酶的作用 蔗糖合成酶(sucrose synthase, SS, EC2.4.1.13)是一种存在于细胞质中的可溶性酶,也有附着在细胞膜上的不溶性蔗糖合成酶,在不同的作物或环境条件下起不同的作用。蔗糖合成酶在植物生长发育中催化如下可逆反应:果糖+UDPG \rightleftharpoons 蔗糖+UDP。蔗糖合成最适pH 8.0~9.5,蔗糖裂解最适pH 5.5~6.5。SS是由分子量为83~100 kD的亚基构成的四聚体。

蔗糖合成酶既能催化蔗糖合成又能催化蔗糖分解,但有报道认为它在蔗糖代谢中是起合成还是分解蔗糖的作用与其是否被磷酸化有关。科研人员研究柑橘果实发育过程中输导组织和汁胞中的蔗糖代谢酶活力发现,在汁胞生长最快阶段,从庞大的韧皮部运输和卸出区域提取的SS活力显著高于汁胞组织。有研究发现汁胞中SS和转化酶在柑橘果实汁胞糖代谢中起重要作用。在菜豆果实发育过程中,SS出现的两次高峰与干物质的积累相一致,干物质积累处于低水平时,SS的活性也处于低水平,由此认为蔗糖合成酶是菜豆果实积累糖的关键酶。桃果实在发育早期虽然蔗糖含量很低,但成熟时蔗糖的含量达到总糖含量的80%,且桃果实发育过程中很少积累淀粉,所以认为SS在桃果实中的作用是合成蔗糖。

蔗糖合成酶可以通过影响果实的库强来影响果实的糖积累。有研究认为蔗糖合成酶影响库强的可能作用机理是:在柑橘果实汁胞外的蔗糖合成酶催化蔗糖分解为UDPG和果糖,UDPG和果糖经三羧酸循环后生成ATP(腺苷三磷酸),ATP供能启动汁胞膜上的H⁺泵,H⁺泵将胞外的H⁺泵入到汁胞内,这样果实汁胞内的H⁺浓度增加,pH降低,有利于汁胞内的蔗糖被酸水解为葡萄糖和果糖,进而提高了细胞液浓度,降低了果实汁胞内的水势,增强了果实的渗透调节,由于汁胞外产生了H⁺浓度梯度,胞内高浓度的H⁺

被运转到胞外的同时,胞外的蔗糖也随之被转入到胞内。

科研人员研究日本梨果实糖代谢时发现,在果实发育过程中产生两种不同形式的 SS:一种在未成熟的果实中催化蔗糖分解;另一种在成熟果实中催化蔗糖合成。在葫芦果实中发现,SS 合成蔗糖能力强,反映在 SS 合成方向上。对脐橙的研究表明,脐橙开花 150 d 后影响果实内蔗糖合成的主要酶是蔗糖合成酶,且果实糖含量与 SS 活性呈显著正相关。蔗糖合成酶还与韧皮部功能有关系,是影响库强的关键酶,在果实开始积累糖分,蔗糖合成酶通过调节果实内蔗糖的浓度平衡来影响果实库强,进而影响果实糖分积累。

此外,蔗糖合成酶还参与调控果实输入蔗糖多少和代谢蔗糖的能力,参与细胞构建,如在细胞发育过程中 SS 提供 UDPG 构建细胞壁或胼胝质,调节淀粉合成,SS 调控着 UDPG 的产生,在此过程中 UDPG 可被焦磷酸化酶转变成 1-磷酸葡萄糖,继而可转化为合成淀粉的底物 ADPG。

3) 蔗糖磷酸合成酶的作用 蔗糖磷酸合成酶 (sucrose phosphate synthase, SPS, EC2.4.1.14) 是合成蔗糖的关键酶,是存在于细胞质中的一种可溶性酶,活性最适 pH 约为 7.0,催化如下反应: $\text{UDPG} + 6\text{-磷酸果糖} \rightarrow 6\text{-磷酸蔗糖} + \text{UDP}$ 。上述反应的生成物 6-磷酸蔗糖通常由 SPP (磷酸蔗糖磷酸化酶) 迅速降解成蔗糖和磷酸根离子;而 SPS 和 SPP 又是以复合体的形式存在于植物体内,所以 SPS 催化蔗糖生成在事实上是不可逆的,它的活力调节蔗糖的合成及光合初级产物在淀粉和蔗糖之间的分配。1955 年 Leloir 和 Cardini 首次在小麦胚芽中检测到 SPS 活性,之后在萌发的小麦和水稻种子中也发现其存在,随着研究材料范围的扩大和深入,人们发现光合组织和非光合组织(果实)中都广泛存在 SPS。SPS 是一种低丰度蛋白(不到可溶性蛋白的 0.1%),且不稳定。

Huber (1983) 曾指出,SPS 活力越高蔗糖积累越多。SPS 活力的高低代表了冬小麦旗叶光合产物转化为蔗糖的能力。在甘蔗茎中蔗糖的含量依赖于 SPS 的活力。甜菜、猕猴桃、柑橘中蔗糖的积累与 SPS 的活性升高有关,蔗糖积累型的番茄、网纹甜瓜蔗糖水平的提高与 SPS 活性的提高和转化酶活性的降低相关。番茄中 SPS 对果实竞争同化物的能力、果实的糖分组成及含量具有重要的调节作用,还调控叶的碳代谢。但有报道认为成熟期的普通番茄果实中蔗糖含量很低,其 SPS 活性在整个果实的发育过程中都很低,而蔗糖积累型番茄果实中蔗糖含量明显高于普通栽培型番茄,其 SPS 活性也很高。香蕉是典型的输入蔗糖积累淀粉的果实,果实充分成熟采收后,由于淀粉水解为可溶性糖(主要是蔗糖)而使果实变甜,充足的证据显示 SPS 参与了香蕉果实成熟过程中乙烯诱导的由淀粉向蔗糖转换的过程。

(3) 蔗糖代谢相关酶基因的表达

1) 转化酶基因的表达 研究表明转化酶是由一个多基因家族编码的蛋白质。根据基因编码转化酶功能及基因序列同源性将高等植物转化酶的基因家族分为两个亚基因家族:编码细胞壁转化酶的基因家族和编码液泡转化酶的基因家族。在番茄中,编码液泡转化酶的基因有 1 个——*TIVI*, *TIVI* 的 mRNA 在成熟、完熟的果实中高度表达,在其他

组织中则很少；编码细胞壁转化酶的基因有4个——*Lin5*、*Lin6*、*Lin7*和*Lin8*，位于番茄的第9和第10染色体上，其中的*Lin6*在旺盛生长的库组织中特异表达。在植物中尚未有编码中性、碱性胞质转化酶的基因或cDNA克隆的报道。已分离的转化酶基因一般长2000~2500 bp，包含1个1000 bp以上的开放阅读框。报道的转化酶的分子量为50~80 kD，为单体或二聚体。

转化酶活力在植物生长发育的不同阶段和不同器官部位有所差异，因此转化酶的基因表达具有时间和空间的差异，即具有发育和组织器官特异性表达的特性，马铃薯的贮藏库和使用库中包含了少量Inv蛋白及mRNA，而在幼嫩的源器官（叶、根、萌发的种子）中则有大量的Inv蛋白及其mRNA，从时间上来看，不同的发育阶段光合和非光合器官中均有不同的Inv表达。转化酶时空表达的差异可能与蔗糖信号有关。转化酶基因的表达还受某些激素的控制，如赤霉素、乙烯、脱落酸等能提高转化酶的表达。

2) 蔗糖合成酶基因的表达 蔗糖合成酶同转化酶相似，也由多个基因编码，蔗糖合成酶由3个大的家族（Class1、Class2和Class3）组成，依次为单子叶植物*SUS*族、双子叶植物*SUS1*族和双子叶植物*SUSA*族，单子叶植物*SUS*族又可分为两个亚族——Group1和Group2，分别以玉米*Sh1*和*Sus1*为代表。不同形式的SS完成不同的代谢功能，拟南芥中编码SS的是一个多基因家族，分别为*AtSus1*、*AtSus2*、*AtSus3*、*AtSus4*、*AtSus5*和*AtSus6*基因，各个基因在应对各种反应时表达不同，如*AtSus1*和*AtSus4*在厌氧条件下表达增加，*AtSus2*仅在开花后12 d特异性高度表达，*AtSus3*在叶片失水、渗透胁迫及后熟的种子等各种脱水条件下的各个器官中均有表达，而*AtSus15*和*AtSus6*在所有组织中的表达不受胁迫条件的影响。

大多数植物中至少有两种SS的同工酶，通常都有较高的氨基酸序列同源性和相似的生化性质，多数存在于细胞质中，也有附着在细胞膜上的不溶性蔗糖合成酶，蔗糖合成酶基因表达有发育和器官特异性。番茄果实中SS在中果皮、胶质胎座和维管束细胞中大量表达。玉米中有3个编码SS的基因——*Sh1*、*Sus1*和*Sus3*，*Sh1*在胚乳中特异性高度表达，*Sus1*在根、茎和叶中均有表达，*Sus3*在胚乳、胚珠、根和幼芽中表达。马铃薯有2个SS基因*Sus3*和*Sus4*，*Sus3*基因在茎中高水平表达有利于维管束物质运输，*Sus4*基因在贮存器官和块茎维管束组织中的表达能促进库功能；在根尖，*Sus3*基因在细胞分裂区高水平表达，*Sus4*在分生组织和根冠中表达。

蔗糖合成酶基因的表达调节在转录水平和转录后水平上，蔗糖合成酶基因启动子有一个高的组织表达特异性。番茄果实中主要的蔗糖合成酶是*TOMSSF*基因家族的表达产物，这种酶至少在两个不同的位点上高度磷酸化，通过磷酸化来调节亚基的不同构象。

3) 蔗糖磷酸合成酶基因的表达 蔗糖磷酸合成酶由A、B、C三个基因家族编码，这3个基因家族的表达有时间和空间上的差异，拟南芥的*SPS*基因B家族在根中没有表达，C家族的表达受光暗调节，水稻的*SPS*基因B家族仅在叶肉和萌发种子的盾片及未成熟花序的花粉中表达。

科研人员在柑橘中克隆了3种SPS同工酶cDNA片段——*CitSPS1*、*CitSPS2*和

CitSPS3, 其中 *CitSPS1* 在柑橘可食组织中表达; *CitSPS2* 在成熟阶段表达水平呈上升趋势; 果皮组织中 *CitSPS1* 呈低水平表达, *CitSPS2* 与在可食组织中的表达相同, *CitSPS3* 比前两个基因转录少一些。这些结果表明 *CitSPS1* 和 *CitSPS2* 在决定柑橘果实蔗糖的成分和积累中发挥重要作用, 在果皮组织中 3 个基因的转录与 SPS 活性相一致, 表明 SPS 基因是独立调节表达的, 表达方式上有时间和空间差异。对柑橘的研究发现, 在汁胞生长最快阶段 SPS 和碱性转化酶活力最活跃, 可溶性酸性转化酶活力在幼果期较活跃, 但随着糖的积累开始几乎消失, SPS 成为成熟期汁胞中活性最高的酶。在温州蜜柑中也发现进入着色期果实中蔗糖的迅速积累与 SPS 的活性升高一致。在许多库组织中, 蔗糖分解和再合成的无效循环需要 SPS 和 SPP, 这些无效循环可用来对碳水化合物代谢和分配进行更为灵活和灵敏的调控, 而且可能通过在库组织内部建立浓度梯度来促进蔗糖由韧皮部向发育的种子卸载。

1.2.1.3 蔗糖代谢的调控

(1) 跨质膜和液泡膜载体的调控

溶质的主动运输有初始主动运输 (primary active transport) 和次级主动运输 (secondary active transport) 两种, 初始主动运输过程同时伴随 ATP 分解将化学能转变为渗透能。次级主动运输需要传递体 (porter) 运载, 包括共向传递体 (symporter)、反向传递体 (antiporter) 或单向传递体 (uniporter), 不能透过疏水的膜脂层的溶质须通过传递体才能进入细胞, 传递体为具有催化作用的蛋白质, 经过共向传递体 (如糖) 随着 H^+ 一同进入细胞, H^+ 经过反向传递体进入细胞的同时有阳离子 (如 Na^+ 、 Ca^{2+}) 的排出。除通过共向传递体、反向传递体的溶质运转外, 还有只有一种阳离子进入细胞或从细胞内排出的单向传递体途径。

细胞质膜上糖的运输同时存在主动和被动过程, 主动运输由质膜上的电化学梯度所驱动, 即 H^+ -ATPase 催化 H^+ 的方向性运输, 从而在质膜内外建立电化学势梯度。在已知的糖的跨质膜主动运输过程中均存在 H^+ -糖的同向运输载体, 其中研究最深入的有 H^+ -蔗糖和 H^+ -葡萄糖的同向运输载体, 大豆子叶的蔗糖跨质膜运输就是由载体介导, 并伴随质子的同向运输。

植物细胞的中央大液泡占细胞体积的 80%~90%, 它是果实中可溶性糖的主要贮存场所。糖跨液泡膜运输同时存在主动和被动运输过程。主动运输的能量来自液泡 ATPase (V-Type ATPase) 和 PPase 产生的 H^+ 的跨液泡膜梯度, 液泡膜上存在糖运输的反向运输载体和单向运输载体。番茄果实果肉细胞的液泡膜上存在特异性的载体机制, 蔗糖、果糖和葡萄糖的吸收对载体的竞争很小, 说明番茄跨液泡膜的 3 种糖有各自的载体。由于分离质膜、液泡膜微粒体等技术的应用, 在离体条件下研究糖的运输机制和鉴定糖的载体取得了很大进展, 运用分子生物学技术首先成功地从小球藻中分离出葡萄糖同向载体基因, 之后又从拟南芥和几种高等植物中分离出己糖的同向载体, 进一步为糖跨质膜和液泡膜运输的研究提供基础。

(2) 蔗糖代谢相关酶的调控

1) 糖对蔗糖代谢相关酶活性的调控 近些年的研究结果显示,蔗糖在植物体内运输具有携带信号给基因的功能,即蔗糖可以使一些基因被诱导、另一些基因被阻遏。当植株中碳水化合物枯竭时,产生正调节,使光合作用、再运输和输出的基因表达增强,而使贮藏和利用碳水化合物基因的 mRNA 减少,当植株中碳水化合物丰富时,通过基因阻遏和诱导相结合,起到与碳水化合物枯竭时相反的作用。

SS 和 *Inv* 的基因表达都受糖调节。科研人员研究玉米中编码 SS 的两个基因——*Sh1* 和 *Sus1* 对组织中碳水化合物状态变化的响应发现,玉米根尖中 *Sh1* mRNA 在碳水化合物供应受限制的情况下(培养在浓度约为 0.2%的葡萄糖溶液中)最大限度地表达,而 *Sus1* 基因的转录水平很低或测不到,当培养液中葡萄糖的浓度提高到 2.0%时,*Sus1* 基因表达达到高峰。培养液中糖水平的不同还影响酶的定位,低糖水平下主要有利于 SS 在根的外周细胞中积累,高糖水平下 SS 在所有细胞类型中的表达都加强。离体马铃薯叶在蔗糖溶液中培养,蔗糖只诱导 *Sus4* 的表达而 *Sus3* 不受影响。

Inv 基因也像 SS 基因一样分为两类:一类是增加碳水化合物的供给可以促进其表达,即产生正调节效应基因 *Inv2*;另一类是受糖供给过多阻遏,而糖耗竭却产生正调节效应的基因 *Inv1*。这两类基因在植物发育过程中的差异表达,表现为糖供给促进基因 *Sus1* 和 *Inv2* 主要在碳水化合物输入组织中表达,而受糖过多阻遏基因 *Sh1* 和 *Inv1* 主要在生殖发育过程中的关键部位和时刻产生正调节。

以苹果为实验材料的研究显示,苹果果实发育过程中,伴随着果糖、葡萄糖和蔗糖的积累,酸性转化酶活性逐渐下降;酸性转化酶 Western 印迹实验检测到一条 30 kD 的多肽,其信号强度随发育过程而增加,免疫电子显微镜定位实验一方面显示酸性转化酶主要分布于细胞壁上,发育后期液泡中酸性转化酶增加明显,另一方面表明酸性转化酶数量随发育过程而增大;用生理浓度的外源糖预温育果实圆片,发现果糖和葡萄糖抑制了可提取的酸性转化酶的活性;但 Western 印迹实验并没有检测到该酶表观数量的变化和分子量不同于 30 kD 的多肽。由此认为,果糖和葡萄糖参与诱导了苹果果实酸性转化酶翻译后或易位后的抑制性调节,这种酸性转化酶活性的翻译后调节机制不同于目前已报道的有关该酶的调节机制,即化学反应平衡系统中己糖产物抑制,及与多肽抑制因子有关的活性抑制,果糖和葡萄糖似乎诱导了有关抑制基因的表达或对酸性转化酶结构进行了某种修饰。

2) 14-3-3 蛋白的调控 14-3-3 蛋白与叶绿体前体蛋白 PSI-N (photosystem I N-subunit) 的转运肽相互作用,并在叶绿体基质和类囊体膜中出现,调节与基本碳代谢相关酶的活性,从而影响植物的碳水化合物代谢。研究发现 14-3-3 蛋白可以和叶绿体前体蛋白、HSP70 形成三聚体,跨膜运输速率是单个前体蛋白的 3~4 倍。

有研究认为 SPS 的调控是通过与 14-3-3 蛋白结合并磷酸化和异构化的遗传翻译后水平上进行的。SPS 有几个可能的磷酸化位点,可以由 14-3-3 蛋白依赖性或非依赖性机制调节。在菠菜中,14-3-3 蛋白与 SPS 的一个特异调控位点 Ser-229 相互作用,使 SPS 活

性受抑制。花椰菜提取物中 14-3-3 蛋白对 SPS 活性的影响也包括 6-磷酸海藻糖合成酶 (trehalose-6-phosphate synthase, TPS), 14-3-3 蛋白与 SPS 结合后可以轻微提高 SPS 的活性, 另外, 采用不同的实验材料和分析方法显示的 14-3-3 蛋白对 SPS 活性的影响不同。但有研究认为 14-3-3 蛋白可以保护靶蛋白, 使拟南芥中的 SPS 免于被蛋白酶水解。

进一步研究表明 14-3-3 蛋白对碳代谢的调控还包括对淀粉积累的影响。拟南芥中, 14-3-3 蛋白可以使叶中的淀粉积累增加 2~4 倍。淀粉合成酶 III 家族包含高度保守的 14-3-3 磷酸丝氨酸/苏氨酸结合序列, 使其成为 14-3-3 蛋白可能的靶子。因此, 14-3-3 蛋白在植物的基本碳代谢中发挥重要的调控作用。

1.2.1.4 蔗糖代谢相关酶基因克隆及基因工程

(1) 蔗糖代谢相关酶基因的克隆

国内外许多学者对番茄蔗糖代谢相关酶的基因进行了克隆, 报道最多的是关于转化酶的基因克隆。目前已从一些高等植物 (如胡萝卜、绿豆、马铃薯、拟南芥、番茄、玉米、燕麦、烟草、红藜、豌豆、郁金香属) 中分离得到编码转化酶的基因或 cDNA, 其中拟南芥的 *Atβfruit1* 和 *Atβfruit3* 基因、玉米的 *Ivv1* 基因、番茄的 *InvLe* 基因都含有 7 个外显子和 6 个内含子, 而胡萝卜的 *InvDC1* 基因和拟南芥的 *Atβfruit2* 基因含有 5 个外显子和 6 个内含子。同种植物的不同转化酶的氨基酸序列差异很大, 而不同植物的同种转化酶的氨基酸序列具有高度相似性。Sato 等利用 RT-PCR 方法从普通番茄中克隆了编码细胞壁酸性转化酶的一条 cDNA, 有 2363 个碱基对, 其中包含了编码 636 个氨基酸、长为 1908 个碱基对的开放阅读框; RNA 印迹分析表明 AI 的 RNA 长约 2.5 kb。Ohyama 等从普通番茄叶片中克隆了一条细胞壁束缚型酸性转化酶的 cDNA, 长 1872 bp。有研究者根据酸性转化酶基因的保守序列设计引物, 采用 RT-PCR 方法, 从番茄果实总 RNA 中扩增出目标 cDNA 片段, 在所测的 1038 个核苷酸中, 与 GenBank 中登记号为 M81081 的番茄果实酸性转化酶基因高度同源, 同源率为 99%。有研究报道普通番茄果实中酸性转化酶的 cDNA 核苷酸序列和推导的氨基酸序列, 酸性转化酶的 mRNA 有近 2200 bp 的多腺苷酸转录体, 其开放阅读框为 ORF636, 同时具有 47 个氨基酸序列的疏水性信号肽及 45 个氨基酸序列的前导序列。

近年来, 蔗糖磷酸合成酶和蔗糖合成酶基因的 cDNA 已经被克隆。大多数植物中至少有两种蔗糖合成酶的同工酶, 它们通常都有较高的氨基酸序列同源性和相似的生化性质, 蔗糖合成酶基因大小约 5.9 kb, cDNA 长约 2.7 kb, 编码 820 个氨基酸, 分子量约为 94 kD 的蛋白质, 由一对等位基因组成, 但在有些植物中则由一对非等位基因组成, 目前一些研究者已成功从马铃薯、甜菜、胡萝卜、水稻、玉米和甘蔗等作物中克隆蔗糖合成酶基因。番茄中已克隆到的蔗糖合成酶包括 *SUS2* 和 *SUS3* 基因, 蔗糖合成酶基因大小约为 4 kb, cDNA 的长度约 2.7 kb, 编码约 810 个氨基酸, 分子量约为 94 kD 的蛋白质。Wang 等从普通番茄果实中克隆了一条长为 2725 bp 的蔗糖合成酶基因的 cDNA, 其中包含了编码 805 个氨基酸、长为 2415 个碱基对的开放阅读框, 在 3'端非翻译区 2569~