



园艺学报  
*Acta Horticulturae Sinica*  
ISSN 0513-353X, CN 11-1924/S

## 《园艺学报》网络首发论文

题目: 苹果糖转运蛋白基因 *MdSWEET1* 在番茄中异源表达提高其耐盐性  
作者: 路静, 马齐军, 康慧, 李文浩, 刘亚静, 郝玉金, 由春香  
DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2018-0744  
网络首发日期: 2019-03-21  
引用格式: 路静, 马齐军, 康慧, 李文浩, 刘亚静, 郝玉金, 由春香. 苹果糖转运蛋白基因 *MdSWEET1* 在番茄中异源表达提高其耐盐性[J/OL]. 园艺学报. <https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2018-0744>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

doi : 10.16420/j.issn.0513-353x.2018-0744

# 苹果糖转运蛋白基因 *MdSWEET1* 在番茄中异源表达提高其耐盐性

路 静, 马齐军, 康 慧, 李文浩, 刘亚静, 郝玉金, 由春香\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘要:**克隆得到苹果糖转运蛋白 SWEET(sugars will eventually be exported transporters)基因 *MdSWEET1* (MDP0000237435), 组织表达分析发现该基因主要在苹果的茎和花中表达, 相对定量分析发现 *MdSWEET1* 对 NaCl、PEG、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ABA 等均有响应。番茄中异位表达 *MdSWEET1* 可提高植株耐盐性, 并且可溶性糖含量, 特别是蔗糖和果糖含量提高。

**关键词:** 苹果; *MdSWEET1*; 盐胁迫; 可溶性糖; 番茄

## Ectopic Expressing *MdSWEET1* in Tomato Enhanced Salt Tolerance

LU Jing, MA Qi jun, KANG Hui, Li Wen hao, LIU Ya jing, HAO Yu jin, and YOU Chun xiang\*

(State Key Laboratory of Crop Biology, MOA Key Laboratory of Horticultural Crop Biology (Huanghuai Region) and Germplasm Innovation, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** Sugars are important energy source and signaling molecule in plant, and play important roles in plant growth and development as well as biotic and abiotic stresses. Sugar cannot be transported independently across the plant biofilm system and needs the assistance of corresponding sugar transporters. SWEET(sugars will eventually be exported transporters) is a class of sugar transporters, it can carry out bidirectional transport of sugar in plants, and participate in many important physiological processes of plant growth and development by regulating the transport, distribution and storage of sugar compounds in plants. In this study, we cloned a gene named *MdSWEET1*. Expression analysis suggested that *MdSWEET1* expressed mainly in stems and flowers and can response to various abiotic stresses including NaCl, PEG, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ABA. Ectopic expressing *MdSWEET1* in tomato enhanced salt tolerance and accumulated more soluble sugar especially sucrose and fructose. The findings provide a theoretical basis for further research into the function of SWEETs in apples.

**Key words:** apple; *MdSWEET1*; salt stress; soluble sugar; tomato

为抵御及适应盐胁迫, 植物进化出了一系列适应机制, 例如清除活性氧、合成渗透调节物、调节离子稳态等。渗透调节物包括脯氨酸、可溶性糖、甜菜碱、可溶性蛋白等 (Rahnama & Ebrahimzadeh, 2004; Hajlaoui et al., 2010), 其中可溶性糖在渗透调节中起重要作用 (Prado et al., 2000)。

糖类不仅是植物主要的能量来源, 而且对植物应对非生物胁迫及生长发育都有影响 (Ohto et al., 2001)。可溶性糖可以通过调节细胞渗透势来应对外界的非生物胁迫 (Rolland et al., 2006; Rosa et al., 2004)。干旱胁迫下, 玉米中的糖及脯氨酸含量上升 (Nayer & Reza, 2008);

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31471854); 山东省自然科学基金重大基础研究项目计划 (ZR2017ZC0328); 国家自然科学基金项目 (31772288)

\*通信作者 Author for correspondence (E-mail: youchunxiang@126.com)

水稻耐盐品种 PT1 随着 NaCl 浓度的增加, 糖含量, 特别是水苏糖、棉子糖、蔗糖和葡萄糖含量也逐渐增加 (Siringam et al., 2011); 在两个花生品种中, 耐盐的比不耐盐的含有更多的可溶性糖 (Ranganayakulu et al., 2013); 高粱在 NaCl 和 PEG 处理下可溶性糖含量增加 (Gill et al., 2003); 低温会使藜麦苗的胚轴中积累大量的蔗糖 (Rosa et al., 2004), 这些足以说明糖在植物应对非生物胁迫中所起的重要作用。

糖在植物体中的运输主要由糖转运蛋白介导。至今拟南芥中已发现近 70 个糖转运蛋白, 包括蔗糖转运蛋白 (SUT/SUC)、己糖转运蛋白 (STP/HXT)、肌醇转运蛋白 (ITR/MIT) 及单糖转运蛋白 (AZT/MSSP) 等 (Rae et al., 2005)。而 SWEET (sugars will eventually be exported transporters) 是近些年新发现的一类糖转运蛋白, 具有 2 个 MtN3/saliva 跨膜结构域, 与花粉营养、花蜜的分泌、种子填充、蔗糖的长距离运输、韧皮部装载、生物与非生物胁迫和调节赤霉素响应有关 (Chen et al., 2012; Sun et al., 2013; Lin et al., 2014; Chen et al., 2015)。拟南芥中有 17 个 SWEET 基因, 其中 *AtSWEET1* 最先被发现, 其功能与葡萄糖的转运有关: *AtSWEET1* 是一类质膜定位的蛋白, 既可以调控葡萄糖的跨膜吸收又可以调节葡萄糖向内质网的流入; *AtSWEET8* 也是一类葡萄糖转运蛋白, 其基因主要在绒毡层中表达, *atsweet8* 突变体表现出雄性不育的特点; 此外, *AtSWEET5* 和 *AtSWEET15* 也参与拟南芥的发育 (Chen et al., 2010)。

SWEET 家族基因除了与植物的发育有关以外, 在非生物胁迫的响应过程中也发挥着关键作用。有研究发现 *AtSWEET11* 和 *AtSWEET12* 在拟南芥中负责韧皮薄壁组织细胞中蔗糖的运出, 参与对冻害和冷害的响应。在 4 °C 的低温环境下, 拟南芥 *sweet11-1* 突变体比野生型积累更多的葡萄糖和果糖, 从而具有更高的耐冷性; 冻害胁迫下, *sweet11-1swee12-1* 双突变体比野生型具有更强的抗性, 而单突则没有明显不同 (Hir et al., 2015)。有研究发现 *AtSWEET17* 定位于液泡膜, 负责果糖的转运, 冷胁迫下 *atsweet17* 突变体果糖含量升高 (Chardon et al., 2013)。*AtSWEET16* 对蔗糖、果糖和葡萄糖的转运都有影响, 冷胁迫下, *AtSWEET16* 过表达植株葡萄糖含量增加, 果糖含量降低; *atsweet16* 突变体对冻害的耐性提高 (Klemens et al., 2013)。*AtSWEET4* 负责果糖和葡萄糖的转运, 过表达 *AtSWEET4* 能提高拟南芥对干旱和冻害的耐性 (Liu et al., 2016)。拟南芥中异源表达尖叶石竹 *DsSWEET12* 和 *DsSWEET17*, 提高果糖和葡萄糖的积累量, 并且提高对盐胁迫、渗透胁迫和氧化胁迫的耐性 (Zhou et al., 2018a, 2018b)。

为进一步研究苹果中 SWEET 家族基因成员的具体功能, 首先从苹果中克隆到 1 个 SWEET 基因 (MDP: 0000237435), 该基因与拟南芥中 *AtSWEET1* 高度同源, 进一步将 *MdSWEET1* 在番茄中异源表达, 研究其在盐胁迫响应过程中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及其总 RNA 提取和 *MdSWEET1* 表达的 qRT-PCR 分析

10 年树龄 ‘嘎拉’ 苹果树种植在山东省果树研究所果树试验田 (中国, 泰安)。2015 年 5 月开始, 分别取生长根、幼茎、新生叶、花 (初花期) 和果实 (花后 20 d), 液氮保存; 另外用 0 和 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、10% PEG6000、100 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 和 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 ‘嘎拉’ 苹果组培苗, 分时间段 (0、1、3、6 h) 取整株组培苗迅速用液氮冷冻, 存放于 -80 °C 冰箱备用。

采用 RNA plant plus Reagent 试剂盒 (天根) 提取液氮冻样的 RNA, 利用反转录试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time, TaKaRa) 获得 cDNA。使用实时定量 RT-PCR 的方法, 用 cDNA 模板检测苹果中 *MdSWEET1* 的表达水平, 以苹果 18S R

NA 作为等量上样参照，引物为 18S-F: ACACGGGGAGGTAGTGACAA, 18S-R: CCTCC AATGGATCCTCGTTA。PCR 分析的特定的引物序列为 MdSWEET1-F (RT): GC TGCTCCTGTACTTCATCTACCG, MdSWEET1-R (RT): GGTTGTTGATCAGGCTTTGCA。用 UltraSYBR Mixture (with ROX) 试剂盒 (康为世纪) 进行实时荧光定量 PCR 分析。20  $\mu$ L 反应体系为: 2 $\times$  UltraSYBR Mixture 10.0  $\mu$ L, 上游引物 (10  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ ) 1.0  $\mu$ L, 下游引物 (10  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ ) 1.0  $\mu$ L, cDNA 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.0  $\mu$ L。荧光定量 PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 65  $^{\circ}$ C 延伸 10s, 40 次循环, 每次循环第 3 步进行荧光采集; 最后, 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行定量数据分析, 样本包含 3 次重复。

## 1.2 MdSWEET1 的分离

2017 年 9 月开始选用山东农业大学园艺科学与工程学院组培室培养 30 d, 生长状态良好, 株高约 5 cm, 约有 12 片叶的‘嘎拉’组培苗叶片为试材, 采用 RNA plant plus Reagent 试剂盒 (天根) 提取样品的 RNA, 利用反转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa) 获得 cDNA, 贮存于 -20  $^{\circ}$ C 备用。

根据苹果基因组数据库中检索到的序列, 设计引物 MdSWWET1-F: ATGGATCCAAAA ACAATGCA 和 MdSWEET1-R: TTAGACATGCCCATCTTGGG。以‘嘎拉’组培苗 cDNA 为模板进行 PCR 扩增: 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 次循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳并回收目的条带, 连接到 pMD18-T 克隆载体进行测序。

## 1.3 MdSWEET1 的生物信息学分析和亚细胞定位

MEGAR 5.0 构建系统进化树; 软件 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 用于分析 MdSWEET1 蛋白稳定性、等电点及亲水性; 用软件 TMHMM Server v. 2.0 分析蛋白跨膜结构域; SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 分析蛋白二、三级结构。

使用 Gateway 技术 (Lu et al., 2019) 构建表达载体, 35S:GFP-MdSWEET1 作为表达载体, 35S:RFP-AtCBL2 作为液泡膜定位的对照载体, 利用农杆菌介导的烟草表皮细胞转化方法, 将这两种表达载体在烟草中瞬时表达, 2-3 d 后利用超高分辨率激光共聚焦显微镜观察亚细胞定位情况。

## 1.4 植物表达载体的构建与农杆菌介导的番茄遗传转化

设计 *MdSWEET1::HA* 的引物(上游引物: AATGGATCCAAAAACAATGCA, 下游引物: TTAGACATGCCCATCTTGGG), 以测序正确的 MdSWEET1-pMD18-T 的质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物连接 1254 植物表达载体, 测序正确后提取质粒并转化 LBA4404 农杆菌, 用于侵染。参照祁春芳 (2018) 的方法用农杆菌转染番茄, 用 CTAB 法提取转基因番茄基因组 DNA。野生型番茄为阴性对照, *MdSWEET1::HA* 质粒为阳性对照, 分别扩增 *MdSWEET1*, 进行阳性转基因植株的鉴定。初步鉴定为转基因的番茄幼苗进行生根后再提 RNA 进行鉴定, 纯合体番茄植株用于试验。所测数据包含 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

## 1.5 转基因番茄淀粉、可溶性糖、过氧化氢、超氧阴离子和丙二醛含量的测定

取野生型和转基因番茄地上部分 (包括茎和叶), 利用试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司), 测定淀粉、可溶性糖、蔗糖、果糖、葡萄糖、过氧化氢、超氧阴离子含量。3 个生物学重复和 3 个技术重复。丙二醛含量采用硫代巴比妥酸法 (赵世杰 等, 1994) 测定。

## 1.6 PCR 鉴定转基因番茄

用 CTAB 法提取转基因番茄基因组 DNA。以 35S 为上游引物：GACGCAC AATCCCACTAT CC，MdSWEET1-R 作为下游引物：TTAGACATGCCCATCTTGGG。*MdSWEET1::HA* 质粒为阳性对照，野生型番茄全基因组 DNA 为阴性对照。

## 2. 结果与分析

### 2.1 *MdSWEET1* 的分离及生物信息学分析

前人研究发现 *SWEETs* 基因与糖转运相关 (Chardon et al., 2013; Chen et al., 2015; Liu et al., 2016)。本研究中以‘嘎拉’组培苗 cDNA 为模板，克隆得到一个约 800 bp 的基因 (MDP0000237435)，该基因编码的蛋白含 263 个氨基酸，等电点 pI 为 9.68，不稳定系数为 34.91，说明该蛋白属于稳定类蛋白。将该基因序列与拟南芥中 *SWEET* 家族成员的蛋白序列进行进化树分析，发现该蛋白与 *AtSWEET1* 亲缘关系最近，因此命名为 *MdSWEET1* (图 1)；该蛋白平均亲水系数为 0.511，说明该蛋白为疏水蛋白 (图 2)；TMHMM 在线软件分析结果表明 *MdSWEET1* 蛋白含有 7 个跨膜结构域 (图 3)，这与之前的研究 (Talbot, 2010; Baker et al., 2012) 相吻合。为进一步研究其生物学特性，对 *MdSWEET1* 进行亚细胞定位，发现其定位于液泡膜 (图 4)。

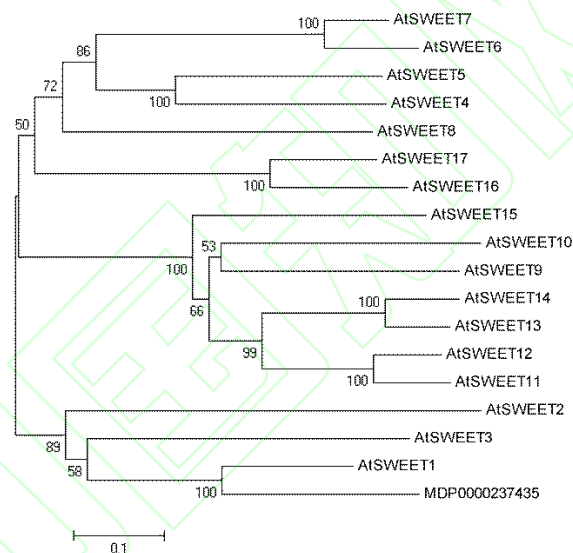


图 1 *MdSWEET1* 的进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *MdSWEET1*.

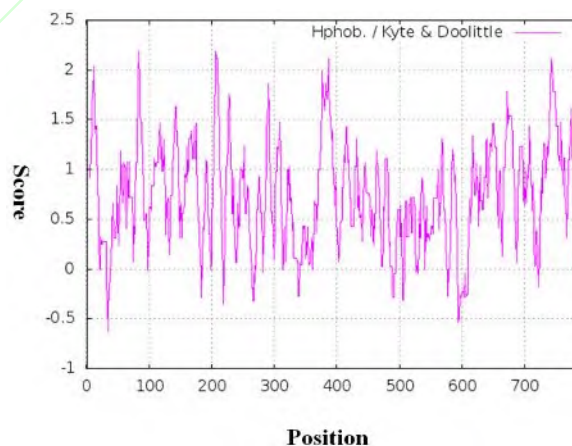


图 2 *MdSWEET1* 蛋白的亲水性分析.

Fig. 2 Hydrophilic analysis of *MdSWEET1*

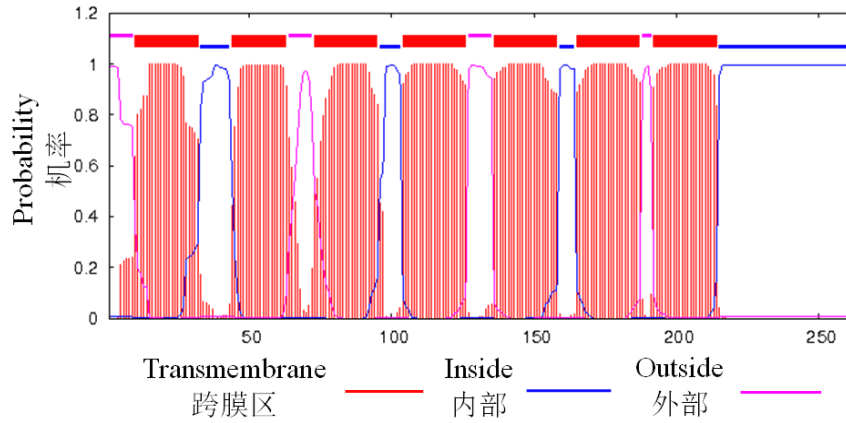


图 3 *MdSWEET1* 蛋白的跨膜结构域分析.

Fig. 3 Transmembrane domain analysis of *MdSWEET1*.

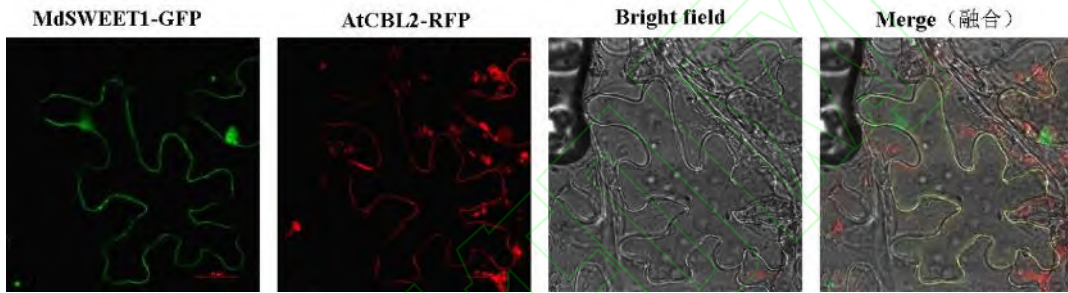


图 4 *MdSWEET1* 的亚细胞定位. *MdSWEET1* 带有绿色荧光, *AtCBL2* 带有红色荧光, 作为液泡膜定位的对照, 两者融合后呈现出黄色荧光。

Fig. 4 Subcellular localization of *MdSWEET1*. *MdSWEET1* fused to GFP, *AtCBL2* fused RFP and was used as vacuole located marker, when *MdSWEET1*-GFP and *AtCBL2*-RFP merged shows yellow fluorescence

## 2.2 ‘嘎拉’苹果中 *MdSWEET1* 的表达模式分析

基因的表达模式可以为分析基因的功能提供重要依据 (Kidokoro et al. 2015)。因此通过 qRT-PCR 的方法检测 *MdSWEET1* 在‘嘎拉’根、茎、叶、花、果中的表达量, 发现其在各器官中均有表达, 并且在茎和花中表达量较高 (图 5)。在茎中表达量约为根中表达量的 7.5 倍, 在花中表达量约为根中表达量的 2 倍。

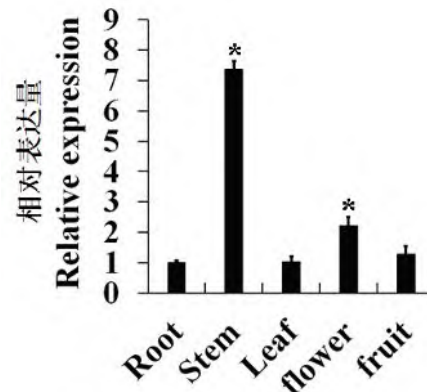


图 5 *MdSWEET1* 的组织表达分析

Fig. 5 Tissue expression pattern of *MdSWEET1*

\* $P < 0.05$ .

### 2.3 ‘嘎拉’苹果 *MdSWEET1* 对多种非生物胁迫的响应

可溶性糖的积累会影响到植物体内的渗透势，从而影响植物对各种非生物胁迫的抗性。分别用  $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、10% PEG、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 和 0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理‘嘎拉’组培苗 0、1、3 和 6h，定量检测 *MdSWEET1* 的基因表达量。结果显示 *MdSWEET1* 对多种胁迫均有响应（图 6），其中对盐的响应最为明显。在盐处理后 6 h 基因表达量急剧升高，约为 0 h 基因表达量的 50 倍（图 6, A）。这些结果说明 *MdSWEET1* 可能会参与盐胁迫的响应。

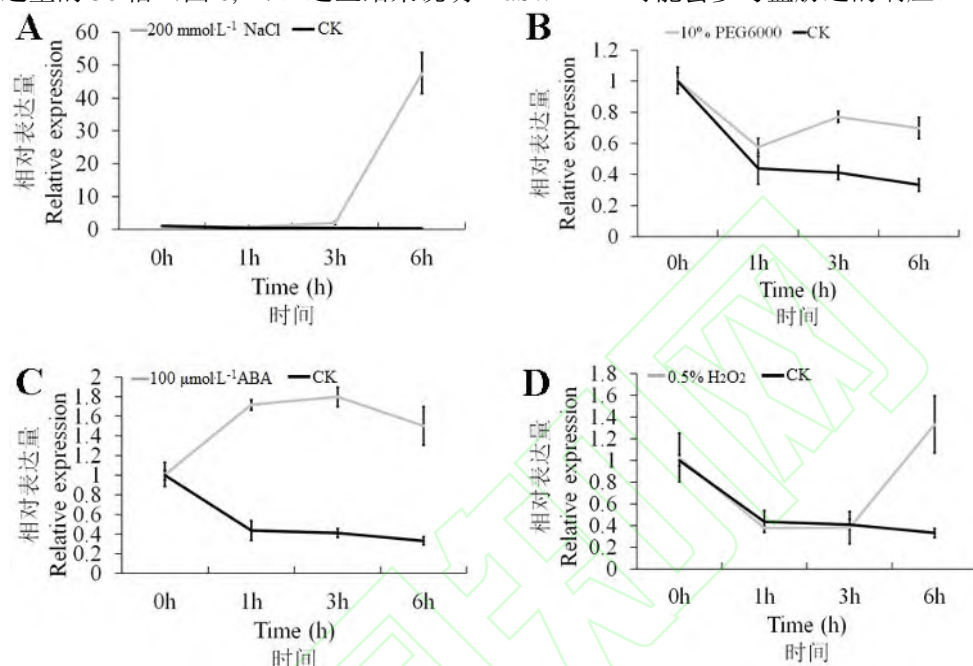


图 6 *MdSWEET1* 对多种胁迫的响应分析。

Fig. 6. Responses to various abiotic stresses of *MdSWEET1*

\* $P < 0.05$ .

### 2.4 *MdSWEET1* 在番茄中异源表达促进可溶性糖的积累

PCR 鉴定转基因番茄，结果显示，在野生型番茄中没有目的条带，在 *MdSWEET1* 转基因番茄中可以看到明显的目的条带（图 7）。用 qRT-PCR 的方法检测两个转基因株系中 *MdSWEET1* 的表达量，结果显示其基因表达量分别为野生型的 74 倍和 50 倍左右（图 8, A）。对转基因和野生型番茄检测可溶性糖含量和淀粉含量，转基因植株淀粉含量显著低于野生型（图 8, B），可溶性糖含量显著高于野生型（图 8, C）。以上数据说明 *MdSWEET1* 能促进可溶性糖的积累。

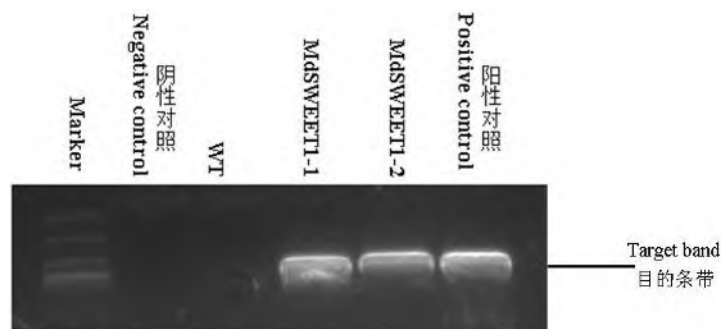


图 7 PCR 检测番茄转基因植株。

Fig. 7 PCR to identify two transgenic lines.

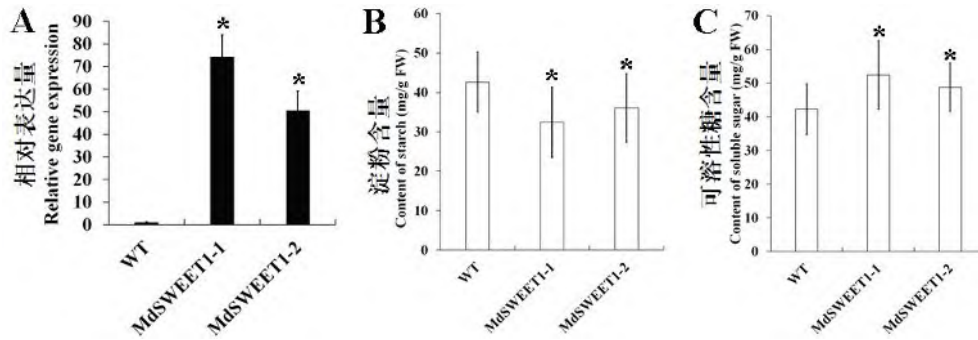


图 8 A. qRT-PCR 检测转基因番茄中 *MdSWEET1* 的表达量; B. 野生型及转基因株系淀粉含量; C. 野生型及转基因株系可溶性糖含量。

Fig. 8 A. Expression level of *MdSWEET1* in transgenic tomatoes by qRT-PCR, B. starch content of wild type and transgenic lines, C. soluble sugar content of wild type and transgenic lines

\* $P < 0.05$ . The data shown are the mean  $\pm$  SE.

## 2.5 *MdSWEET1* 在番茄中异位表达提高其耐盐性

转基因和野生型番茄在正常状态下生长 3 周后用 NaCl 溶液浇灌，每 3 天浇一次，NaCl 浓度从 200、250、300 到 400、500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  逐渐增加，约 20 d 后观察表型。发现转基因番茄比野生型有更强的耐盐性（图 9）。检测发现，野生型在盐胁迫下积累更多的 MDA，与转基因植株相比，盐处理后野生型植株的 MDA 含量比转基因多  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW 左右（图 10, A）；之后检测了超氧阴离子和过氧化氢的含量，结果显示盐处理后野生型和转基因番茄超氧阴离子含量显著上升，过氧化氢含量也明显增加，但是野生型增加的幅度明显是比转基因番茄增长的幅度要高。对于超氧阴离子的变化，野生型植株盐处理后超氧阴离子含量增加了  $128.8 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW，转基因植株分别增加了 33.1 和  $39.6 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  FW（图 10, B）。过氧化氢的变化与超氧阴离子变化类似，在盐处理后野生型与转基因番茄过氧化氢含量均出现增加的趋势，但是野生型比转基因番茄积累了更多的过氧化氢，野生型植株比原来的过氧化氢含量高 82%，而转基因植株分别比原来的含量高 59% 和 58.6%（图 10, C）。以上结果说明异源表达 *MdSWEET1* 能提高番茄耐盐性。

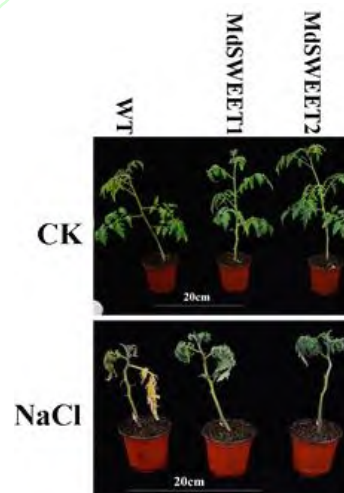


图 9 *MdSWEET1* 转基因番茄在盐胁迫下的表型。

Fig. 9 Phenotype of *MdSWEET1* transgenic tomato under salt stress.



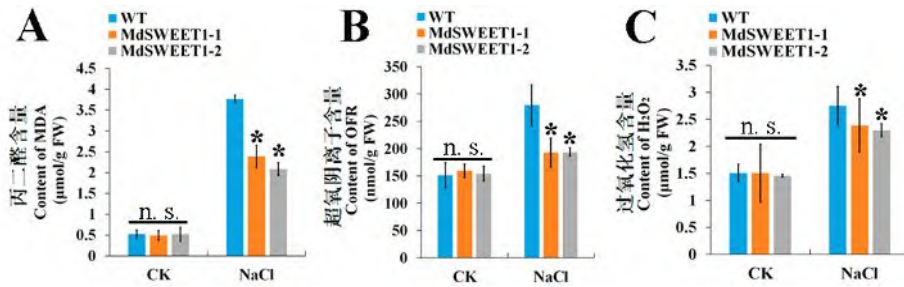


图 10 盐处理前后野生型及转基因植株 A. 丙二醛 (MDA); B. 超氧阴离子; C. 过氧化氢含量。

Fig. 10 A. Content of MDA, B. oxygen free radical (OFR), C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of WT and *MdSWEET1-1, 2* before and after salt treatment

\*P < 0.05.

## 2.6 MdSWEET1 通过影响蔗糖和果糖的积累提高番茄耐盐性

为研究 MdSWEET1 在糖转运过程中发挥的作用, 检测盐处理前后淀粉含量及可溶性糖含量的变化。未经盐处理的野生型植株淀粉含量比转基因植株淀粉含量高, 盐处理后野生型和转基因植株淀粉含量均下降, 但转基因植株淀粉含量下降幅度明显高于野生型。正常培养的野生型番茄可溶性糖含量比转基因番茄可溶性糖含量低, 盐处理后, 可溶性糖含量均增加, 但转基因番茄可溶性糖含量上升幅度比野生型植株高 (图 11, A、B)。检测葡萄糖含量发现, 盐处理后不论是野生型还是转基因番茄, 葡萄糖含量都有所增加, 但是增加的幅度相差不大 (图 11, C)。盐处理前野生型植株蔗糖含量比转基因植株蔗糖含量低, 盐处理后野生型番茄和转基因番茄中蔗糖含量均升高, 但野生型植株蔗糖含量的升高幅度明显比转基因植株蔗糖含量升高的幅度小 (图 11, D)。果糖含量的变化趋势与蔗糖变化趋势相似, 盐处理后转基因和野生型植株果糖含量升高, 但转基因番茄果糖含量的增加幅度明显高于野生型 (图 11, E)。以上结果说明 *MdSWEET1* 可能通过影响蔗糖和果糖的积累调节植物耐盐性。

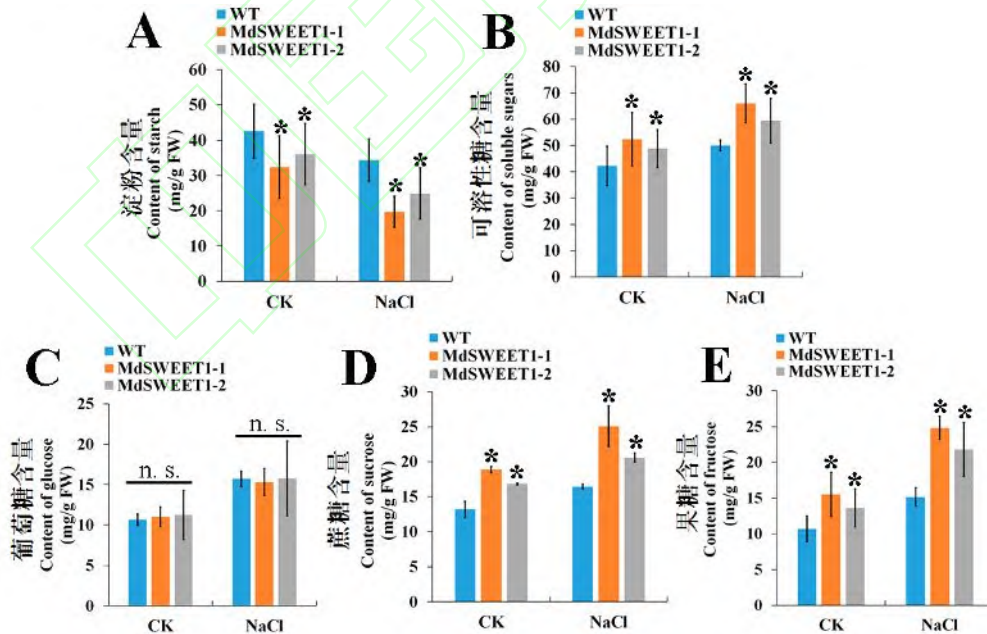


图 11 A. 野生型和转基因番茄盐处理前后淀粉含量的变化; B. 野生型和转基因番茄盐处理前后可溶性糖总量的变化; C-E. 野生型和转基因番茄盐处理前后葡萄糖、蔗糖、果糖含量的变化。

Fig. 11 A. Starch content of WT and transgenic lines for salt treatment. B. Total soluble sugar content of WT and transgenic lines for salt treatment. C-E. Content of glucose, sucrose and fructose of WT and transgenic lines for salt treatment

\*P < 0.05.

### 3 讨论

将苹果 *MdSWEET1* 基因在番茄中异源表达, 并获得了两株稳定遗传的转基因番茄做进一步的研究。研究发现在盐胁迫下转基因番茄积累了更多的可溶性糖, 特别是蔗糖和果糖, 并且转基因株系盐抗性高于野生型, 这些结果说明 *MdSWEET1* 可能通过调节蔗糖和果糖的积累来提高植物的耐盐性。

世界上大约有 20% 的土地受到盐碱胁迫的影响, 并且这一趋势将会越来越严重 (Zhao et al., 2014; Zhang et al., 2016)。土壤盐碱化严重制约着土地利用率和作物生产力 (Wang et al., 2016)。为应对盐胁迫, 植物进化出了很多机制: 一种是液泡中储存  $\text{Na}^+$  以保证胞质中  $\text{Na}^+$  浓度不至于过高, 造成离子毒害, 另一种是通过渗透调节物排除  $\text{Na}^+$  或  $\text{Cl}^-$  (Shabala et al., 2013)。渗透调节物可以提高胞质渗透压, 从而维持细胞膨压 (Blum et al., 1983)。

前人研究发现渗透调节物主要包括脯氨酸、游离氨基酸、可溶性蛋白和可溶性糖等 (Hajlaoui et al., 2010)。非生物胁迫如干旱、盐、低温等会引起糖在植物体内的积累 (Krasensky et al., 2012)。有研究发现盐胁迫下葡萄糖、蔗糖和果糖的积累在碳的储存、渗透调节和体内平衡以及清除自由基等方面起着非常重要的作用 (Singh et al., 2015)。水稻中葡萄糖和果糖与渗透压的调节及活性氧的清除有关 (Pattanagul & Thitisaksakul, 2008)。

SWEET 是一类糖转运蛋白, 对葡萄糖、蔗糖和果糖都有转运功能。尖叶石竹 *DsSWEET12* 和 *DsSWEET17* 基因在拟南芥中异源表达, 果糖和葡萄糖含量增加, 过表达这两个基因影响了糖代谢, 从而影响了果糖和葡萄糖的积累 (Zhou et al., 2018a, 2018b), 拟南芥中 *AtSWEET12* 和 *AtSWEET17* 也可以影响果糖的转运 (Chardon et al., 2013)。本研究发现, *MdSWEET1* 是定位于液泡膜的糖转运蛋白, 番茄中异源表达 *MdSWEET1* 提高果糖和蔗糖含量, 同时耐盐性也提高, 推测 *MdSWEET1* 通过影响果糖和蔗糖的积累提高植物盐抗性。

果实中糖含量是影响果实品质的重要因素之一, 苹果果实中的可溶性糖主要包括蔗糖、果糖和葡萄糖, 而果糖是它们之中最甜的 (王永章 张大鹏, 2000; 王海波 等, 2007)。本研究发现 *MdSWEET1* 能调节蔗糖和果糖的积累, 所以猜测 *MdSWEET1* 可能会影响果实品质。

苹果是温带地区主要的经济果实之一, 其生长发育受到各种非生物胁迫 (盐、干旱, 低温等) 的影响, 因此, 研究如何提高苹果对各种非生物胁迫的抗性意义重大。本研究通过在番茄中异源表达苹果 *MdSWEET1* 基因, 发现该基因可以通过调节蔗糖和果糖的积累提高植物耐盐性, 为进一步开展苹果改良育种等发面奠定了理论基础。

### References

- Baker R F, Leach K A, Braun D M. 2012. SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Molecular Plant*, 5: 766-768.
- Blum A, Mayer J, Gozlan G. 1983. Association between plant production and some physiological components of drought resistance in wheat. *Plant Cell & Environment*, 6: 219-225.
- Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens P A, Spinner L, Clement G, Chietera G, Leran S, Ferrand M, Lacombe B, Loudet O, Dinant S, Bellini C, Neuhaus H E, Daniel V F, Krapp A. 2013. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 23: 697-702.
- Chen L Q. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 335:207-211.
- Chen L Q, Hou B H, Lalonde S. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468: 527-532.
- Chen L Q, Lin I W, Qu X Q, Sosso D, Mcfarlane H E, Londoño A, Samuels A L, Frommer W B. 2015. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *The Plant Cell*, 27: 607.
- Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens P A, Spinner L, Clement G, Chietera G, Leran S, Ferrand M, Lacombe B, Loudet O, Dinant S, Bellini C, Neuhaus H E, Daniel V F, Krapp A. 2013. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 23: 697-702.

- Gill P K, Sharma A D, Singh P, Bhullar S S. 2003. Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 40: 157-162.
- Hajlaoui H, Ayebe N E, Garrec J P, Denden M. 2010. Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. *Industrial Crops and Products*, 31: 122-130.
- Hir R L, Spinner L, Klemens P A W, Chakraborti D, Marco F D, Vilaine F O, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Gery C, Teoule E, Chabout S, Mouille G, Neuhaus H E, Dinant S, Bellini C. 2015. Disruption of the Sugar Transporters *AtSWEET11* and *AtSWEET12* Affects Vascular Development and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 8: 1687-1690.
- Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, Moriwaki T, Maruyama K, Mizoi J, Myint P, Fujita Y, Sekita S, Shinozaki K. 2015. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 81: 505-518.
- Klemens P A W, Patzke K, Deitmer J, Spinner L, Hir R L, Catherine B C, Bedu M, Chardon F, Krapp A, Neuhaus H E. 2013. Overexpression of the vacuolar sugar carrier *AtSWEET16* modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 163: 1338-1352.
- Krasensky J, Jonak C. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1593-1608.
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 65: 799-807.
- Lu J, Liu X, Ma Q J, Kang H, Liu Y J, Hao Y J, You C X. 2019. Molecular cloning and functional characterization of the Aluminum activated malate transporter gene *MdALMT14*. *Scientia Horticulturae*, 244: 208-217.
- Ohto M A, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K. 2001. Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127: 252-261.
- Pattanagul W, Thitisaksakul M. 2008. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Journal of Experimental Biology*, 46:10.
- Prado F E, Boero C, Gallardo M, González J A. 2000. Effect of NaCl on germination, growth, and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. Seeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41 (1): 27-34.
- Qi Chun-fang, Wang Ting, Liu Xia-yu, Shi Xiao-wen, Yu Zhi-qin, Liu Shi-fang, Liang Jian-ping, Jia Xiao-yun. 2018. Study on improvement of tomato genetic transformation and screening and identification. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 27: 554-561. (in Chinese)
- 祁春芳, 王婷, 刘霞宇, 石晓雯, 于治芹, 刘世芳, 梁建萍, 贾小云. 2018. 番茄遗传转化与筛选鉴定的改进研究. *西北农业学报*, 27:554-561.
- Rahnama H, Ebrahimzadeh H. 2004. The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26: 263-270.
- Ranganayakulu G S, Veeranagamallaiah G, Sudhakar C. 2013. Effect of salt stress on osmolyte accumulation in two groundnut cultivars (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting salt tolerance. *African Journal of Plant Science*, 7: 586-592.
- Rae A, Perroux, J M, Grof C P L. 2005. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta*, 220 (6): 817-825.
- Rosa M, Hilal M, González J A, Prado F E. 2004. Changes in soluble carbohydrates and related enzymes induced by low temperature during early developmental stages of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 161: 683-689.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57(1): 675-709.
- Seo P J, Park J M, Kang S K, Kim S G, Park C M. 2011. An *Arabidopsis* senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta*, 233: 189-200.
- Shabala S. 2013. Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot-London*, 112: 1209-1221.

- Singh M, Kumar J, Singh S, Singh V P, Prasad S M. 2015. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews Environmental Science and Biology*, 14: 407-426.
- Siringam K, Juntawong N, Cha-um S, Kirdmanee C. 2011. Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) roots under osmotic conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1340-1346.
- Sun M X, Huang X Y, Yang J, Guan Y F, Yang Z N. 2013. Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reproduction*, 26: 83-91.
- Talbot N J. 2010. Raiding the sweet shop. *Nature*, 468: 527-532.
- Wang Yong-zhang, Zhang Da-peng. 2000. Regulating effects of ethylene on carbohydrate metabolism in apple fruit during the ripening period. *Acta Horticulturae Sinica*, 27: 391-395. (in Chinese)
- 王永章, 张大鹏. 2000. 乙烯对成熟期红星苹果果实碳水化合物代谢的调控. *园艺学报*, 27: 391-395.
- Wang Hai-bo, Chen Xue-sen, Xin Pei-gang, Zhang Xiao-yan, Ci Zhi-juan, Shi Jun, Zhang Hong. 2007. Study on sugar and acid constituents in several early apple cultivars and evaluation of their flavor quality. *Journal of Fruit Science*, 24: 513-516. (in Chinese)
- 王海波, 陈学森, 辛培刚, 张晓燕, 慈志娟, 石俊, 张红. 2007. 几个早熟果品种果实糖酸组分及风味品质的评价. *园艺学报*, 24: 513-516.
- Wang Bao-shan. 2010. *Adverse plant biology*. Beijing: Higher Education Press.
- 王宝山. 2010. *逆境植物生物学*. 北京: 高等教育出版社.
- Zhao Shi-jie, Xu Chang-cheng, Zou Qi, Meng Qing-wei. 1994. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. *Plant Physiol Commun*, 30: 207-210. (in Chinese)
- 赵世杰, 许长成, 邹琦, 孟庆伟. 1994. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. *植物生理学通讯*, 30: 207-210.
- Zhang X X, Shi Z Q, Tian Y J, Zhou Q, Cai J, Dai T B, Cao W X, Pu H C, Jiang D. 2016. Salt stress increases content and size of glutenin macropolymers in wheat grain. *Food Chemistry*, 197: 516-521.
- Zhao X Y, Bian X Y, Li Z X, Wang X W, Yang C J, Liu G F, Jiang J, Kentbayev Y, Kentbayeva B, Yang C P. 2014. Genetic stability analysis of introduced *Betula pendula*, *Betula kirghisorum*, and *Betula pubescens* families in saline-alkali soil of northeastern China. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 29: 639-649.
- Zhou A, Ma H, Feng S, Gong S, Wang J G. 2018a. A novel sugar transporter from *Dianthus spiculifolius*, *DsSWEET12*, affects sugar metabolism and confers osmotic and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2):497.
- Zhou A, Ma H, Feng S, Gong S, Wang J G. 2018b. *DsSWEET17*, a tonoplast-localized sugar transporter from *Dianthus spiculifolius*, affects sugar metabolism and confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (6): 1564.