

## 木薯糖转运蛋白 *MeSWEET18* 的克隆与功能分析

薛晶晶, 安飞飞, 朱文丽, 罗秀芹\*

中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 海南海口 571101

**摘要:** 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是热带亚热带地区重要的粮食作物。而 SWEET 家族基因在植物运输糖类、生殖和发育、植物逆境、与病原体互作等方面发挥着重要作用。为了明确 SWEET 家族基因在木薯生长发育过程中的功能, 本研究以木薯华南 9 号 (SC9) 作为实验材料, 克隆糖转运蛋白基因 *MeSWEET18* 并进行生物信息学分析, 通过酵母实验验证其糖转运能力; 采用 qRT-PCR 分析该基因在木薯不同器官及不同发育时期的表达情况以及在非生物胁迫下的表达趋势。结果表明: *MeSWEET18* 基因开放阅读框为 714 bp, 编码 237 个氨基酸, 蛋白分子质量为 25.94 kDa, 理论等电点为 6.57, 不稳定系数为 37.50, 属于稳定类蛋白。*MeSWEET18* 蛋白 N 端含有保守结构域 MtN3\_slv, C 端含有 PQ-loop super family 保守结构域, 且具有 7 个跨膜结构域, 是典型的膜蛋白。ProtScale 预测表明 *MeSWEET18* 蛋白属于亲水性蛋白。系统进化树分析发现 *MeSWEET18* 属于 CladeIV 亚类, 与 *AtSWEET16*、*AtSWEET17* 亲缘关系最近; 氨基酸序列同源分析显示, *MeSWEET18* 和 *AtSWEET16* 的同源性达到 53.23%, *MeSWEET18* 和 *AtSWEET17* 的同源性达到 56.05%。酵母功能互补试验显示 *MeSWEET18* 主要转运果糖。qRT-PCR 结果表明, 随着木薯的生长发育, *MeSWEET18* 在膨大期的块根中表达水平最高, 成熟期时急剧下降; 而在叶片、叶柄和茎秆中的表达水平随着木薯的发育呈上升趋势, 至成熟期达到最大值。黑暗条件下, 蔗糖、葡萄糖和果糖溶液对 SC9 水培苗的处理结果显示, *MeSWEET18* 受果糖影响明显。对 SC9 水培苗进行高盐 (8 g/L NaCl)、干旱 (100 mmol/L 甘露醇)、氧化 (10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 和低温 (15 °C 24 h, 后降至 4 °C 24 h) 等非生物胁迫, 结果发现, *MeSWEET18* 在叶片、叶柄、茎秆和根等不同器官的表达出现不同程度的变化。推测 *MeSWEET18* 在木薯的非生物胁迫中起着重要作用。

**关键词:** 木薯; 糖转运蛋白; 功能分析; 糖转运能力; 非生物胁迫

中图分类号: S533 文献标识码: A

## Cloning and Functional Analysis of Sugar Transporter *MeSWEET18* in Cassava

XUE Jingjing, AN Feifei, ZHU Wenli, LUO Xiuqin\*

Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Conservation and Utilization for Cassava Germplasm Resources, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important food crop in tropical and subtropical areas. SWEETs participate in a variety of plant activities, including sugar transport, reproduction and development, plant stress, and interaction with pathogens, which play an important role in plant development. In order to clarify the function of SWEET in the growth and development of cassava, sugar transporter *MeSWEET18* was cloned from Cassava South China 9 (SC9) for bioinformatics analysis and verified sugar transport capacity by yeast experiment in this study. The expression trend of *MeSWEET18* in cassava in different organ, different developmental stages and under abiotic stress were determined via qRT-PCR method. *MeSWEET18* contained a 714 bp open reading frame (ORF) encoding a protein of 237 amino acids residues with predicted molecular mass of 25.94 kDa and theoretical isoelectric point of 6.57. Through instability index (II) analysis by ProtParam, the instability index (II) of the protein encoded by *MeSWEET18* was 37.50, indicating

收稿日期 2022-06-21; 修回日期 2022-08-24

基金项目 海南省基础与应用基础研究计划 (自然科学领域) 高层次人才项目 (No. 2019RC314)。

作者简介 薛晶晶 (1983—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 木薯糖代谢。\*通信作者 (Corresponding author): 罗秀芹 (LUO Xiuqin), E-mail: xiuqinluo@163.com。

the protein of MeSWEET18 as stable. MeSWEET18 was a typical membrane protein with a conserved domain MtN3\_slv at the N-terminal and a PQ-Loop Super family conserved domain at the C-terminal and seven transmembrane domains. ProtScale predicted that MeSWEET18 was a hydrophilic protein. Phylogenetic tree analysis revealed that MeSWEET18 belonged to Clade IV. MeSWEET18 was in the same evolutionary tree as AtSWEET16 and AtSWEET17. Alignment of amino acid sequences revealed 53.23% homology between MeSWEET18 and AtSWEET16, and 56.05% homology between MeSWEET18 and AtSWEET17. Yeast functional complementarity tests showed that *MeSWEET18* primarily transported fructose. qRT-PCR analysis showed that *MeSWEET18* was highly expressed in tuberous roots during the expansion and decreased sharply at maturity of cassava tuberous roots, while the expression levels in leaf, petiole and stem increased with the development of cassava, and reached the maximum at the maturity stage of cassava. qRT-PCR analysis showed that *MeSWEET18* was significantly affected by fructose when the hydroponic seedlings of SC9 were treated with sucrose, glucose and fructose solutions under dark conditions. The hydroponic seedlings of SC9 were subjected to abiotic stress including high salt (8 g/L NaCl) stress, drought (100 mmol/L mannitol) stress, oxidation (10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stress and low temperature (15 °C for 24 h, then reduced to 4 °C for 24 h) stress. The results show that *MeSWEET18* is expressed differently in leaf, petiole, stem and root under abiotic stress. It can be speculated that *MeSWEET18* play an important role under abiotic stress in cassava.

**Keywords:** cassava; sugar transporter; function analysis; sugar transport capacity; abiotic stress

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.06.001

蔗糖是大多数植物光合作用的主要碳水化合物,从叶片向各库器官长距离运输,促使根、花、果实和种子生长发育<sup>[1]</sup>。叶绿体通过光合作用合成蔗糖,蔗糖通过胞间连丝进入韧皮部薄壁细胞组织,由 SWEET(sugar will eventually be exported transporter)蛋白卸载至质外体,再通过 SUT(sucrose transporter)蛋白转运至伴胞细胞和筛管分子,然后由定位于筛分子细胞-伴胞复合体上的 H<sup>+</sup>共转运蛋白通过质子动力势将同化物送进韧皮部进入长距离运输。

SWEET 蛋白属于 MtN3/saliva 基因家族,也称为 MtN3/saliva/SWEET,可以转运己糖和蔗糖,并介导糖外流到质外体,是糖转运蛋白中的一员,含有 2 个 MtN3/saliva 跨膜螺旋结构域。已测序的植物基因组中均有发现 SWEET 家族成员。绿色荧光蛋白融合研究发现,大部分植物 SWEETs 家族基因位于细胞质膜上<sup>[2-3]</sup>。根据 SWEETs 蛋白转运糖的类型不同,所有 SWEETs 蛋白都可以分成 4 个分支,第一分支和第二分支 SWEET 蛋白主要选择转运己糖,尤其是葡萄糖;第三分支 SWEET 蛋白优先跨膜转运蔗糖;第四分支的 SWEET 蛋白主要介导果糖的转运<sup>[4]</sup>。同 SUT 一样, SWEET 可以自身互作形成同聚物,也能相互之间形成异聚体,进而形成更大的通道提高转运效率<sup>[5]</sup>。SWEETs 家族基因在植物运输糖类、生殖和发育、植物逆境、与病原体互作等方面发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是热带亚热

带地区重要的粮食作物<sup>[7]</sup>。木薯 SWEET 家族共有 28 个同源基因, COHN 等<sup>[8]</sup>发现地毯黄单胞菌的毒力可以通过转录激活因子 *TAL20Xam668* 特异性诱导木薯 *MeSWEET10a* 的表达,并最终导致木薯细菌性枯萎病的蔓延。胡梅珍<sup>[9]</sup>、薛蓓蓓等<sup>[10]</sup>对木薯 SWEET 家族基因进行生物信息学分析,明确其对己糖的转运能力以及不同木薯种质的表达情况。刘秦等<sup>[11]</sup>克隆了木薯 *MeSWEET1* 基因,并将其定位于细胞膜上,组织特异性分析发现,成熟叶片中相对表达量最高。朱柏光等<sup>[12]</sup>分析木薯 *MeSWEET3b* 的糖转运能力,发现其转运半乳糖,且受木薯黄单胞菌(Xam)的诱导。未发现木薯其他 SWEET 蛋白的功能研究。木薯 *MeSWEET18* 在不同组织器官中均具有较高的表达水平<sup>[13]</sup>,可能在木薯的生长发育及逆境胁迫中起着重要作用。因此,本研究以木薯 *MeSWEET18* (Manes. 15G011300) 为研究对象,通过克隆、体外验证以及非生物胁迫等方法,研究该基因在木薯中的功能,为木薯 SWEET 基因家族相关成员的功能研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采用生长于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质资源圃华南 9 号(SC9)品种作为研究材料。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 总 RNA 提取

参照 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen) 的操作说明进行, 用 Dnase I 柱上消化 RNA 样品中残留的微量 DNA。用 1  $\mu$ g RNA 逆转录合成第一链 cDNA。cDNA 第一链合成参照 RevertAid RT 逆转录试剂盒 (Thermo) 的操作说明进行。

1.2.2 *MeSWEET18* 基因全长 cDNA 扩增 以 Phytozome12.0 中 *Manihot esculenta* v7.1 (cassava) 数据库的 *MeSWEET18* 序列设计引物 (5'-TTGAA GAAGTTGTTTCATTTTC-3'和 5'-TCAACTCCCTGG CCCTTACT-3'), 采用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 进行 cDNA 序列的克隆。全长 cDNA 的扩增体系含 PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L、*MeSWEET18*-F (10  $\mu$ mol/L) 2.5  $\mu$ L、*MeSWEET18*-R (10  $\mu$ mol/L) 2.5  $\mu$ L、cDNA 模板 0.5  $\mu$ L、无菌水补足至 50  $\mu$ L。扩增程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s、56  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 回收纯化目的条带, 克隆至 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 载体 (TransGen) 上测序。

1.2.3 生物信息学分析 利用 NCBI 网站 ORF Finder 软件对获得的 SC9 cDNA 序列进行开放阅读框 (ORF) 预测, 同时翻译成蛋白序列。利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 软件分析该蛋白的分子量与等电点; 采用 NCBI 在线软件 CDD 分析蛋白的保守结构域; 采用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 在线软件进行跨膜结构域分析; 运用 PSORT 在线软件对该蛋白进行亚细胞定位预测; 运用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线软件预测该氨基酸序列的疏水性/亲水性; 利用 SOPMA SECONDARYSTRUCTURE PREDICTIONMETHOD ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopm.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopm.pl)) 在线软件预测蛋白的二级结构。从 NCBI 和 Phytozome12.0 数据库下载木薯和拟南芥 SWEET 蛋白家族基因, 利用 MEGA6 软件, 选择 neighbour-joining (NJ) 模型, 并进行 1000 次 bootstrap 统计学检验, 构建包括 *MeSWEET18* 蛋白序列在内的木薯和拟南芥 SWEET 蛋白的系统进化树。

1.2.4 不同生育期的实时荧光定量 PCR 分析 分别取 SC9 形成期 (植后 4 个月)、膨大期 (植后 7 个月) 及成熟期 (植后 10 个月) 叶片、叶柄、

茎秆和块根作为研究材料。每个材料每个生育期随机选取 3 株, 混合保存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中, 3 次重复。利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen) 提取 RNA。然后取 1  $\mu$ g RNA, 逆转录合成第一链 cDNA, 稀释 10 倍后作为实时荧光定量 PCR 分析的模板。

采用 Thermo 公司的 CFX 实时荧光定量 PCR 系统, 实验操作按仪器使用说明书进行。10  $\mu$ L 反应体系中, 包含 1  $\mu$ L 模板、5  $\mu$ L 2 $\times$ SYBR Premix、10  $\mu$ mol/L qPCR-*MeSWEET18*-F 和 qPCR-*MeSWEET18*-R 引物 (5'-GGAGTTTGAGAGTCTT CCTTATGTG-3'和 5'-GAGTTACATAGACGATTT CCACCAG-3') 各 0.4  $\mu$ L、无菌水补足至 10  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C 10 s、60  $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环, 循环完成后进行产物溶解曲线分析。以 *MeActin* 作为内参基因 (5'-TGA TGAGTCTGGTCCATCCA-3'和 5'-CCTCCTACG ACCCAATCTCA-3'), 以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  算法进行基因的相对定量表达。采用 Dunnett's 法对同一部位不同发育期的相对表达结果进行统计分析。

1.2.5 *MeSWEET18* 的糖转运特性分析 EBY.VW4000 酵母是一种己糖转运功能缺陷型酵母突变体, 此菌株无法在己糖为唯一碳源的尿嘧啶 (ura) 缺陷型选择培养基 SD-ura 平板上生长, 可以在麦芽糖为唯一碳源的选择培养基 SD-ura 平板上恢复生长<sup>[14]</sup>。运用包含 pDR196 表达载体序列的引物 (5'-ATATACCCCAGCCTCGATG GAAATCTTGAGTTTG-3'和 5'-CGATAAGCTT GATATCTTATTCCGATGA-TGGAGAT-3') 扩增 *MeSWEET18* 的 CDS 序列, 采用 DNA 无缝克隆技术将 *MeSWEET18* 的 CDS 序列与酵母表达载体 pDR196 进行重组, 获得 *MeSWEET18*-pDR196 表达载体, 使用聚乙二醇/醋酸锂高效酵母转化法将重组后的 *MeSWEET18*-pDR196 质粒转化到 EBY.VW4000 酵母菌中。利用含有 2% 麦芽糖的 SD-ura 培养基过夜培养至  $OD_{600}$  约 1.0, 然后连续稀释至  $OD_{600}$  分别约 0.1、0.01、0.001, 分别涂布于含有 2% 麦芽糖、2% 葡萄糖、2% 果糖等不同糖源的缺陷型选择培养基 SD-ura 平板上, 30  $^{\circ}$ C, 倒置培养 3~5 d, 观察生长情况。

1.2.6 *MeSWEET18* 在不同糖处理下的表达分析 将生长 20 d 左右的 SC9 水培苗, 于黑暗条件下进行不同糖源的暗处理。以未进行处理的 SC9 水培苗作为对照, 分别添加水、2% 蔗糖、2% 葡萄糖、

2%果糖的溶液中分别培养 2 d 和 5 d, 每个时间点不同处理随机选取 3 株, 混合保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 3 次重复, 进行实时荧光定量 PCR 分析。

1.2.7 *MeSWEET18* 在 SC9 非生物胁迫下的表达分析 将 SC9 茎秆水培 20 d 后, 分别进行盐胁迫 ( $8\text{ g/L NaCl}$ )、干旱胁迫 ( $100\text{ mmol/L}$  甘露醇)、氧化胁迫 ( $10\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 处理, 各处理时间分别为 0 (CK)、12、24、36 h。低温处理采用  $15^{\circ}\text{C}$  24 h, 后降至  $4^{\circ}\text{C}$  24 h。分别取叶片、叶柄、茎秆和根 4 个部位的样品, 保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 3 次重复, 进行实时荧光定量 PCR 分析。

### 1.3 数据处理

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析、作图以及 Dunnett's 检验 ( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MeSWEET18* 基因全长 CDS 克隆及蛋白质结构特性分析

通过 RT-PCR 扩增及测序, 获得 *MeSWEET18* 基因编码框序列 714 bp, 编码 237 个氨基酸 (图 1), 蛋白分子质量为 25.94 kDa, 理论等电点为 6.57, 不稳定系数为 37.50, 属于稳定类蛋白。通过 NCBI 在线软件 CDD 分析发现, 该蛋白含有 2 个保守结构域, 在 N 端含有植物 SWEET 家族基因共有的保守结构域 MtN3\_slv, C 端含有 PQ-loop super family 保守结构域。TMHMM Server v.2.0 在线软件预测显示, 该蛋白含有 7 个跨膜结构域, 是典型的膜蛋白; PSORT 分析显示, *MeSWEET18* 定位于液泡的可能性为 85.71%; ProtScale 预测表明, *MeSWEET18* 蛋白属于亲水性蛋白; SOPMA 分析显示, *MeSWEET18* 蛋白二级结构由 44.30%  $\alpha$ -螺旋、20.68% 延伸链、3.38%  $\beta$ -转角和 31.65% 无规则卷曲组成。

### 2.2 *MeSWEET18* 的系统进化树分析

已发表的拟南芥和葡萄树 SWEET 蛋白进化树分析结果显示, SWEET 蛋白可以划分为 4 个亚类<sup>[4, 15]</sup>。对木薯和拟南芥的 SWEET 蛋白进行系统进化树分析, 发现木薯 *MeSWEET18* 与拟南芥的 *AtSWEET16* 和 *AtSWEET17* 位于同一进化枝上, 属于 Clade IV, 该亚类共含有 6 个木薯 SWEET 基因(图 2)。采用 DNAMAN 软件对 *MeSWEET18*、*AtSWEET16* 和 *AtSWEET17* 氨基酸序列进行对比, 结果显示: *MeSWEET18* 和 *AtSWEET16* 的

```

1  ATGGAATCTTGAGTTGCTTTTTGGAGTCATAGGCAACGTGATC
   M E I L S L L F G V I G N V I
46  TCAGTGCTCATGTTTCTTTCCAGCTGGAACATTTGGAGAATA
   S V L M F L S P A G T F W R I
91  GTAAAGCACGGATCTACAGAGGAGTTGAGAGTCTTCTTATGTG
   V K H G S T E E F E S L P Y V
136  TGCACGTTACTGAATGCAGCTTTGTGGACCTACTATGGGATCATC
   C T L L N A A L W T Y Y G I I
181  AAGCCAGGAGCTTCTTAGTTGCCACAGTTAATGGTTTGGGATC
   K P G A F L V A T V N G F G I
226  CTGGTGGAAATCGTCTATGTAACCTATTCTTATATATGCACCA
   L V E I V Y V T L F L I Y A P
271  CTCAAAATGAGGGCTAAAACATGGATTCTTCTGGGTTGTTGGAT
   L K M R A K T W I L L G L L D
316  GTGGTTTCCCAGCAGCAGCCATTCTGGTTACCGCGGTAGCATTG
   V G F P A A A I L V T R L A L
361  CAGGGTCAAGTACGGATTGATGCAACAGGGTTCATGTGTGCTGGA
   Q G Q V R I D A T G F M C A G
406  CTCAAATCGTTATGTATGGTTCGCTCTCGCTGCCATGAAAACA
   L N I V M Y G S P L A A M K T
451  GTGTCACTACCAAGAGTGTGGAGTTCATGCCCTTCTCCTCTCT
   V V T T K S V E F M P F L L S
496  TTCTTCTTTTTTGAACGGTGGCGTTTGGACTTATATGCATTT
   F F L F L N G G V W T L Y A F
541  CTCCAACTGATTATTTCTTGGGGTCCAAATGGGGCTGGATTT
   L T T D Y F L G V P N G A G F
586  TTACTTGGAGCAGCAGCTAGTGCTTTATGCGATTACAGAAAC
   L L G A A Q L V L Y A I Y R N
631  GCCAAGCCTCCAGAACGTTTCTGATGGGCTGAAGAAGGATGG
   A K P S R N V S D G L E E G W
676  CAATACCAAAACCTTATCTCATCTCCATCATCGGAATAA
   Q Y Q N L I S S P S S E *

```

\*表示终止密码子, 下划线表示保守结构域 PQ-loop superfamily。

\* represents stop codon, underline represents conserved domains PQ-loop superfamily.

图 1 *MeSWEET18* 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and derived amino acid sequences of *MeSWEET18*

同源性达到 53.23%, *MeSWEET18* 和 *AtSWEET17* 的同源性达到 56.05%, 含有 2 个明显的 PQ-loop superfamily 保守结构域。

### 2.3 不同生育期 *MeSWEET18* 的表达分析

分析 *MeSWEET18* 在 SC9 形成期、膨大期及成熟期叶片、叶柄、茎秆和块根的表达情况。结果显示: *MeSWEET18* 在叶片中的表达随着木薯的生长表现为先上升后下降; 在叶柄中的表达随着木薯的生长持续上升, 在成熟期达到最大; 形成期和膨大期的茎秆表达无差异, 成熟期呈上升趋势; *MeSWEET18* 在块根膨大期表达量最高, 随着木薯生长, 表达量低于木薯形成期 (图 3)。

### 2.4 *MeSWEET18* 的糖转运特性分析

为了验证 *MeSWEET18* 的糖转运特性, 将其转化至己糖转运缺陷型酵母 EBY.VW4000 中, 该

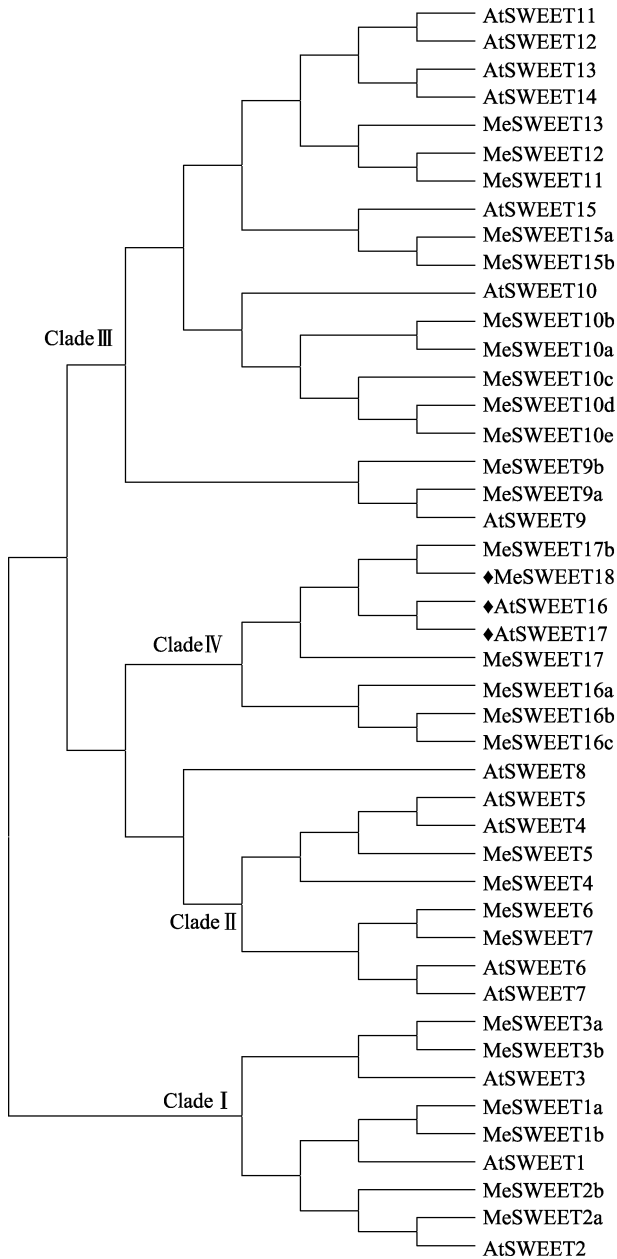
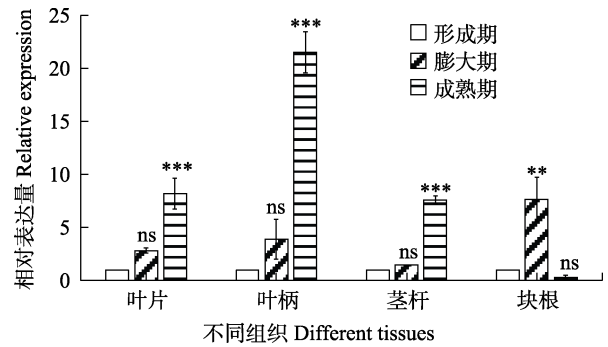


图 2 *MeSWEET18* 的系统进化树  
Fig. 2 Phylogenetic analysis of *MeSWEET18*



ns 表示无显著差异 ( $P>0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P<0.01$ ), \*\*\*表示差异极显著 ( $P<0.001$ ).  
ns indicates no significant difference ( $P>0.05$ ), \*\* indicates extremely significant difference ( $P<0.01$ ), \*\*\* indicates extremely significant difference ( $P<0.001$ ).

图 3 *MeSWEET18* 在不同发育期的表达分析  
Fig. 3 Expression analysis of *MeSWEET18* at different developmental stages

酵母无法在己糖为唯一碳源的尿嘧啶缺陷型 SD-ura 选择培养基上生长, 但是可以在麦芽糖为唯一碳源的培养基上恢复生长(图 4)。结果表明, *MeSWEET18* 可以转运果糖, 但不能转运葡萄糖, 脱氧-2-葡萄糖的添加对 *MeSWEET18* 无影响。

### 2.5 *MeSWEET18* 在不同糖处理下的表达分析

以未进行黑暗处理的 SC9 水培苗作为对照, 黑暗下分别添加水、2%蔗糖、2%葡萄糖和 2%果糖的溶液进行处理 2 d 和 5 d。黑暗条件下, *MeSWEET18* 在不同糖处理下的表达水平显示, 黑暗处理 2 d 时, 水、2%蔗糖、2%葡萄糖和 2%果糖处理对 *MeSWEET18* 的表达均有影响; 随着黑暗处理时间延长到 5 d, *MeSWEET18* 的表达在不同糖处理下表达呈极显著下降趋势(图 5)。

### 2.6 *MeSWEET18* 在非生物胁迫下的表达分析

将 SC9 进行水培培养 20 d 后, 进行盐、干旱、氧化以及低温胁迫, 各胁迫处理时间为 0、12、

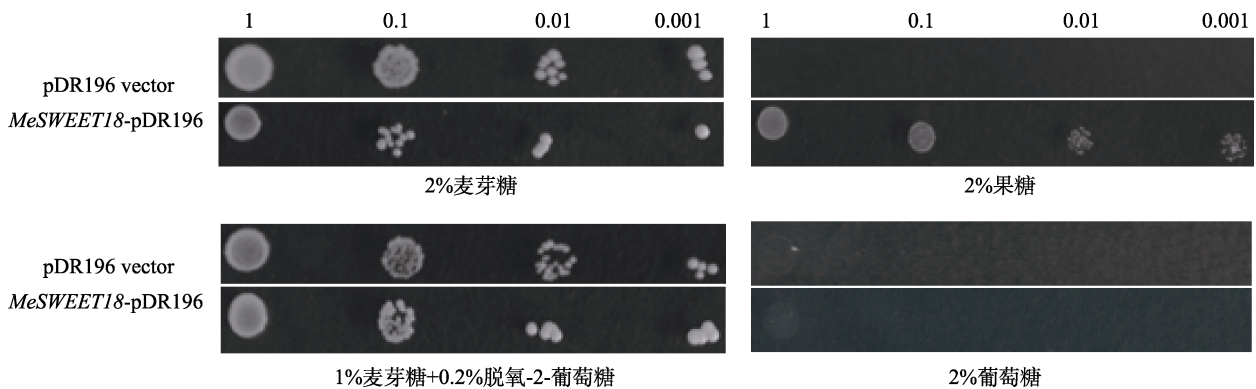
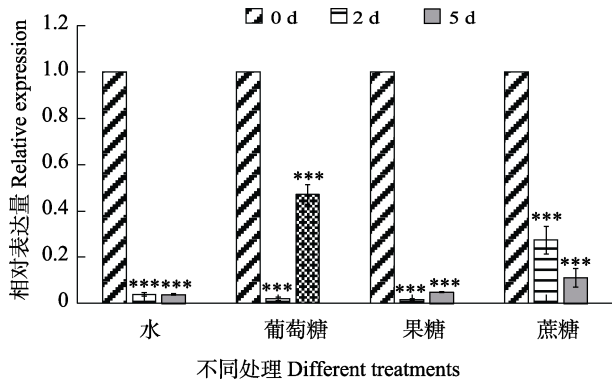


图 4 *MeSWEET18* 在酵母 *EBY.VW4000* 中的功能互补试验

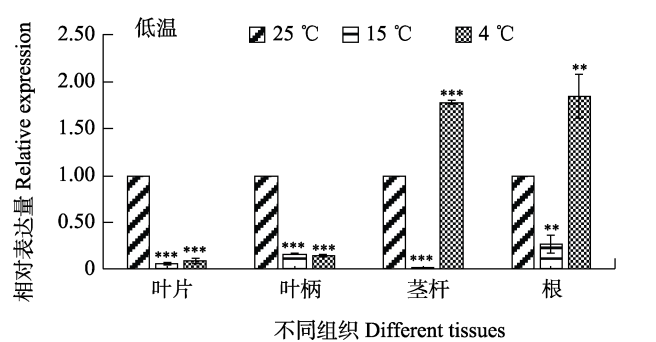
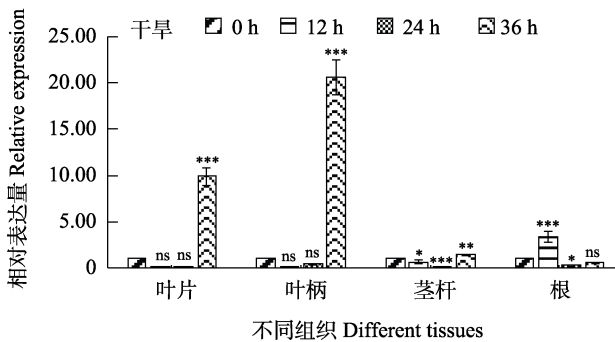
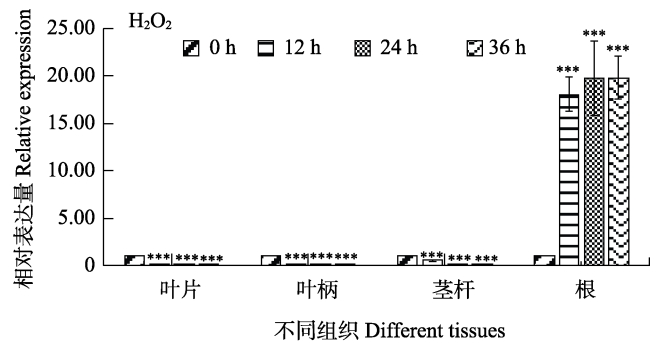
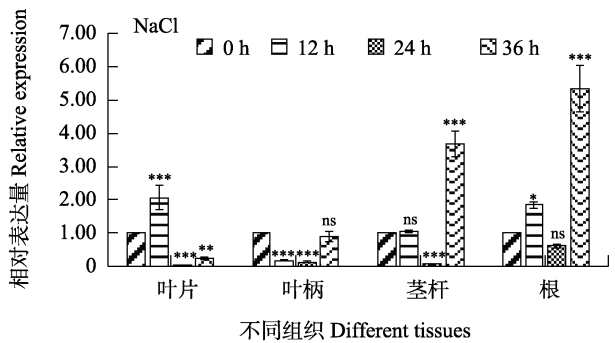
Fig. 4 Functional characterization of *MeSWEET18* using yeast sugar transport-defective strains *EBY.VW4000*



ns 表示无显著差异 ( $P>0.05$ ), \*\*\*表示差异极显著 ( $P<0.001$ )。ns indicates no significant difference ( $P>0.05$ ), \*\*\* indicates extremely significant difference ( $P<0.001$ ).

图 5 *MeSWEET18* 在添加不同糖的黑暗处理下的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *MeSWEET18* in dark treatment with different sugar



ns 表示无显著差异 ( $P>0.05$ ), \*表示差异显著 ( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P<0.01$ ), \*\*\*表示差异极显著 ( $P<0.001$ )。ns indicates no significant difference ( $P>0.05$ ), \* indicates significant difference ( $P<0.05$ ), \*\* indicates extremely significant difference ( $P<0.01$ ), \*\*\* indicates extremely significant difference ( $P<0.001$ ).

图 6 *MeSWEET18* 在非生物胁迫下的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *MeSWEET18* under abiotic stress

### 3 讨论

SWEET 转运蛋白在植物中广泛存在, 参与多种生理过程, 如韧皮部装载、籽粒灌浆、花粉发育、叶片衰老以及响应生物和非生物胁迫等<sup>[16-17]</sup>。本研究从木薯 SC9 中克隆获得 *MeSWEET18* 基因序列, 完整开放阅读框为 714 bp, 编码 237 个氨基酸。系统进化树分析表明, *MeSWEET18* 位于

24、36 h。采集每个时间点的叶片、叶柄、茎秆和根进行表达分析 (图 6)。结果发现, 叶片在盐胁迫 12 h 时表达水平提高了 2.07 倍, 随着时间延长至 24 h, 表达水平较 0 h 急速下降至 0.05 倍; 与 0 h 相比, 茎秆和根的表达水平在 24 h 出现下调, 随着处理时间延长至 36 h, 表达水平呈极显著上调, 分别是 0 h 的 3.69 倍和 5.34 倍。干旱胁迫下, 与 0 h 相比, 叶片和叶柄在处理 36 h 时表达水平分别提高了 9.89 倍和 20.82 倍。氧化胁迫下, *MeSWEET18* 在 SC9 的叶片、叶柄和茎秆的表达均呈显著下调, 但是根的表达水平出现显著上调, 24 h 的表达水平是 0 h 的 18.01 倍。低温 (15 °C) 处理 24 h, *MeSWEET18* 在叶片、叶柄、茎秆和根的表达呈显著下降, 随着低温 (4 °C) 处理 24 h, *MeSWEET18* 在茎秆和根中的表达较 0 h 呈现上升趋势。

Clade IV, 与拟南芥 *AtSWEET16* 和 *AtSWEET17* 属于同一进化分支。*AtSWEET17* 在叶片的果糖分配上发挥着重要作用, *AtSWEET17* 沉默株系表现为果糖积累功能紊乱、植株发育不良以及影响种子产量等<sup>[18]</sup>。对 *MeSWEET18* 的糖转运能力进行检测, 发现其主要转运果糖, 与 *AtSWEET17* 主要影响果糖积累的研究结果一致。

拟南芥中过表达 *AtSWEET16* 会促进植株发芽、生长发育以及提高植株对冻害的耐受性<sup>[19]</sup>。石竹 *DsSWEET17* 的表达受外源果糖、葡萄糖、盐胁迫和渗透胁迫的影响,转化拟南芥后,能够促进根的生长<sup>[20]</sup>。萱草 *HfSWEET17* 在低温胁迫下表达上调,过表达烟草能够提高其抗寒性<sup>[21]</sup>。茶树 *CsSWEET17* 的交替剪接受低温胁迫的诱导,过表达植株显著降低了低温胁迫下电解质渗出水平<sup>[22]</sup>。麻风树 *JcSWEET16* 基因能够响应叶片的干旱和盐胁迫,在拟南芥中过表达能够改良其开花时间和耐盐水平,但不影响其耐旱性<sup>[23]</sup>。对木薯 SC9 水培苗进行盐、干旱、氧化和低温等非生物胁迫,结果发现 *MeSWEET18* 在叶片、叶柄、茎秆和根等不同部位的表达变化差异显著,表明 *MeSWEET18* 能够响应多种非生物胁迫。

外源施加 20 mmol/L 蔗糖处理杭白菊,导致 *CmSWEET17* 基因特异表达;过表达 *CmSWEET17* 可促进双节茎处理的腋芽生长。因此, *CmSWEET17* 基因可能通过生长素转运途径参与了蔗糖诱导的腋芽生长过程<sup>[3]</sup>。对木薯 SC9 的水培苗进行蔗糖、果糖和葡萄糖的黑暗处理,发现随着黑暗处理时间的增加, *MeSWEET18* 的表达呈现显著下调,说明 *MeSWEET18* 不仅对果糖胁迫敏感,对其他糖的胁迫也能产生响应。杨官显等<sup>[24]</sup>对苹果 *MdSWEET17* 的研究发现,其在根和叶片中大量表达。在果实发育期, *MdSWEET17* 的表达水平与果糖含量呈显著负相关<sup>[18, 24]</sup>。研究 *MeSWEET18* 在木薯 SC9 形成期、膨大期和成熟期的叶片、叶柄、茎秆和块根的表达,结果发现,其在成熟期的叶片、叶柄和茎秆大量表达,而在块根中的表达随着木薯的生长呈现先上升后下降的趋势。

在后续研究中,将测定 SC9 不同非生物胁迫下蔗糖、果糖和葡萄糖等可溶性糖的变化,分析 *MeSWEET18* 启动子序列中与非生物胁迫、糖信号等相关的顺式作用元件。构建过表达载体通过农杆菌介导法遗传转化木薯,对获得的过表达株系进行不同的非生物胁迫,分析 *MeSWEET18* 以及糖代谢相关基因的表达趋势,为研究木薯糖代谢的分子通路提供依据。

## 参考文献

[1] LIESCHE J. Sucrose transporters and plasmodesmal regula-

tion in passive phloem loading[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2017, 59(5): 311-321.

- [2] WANG S D, YOKOSHO K, GUO R Z, WHELAN J, RUAN Y L, MA J F, SHOU H X. The soybean sugar transporter *GmSWEET15* mediates sucrose export from endosperm to early embryo[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(4): 2133-2141.
- [3] LIU W X, PENG B, SONG A P, JIANG J F, CHEN F D. Sugar transporter, *CmSWEET17*, promotes bud outgrowth in *Chrysanthemum morifolium*[J]. *Genes*, 2020, 11(1): 26-37.
- [4] CHEN L Q, HOU B H, LALONDE S, TAKANAGA H, HARTUNG M L, QU X Q, GUO W J, KIM J G, UNDERWOOD W, CHAUDHURI B, CHERMAK D, ANTONY G, WHITE F F, SOMERVILLE S C, MUDGETT M B, FROMMER W B. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens[J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 527-532.
- [5] XUAN Y H, HU Y B, CHEN L Q, SOSSO D, DUCAT D C, HOU B H, FROMMER W B. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family[J]. *PNAS*, 2013, 110(39): 3685-3694.
- [6] HU Z, TANG Z J, ZHANG Y M, NIU L P, YANG F, ZHANG D C, HU Y B. Rice SUT and SWEET transporters[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 11198-11209.
- [7] SREEKUMAR J, SADIQ PAM, RAJU S, MUKHERJEE A. In silico analysis of carotenoid biosynthesis pathway in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Journal of Genetics*, 2022, 101: 2-19.
- [8] COHN M, BART R S, SHYBUT M, DAHLBECK D, GOMEZ M, MORBITZER R, HOU B H, FROMMER W B, LAHAYE T, STASKAWICZ B J. *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator like (TAL) effector mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 2014, 27(11): 1186-1198.
- [9] 胡梅珍. 木薯叶片蔗糖质体外装载模式[D]. 海口: 海南大学, 2016.
- HU M Z. Sucrose apoplastic loading pattern in cassava leaf[D]. HaiKou: Hainan University, 2016. (in Chinese)
- [10] 薛蓓蓓, 覃丽芳, 董明右, 李有志, 樊宪伟. 木薯 SWEETs 基因家族生物信息学及表达特性研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(1): 260-268.
- XUE B B, QIN L F, DONG M Y, LI Y Z, FAN X W. Bioinformatics analysis and expressional characteristics of cassava SWEETs gene family [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(1): 260-268. (in Chinese)
- [11] 刘秦, 马畅, 冯世鹏, 唐枝娟, 陈银华, 罗丽娟, 牛晓磊. 木薯 *SWEET1* 基因的分子克隆、亚细胞定位与功能分析[J].

- 分子植物育种, 2017, 15(7): 2502-2509.
- LIU Q, MA C, FENG S P, TANG Z J, CHEN Y H, LUO L J, NIU X L. Molecular cloning, subcellular localization and function analysis of a *MeSWEET1* gene from *Manihot esculenta*[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(7): 2502-2509. (in Chinese)
- [12] 朱柏光, 李闯, 张雪娇, 谢清标, 陶均, 骆凯, 陈银华, 牛晓磊. 木薯 *MeSWEET3b* 的基因克隆及功能分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(3): 733-741.
- ZHU B G, LI C, ZHANG X J, XIE Q B, TAO J, LUO K, CHEN Y H, NIU X L. Molecular cloning and function analysis of a *MeSWEET3b* gene from *Manihot esculenta*[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(3): 733-741. (in Chinese)
- [13] WILSON M C, MUTKA A M, HUMMEL A W, BERRY J, CHAUHAN R D, VIJAYARAGHAVAN A, TAYLOR N, VOYTAS D F, CHITWOOD D H, BART R S. Gene expression atlas for the food security crop cassava[J]. New Phytologist, 2017, 213(4): 1632-1641.
- [14] WIECZORKE R, KRAMPE S, WEIERSTALL T, FREIDEL K, HOLLENBERG C P, BOLES E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 1999, 464(3): 123-128.
- [15] CHONG J L, PIRON M C, MEYER S, MERDINOGLU D, BERTSCH C, MESTRE P. The SWEET family of sugar transporters in grapevine: *VvSWEET4* is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(22): 6589-6601.
- [16] LIN W N, SOSSO D, CHEN L Q, GASE K, KIM S G, KESSLER D, KLINKENBERG P M, GORDER M K, HOU B H, QU X Q, CARTER C J, BALDWIN I T, FROMMER W B. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9[J]. Nature, 2014, 508(7497): 546-549.
- [17] DURAND M, MAINSON D, PORCHERON B, MAUROUSSET L, LEMOINE R, POURTAU N. Carbon source-sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters[J]. Planta, 2018, 247(1): 587-611.
- [18] CHARDON F, BEDU M, CALENGE F, KLEMENS P A W, SPINNER L, CLEMENT G, CHIETERA G, LÉRAN S, FERRAND M, LACOMBE B, LOUDET O, DINANT S, BELLINI C, NEUHAUS H E, DANIEL-VEDELE F, KRAPP A. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter *SWEET17* in *Arabidopsis*[J]. Current Biology, 2013, 23(8): 697-702.
- [19] KLEMENS P A W, PATZKE K, DEITMER J, SPINNER L, HIR R L, BELLINI C, BEDU M, CHARDON F, KRAPP A, NEUHAUS H E. Overexpression of the vacuolar sugar carrier *AtSWEET16* modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2013, 163(3): 1338-1352.
- [20] ZHOU A M, MA H P, FENG S, GONG S F, WANG J G. *DsSWEET17*, a tonoplast-localized sugar transporter from *Dianthus spiculifolius*, affects sugar metabolism and confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6): 1564-1574.
- [21] HUANG D M, CHEN Y, LIU X, NI D A, BAI L, QIN Q P. Genome-wide identification and expression analysis of the *SWEET* gene family in daylily (*Hemerocallis fulva*) and functional analysis of *HfSWEET17* in response to cold stress[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 211-225.
- [22] YAO L N, DING C Q, HAO X Y, ZENG J M, YANG Y J, WANG X C, WANG L. *CsSWEET1a* and *CsSWEET17* mediate growth and freezing tolerance by promoting sugar transport across the plasma membrane[J]. Plant Cell Physiology, 2020, 61(9): 1669-1682.
- [23] WU Y T, WU P Z, XU S M, CHEN Y P, LI M R, WU G J, JIANG H W. Genome-wide identification, expression patterns and sugar transport of the physic nut *SWEET* gene family and a functional analysis of *JcSWEET16* in *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10): 5391-5407.
- [24] 杨官显, 许海峰, 张静, 王楠, 房鸿成, 邹琦, 王意程, 姜生辉, 陈学森. 苹果糖转运蛋白基因 *MdSWEET17* 的功能鉴定[J]. 植物生理学报, 2018, 54(11): 1737-1745.
- YANG G X, XU H F, ZHANG J, WANG N, FANG H C, ZOU Q, WANG Y C, JIANG S H, CHEN X S. Functional identification of a sugar transporter gene *MdSWEET17* in apple[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(11): 1737-1745. (in Chinese)