

## 甜橙糖转运蛋白 *CitSWEET15* 基因的表达分析与转运活性检测

郑乾明<sup>1</sup>, 王小柯<sup>1</sup>, 王红林<sup>1</sup>, 解 璞<sup>1</sup>, 付慧敏<sup>2</sup>, 陈传武<sup>2\*</sup>

1. 贵州省农业科学院果树科学研究所, 贵州贵阳 550006; 2. 广西桂北特色经济作物种质创新与利用实验室/广西特色作物研究院, 广西桂林 541004

**摘 要:** 高等植物糖转运蛋白 SWEET (sugars will eventually be exported transporter) 家族具有葡萄糖、果糖或蔗糖的转运活性, 广泛参与光合产物韧皮部装载和卸载, 以及花、果实和种子发育等生理过程。为探讨 *CitSWEET15* 基因在甜橙果实发育和成熟期间的生理功能, 本研究开展 *CitSWEET15* 的基因克隆、表达模式、亚细胞定位和蔗糖转运活性分析。*CitSWEET15* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 918 bp, 编码 305 个氨基酸, 含有 7 个跨膜结构域。*CitSWEET15* 的理论等电点为 6.29, 相对分子量为 34.15 kDa。系统进化分析表明, *CitSWEET15* 与 *AtSWEET15*、*VvSWEET15*、*LcSWEET15* 和 *PuSWEET15* 为直系同源基因, 属于 SWEET III 类。序列比对表明, *CitSWEET15* 与克里曼丁橘、莽山野橘、金柑、柚、宜昌橙和枸橼的 *SWEET15* 基因的核苷酸序列一致率为 98.69%~99.9%, 氨基酸序列一致率为 97.38%~100%。*CitSWEET15* 和上述柑橘类 *SWEET15* 成员, 与 *AtSWEET13* 的 4 个蔗糖识别位点和 3 个蔗糖转运活性相关位点完全一致, 说明 *CitSWEET15* 和柑橘类 *SWEET15* 成员可能均具有蔗糖转运活性。荧光定量 PCR 检测表明, *CitSWEET15* 基因在甜橙果实的种子和果肉中表达量较高, 果肉中 *CitSWEET15* 基因的表达水平在花后 80~140 d 较低, 随着果实发育显著上调, 在花后 230 d 达到最高水平。将 *CitSWEET15* 的 C 端融合绿色荧光蛋白, 然后在拟南芥叶肉原生质体中瞬时表达。亚细胞定位分析表明, 荧光信号分布在原生质体外缘, *CitSWEET15* 定位于细胞膜。通过在酿酒酵母 W303a (W303-1A) 菌株中异源表达和蔗糖类似物七叶苷孵育, 检测 *CitSWEET15* 和 *AtSWEET10* (*At5g50790*, 阳性对照) 的蔗糖转运活性。表达 *CitSWEET15* 的酵母细胞与 *AtSWEET10* 相似, 其荧光强度显著高于载体对照, 表明 *CitSWEET15* 具有蔗糖转运活性。因此, *CitSWEET15* 是定位于细胞膜的蔗糖转运蛋白, 在柑橘类物种中序列高度保守, 参与甜橙果实成熟期间的质外体蔗糖跨膜转运。本研究结果为了解甜橙果实可溶性糖积累提供基础, 为改良果实风味和品质提供候选基因。

**关键词:** 蔗糖; 细胞膜; 酵母表达; 果实成熟

中图分类号: S666.4 文献标识码: A

## Expression Pattern and Transportation Activity Test of Sugar Transporter Gene *CitSWEET15* from Sweet Orange

ZHENG Qianming<sup>1</sup>, WANG Xiaoke<sup>1</sup>, WANG Honglin<sup>1</sup>, XIE Pu<sup>1</sup>, FU Huimin<sup>2</sup>, CHEN Chuanwu<sup>2\*</sup>

1. Institute of Pomology Science, Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang, Guizhou 550006, China; 2. Guangxi Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization of Specialty Commercial Crops in North Guangxi / Guangxi Academy of Specialty Crops, Guilin, Guangxi 541004, China

**Abstract:** The sugar transporter SWEET (sugars will eventually be exported transporter) family has sugar transportation activity for glucose, fructose or sucrose, which is involved in the phloem loading and unloading of photosynthetic product, as well as physiological processes such as flower, fruit and seed development in higher plant. To explore the physiological functions of *CitSWEET15* (Cs7g02970) during fruit development and ripening of sweet orange, gene

收稿日期 2022-11-16; 修回日期 2022-12-10

基金项目 贵州省科技计划项目 (黔科合服企[2019]4002); 广西科技计划项目 (桂科 AA22068092); 国家重点研发计划项目 (No. 2019YFD1001400)。

作者简介 郑乾明 (1985—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 果实品质形成机理。\*通信作者 (Corresponding author): 陈传武 (CHEN Chuanwu), E-mail: 13707832977@126.com。

cloning, expression patterns, subcellular localization and sucrose transport activity were performed in the study. The ORF (open reading frame) of *CitSWEET15* gene was 918 bp, which encoded 305 amino acids, and possessed seven transmembrane domains. The theoretical isoelectric point of CitSWEET15 was 6.29, and the relative molecular weight was 34.15 kDa. Phylogenetic analysis suggested that *CitSWEET15* together with *AtSWEET15*, *VvSWEET15*, *LcSWEET15* and *PuSWEET15* were orthologous genes, and belonged to the SWEET III clade. Sequence alignment showed that nucleotide and amino acid sequence identities of CitSWEET15 with those of Clementine mandarin, Mangshan wild mandarin, Kumquat, Pomelo, *Citrus ichangensis* Swingle and Citron were 98.69%–99.9% and 97.38%–100%, respectively. CitSWEET15 and the mentioned Citrus SWEET15 members were completely consistent with four sucrose recognition sites and three sucrose transport activity sites of AtSWEET13, which suggested that all CitSWEET15 and Citrus SWEET15 members may have sucrose transport activity. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that the expression of *CitSWEET15* was high in the seed and fruit pulp of sweet orange, the expression level of *CitSWEET15* in fruit pulp was low at 80–140 days after flowering, then significantly up-regulated as fruit development, and reached the highest at 230 days after flowering. CitSWEET15 was fused with green fluorescent protein at the C-terminus, and then transiently expressed in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. The subcellular localization analysis suggested the fluorescence signal was distributed around the outer edge of protoplast, indicating that CitSWEET15 was located in the plasma membrane. By heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* W303a (W303-1A) strain and incubation in the sucrose analogue Esculin, the fluorescence intensity was detected to test the sucrose transportation activity of CitSWEET15 and AtSWEET10 (At5g50790, positive control). The fluorescent intensity of yeast cells expressing CitSWEET15, as similar as AtSWEET10, was significantly higher than vector control, indicating that CitSWEET15 had sucrose transportation activity. In conclusion, CitSWEET15 is highly conserved in Citrus species, functions as a plasma membrane sucrose transporter, and involves in apoplastic sucrose transport during fruit ripening of sweet orange. The results would provide a basis for understanding the soluble sugar accumulation in sweet orange fruit, and a candidate gene for improving fruit flavor and quality.

**Keywords:** sucrose; plasma membrane; yeast expression; fruit ripening

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.10.002

可溶性糖组分和含量是决定果实品质的最关键因子,也是园艺作物育种和改良的重要研究方向。果实积累的可溶性糖主要包括葡萄糖、果糖、蔗糖和山梨醇等,来自于源器官的光合作用,经韧皮部装载、长距离运输和卸载,进入果实细胞参与代谢、转运和储存<sup>[1]</sup>。这一系列过程涉及糖的多次跨膜运输,均需要糖转运蛋白(或载体)介导。

植物糖转运蛋白主要包括易化扩散载体超家族(major facilitator superfamily, MFS)的蔗糖转运蛋白(sucrose transporter, SUT)和单糖转运蛋白(monosaccharide transporter, MST),以及新型 SWEET 家族<sup>[2]</sup>。SUT 和 MST 通常含有 12 个跨膜结构域,偶联质子介导糖的跨膜转运<sup>[3-4]</sup>。2010 年 CHEN 首次使用荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)鉴定了 AtSWEET1 的葡萄糖转运活性,该蛋白含 7 个跨膜螺旋结构域,依赖细胞内外糖浓度梯度而非跨膜质子梯度来完成跨膜转运功能<sup>[5]</sup>。拟南芥 SWEET 家族的 17 个成员分为四类, I 和 II 类均定位于细胞膜,转运葡萄糖等单糖,参与花发育,

种子萌发,宿主-病原体互作等; III 类定位于细胞膜,主要转运蔗糖,参与蔗糖的韧皮部装载,花蜜分泌,花、果实及种子发育等; IV 类定位于液泡膜,转运果糖、葡萄糖和蔗糖,控制果糖积累,调控耐寒性<sup>[6]</sup>。

近年来通过同源搜索获得大量园艺作物的 SWEET 家族信息,且大量研究表明 SWEET 影响果实可溶性糖积累,参与果实发育和成熟。葡萄 SWEET 家族含有 17 个成员<sup>[7]</sup>, *VvSWEET10* 主要在果实转色期表达,参与己糖积累<sup>[8]</sup>。番茄 SWEET 家族含有 29 个成员<sup>[9]</sup>, *SISWEET7a* 在绿熟期果实果柄和维管束高表达,推测参与蔗糖的韧皮部装载和卸载<sup>[10]</sup>。苹果 SWEET 家族的 13 个成员与果实可溶性糖积累表现较高的相关性<sup>[11]</sup>, *MdSWEET1* 在番茄中过表达提高果实蔗糖和果糖含量<sup>[12]</sup>。荔枝 SWEET 家族含有 16 个成员,其中 8 个在果肉(假种皮)中高表达<sup>[13]</sup>。枣 SWEET 家族含有 19 个成员, *ZjSWEET2.2* 定位于细胞膜,与果实己糖积累负相关<sup>[14]</sup>。

甜橙基因组 SWEET 家族含有 16 个成员,其中 12 个在果实表达,包含在果实高表达的 *Cs7g02970*

基因<sup>[15]</sup>。*Cs7g02970* 基因 (命名 *CitSWEET15*) 在甜橙果实囊衣和汁胞高表达, 与果实可溶性糖积累高度正相关, 可能介导蔗糖跨细胞膜转运至质外体<sup>[16]</sup>。然而 *CitSWEET15* 的亚细胞定位和糖转运活性尚不清楚, 不能明确其生理功能。对此, 本研究克隆了 *CitSWEET15* 基因的 ORF 序列, 重点分析其蛋白的亚细胞定位和转运活性, 探讨其在甜橙果实可溶性糖积累过程中的生理功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为广西特色作物研究院种植的甜橙品种暗柳橙 (*Citrus sinensis* Osbeck cv. 'Anliu'), 选择 5 株处于盛果期且长势良好的成年结果树, 采集成熟叶片和盛开的花, 以及花后 80 d (80DAF)、110 d (110DAF)、140 d (140DAF)、170 d (170DAF)、200 d (200DAF)、230 d (230DAF) 果实。样品置于冰盒带回实验室, 果实剥去果皮取果肉和成熟果实 (230 d) 种子。所有样品设置 3 次生物学重复, 样品液氮速冻后 -80 °C 保存。

### 1.2 方法

1.2.1 基因克隆 在甜橙基因组数据库 (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>) 查询 *Cs7g02970*, 即 *CitSWEET15*, 下载其 cDNA 和 CDS 序列。提取甜橙果肉总 RNA (Aidlab, RN53), 利用 PrimeScript™ 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (TaKaRa, 6110A) 反转录合成 cDNA 第一链。以此为模板进行 RT-PCR 扩增, 扩增引物序列为 5'-ATGGCCATAATGTTTCGAT-3'/5'-TCAAACAGCAACAGCACA-3', 利用高保真 PCR 酶扩增试剂 (Vazyme Biotech, P515-1) 进行扩增。PCR 扩增产物经电泳和回收, 连接至测序载体 pMD19-T 测序。

1.2.2 序列分析 在甜橙基因组数据库和 NCBI 网站使用在线 Blastn 进行检索, 下载核苷酸序列。使用 DNAMAN 软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列, 使用在线软件 ExPASy (<https://web.expasy.org/>) 预测相对分子量和理论等电点, 使用在线软件 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测跨膜结构。使用 Clustal W 软件进行氨基酸序列比对, 利用 MEGA 7.0 软件, 使用邻接法构建系统进化树, 进行 1000 次重复的 Bootstrap 值检验。

1.2.3 qRT-PCR 检测 提取成熟叶片、花、种子

和果肉的总 RNA, 反转录合成 cDNA。使用 2× SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂 (Biomarker, RK02001), 在荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD, CFX96) 检测基因的表达量。目标基因引物序列: 5'-GGGAGTTGCATTTGGCATCT-3'/5'-GCACCGGAGCCAGGTACA-3', 内参基因 *Actin* 引物序列: 5'-CCAAGCAGCATGAAGATCAA-3'/5'-ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG-3'。设置 3 次技术重复, 基因的相对表达量使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  值计算。

1.2.4 亚细胞定位 以含有 *CitSWEET15* 基因 CDS 的质粒为模板, 以去除终止密码子的引物 (5'-ACAGCCCAAGCTTGCATGCCTGCAGATGGCCA TAATGTTTCGAT-3'/5'-CCTCGCCCTTGCTCACCA TGGATCCAACAGCAACAGCACATCCA-3'), 利用高保真 2×Phanta<sup>®</sup> Max Master DNA 聚合酶 (Vazyme Biotech, P515) 进行 PCR 扩增。经 *Pst* II 和 *Bam* HI (NEB) 将载体酶切线性化后, 使用 ClonExpress<sup>®</sup> II One Step 克隆试剂盒 (Vazyme Biotech, C112) 将扩增产物插入至目标载体 16318-hGFP。构建的融合表达载体和空载体分别转化拟南芥叶肉原生质体, 具体操作步骤参考 YOO 等<sup>[17]</sup>的方法。

1.2.5 酵母表达载体构建和转化 以含有 *CitSWEET15* 基因 CDS 的质粒为模板, 使用引物 (5'-GTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCAT GGCCATAATGTTTCGAT-3'/5'-AATTGGGTACCG GGCCCCCTCGAGTCAAACAGCAACAGCA CA-3') 进行 PCR 扩增。使用 *Eco*R I 和 *Xho* I (NEB) 将载体线性化, 利用 ClonExpress<sup>®</sup> II One Step 克隆试剂盒 (Vazyme Biotech, C112) 将扩增产物插入至酵母表达载体 pDR196 的多克隆位点。经测序确认后将 *CitSWEET15*-pDR196、载体 pDR196 (载体对照) 和 *AtSWEET10*-pDR196 (阳性对照) 分别转化至酿酒酵母菌株 W303a (W303-1A)。酵母转化采用醋酸锂转化法, 使用酵母转化试剂盒 (Coolaber, SK2400), 转化后的单克隆进行 PCR 扩增验证。

1.2.6 Esculin 转运检测 酵母阳性单克隆使用 SC/-ura (2%葡萄糖为碳源) 液体培养基 30 °C 震荡过夜, 至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~1.0。酵母细胞吸收 Esculin 和荧光强度检测方法参考 GORA 等<sup>[18]</sup>的方法, 略作修改。吸取酵母菌液, 加入 Esculin 溶液 (Solarbio, E8230) 至终浓度 1 mmol/L, 30 °C 震荡培养 60 min。离心收集酵母细胞, 使用磷酸盐

缓冲液清洗酵母细胞 2 次，再加入磷酸盐缓冲液充分重悬。使用多功能酶标仪 (Molecular Devices, SpectraMax iD3) 检测 Esculin 荧光强度，激发波长为 367 nm，发射波长为 454 nm。同时按照 1 : 2 的比例稀释酵母细胞，使用酶标仪 (Thermo Scientific, Multiskan GO) 检测酵母重悬细胞的 OD<sub>600</sub> 值。计算每 1 个 OD<sub>600</sub> 值的酵母细胞的荧光强度值，每个基因或对照的数据均来自于 4 个独立的酵母单克隆。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因克隆

经 RT-PCR 扩增和测序表明，*CitSWEET15* 的 ORF 长度为 918 bp，编码 305 个氨基酸。预测其等电点为 6.29，相对分子量为 34.15 kDa，含有 7 个跨膜结构域。*CitSWEET15* 与拟南芥 SWEET 家族 AtSWEET15 的氨基酸序列一致率为 55.5%，与其他 16 个成员的氨基酸序列一致率为 28.5%~49.8%。对 21 个 SWEETs 的氨基酸序列进行系统进化分析 (图 1)，结果发现，*CitSWEET15* 与 PuSWEET15<sup>[19]</sup>、VvSWEET15<sup>[7]</sup>、LcSWEET15<sup>[13]</sup> 和 AtSWEET15 为直系同源，并与 AtSWEET9~AtSWEET15 同属于 SWEET III 类。

### 2.2 序列分析

将甜橙 *CitSWEET15* 与已有基因组数据报道的柑橘类 *SWEET15* 基因比较序列差异，结果见表 1。*CitSWEET15* 与柑橘属的克里曼丁橘和莽山野橘 *SWEET15* 基因的核苷酸序列一致率为 99.90%，氨基酸序列一致率为 100%。与金柑属的金柑 *SWEET15* 基因的核苷酸和氨基酸序列一致率略低，分别为 99.13%和 98.03%。与柑橘属的柚、宜昌橙和枸橼 *SWEET15* 基因的核苷酸序列一致率为 98.69%~99.02%，氨基酸序列一致率为 97.38%~97.70%。

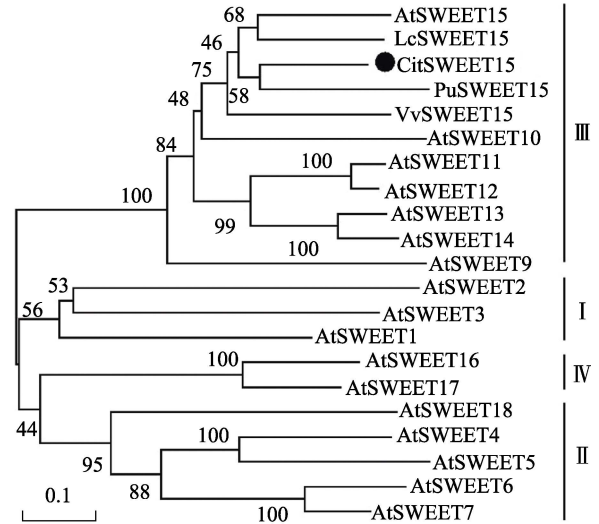


图 1 *CitSWEET15* 与其他 SWEETs 的系统进化关系  
Fig. 1 Phylogenetic relationship of *CitSWEET15* with other SWEETs

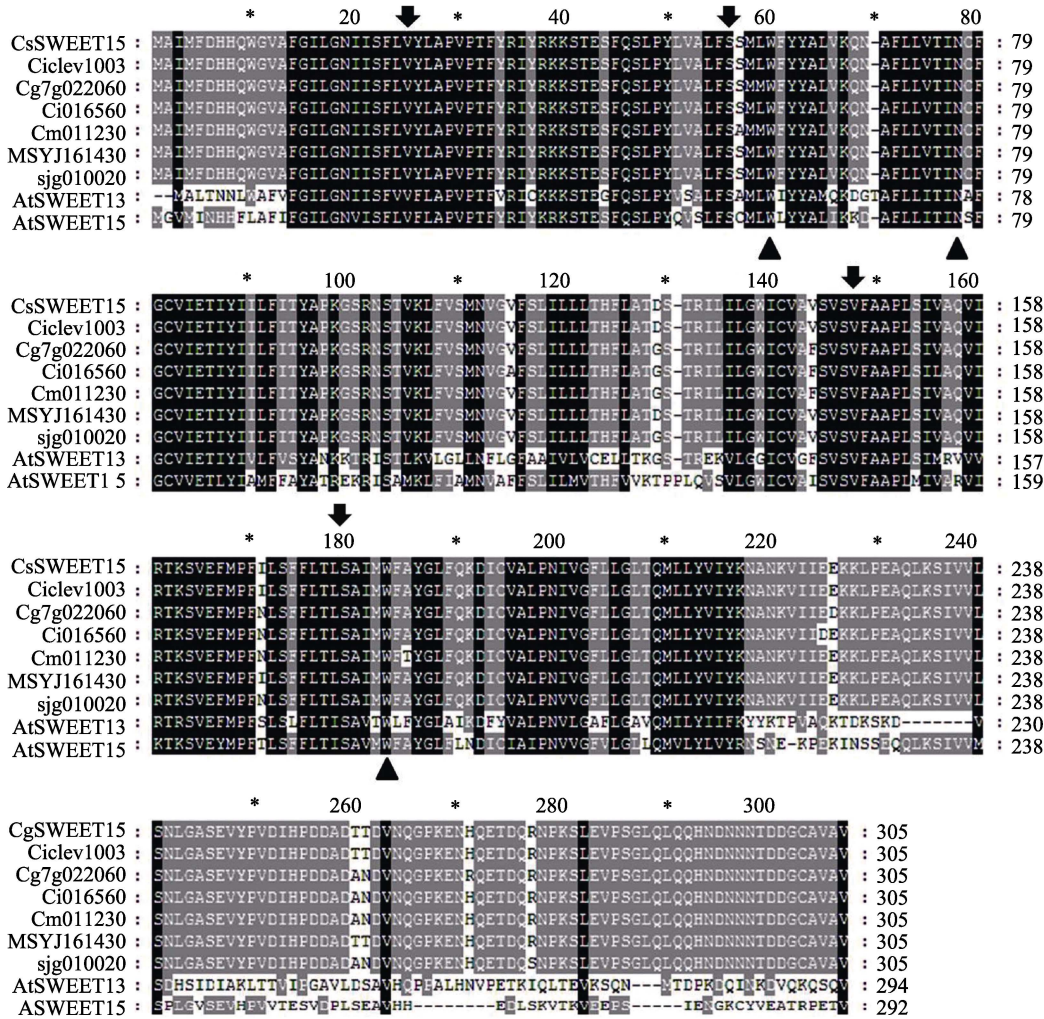
前人对 SWEET III 类成员 AtSWEET13 蛋白结构解析表明，若干氨基酸残基对蔗糖识别和转运具有决定性作用<sup>[20]</sup>。将 *CitSWEET15* 及上述柑橘类 SWEET15 的氨基酸序列共同比对，结果见图 2。4 个特异性识别蔗糖的位点 (V/25、S/56、V/146 和 S/177) 与 AtSWEET13、AtSWEET15 完全一致，3 个与蔗糖转运活性相关的位点 (W/60、N/77 和 W/181) 也与 AtSWEET13、AtSWEET15 完全一致，因此推测 *CitSWEET15* 和柑橘类 SWEET15 成员可能均具有蔗糖转运活性。

### 2.3 基因表达分析

利用 qRT-PCR 检测 *CitSWEET15* 基因在甜橙叶片、花、种子和果实不同发育时期果肉中的表达模式，结果如图 3 所示。*CitSWEET15* 基因在种子中表达量较叶片和花中高，在果肉中的表达量随果实发育和成熟逐渐增加。花后 80、110、140 d 的果实中表达量较低，此后快速增加，在花后 230 d 的果实中的表达量达到最高。

表 1 *CitSWEET15* 与其他柑橘类 *SWEET15* 基因的序列一致率  
Tab. 1 Sequence identities between *CitSWEET15* and other Citrus *SWEET15* genes

属 Genus	物种 Speice	基因编号 Gene ID	序列一致率 Sequence identity/%	
			核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid
柑橘属	克里曼丁橘 <i>Citrus clementina</i>	Ciclev10032218m	99.90	100.00
柑橘属	莽山野橘 <i>Citrus reticulata</i> Mangshan	MSYJ161430.1	99.90	100.00
金柑属	金柑 <i>Fortunella margarita</i>	sjg010020.1	99.13	98.03
柑橘属	柚 <i>Citrus grandis</i>	Cg7g022060.1	99.02	97.38
柑橘属	宜昌橙 <i>Citrus Ichangensis</i>	Ci016560.1	98.69	97.70
柑橘属	枸橼 <i>Citrus Medica</i>	Cm011230.1	98.91	97.40

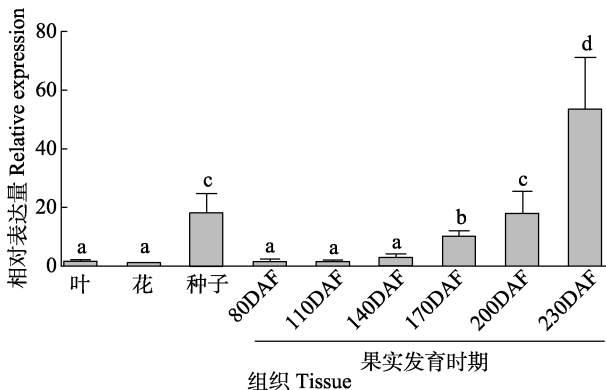


箭头符号分别表示 4 个蔗糖识别位点：V/25、S/56、V/146 和 S/177；三角符号分别表示 3 个蔗糖转运活性相关的位点：W/60、N/77 和 W/181。

Arrow symbols represented four sucrose recognition sites: V/25, S/56, V/146 and S/177, respectively; Triangle symbols represented three sucrose transport activity sites: W/60, N/77 and W/181, respectively.

图 2 柑橘类 SWEET15 成员与 AtSWEET13 和 AtSWEET15 氨基酸序列的保守位点分析

Fig. 2 Conserved sites analysis of amino acid sequences in Citrus SWEET15 members, AtSWEET13 and AtSWEET15



不同小写字母表示差异显著 (P < 0.05)。

Different lowercase letters indicate significant difference (P < 0.05).

图 3 CitSWEET15 在甜橙不同组织和果实不同发育时期的表达模式

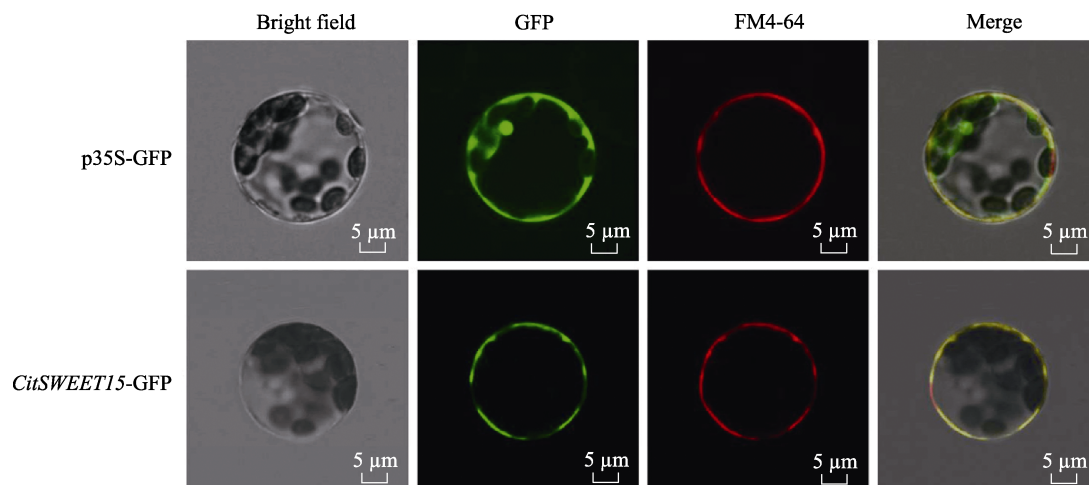
Fig. 3 Expression patterns of CitSWEET15 among various tissues and fruit developmental stages of sweet orange

## 2.4 亚细胞定位检测

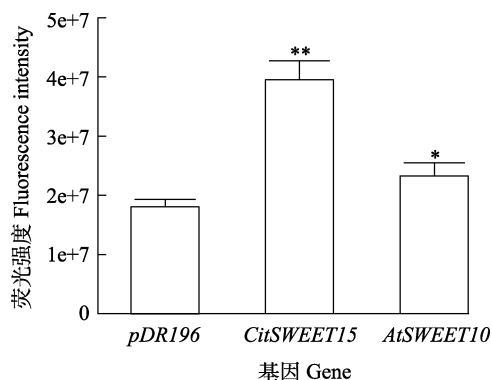
为了解 CitSWEET15 的亚细胞定位, 在其 C 端融合绿色荧光蛋白, 瞬时转化拟南芥叶肉原生质体。如图 4 所示, 空载体 p35S-GFP 的绿色荧光分布于细胞膜、细胞质和细胞核。目标基因载体 CitSWEET15-GFP 的绿色荧光围绕原生质体外缘分布, 与细胞膜被 FM4-64 染料标识后产生的红色荧光重合。二者完全融合后产生黄色荧光, 说明 CitSWEET15 定位于细胞膜。

## 2.5 转运功能验证

使用具有荧光的蔗糖类似物 Esculin 为转运底物, 检测表达 CitSWEET15 的酵母细胞转运 Esculin 情况, 比较荧光强度明确其转运活性。酵母细胞经 Esculin 孵育后, 阳性对照 AtSWEET10

图 4 *CitSWEET15* 蛋白的亚细胞定位Fig. 4 Subcellular localization of *CitSWEET15* protein

的荧光强度显著高于空载体 pDR196, 强度约为空载体 pDR196 的 1.3 倍; *CitSWEET15* 的荧光强度也显著高于空载体 pDR196, 强度约为空载体 pDR196 的 2.2 倍 (图 5)。以上说明 *CitSWEET15* 和阳性对照 *AtSWEET10* 均具有蔗糖转运活性。



\*表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。  
\* indicates significant difference ( $P < 0.05$ ), \*\* indicates extremely significant difference ( $P < 0.01$ ).

图 5 表达 *CitSWEET15* 的酵母细胞转运蔗糖类似物 Esculin 检测Fig. 5 Transportation test of sucrose analog Esculin by yeast cells expressing *CitSWEET15*

### 3 讨论

近年来关于 *VvSWEET10*<sup>[8]</sup>、*ZjSWEET2.2*<sup>[14]</sup>、*PbSWEET15*<sup>[19]</sup>、*SISWEET7a*<sup>[10]</sup>和 *SISWEET15*<sup>[21]</sup> 的研究表明, SWEET 家族对果实可溶性糖积累具有重要作用。此前已分离甜橙 SWEET 家族, 根据其表达模式筛选出若干参与果实可溶性糖积累的候选基因<sup>[15]</sup>。本研究选取在甜橙成熟果实高表达的 *CitSWEET15* 深入研究, 其在柑橘类不同物

种中的核苷酸和氨基酸序列一致性较高, 且识别蔗糖的关键氨基酸位点与 *AtSWEET13* 等完全一致<sup>[20]</sup>。因此推测包括 *CitSWEET15* 在内的 SWEET15 类基因在柑橘类物种中序列高度保守, 可能都具有蔗糖转运活性。

离体表达体系是检测植物 SWEET15 类成员蔗糖转运活性的有效方法, 如通过 HEK293T 细胞表达结合 FRET 检测 *AtSWEET15*<sup>[22]</sup> 和 *OsSWEET15* 的蔗糖转运活性<sup>[23]</sup>; 通过爪蟾卵母细胞表达结合放射性底物检测 *AtSWEET15*<sup>[24]</sup> 和 *GmSWEET15b*<sup>[25]</sup> 的蔗糖转运活性; 通过酵母蔗糖利用缺陷菌株表达结合生长互补检测 *PbSWEET15*<sup>[19]</sup> 和 *SISWEET15*<sup>[21]</sup> 的蔗糖转运活性, 通过酵母蔗糖利用缺陷菌株表达结合放射性底物检测 *MtSWEET15.3*<sup>[26]</sup> 的蔗糖转运活性。本研究利用的 Esculin(6,7-二羟基香豆素-b-D-葡糖苷) 与蔗糖结构类似, 具有较强的自发荧光。此前已建立酵母表达结合 Esculin 荧光检测验证 SUT 类 *AtSUC2* 和马铃薯 *StSUT1* 转运活性的简单方法<sup>[18]</sup>。Esculin 还用于示踪叶肉原生质体<sup>[27]</sup>、韧皮部<sup>[28]</sup>、花粉管<sup>[29]</sup>和花柄<sup>[30]</sup>的蔗糖转运。SWEET III 类的 *AtSWEET10* 也具有 Esculin 转运活性, 基于此种特性建立检测该类成员蔗糖转运活性的简单方法<sup>[27]</sup>。此外, 蔗糖正常利用的酵母菌株也能用于 Esculin 的吸收检测, 其结果与使用蔗糖利用缺陷型菌株的结果基本一致<sup>[18]</sup>。因此, 本研究使用常见的酵母蔗糖正常利用的 W303a 菌株为异源表达体系, 通过检测胞内 Esculin 荧光强度来判断目标基因的蔗糖转运活性。*CitSWEET15* 转运 Esculin, 荧光强度约为对照的 2.2 倍, 说明其具有蔗糖转

运活性。

目前报道的园艺作物 *SWEET15* 类基因普遍在果实和花等库器官表达, 参与库器官可溶性糖积累。苹果 *SWEET15* 基因 *MdSWEET3.9~11* 随果实成熟显著上调, 与果糖和蔗糖相关性较高<sup>[11]</sup>。进一步研究发现苹果 *MdSWEET15a* 位于染色体上的区域中包含与果实可溶性糖相关的数量性状位点, 其序列多态性对果实可溶性糖含量具有较大贡献<sup>[31]</sup>。*VvSWEET15* 在葡萄果实成熟期间高表达<sup>[7]</sup>; *SWEET15* 基因 *SINECI* 主要在番茄的花、子叶和果实高表达<sup>[9]</sup>; *LcSWEET15* 在荔枝的花、果肉(假种皮)和种子表达<sup>[13]</sup>, 均表明 *SWEET15* 类基因在库器官参与可溶性糖积累。此外, *PbSWEET15*<sup>[19]</sup>和 *EjSWEET15*<sup>[32]</sup>分别随梨和枇杷的果实蔗糖积累显著上调, 在梨果实高蔗糖积累的芽变品种中的表达量显著高于亲本, 进一步说明 *SWEET15* 对果实可溶性糖积累的作用。蔗糖是柑橘植株光合产物运输的主要形式<sup>[33]</sup>, 果实蔗糖的卸载采用共质体和质外体途径, 且以共质体途径为主<sup>[34]</sup>。*CitSWEET15* 在甜橙果实成熟期间显著上调表达, 在高蔗糖积累的芽变品种中表达量显著高于母本<sup>[16]</sup>。本研究发现 *CitSWEET15* 蛋白具有蔗糖转运活性且定位于细胞膜, 这也证明 *CitSWEET15* 介导的跨细胞膜蔗糖转运(质外体途径)对甜橙果实成熟期间的蔗糖积累具有较大贡献。同时, 原位杂交表明 *CitSWEET15* 在甜橙果实囊衣和汁胞的表皮细胞高表达, 推测其功能是将囊衣维管束和汁胞表皮细胞的蔗糖卸载到质外体<sup>[16]</sup>。上述报道在组织水平上分析了 *CitSWEET15* 的表达, 但其在细胞水平的表达仍需深入研究。

本研究对甜橙 *CitSWEET15* 开展序列比对、基因表达、亚细胞定位和转运活性检测等分析, 结果发现 *CitSWEET15* 在柑橘类物种中序列高度保守, 定位于细胞膜, 具有蔗糖转运活性, 参与果实成熟期间的质外体蔗糖跨细胞膜转运。下一步需从细胞水平精细检测 *CitSWEET15* 在甜橙果实中的表达模式, 深入了解其参与蔗糖通过质外体途径卸载进入果肉细胞的生理功能, 明确其参与果实可溶性糖积累的分子机制。

## 参考文献

- [1] YAMAKI S. Metabolism and accumulation of sugars translocated to fruit and their regulation[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2010, 79(1): 1-15.
- [2] 耿艳秋, 董肖昌, 张春梅. 园艺作物糖转运蛋白研究进展[J]. 园艺学报, 2021, 48(4): 676-687.  
GENG Y Q, DONG X C, ZHANG C M. Recent progress of sugar transporter in horticultural crops[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(4): 676-687. (in Chinese)
- [3] BUTTNER M. The monosaccharide transporter (-like) gene family in Arabidopsis[J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2318-2324.
- [4] KUHN C, GROF C P. Sucrose transporters of higher plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(3): 287-297.
- [5] 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.
- [6] JEENA GS, KUMAR S, SHUKLA R K. Structure, evolution and diverse physiological roles of SWEET sugar transporters in plants[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 100(4/5): 351-365.
- [7] CHONG J L, PIRON M 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.
- [8] ZHANG Z, ZOU L M, REN C, REN F R, WANG Y, FAN P G, LI S H, LIANG Z C. *VvSWEET10* mediates sugar accumulation in grapes[J]. Genes, 2019, 10(4): 255.
- [9] FENG C Y, HAN J X, HAN X X, JIANG J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato[J]. Gene, 2015, 573(2): 261-272.
- [10] 程杰, 张新圣, 李安琪, 姜晶. 番茄果实成熟过程中 *SISWEET7a* 的功能分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(15): 2958-2968.  
CHENG J, ZHANG X S, LI A Q, JIANG J. Functional analysis of *SISWEET7a* gene during maturation of tomato fruits[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(15): 2958-2968. (in Chinese)
- [11] WEI X Y, LIU F L, CHEN C, MA F W, LI M J. The *Malus domestica* sugar transporter gene family: identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 569.
- [12] 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]. 园艺学报, 2019, 46(3): 433-443.
- LU J, MA Q J, KANG H, LI W H, LIU Y J, HAO Y J, YOU C X. Ectopic expressing *MdSWEET1* in tomato enhanced salt tolerance[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(3): 433-443. (in Chinese)
- [13] XIE H H, WANG D, QIN Y Q, MA A N, FU J X, QIN Y H, HU G B, ZHAO J T. Genome-wide identification and expression analysis of SWEET gene family in *Litchi chinensis* reveal the involvement of *LcSWEET2a/3b* in early seed development[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19: 499.
- [14] GENG Y Q, WU M J, ZHANG C M. Sugar transporter *ZjSWEET2.2* mediates sugar loading in leaves of *Ziziphus jujuba* Mill.[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 1081.
- [15] ZHENG Q M, TANG Z, XU Q, DENG X X. Isolation, phylogenetic relationship and expression profiling of sugar transporter genes in sweet orange (*Citrus sinensis*)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 119(3): 609-624.
- [16] FENG G Z, WU J X, XU Y H, LU L Q, YI H L. High-spatiotemporal-resolution transcriptomes provide insights into fruit development and ripening in *Citrus sinensis*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(7): 1337-1353.
- [17] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [18] GORA P J, REINDERS A, WARD J M. A novel fluorescent assay for sucrose transporters[J]. Plant Methods, 2012, 8: 13.
- [19] LI X Y, GUO W, WANG A D. Histone acetylation at the promoter for the transcription factor *PuWRKY31* affects sucrose accumulation in pear fruit[J]. Plant Physiology, 2020, 182(4): 2035-2046.
- [20] HAN L, ZHU Y P, LIU M, ZHOU Y, LU G Y, LAN L, WANG X P, ZHAO Y F, ZHANG X C. Molecular mechanism of substrate recognition and transport by the *AtSWEET13* sugar transporter[J]. Proceedings of the National Academy, 2017, 114(38): 10089-10094.
- [21] KO H Y, HO L H, NEUHAUS H E, GUOW J. Transporter *SISWEET15* unloads sucrose from phloem and seed coat for fruit and seed development in tomato[J]. Plant Physiology, 2021, 187(4): 2230-2245.
- [22] CHEN L Q, QU X Q, HOU B H, SOSSO D, OSORIO S, FERNIE A R, FROMMER W B. Sucrose efflux mediated by *SWEET* proteins as a key step for phloem transport[J]. Science, 2012, 335(6065): 207-211.
- [23] YANG J, LUO D P, YANG B, FROMMER W B, EOM J S. *SWEET11* and *15* as key players in seed filling in rice[J]. New Phytologist, 2018, 218(2): 604-615.
- [24] CHEN L Q, LIN I W, QU X Q, DAVIDE S, HEATHER E M, ALEJANDRA L, LACEY S A, FROMMER W B. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo[J]. Plant Cell, 2015, 27(3): 607-619.
- [25] WANGS D, KENGO Y, GUO R Z, JAMES W, 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.
- [26] WANG X J, FANF J N, LIU P, LIU J J, FANG W, FANG Z M, XIAO Y Z. Mucoromycotina Fungi possess the ability to utilize plant sucrose as a carbon source: evidence from *Gongronella sp.* w5[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 591697.
- [27] ROTTMANN T M, FRITZ C, LAUTER A, SCHNEIDER S, FISCHER C, DANZBERGER N, DIETRICH P, SAUER N, STADLER R. Protoplast-esculin assay as a new method to assay plant sucrose transporters: characterization of *AtSUC6* and *AtSUC7* sucrose uptake activity in Arabidopsis Col-0 ecotype[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 430.
- [28] MA Q J, SUN M H, LU J, KANG H, YOU C X, HAO Y J. An apple sucrose transporter *MdSUT2.2* is a phosphorylation target for protein kinase *MdCIPK22* in response to drought[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(3): 625-637.
- [29] LI C L, MENG D, PINEROS M A, MAO Y X, DANDEKAR A M, CHENG L L. A sugar transporter takes up both hexose and sucrose for sorbitol-modulated in vitro pollen tube growth in apple[J]. Plant Cell, 2020, 32(2): 449-469.
- [30] LIANG Y, JIANG C Y, LIU Y, GAO Y R, LU J Y, PALINUER A, FEIZ J, JIANG C Z, HONG B, MA C, GAO J P. Auxin regulates sucrose transport to repress petal abscission in rose (*Rosa hybrida*)[J]. Plant Cell, 2020, 32(11): 3485-3499.
- [31] ZHEN Q L, FANG T, PENG Q, LIAO L, ZHAO L, OWITI A, HAN Y P. Developing gene-tagged molecular markers for evaluation of genetic association of apple *SWEET* genes with fruit sugar accumulation[J]. Horticulture Research, 2018, 5(1): 14.
- [32] LI J, CHEN D, JIANG G L, SONG H Y, TU M Y, SUN S X. Molecular cloning and expression analysis of *EjSWEET15*, encoding for a sugar transporter from loquat[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 272: 109552.
- [33] HIRATSUKA S, NAKAYAMA S, TAMURA S, NADA K. Translocation and accumulation of fruit-fixed photosynthate in Satsuma mandarin[J]. Plant Growth Regulation, 2017, 81(2): 277-282.
- [34] SADKA A, SHLIZERMAN L, KAMARA I, BLUMWALD E. Primary metabolism in citrus fruit as affected by its unique structure[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1167.