

甘薯 CIN 基因家族鉴定及影响块根膨大关键 CIN 基因的挖掘

刘嘉婷^{1,2}, 辛曙丽³, 赵 添^{1,2}, 刘永华^{1,2*}, 朱国鹏^{1,2*}

1. 海南大学南繁学院(三亚南繁研究院), 海南三亚 572022; 2. 海南大学热带农林学院(农业农村学院、乡村振兴学院)/海南大学海南省热带园艺作物品质调控重点实验室, 海南儋州 571737; 3. 保亭黎族苗族自治县农业服务中心, 海南保亭 572316

摘 要: 细胞质转化酶(CIN)催化蔗糖不可逆地水解为葡萄糖和果糖,在模式植物根系生长发育中发挥着重要作用。目前尚未对甘薯 CIN 基因家族进行研究,更不清楚 CIN 在甘薯块根膨大中的具体作用。本研究系统鉴定了甘薯 CIN 基因家族的种类和数量并分析其蛋白质理化性质、染色体定位、系统发育、基因结构和保守基序、启动子顺式元件,同时,分析甘薯 CIN 家族基因在不同组织部位进行的表达特异性分析及其在不同类型根系中的表达水平和酶活性,初步筛选出在甘薯块根膨大中发挥重要作用的关键候选 CIN 基因。结果如下:(1)从甘薯(*Ipomoea batatas*)基因组中共鉴定出 12 个 *IbCIN* 基因(*IbCIN1-12*),分布于 8 条染色体上,编码蛋白质的氨基酸数量范围为 417~825 aa,分子量范围为 46.60~93.75 kDa,等电点范围为 4.83~7.17。(2)系统发育分析发现 *IbCIN* 可分为 3 个亚组,其中 $\alpha 1$ 亚组 1 个, $\alpha 2$ 亚组 3 个, β 亚组 8 个。 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 亚组成员之间在保守基序和基因结构上差异较小、相对保守,而 β 亚组成员之间则差异较大,表明 β 亚组的 *IbCIN* 基因可能在功能上更为多样,可以参与更多的生物过程。此外,*IbCIN1*、*IbCIN7*、*IbCIN10*、*IbCIN12* 与拟南芥和木薯根系发育相关 CIN 基因的亲缘关系较近,推测其可能与非块根类型根系发育密切相关。(3) *IbCINs* 在不同组织部位(幼叶、成熟叶、茎、花、60 d 块根)和不同类型根系(白色纤维根、红色纤维根、柴根和 60 d 块根)中的表达水平分析表明, *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 在块根中的表达水平最高,同时块根中的 CIN 酶活性也显著高于非块根类型根系,推测这 3 个基因可能在甘薯块根膨大中发挥着重要作用。(4)生物信息学分析进一步揭示 *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 可能通过调控蔗糖转运和代谢、光周期反应、赤霉素信号转导等途径和机制来共同促进甘薯块根的发育。本研究可为后续通过转基因技术等手段深入研究甘薯 CIN 基因的功能奠定基础。

关键词: 甘薯; 细胞质转化酶; 蔗糖代谢; 基因家族; 块根膨大

中图分类号: S531

文献标志码: A

Identification of CIN Gene Family in Sweetpotato and Screen of Key CIN Genes Regulating Storageroot Development

LIU Jiating^{1,2}, XIN Shuli³, ZHAO Tian^{1,2}, LIU Yonghua^{1,2*}, ZHU Guopeng^{1,2*}

1. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University, Sanya, Hainan 572022, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry (School of Agricultural and Rural Affairs, School of Rural Revitalization) / Key Laboratory for Quality Regulation of Tropical Horticultural Crops of Hainan Province, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 3. Baoting Agricultural Service Center, Baoting, Hainan 572316, China

Abstract: Cytoplasmic invertase (CIN) irreversibly hydrolyzes sucrose into glucose and fructose and plays an important role in the development of roots in various model plants. Presently, there is no research on the CIN gene family in sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and the role of *IbCINs* in the development of storage roots of sweetpotato remains to be elucidated. This study systematically identified the types and quantities of *IbCIN* gene family. Physicochemical proper-

收稿日期 2024-03-08; 修回日期 2024-03-19

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 32260440); 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. 2019RC146); 国家甘薯产业技术体系项目(No. CARS-10)。

作者简介 刘嘉婷(1999—),女,硕士研究生,研究方向:甘薯栽培技术和品质。*通信作者(Corresponding author): 刘永华(LIU Yonghua), E-mail: yong-hua.liu@hainanu.edu.cn; 朱国鹏(ZHU Guopeng), E-mail: zhuguopeng@hainanu.edu.cn。

ties, chromosome localization, phylogeny, gene structure and conserved motifs, promoter *cis* elements of *IbCINs* were also analyzed. Simultaneously, through the expression analysis of *IbCINs* in different tissues and different types of roots, and the activity analysis of CIN in different types of roots, several candidate CIN genes were identified that play an important role in the development of storage roots of sweetpotato. A total of 12 *IbCIN* genes (*IbCIN1-12*) were identified from the genome of sweetpotato, distributing on 8 chromosomes. The number of amino acids of *IbCIN*-encoded protein was 417–825 aa, the molecular weight was 46.60–93.75 kDa, and the isoelectric point was 4.83–7.17. Phylogenetic analysis revealed that *IbCINs* could be divided into three groups, $\alpha 1$, $\alpha 2$ and β groups, comprising 1, 3 and 8 members, respectively. $\alpha 1$ and $\alpha 2$ members were very conservative in conserved motifs and gene structures, while β members were less conservative, which indicating that β group may have more diverse function than the other two groups, allowing β members to participate in more biological processes. In addition, phylogenetic analysis also revealed that *IbCIN1*, *IbCIN7*, *IbCIN10* and *IbCIN12* were closely related to CIN genes related to root development in *Arabidopsis* and cassava, suggesting that the four genes may play important roles in the development of non-storage root of sweetpotato. The analysis of the expression levels of *IbCINs* in different tissue (young leaves, mature leaves, stems, flowers, 60 d storage roots) and different types of roots (white fiber roots, red fiber roots, pencil roots and 60 d storage roots) showed that *IbCIN4*, *IbCIN8* and *IbCIN11* had the highest expression levels in storage roots, and simultaneously the CIN activity in storage roots was significantly higher than that in non-storage roots. Thus, it can be speculated that the three genes may play an important role in the development of storage roots of sweetpotato. Bioinformatics analysis further revealed that *IbCIN4*, *IbCIN8* and *IbCIN11* may jointly promote the development of storage roots via different mechanisms, including facilitating sucrose transport to and subsequent degradation in storage roots, attenuating photo-period response and signal transduction of gibberellin. This study could lay a foundation for further research on the function of *IbCIN* genes through transgenic technology.

Keywords: sweetpotato; cytoplasmic invertase (CIN); sucrose metabolism; gene family; development of storage root

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.008

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 适应能力强、产量高且易于管理, 在全球广泛栽培, 为世界第一大农作物^[1]。我国是世界第一大甘薯种植国, 面积、产量均居全球首位^[2]。2022 年我国甘薯种植面积和产量分别占全球的 30% 和 54%^[3]。甘薯块根富含淀粉、可溶性糖、蛋白质、维生素和矿物质, 可作为主粮和饲料, 也可用于鲜食、食品和淀粉加工^[4]。和其他发展中国家相比, 我国甘薯单产相对较高, 但与发达国家相比, 仍有一定差距。目前我国甘薯平均单产为 22.5 t/hm²^[5], 而日本和以色列则分别为 24.7、33.3 t/hm²^[6], 澳大利亚更是高达 39.7 t/hm²^[3]。目前我国甘薯单产已处平台期, 近 20 年来一直徘徊在 22 t/hm² 左右, 没有进一步提升^[3]。虽然很多发展中国家和地区仍依靠甘薯作为主粮来确保粮食安全^[7-8], 但其甘薯单产远低于世界平均水平的 12 t/hm², 如非洲仅为 7 t/hm²^[3]。如何进一步提高甘薯产量, 不仅可以保障“一带一路”沿线发展中国家和地区的粮食安全, 还可提高我国甘薯种植效益。甘薯产量主要由 2 个因素决定, 即块根数量和块根大小。因此, 阐明甘薯块根发育和膨大的机理, 将有利于进一步提高甘薯产量, 实现高产、稳产的目标。

蔗糖 (sucrose, Suc) 分解产生的己糖可作为

碳骨架、能量或糖信号在植物的生长发育中发挥重要作用^[9]。转化酶 (invertase, INV) 和蔗糖合酶 (sucrose synthase, Sus) 参与植物体内 Suc 的分解。Sus 将 Suc 分解为 UDP-葡萄糖 (UDP-Glc) 和果糖 (Fru), 该分解过程为可逆过程; INV 则不可逆地将 Suc 水解为 Glc 和 Fru^[10]。根据亚细胞定位的不同, INVs 可进一步分为 3 种: 细胞壁转化酶 (cell wall invertase, CWIN)、液泡转化酶 (vacuolar invertase, VIN) 和细胞质转化酶 (cytoplasmic invertase, CIN)^[11]。这 4 种蔗糖分解酶在植物发育、非生物胁迫反应和植物-病原菌互作中分别发挥着重要的作用^[9, 11-12]。

迄今为止, 有关蔗糖分解酶对块根/块茎等地下储藏器官 (如胡萝卜肉质根和马铃薯块茎等) 生长发育影响的研究主要集中于 Sus、CWIN 和 VIN^[13-16], 对 CIN 的研究较少。与 CWIN、VIN 不同, CIN 在植物进化过程中更为保守, 其基因序列变异程度远低于 CWIN 和 VIN, 因此在植物生长发育中发挥的作用可能更为重要^[17]。研究表明, CIN 分解产生的己糖可参与各种生理生化反应, 包括呼吸代谢、抗氧化、各种代谢物的生物合成以及基因表达的调控等^[11, 18]。

越来越多的证据表明, CIN 在植物根系发育

中发挥着重要的作用。拟南芥中 T-DNA 的插入导致 CIN 基因 *CINV1* 缺失突变,造成突变体幼苗根系变短^[19]。拟南芥的双 CIN 基因突变体 (*cin1/cin2*) 表现为初生根伸展减少 30%, 同时叶片数量也显著减少^[20]。在百脉根 (*Lotus japonicus*) 中, CIN 基因 *LjINV1* 的突变会显著降低 CIN 活性, 严重抑制根系的生长, 且会导致根系上形成根瘤^[21]。EMS 诱导水稻 CIN 基因 *OsCyt-inv1* 突变导致根系发育受阻, 包括根系伸长区细胞皱缩和根系变短^[22]。此外, 拟南芥 CIN 基因 *AtCYT-INV1* 的突变会缓解渗透胁迫对侧根生长的抑制, 表明 CIN 基因还可调控胁迫条件下根系的生长发育^[23]。

如上所述, 目前 CIN 对根系发育影响的研究主要集中在模式植物上, 有关 CIN 对甘薯块根膨大调控的研究较少。这很大程度上是由于甘薯是六倍体 ($2n=6x=90$) 且染色体高度杂合, 基因组测序较晚所导致的^[24]。近期公布的甘薯基因组序列可为研究 CIN 在甘薯块根膨大中的潜在作用提供重要帮助^[24-25]。本研究对甘薯基因组中的 CIN 基因家族成员进行鉴定和生物信息学分析, 进一步研究 CIN 基因成员在甘薯不同组织部位和不同类型根系表达水平以及 CIN 活性, 最后筛选出可能在块根膨大中起重要调控作用的关键 CIN 基因。本研究将为后续通过转基因技术研究 CIN 在甘薯块根膨大中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2021 年 10 月 20 号至 12 月 20 号在海南大学露地种植海南甘薯主栽品种高系 14, 基肥按照 450 kg/hm² 的量施史丹利复合肥 (N : P : K 为 15 : 15 : 15) 和 12 t/hm² 的量施羊粪有机肥。取样部位分别为高系 14 甘薯的幼叶、成熟叶、茎、花 (仅花瓣) 和 60 d 块根, 每个部位取 0.3 g, 4 个生物学重复。

2023 年 2 月至 4 月在海南大学农科实验田基地的温室大棚盆栽种植高系 14 甘薯。定植前将土壤与基质 (由椰糠、泥炭、稻谷壳、珍珠岩及微生物料配置而成) 按体积比 3 : 1 混匀, 再施史丹利复合肥作为基肥。花盆规格为外直径 31 cm, 高 19.4 cm, 4 个生物学重复。取样部位为白色纤维根 (白色细纤维状根)、红色纤维根 (直径小于 0.2 cm 的红色纤维状根)、柴根 (直径 0.5~2.0 cm

的红色不膨大根) 和 60 d 块根。每个样品分别称取 0.2、0.3 g 存放在 2 mL 试管中, 液氮处理后保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 甘薯 CIN 基因家族成员鉴定 采用木薯、水稻、拟南芥等 3 个物种作为种子序列进行 Blast 对比, 具体参照 CHEN 等^[26]的方法。在甘薯数据库 (<https://ipomoea-genome.org/>) 下载栽培种甘薯 *Ipomoea batatas* 的全基因组数据, 在 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库和文献查阅中下载拟南芥、水稻、木薯的所需氨基酸序列^[10, 27-28]。用 TBtools^[29]软件和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库进行双向 Blast 比对筛选。

1.2.2 甘薯 CIN 基因家族成员理化性质分析及染色体定位 使用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件分析 CIN 的理化性质。使用 TBtools 软件可视化分析 CIN 基因家族成员在染色体上的位置。

1.2.3 甘薯 CIN 基因家族成员系统发育分析 使用 MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>) 在线软件对拟南芥、木薯和甘薯的 CIN 蛋白氨基酸序列进行进化分析, 采用邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统进化树, 自展值为 1000。使用 Adobe illustrator CC 2019 软件美化。

1.2.4 甘薯 CIN 基因家族成员保守结构域、基因结构和基序分析 通过 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 数据库确定甘薯 CIN 基因的保守结构域。使用 TBtools 软件确定甘薯 CIN 家族基因结构 (内含子-外显子)。使用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 在线软件预测甘薯 CIN 家族成员的基序 (motif), 预测 CIN 蛋白基序的标准为: 不同图案的数量=10, 其他参数默认, 得到的结果使用 TBtools 软件进行可视化分析。

1.2.5 甘薯 CIN 基因家族成员顺式作用元件分析 将甘薯 CIN 基因转录起始上游 2000 bp 的序列, 通过 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件对甘薯 CIN 启动子进行顺式作用元件预测, 并使用 TBtools 软件制作热图。

1.2.6 甘薯 CIN 基因家族共线性分析 用 TBtools 软件的 One Step MCscanX 功能分析甘薯 CIN 基因的共线性关系, 用 TBtools 中的 Advanced

Circos 功能将甘薯 CIN 同源基因的共线性关系可视化, 计算基因对的 Ka/Ks (非同义替换率/同义替换率)。

1.2.7 甘薯 CIN 基因家族成员表达分析 采用 OmniPlant RNA Kit (DNase I) (CoWin Biotech, 北京, 中国) 试剂盒提取甘薯样品总 RNA。使用 HiScript III All-in-one RT SurperMix Perfect for qPCR cDNA 合成试剂盒 (Vazyme, 南京, 中国)

对提取的 RNA 进行反转录 cDNA。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme, 南京, 中国) 试剂盒和 QuantStudio™ 1 实时荧光定量 PCR 仪 (applidbiosystems, Thermo Fisher Scientific) 进行实时定量 PCR。以管家基因 *IbActin* 为内参基因, 引物见表 1。反应程序: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算基因的相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物
Tab. 1 Primers used for qRT-PCR determination

基因名称 Gene name	登录号 Accession No.	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	产物长度 Amplicon length/bp
<i>IbCIN1</i>	g4072	GGATAATCAAGAACATGGGCTG	TCCTGGTAGATGAAAGAGGGGT	236
<i>IbCIN2</i>	g5893	GGAGTAAAGAGGGAGGAACCCA	CAAGTCACCAACAAACACCGAG	252
<i>IbCIN3</i>	g8522	GGAGAATCGTGACTGGCTGTG	CTTCCGAGTTTCCCGTCATAG	199
<i>IbCIN4</i>	g13714	ACTGAGTGAAATGTCCGTTGG	GAGTTGCGGGTGGAAGAAA	108
<i>IbCIN5</i>	g18829	GAGGATGGATTTCCGTTGGT	CTTGATGCCGCAGTGAGTAG	270
<i>IbCIN6</i>	g19034	TCTCCCGCCTTCCATACC	CTCCCAAGCATCAGCAAACA	151
<i>IbCIN7</i>	g23246	TCTCTGAATAGGGAGGAGGGGA	CCAACTGGGCTGTCACAATACC	140
<i>IbCIN8</i>	g25759	GAATGGATGCCGAATAAAGGA	CCGTGGCAAGACTGCTGACTA	115
<i>IbCIN9</i>	g34021	CGTCCTTAGCAACTCCTGAAC	CACCCTGTTACAATACGCCAC	139
<i>IbCIN10</i>	g41626	CTCACATGGATTTTCGGTTTTTC	CCAGTTATTATTCGCCAGTCTTC	187
<i>IbCIN11</i>	g41717	AGCACGACGAAGAAAGTAGGG	TCGAGTTGGCATGAAATCAAA	215
<i>IbCIN12</i>	g44130	ATTCCACAGAGGCAACAAACAA	GACTCCAAAGCCGGATAACATA	274
<i>IbActin</i>	EU250003.1	TATGGTTGGGATGGGACAGAA	CGGTAAGAAGGACAGGGTGCT	191

1.2.8 甘薯 CIN 酶活性测定 参照 TOMLINSON 等^[30]的方法测定甘薯 CIN 活性。

1.3 数据处理

采用 Excel 2022 软件对相关数据进行处理, 采用 SPSS 27.0 软件对甘薯 CIN 基因表达和 CIN 酶活性数据进行单因素方差分析 (ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 甘薯 CIN 基因家族成员的鉴定

用 TBtools 软件和 NCBI 网站进行双向 Blast 序列比对筛选, 共鉴定出 12 个 CIN 基因家族成员, 按照其在染色体上的先后顺序命名为 *IbCIN1-12* (图 1)。甘薯属于六倍体 (6x=90), 其 *IbCINs* 分别分布在 15 条染色体中的 8 条染色体上, 在 LG11 上有 3 个 *IbCINs* (*IbCIN10-12*), 在 LG2 和 LG5 上分别有 2 个 *IbCINs* (*IbCIN2-3*、*IbCIN5-6*), 而在 LG1、LG4、LG6、LG7 和 LG9 上均只有 1 个 *IbCIN*(*IbCIN1*、*IbCIN4*、*IbCIN7-9*)。在其他 7 条染色体上均无 *IbCIN* 基因。

IbCIN 蛋白的理化性质分析结果显示(表 2), *IbCIN* 蛋白长度在 417~825 aa 之间, 等电点在 4.83~7.17 之间, 分子量在 46 595.11~93 753.02 Da 之间。除 *IbCIN10* 外, 其他 *IbCIN* 蛋白的不稳定指数均大于 40, 为不稳定蛋白, 与已有的研究结果一致, 即与 *CWIN* 和 *VIN* 不同, 由于 CIN 蛋白没有糖基化, 导致其结构不稳定, 非常容易分解^[9]。在所有 *IbCIN* 蛋白中, 仅 *IbCIN9* 平均疏水性为正值, 属于疏水蛋白, 其他 *IbCIN* 蛋白均为负值, 属于亲水蛋白 (表 2)。

2.2 甘薯 CIN 基因家族成员的系统发育分析

前人研究发现 CIN 蛋白可被分为 3 个亚组, 分别为 α1、α2 和 β 亚组, 其中 α1 亚组定位于质体上 (如叶绿体), α2 亚组定位于线粒体上, β 亚组则位于细胞质中^[31]。用 MEGA-X 软件将鉴定出的 12 个 *IbCINs* 与已鉴定出的 9 个拟南芥和 10 个木薯 CIN 家族成员共 31 个 CIN 基因构建系统发育树 (图 2)。拟南芥 α1 亚组有 1 个成员, α2 亚组有 3 个成员, β 亚组有 5 个成员; 木薯 α1 亚

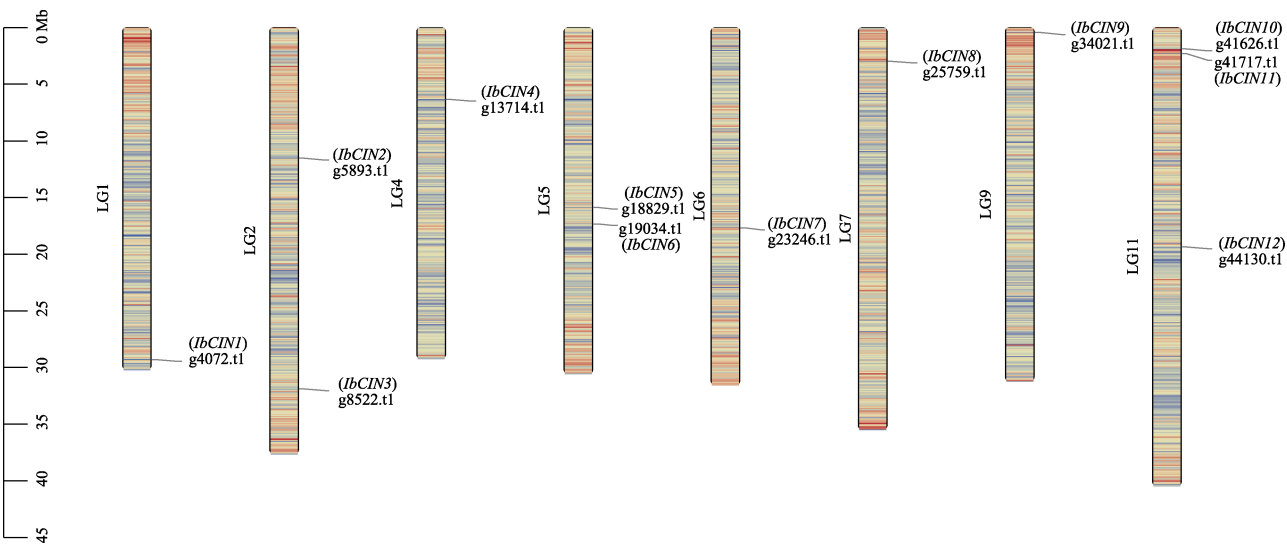


图 1 *IbCINs* 在染色体上的定位

Fig. 1 Localization of sweetpotato *IbCIN* genes on chromosomes

表 2 *IbCIN* 蛋白的理化性质分析

Tab. 2 Analysis of physicochemical properties of *IbCIN* proteins

蛋白名称 Protein name	登录号 Accession No.	氨基酸数量 Number of aa	等电点 pI	分子量 MW/Da	不稳定指数 Instability index	平均疏水性 Average hydrophobicity
IbCIN1	g4072.t1	417	4.83	46595.11	45.78	-0.120
IbCIN2	g5893.t1	419	7.17	47944.41	48.05	-0.135
IbCIN3	g8522.t1	461	6.54	52747.93	48.98	-0.085
IbCIN4	g13714.t1	496	6.06	56349.48	46.35	-0.261
IbCIN5	g18829.t1	468	5.13	53375.10	59.34	-0.269
IbCIN6	g19034.t1	536	5.67	61206.33	58.47	-0.194
IbCIN7	g23246.t1	602	5.88	68721.97	44.88	-0.271
IbCIN8	g25759.t1	719	6.27	80059.18	41.56	-0.261
IbCIN9	g34021.t1	825	6.59	93753.02	50.60	0.085
IbCIN10	g41626.t1	612	5.33	69438.59	36.81	-0.202
IbCIN11	g41717.t1	571	6.46	65460.02	60.02	-0.303
IbCIN12	g44130.t1	578	5.65	65374.76	41.65	-0.261

组有 3 个成员， $\alpha 2$ 亚组有 3 个成员， β 亚组有 4 个成员，这和前人的研究结果一致^[31-32]。12 个 *IbCINs* 也可以分为 3 个亚组， $\alpha 1$ 亚组有 1 个成员（*IbCIN8*）； $\alpha 2$ 亚组有 3 个成员（*IbCIN7*、*IbCIN10* 和 *IbCIN12*）， β 亚组有 8 个成员（*IbCIN1-6*、*IbCIN9* 和 *IbCIN11*）。

位于细胞质的拟南芥 CIN 基因 *AtCINV1* 的缺失可以减少 30% 的初生根伸长生长^[20]。超表达拟南芥 CIN 基因 *At-A/N-InvA* 或 *At-A/N-InvG*（*AtCINV1*）表明，这 2 个基因都会显著降低原生质体中 POD 的表达，从而抑制根系过早木质化，最终促进根系生长发育^[33-34]。根据系统发育树，发现甘薯 *IbCIN7*、*IbCIN12* 与拟南芥

At-A/N-InvA 亲缘关系较近，甘薯 *IbCIN1* 与拟南芥 *At-A/N-InvG*（*AtCINV1*）亲缘关系较近，初步推测甘薯 *IbCIN1*、*IbCIN7*、*IbCIN12* 有降低原生质体中 POD 表达的功能，与甘薯根系发育相关。木薯中 *MeNINV1* 是块根淀粉积累的关键基因，可促进木薯块根膨大^[27, 35]。拟南芥中 *A/N-InvH* 与根中 ROS 合成相关，与根系生长密切相关^[36]。*IbCIN10* 与 *MeNINV1* 亲缘关系较近，而 *IbCIN7*、*IbCIN12* 与 *At-A/N-InvH* 亲缘关系较近，推测这 3 个基因可能与甘薯根系发育相关。综上所述，*IbCIN1*、*IbCIN7*、*IbCIN10*、*IbCIN12* 等 4 个基因可能均和甘薯根系发育密切相关。但具体哪个基因与甘薯块根膨大相关还有待进一步确定。

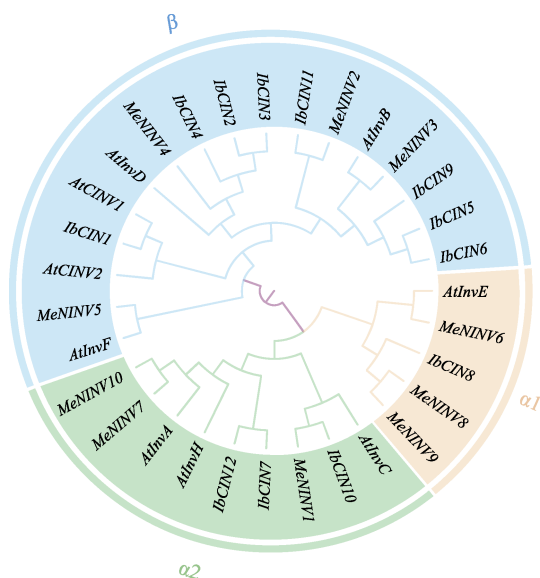


图 2 甘薯、拟南芥、木薯 CIN 家族系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of CIN family of sweetpotato, arabidopsis and cassava

2.3 甘薯 CIN 基因家族成员的基因结构和基序分析

通过 NCBI 蛋白保守域数据库对甘薯 (*IbCIN1-12*) 和木薯 (*MeNINV1-10*) 的 CIN 进行蛋白保守结构域分析发现, 与木薯 CIN 一样, 12 个甘薯 CIN 均含有 CIN 蛋白特有的 Glyco_hydro_100 保守结构域 (图 3), 属于糖基水解酶基因家族 GH 100, 与前人研究结果一致^[31]。表明本研究鉴定出的 12 个 *IbCINs* 属于 CIN 基因家族。此外, 保守基序分析显示 (图 4), *IbCINs* 有 10 个保守基序 (motif), $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚组的 4 个 *IbCINs*

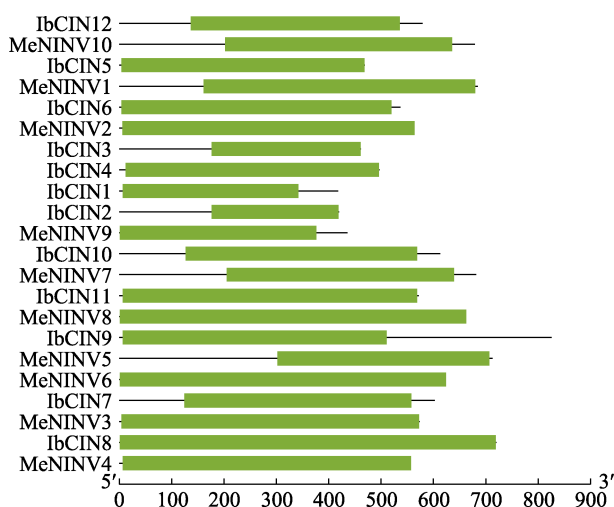


图 3 甘薯和木薯 CIN 家族保守结构域
Fig. 3 Domains of CIN family in sweetpotato and cassava

包含 10 个 motif, 在 β 亚组中只有 *IbCIN11* 基因包含 10 个 motif, *IbCIN1-2* 包含 5 个 motif, *IbCIN3* 包含 6 个 motif, *IbCIN4-5* 包含 8 个 motif, *IbCIN6*、*IbCIN9* 包含 9 个 motif, 只有 motif1 存在于所有 *IbCINs*。

为进一步了解甘薯 CIN 基因家族的进化, 对甘薯 CIN 基因家族成员的外显子-内含子分布进行分析。 $\alpha 1$ 亚组的唯一一个 CIN 基因 *IbCIN8* 有 7 个外显子; $\alpha 2$ 亚组中除 *IbCIN10* 具有 8 个外显子外, 其他 2 个 *IbCINs* 也均有 7 个外显子; β 亚组中 *IbCIN4*、*IbCIN6* 和 *IbCIN11* 有 4 个外显子, *IbCIN5* 有 5 个外显子, *IbCIN1* 有 6 个外显子, *IbCIN3* 有 8 个外显子, *IbCIN2* 有 9 个外显子, *IbCIN9* 有 11 个外显子 (图 4)。

$\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 亚组成员之间在保守基序和基因结构上差异较小、相对保守, 而 β 亚组成员之间则差异较大, 表明 β 亚组 CIN 基因在甘薯栽培种的进化过程中经历了结构缺失和变异, 这可能导致其在功能上的多样化, 从而可以参与更多的生物过程^[37]。在保守基序方面, $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 亚组的 4 个 *IbCINs* 都包含有 10 个保守基序, 而 8 个 β 亚组成员中仅 *IbCIN11* 含有 10 个保守基序, 其余 7 个 *IbCINs* (*IbCIN1-6* 和 *IbCIN9*) 的保守基序介于 5~9 个之间。同样, 在基因结构方面, $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚组 4 个基因中除 *IbCIN10* 具有 8 个外显子外, 其他 3 个 *IbCINs* 具有 7 个外显子, 而 β 亚组成员包含的外显子数量则波动较大, 介于 4~11 个之间。不同亚组 CIN 之间在保守基序和基因结构上的差异可能是影响其亚细胞定位和功能的重要原因。

2.4 甘薯 CIN 基因家族成员的顺式作用元件分析

启动子顺式元件与基因功能密切相关, 利用甘薯 CIN 基因家族的 2000 bp 启动子区域分析其顺式作用元件。*IbCINs* 的启动子顺式作用元件有 16 种, 可分为 4 大类, 根据每大类中顺式元件数量从多到少依次为光响应元件 (AAAC-motif、ACA-motif、ACE、AE-box、ATCT-motif、Box 4、Box II、chs-CMA1a、chs-CMA2a、G-box、GA-motif、GATA-motif、GT1-motif、I-box、LAMP-element、L-box、MRE、Sp1、TCCC-motif、TCT-motif)、激素响应元件 (生长素 AuxRR-core 和 TGA-element; 脱落酸 ABRE、赤霉素 GARE-motif、P-box、TATC-box; 水杨酸 TCA-element;

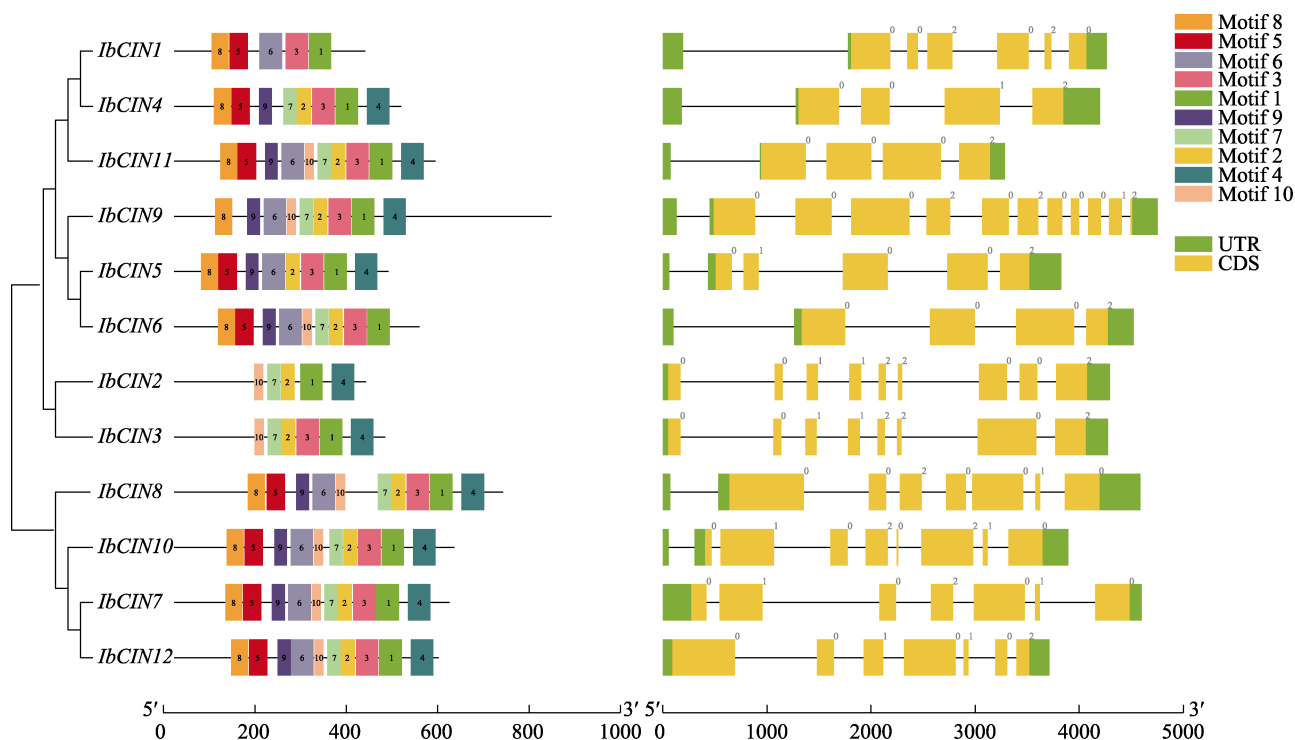


图 4 甘薯 CIN 家族基因结构和保守基序
Fig. 4 Gene structure and conserved motif of CIN family in sweetpotato

茉莉酸甲酯 CGTCA-motif 和 TGACG-motif)、逆境胁迫响应元件（低温 LTR、干旱 MBS、缺氧 ARE 和 GC-motif、防御 TC-rich repeats）和生长发育响应元件（胚乳表达 GCN4_motif、分生组织表达 CAT-box；昼夜节律调控 circadian、种子特异性元件 RY-element、玉米醇溶蛋白代谢元件 O2-site、细胞循环 MSA-like）（图 5）。由于光响应元件和激素响应元件在 CIN 基因中数量最多，推测光和激素是影响 *IbCIN* 基因表达的主要因素。在光周期响应方面，甘薯属于短日照植物，短日照会促进其开花。*IbCIN1*、*IbCIN5*、*IbCIN6*、*IbCIN10*、*IbCIN11* 具有最多的光响应元件，推测这 5 个基因可能和甘薯开花密切相关，而其他 7 个成员的光响应元件相对较少。研究表明，对于块根/块茎作物，开花会抑制块根/块茎的膨大^[38]，推测 *IbCIN1*、*IbCIN5*、*IbCIN6*、*IbCIN10*、*IbCIN11* 可能会抑制块根膨大，而其他 7 个 *IbCINs*（*IbCIN2-4*、*IbCIN7-9*、*IbCIN12*）则可能在甘薯块根膨大中发挥重要作用。在激素响应方面，脱落酸促进甘薯块根的形成^[39]和膨大^[40]。与其他家族成员相比，*IbCIN1*、*IbCIN5-7* 和 *IbCIN9-10* 都包含相对较多的 ABA 响应元件，推测 *IbCIN1*、*IbCIN5-7* 和 *IbCIN9-10* 可能通过响应 ABA 来促进甘薯块根膨大。研究表明，赤霉素促进木质化从

而抑制甘薯块根生长^[41]，而 *IbCIN4-9* 和 *IbCIN12* 均不包含赤霉素响应元件，因此推测 *IbCIN4-9* 和 *IbCIN12* 可能会促进甘薯块根膨大。

2.5 甘薯 CIN 基因家族成员共线性分析和压力选择分析

使用 TBtools 软件的 MCScanX 功能在 *IbCINs* 中共鉴定出 2 个重复基因对，其中 *IbCIN9-IbCIN11* 分布于不同的染色体上，而 *IbCIN2-IbCIN3* 位于同一染色体（图 6）。这 2 个重复基因对均为片段复制，没有发现串联重复，说明片段复制是 *IbCIN* 基因进化的主要动力，从而导致功能冗余和亚/新功能化^[42]。通过计算基因对的 Ka/Ks 值，发现这 2 个重复基因对的 Ka/Ks < 1，说明 *IbCIN* 受纯化选择，*IbCIN* 在进化过程的非同义突变是有害的，因而在甘薯进化过程中处于劣势而被淘汰。这表明 CIN 在甘薯生长发育中发挥着重要且不可替代的作用，从而在甘薯进化中具有很强的保守性。

2.6 *IbCINs* 在不同组织部位中的表达分析

为鉴定出与甘薯块根膨大密切相关的 *IbCIN* 基因，本研究对 12 个 *IbCIN* 基因在甘薯幼叶、成熟叶、茎、花、60 d 块根等不同组织部位中的表达进行分析（图 7）。*IbCIN2-4*、*IbCIN7*、*IbCIN9-12* 等 8 个基因在 5 种组织部位中均有表达，其中

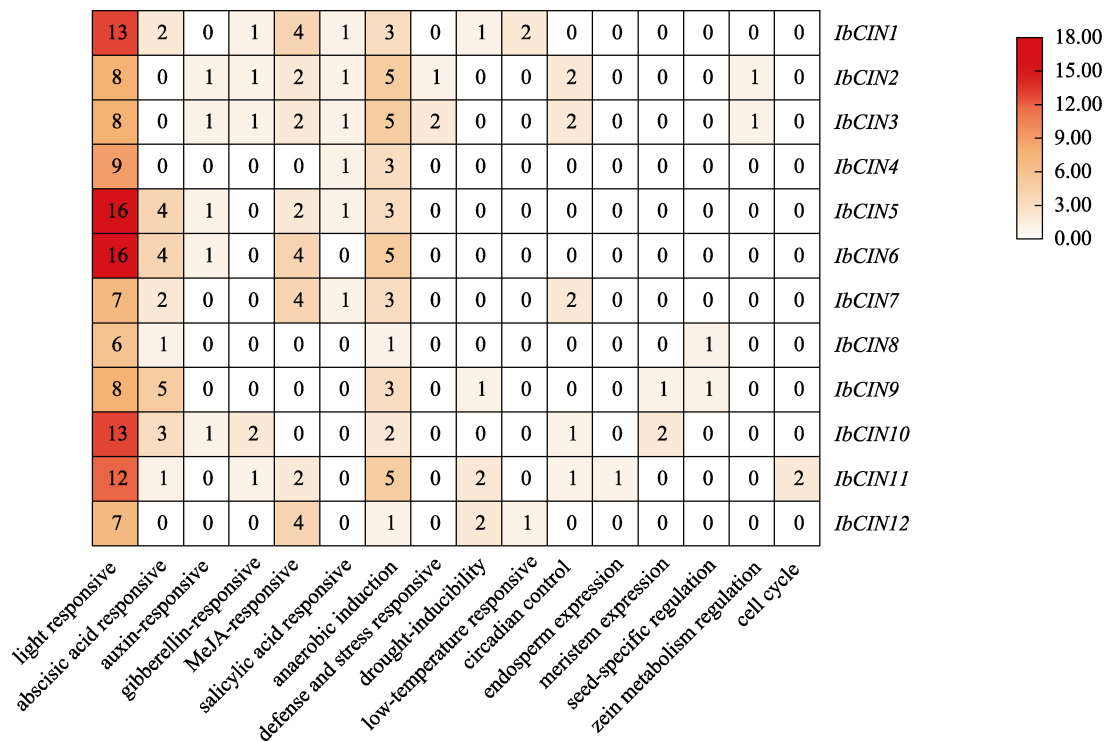


图 5 甘薯 CIN 家族顺式作用元件热图

Fig. 5 Heat map of cis-acting elements of CIN family in sweetpotato

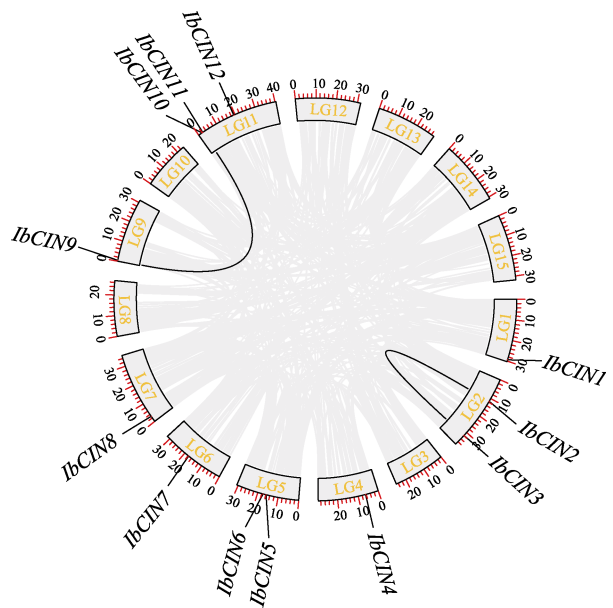


图 6 甘薯 CIN 家族种内共线性分析

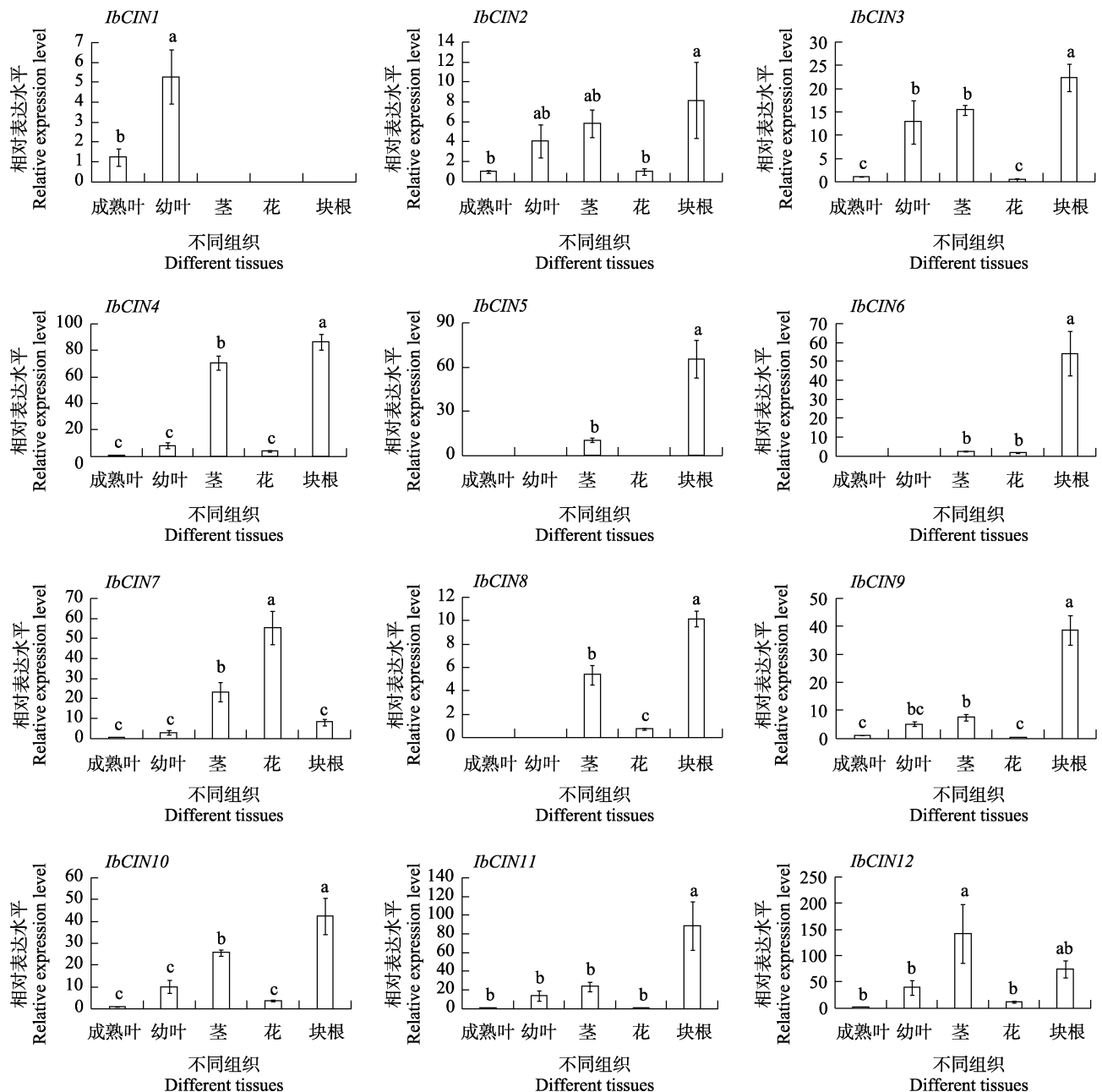
Fig. 6 Intraspecific collinearity analysis of CIN family of sweetpotato

IbCIN2-6 与 *IbCIN8-11* 在块根中的表达量最高, *IbCIN7* 在花中的表达量最高, *IbCIN12* 在茎中的表达量最高。此外, *IbCIN1* 仅在成熟叶和幼叶中表达, 且在幼叶中的表达量高于成熟叶。 *IbCIN5* 仅在茎和块根中表达, 且在块根中的表达量最高。

IbCIN6 和 *IbCIN8* 仅在茎、花和块根中表达, 且在块根中的表达量最高。 *IbCIN* 基因的表达模式具有明显的组织特异性, 12 个 *IbCINs* 中有 9 个 (*IbCIN2-6* 和 *IbCIN8-11*) 在块根中的表达量最高, 而其他 3 个 *IbCINs* 分别在幼叶 (*IbCIN1*)、花 (*IbCIN7*) 和茎 (*IbCIN12*) 中的表达量最高。

2.7 *IbCIN* 基因在不同类型根系中的表达分析

为进一步缩小影响甘薯块根膨大的候选 *IbCIN* 基因的范围, 对白色纤维根、红色纤维根、柴根和 60 d 块根等 4 种根系进行取样, 测定其 *IbCIN* 基因的表达水平(图 8)。结果发现, *IbCIN1* 在甘薯不同类型根系中均不表达, 此结果和图 7 的测定结果相吻合。 *IbCIN5* 仅在红色纤维根和块根中表达, 且在红色纤维根中的表达量最高。其余 10 个 *IbCINs* 在所有类型根系中均有表达, 其中 *IbCIN4*、*IbCIN8*、*IbCIN11*、*IbCIN12* 等 4 个基因在块根中的表达量最高, 显著高于在其他类型根系中的表达。 *IbCIN2*、*IbCIN3* 和 *IbCIN9* 等 3 个基因在块根、白色和红色纤维根中的表达量较高, 且差异不显著。 *IbCIN7* 和 *IbCIN10* 等 2 个基因在白色和红色纤维根中的表达量较高, 而 *IbCIN6* 在柴根和红色纤维根中的表达量较高。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

The different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 7 不同甘薯组织部位中 CIN 基因表达水平

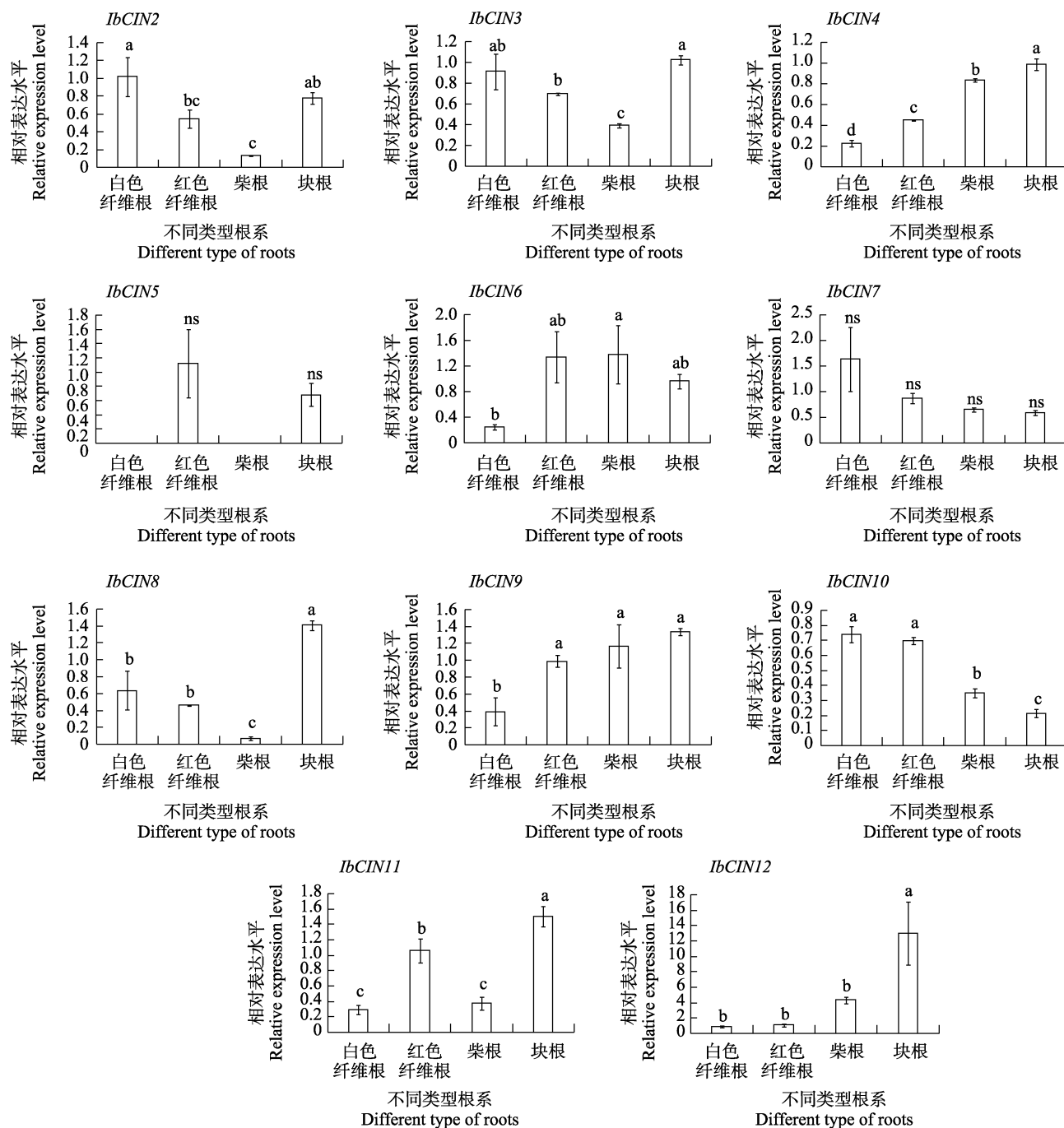
Fig. 7 Expression levels of CIN genes in different tissue of sweetpotato

由于在 12 个 *IbCINs* 中,只有 *IbCIN4*、*IbCIN8*、*IbCIN11* 和 *IbCIN12* 等 4 个基因的表达水平在块根中显著高于其他 3 种类型根系,因此推测 *IbCIN4*、*IbCIN8*、*IbCIN11* 和 *IbCIN12* 这 4 个基因可能在甘薯块根膨大中发挥着重要作用。*IbCIN* 基因在不同组织部位(幼叶、成熟叶、茎、花、60 d 块根)中的表达分析结果也显示,*IbCIN4*、*IbCIN8*、*IbCIN11* 在块根中的表达量最高。因此,推测 *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 等 3 个基因可能

是影响甘薯块根膨大关键 CIN 基因。

2.8 甘薯不同类型根系 CIN 活性分析

甘薯不同类型根系的 CIN 活性测定结果显示,块根中的 CIN 活性显著高于白色纤维根、红色纤维根、柴根,且在这 3 种根系中的 CIN 活性差异不显著(图 9)。表明 CIN 在块根膨大中发挥着重要的作用。不同类型根系 *IbCIN* 基因的表达分析表明,块根中只有 4 个 *IbCINs* (*IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11-12*) 的表达



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), ns 表示无显著差异 ($P > 0.05$)。

The different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), ns indicates no significant ($P > 0.05$).

图 8 甘薯不同类型根系中 *IbCIN* 基因表达水平

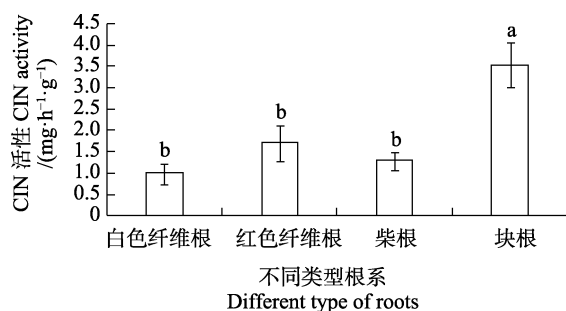
Fig. 8 Expression levels of *IbCIN* genes in different type of sweetpotato roots

水平显著高于其他类型根系。推测 *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 是决定块根 CIN 活性的关键基因，也是影响甘薯块根膨大关键 CIN 基因。

3 讨论

CIN 在植物中广泛存在，可通过不同途径调控植物根系的生长发育。首先，CIN 可通过促进

根系中蔗糖的分解降低其浓度，最终促进蔗糖由叶片向根系的转运，为根系生长提供碳骨架和能量，如 EMS 诱导水稻 CIN 基因 *OsCyt-inv1* 突变导致根系已糖含量下降，同时根系伸长区细胞皱缩和根系变短，而外源供应 3% 葡萄糖可以恢复根系生长，表明蔗糖向根系的转运和分解受阻可能是根系生长受阻的重要原因^[22]。其次，过氧化物



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
The different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 甘薯不同类型根系中 CIN 活性

Fig. 9 Activities of CIN in different type of sweetpotato roots

酶 (peroxidase, POD) 是木质素合成过程中的关键酶^[43-44], 而 CIN 可抑制 POD 的表达^[34], 因此推测 CIN 可通过抑制 POD 来减缓植物根系木质化进程, 从而促进根系的生长发育。此外, CIN 还可通过糖信号途径对植物根系发育进程进行调控^[19], 如, CIN 可通过调控葡萄糖含量来影响拟南芥根系发育关键激素 ABA 的合成和信号转导^[23]。本课题组前期对不同发育时期块根中的 4 种蔗糖分解酶活性测定和相关性分析也表明, CIN 是调控甘薯块根膨大的关键蔗糖分解酶之一^[45]。

近年来, 多种植物的 CIN 基因家族已经被鉴定出来并进行相应的功能研究。本研究首次在甘薯基因组中鉴定出 12 个 CIN 基因家族成员, 并依据其在染色体上的先后顺序命名为 *IbCIN1-12*。这和其他植物物种中鉴定出的 CIN 家族成员的数量基本相当, 如拟南芥为 9 个^[10], 水稻为 8 个 (*OsNINV1-8*)^[10], 木薯为 10 个 (*MeNINV1-10*)^[27], 杨树为 16 个 (*PtrNINV1-16*)^[26]。对甘薯 CIN 家族蛋白理化性质分析表明, *IbCIN* 蛋白中除 *IbCIN10* 外不稳定指数均大于 40, 为不稳定蛋白, 这与前人的研究结果一致, 即与 *CWIN* 和 *VIN* 不同, 由于 CIN 蛋白没有糖基化, 导致其结构不稳定, 非常容易分解^[9]。此外, 12 个 *IbCIN* 蛋白均含有 CIN 蛋白特有的 Glyco_hydro_100 保守结构域, 上述结果表明, 这 12 个 *IbCINs* 确实属于 CIN 基因家族。

通过测定 *IbCIN* 在不同组织中以及不同类型根系中的表达水平, 推测在块根中高表达的 *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 基因可能为调控甘薯块根膨大的关键 CIN 基因。对不同类型根系中 CIN 活性的测定表明, 上述 3 个基因在块根中同

时也表现出更高的 CIN 活性, 进一步证明 *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 等 3 个基因可能是调控甘薯块根膨大的关键 CIN 基因。通过构建系统发育树和亲缘关系分析, 发现 *IbCIN1*、*IbCIN7*、*IbCIN10* 和 *IbCIN12* 等 4 个基因与拟南芥和木薯根系发育相关 CIN 基因的亲缘关系较近, 推测这 4 个基因可能也和甘薯根系发育密切相关。然而, 和其他组织部位 (叶片、花和茎)、其他类型根系相比, 这 4 个基因在块根中的表达水平并不是最高, 可能不是调控甘薯块根膨大的关键基因。推测这 4 个基因可能与非块根类型根系的发育密切相关, 例如 *IbCIN7*、*IbCIN10* 在白色和红色纤维根中表达水平较高, 而 *IbCIN12* 在柴根中表达较高。生物信息学分析结果也从不同角度揭示 *IbCIN4*、*IbCIN8*、*IbCIN11* 基因可能通过不同机制调控甘薯块根的发育。

首先, 在这 3 个基因中, *IbCIN8* 属于 $\alpha 1$ 亚组, 位于质体中, 而 *IbCIN4* 和 *IbCIN11* 属于 β 亚组, 位于细胞质中。质体作为储藏淀粉、蛋白质和脂肪等生物大分子的细胞器, 在甘薯中主要用来储藏淀粉。上述证据表明, 位于质体中的 $\alpha 1$ 亚组 *IbCIN8* 可通过分解蔗糖为质体自身的发育提供能量和物质供应, 从而为淀粉的储藏提供场所和空间, 而位于细胞质中的 β 亚组 *IbCIN4* 和 *IbCIN11* 可通过分解蔗糖降低块根中蔗糖的浓度, 从而促进蔗糖由叶片向块根转运, 为块根的膨大和淀粉的合成提供能量和碳骨架。因此, 这 3 个 *IbCIN* 基因可能协同合作, 共同通过促进蔗糖向块根的转运以及分解代谢来促进块根的生长发育。

其次, 这 3 个基因中 *IbCIN4* 和 *IbCIN11* 均属于 β 亚组。保守基序和基因结构分析表明, $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 亚组成员之间在保守基序和基因结构上差异较小、相对保守, 而 β 亚组成员之间则差异较大, 表明 β 亚组 CIN 基因在甘薯栽培种的进化过程中经历了结构缺失和变异, 这可能导致其在功能上的多样化, 从而可以参与更多的生物过程^[37], 包括块根的生长发育。本课题组前期的研究也表明, 甘薯 2 个近缘野生种 *I. trifida* 和 *I. triloba* 均具有 10 个 CIN 基因成员, 且这 20 个 CIN 基因的保守基序和基因结构与甘薯栽培种的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 亚组更相似, 而与甘薯栽培种的 β 亚组差异较大 (结果未列出)。由于 2 个近缘野生种根系基本不发生膨大, 从而推测 β 亚组的 *IbCIN4* 和 *IbCIN11* 可能与

甘薯块根的膨大密切相关。

最后,研究表明对于块根/块茎作物,开花会抑制块根/块茎的膨大^[38]。在光周期响应方面,甘薯属于短日照植物,短日照会促进其开花,但会抑制块根膨大。通过分析甘薯 CIN 基因的启动子顺式作用元件,发现在 12 个 *IbCIN* 基因中, *IbCIN8* 具有最少的光响应元件,推测其不受光周期影响,从而可以抑制开花并促进块根膨大。此外,研究表明赤霉素促进木质化从而抑制甘薯块根的形成和生长^[41],而 *IbCIN4* 和 *IbCIN8* 都不包含赤霉素响应元件,因此推测 *IbCIN4* 和 *IbCIN8* 可能通过减弱赤霉素信号转导来促进块根膨大。

通过对甘薯 CIN 基因家族进行鉴定,本研究共获得 12 个甘薯 CIN 基因家族成员。通过对甘薯 CIN 基因在不同组织部位和不同类型根系中表达的特异性分析,初步鉴定出 *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 在块根中的表达高于其他组织部位和其他类型的根系,与这 3 个 CIN 基因在块根中的高表达相对应,块根中的 CIN 活性也显著高于其他类型根系,因此 *IbCIN4*、*IbCIN8* 和 *IbCIN11* 可能是调控甘薯块根膨大的关键 CIN 基因。此外,通过系统发育树分析、保守基序和基因结构分析、基因启动子顺式作用元件分析,进一步证明这 3 个基因可能通过调控蔗糖转运和代谢、光周期反应和赤霉素信号转导等途径和机制来共同促进甘薯块根的发育。本研究可为后续通过转基因技术等手段深入研究甘薯 CIN 基因的功能奠定基础。

参考文献

- [1] TAO X, GU Y H, WANG H Y, ZHENG W, LI X, ZHAO C W, ZHANG Y Z. Digital gene expression analysis based on integrated de novo transcriptome assembly of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.][J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36234.
- [2] 陆建珍, 汪翔, 秦建军, 易中懿, 徐雪高. 我国甘薯种植业时空布局分析及产业发展建议[J]. 天津农业科学, 2020, 26(3): 53-62.
LU J Z, WANG X, QIN J J, YI Z Y, XU X G. A report on spatiotemporal layout of sweet potato planting and industry development suggestions in China[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2020, 26(3): 53-62. (in Chinese)
- [3] Food and Agriculture Organization (FAO). FAOSTAT [EB/OL]. [2024-03-07]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- [4] 马代夫, 李洪民, 李秀英, 谢逸平, 李强. 甘薯育种与甘薯产业发展[C]. 成都: 全国甘薯育种与产业化学术研讨会, 2005.
- [5] MA D F, LI H M, LI X Y, XIE Y P, LI Q. Sweet potato breeding and sweet potato industry development[C]. Chengdu: National symposium on sweet potato breeding and industrialization, 2005. (in Chinese)
- [6] LOEBENSTEIN G. Origin, distribution and economic importance[M]. Dordrecht: Springer, 2009.
- [7] LOEBENSTEIN G, THOTTAPPILLY G. The sweetpotato[M]. Berlin: Springer Science & Business, 2009.
- [8] MWANGA R O M, SWANCKAERT J, DA SILVA PEREIRA G, ANDRADE M I, MAKUNDE G, GRUNEBERG W J, KREUZE J F, DAVID M, BOECK B D, CAREY E, SSALI R T, UTOBLO O, GEMENET D C, ANYANGA M O, YADA B, CHELANGAT D M, OLOKA B M, MTUNDA K, CHIONA M, KOUSSAO S, LAURIE S M, CAMPOS H, YENCHO G C, LOW J W. Breeding progress for vitamin A, iron and zinc biofortification, drought tolerance, and sweetpotato virus disease resistance in sweetpotato[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2021, 5: 616674.
- [9] RUAN Y L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65: 33-67.
- [10] JI X M, VAN DEN ENDE W, VAN LAERE A, CHENG S H, BENNETT J. Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 60(5): 615-634.
- [11] STURM A. Invertases. primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning[J]. Plant Physiology, 1999, 121(1): 1-8.
- [12] LIU Y H, SONG Y H, RUAN Y L. Sugar conundrum in plant-pathogen interactions: roles of invertase and sugar transporters depend on pathosystems[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(7): 1910-1925.
- [13] TANG G Q, LÜSCHER M, STURM A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning[J]. The Plant Cell, 1999, 11(2): 177-189.
- [14] TANG G Q, STURM A. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 41(4): 465-479.

- [15] ZRENNER R, SALANOUBAT M, WILLMITZER L, SONNEWALD U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.)[J]. The Plant Journal, 1995, 7(1): 97-107.
- [16] TJADEN J, MÖHLMANN T, KAMPFENKEL K, NEUH-AUS G H H E. Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch[J]. The Plant Journal, 1998, 16(5): 531-540.
- [17] WAN H J, WU L M, YANG Y J, ZHOU G Z, RUAN Y L. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(2): 163-177.
- [18] COLUCCIO LESKOW C, CONTE M, DEL POZO T, BERMÚDEZ L, LIRA B S, GRAMEGNA G, BAROLI I, BURGOS E, ZAVALLO D, KAMENETZKY L, ASÍS R, GONZALEZ M, FERNIE A R, ROSSI M, OSORIO S, CARRARI F. The cytosolic invertase NI6 affects vegetative growth, flowering, fruit set, and yield in tomato[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(7): 2525-2543.
- [19] LOU Y, GOU J Y, XUE H W. PIP5K9, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth[J]. The Plant Cell, 2007, 19(1): 163-181.
- [20] BARRATT D H P, DERBYSHIRE P, FINDLAY K, PIKE M, WELLNER N, LUNN J, FEIL R, SIMPSON C, MAULE A J, SMITH A M. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2009, 106(31): 13124-13129.
- [21] WELHAM T, PIKE J, HORST I, FLEMETAKIS E, KATINAKIS P, KANEKO T, SATO S, TABATA S, PERRY J, PARNISKE M, WANG T L. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(12): 3353-3365.
- [22] JIA L Q, ZHANG B T, MAO C Z, LI J H, WU Y R, WU P, WU Z C. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Planta, 2008, 228: 51-59.
- [23] QI X P, WU Z C, LI J H, MO X R, WU S H, CHU J, WU P. AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress-induced inhibition on lateral root growth in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64: 575-587.
- [24] YANG J, MOEINZADEH M, KUHL H, HELMUTH J, XIAO P, HAAS S, LIU G L, ZHENG J L, SUN Z, FAN W J, DENG G F, WANG H X, HU F H, ZHAO S S, FERNIE A R, BOERNO S, TIMMERMANN B, ZHANG P, VINGRON M. Haplotype-resolved sweet potato genome traces back its hexaploidization history[J]. Nature Plants, 2017, 3(9): 696-703.
- [25] ISOBE S, SHIRASAWA K, HIRAKAWA H. Current status in whole genome sequencing and analysis of *Ipomoea* spp[J]. Plant Cell Reports, 2019, 38(11): 1365-1371.
- [26] CHEN Z, GAO K, SU X X, RAO P, AN X M. Genome-wide identification of the invertase gene family in *Populus*[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e018540.
- [27] YAO Y, GENG M T, WU X H, LIU J, LI R M, HU X W, GUO J C. Genome-wide identification, expression, and activity analysis of alkaline/neutral invertase gene family from cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33: 304-315.
- [28] MURAYAMA S, HANDA H. Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids[J]. Planta, 2007, 225: 1193-1203.
- [29] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [30] TOMLINSON K L, MCHUGH S, LABBE H, GRAINGER J L, JAMES L E, POMEROY K M, MULLIN J W, MILLER S S, DENNIS D T, MIKI B L A. Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplastic invertase[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(406): 2291-2303.
- [31] WAN H J, ZHANG Y J, WU L M, ZHOU G Z, PAN L Z, FERNIE A R, RUAN Y L. Evolution of cytosolic and organellar invertases empowered the colonization and thriving of land plants[J]. Plant Physiology, 2023, 193(2): 1227-1243.
- [32] 姚远. 木薯转化酶基因家族克隆、结构进化及表达分析[D]. 海口: 海南大学, 2016.
- YAO Y. Cloning, structure evolution and expressing analysis of the invertase family genes in cassava[D]. Haikou: Hainan University, 2016. (in Chinese)
- [33] BOLOURI-MOGHADDAM M R, LE ROY K, XIANG L, ROLLAND F, VAN DEN ENDE W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells[J]. The FEBS Journal, 2010, 277(9): 2022-2037.
- [34] XIANG L, LE ROY K, BOLOURI-MOGHADDAM M R, VANHAECKE M, LAMMENS W, ROLLAND F, VAN DEN ENDE W. Exploring the neutral invertase-oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(11): 3849-3862.
- [35] WANG Y J, ZHEN X H, ZHOU Y J, WANG Y L, HOU J Y,

- WANG X, LI R M, LIU J, HU X W, GENG M T, YAO Y, GUO J C. *MeNINV1*: An alkaline/neutral invertase gene of *manihot esculenta*, enhanced sucrose catabolism and promoted plant vegetative growth in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plants*, 2022, 11(7): 946.
- [36] BATTAGLIA M E, MARTIN M V, LECHNER L, MARTÍNEZ-NOËL G M A, SALERNO G L. The riddle of mitochondrial alkaline/neutral invertases: a novel *Arabidopsis* isoform mainly present in reproductive tissues and involved in root ROS production[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185286.
- [37] LECHARNY A, BOUDET N, GY I, AUBOURG S, KREIS M. Introns in, introns out in plant gene families: a genomic approach of the dynamics of gene structure[J]. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2003, 3: 111-116.
- [38] NAVARRO C, ABELENDA J A, CRUZ-ORÓ E, CUÉLLAR A, TAMAKI S, SILVA J, SHIMAMOTO K, PRAT S. Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T[J]. *Nature*, 2011, 478(7367): 119-122.
- [39] DONG T T, ZHU M K, YU J W, HAN R P, TANG C, XU T, LIU J R, LI Z Y. RNA-Seq and iTRAQ reveal multiple pathways involved in storage root formation and development in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1-16.
- [40] WANG S J, CHEN M H, YE H K W, TSAI C Y. Changes in carbohydrate content and gene expression during tuberous root development of sweet potato[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 15: 21-25.
- [41] SINGH V, SERGEEVA L, LIGTERINK W, ALONI R, ZEMACH H, DORON-FAIGENBOIM A, YANG JUN, ZHANG P, SHABTAI S, FIRON N. Gibberellin promotes sweetpotato root vascular lignification and reduces storage-root formation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1320.
- [42] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, YOUNG N D, MAY G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 1-21.
- [43] HERBERS K, MEUWLY P, FROMMER W B, METRAUX J P, SONNEWALD U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(5): 793-803.
- [44] JIA X L, WANG G L, XIONG F, YU X R, XU Z S, WANG F, XIONG A S. *De novo* assembly, transcriptome characterization, lignin accumulation and anatomic characteristics: novel insights into lignin biosynthesis during celery leaf development[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 8259.
- [45] 张文杰. 影响甘薯块根发育主要糖转运蛋白和蔗糖分解酶种类及其关键基因家族成员的鉴定[D]. 海口: 海南大学, 2022.
- ZHANG W J. Key sugar transporters and affecting root tuber development in sweet potato studies on the species of sucrose decomposing enzymes and their gene family members appraisal[D]. Haikou: Hainan University, 2022. (in Chinese)