

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.23329

CSTR: 32231.14.PSJ.2095-0837.23329

郑帅, 韩世明, 郑浩, 徐明, 苑馨予, 董家琦, 钟彩虹, 张琼. 猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族的鉴定与表达分析 [J]. 植物科学学报, 2024, 42 (5): 612~623Zheng S, Han SM, Zheng H, Xu M, Yuan XY, Dong JQ, Zhong CH, Zhang Q. Identification and expression analysis of the *AcSWEET* gene family in *Actinidia chinensis* Planch. [J]. *Plant Science Journal*, 2024, 42 (5): 612~623

猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族的鉴定与表达分析

郑帅^{1,2#}, 韩世明^{2#}, 郑浩¹, 徐明³, 苑馨予¹, 董家琦^{1,4}, 钟彩虹^{1*}, 张琼^{1*}

(1. 中国科学院武汉植物园/中国科学院猕猴桃产业技术工程实验室, 武汉 430074; 2. 六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州六盘水 553004; 3. 陕西省农村科技开发中心, 西安 710054; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: SWEET (Sugars will eventually be exported transporters) 是近年来在植物中发现的一组糖转运蛋白, 在植物生长、发育和非生物及生物胁迫响应等多种生理过程中发挥着重要作用。本研究利用生物信息学方法对猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) *AcSWEET* 基因家族进行了鉴定, 共获得 29 个 *AcSWEET* 基因, 并对其氨基酸数量、相对分子量、等电点、不稳定系数、亚细胞定位、亲水指数进行了分析。结果显示: 29 个基因编码的氨基酸数目为 680~906 个; 分子量范围为 7.531~101.266 kDa, 等电点在 6.95~9.90, 多数蛋白为定位于细胞膜的疏水性蛋白, 具有 1~2 个 MtN3 结构域或 PQ-loop 结构域。此外, *AcSWEET* 基因的外显子数量在 4~6 个, 系统进化分析结果表明猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族被分为 4 个亚族, 同一亚族基因具有相似的内含子、外显子以及保守基序。表达模式分析结果表明, 这些基因在果实不同发育时期具有表达特异性。推测 *AcSWEET26*、*AcSWEET7*、*AcSWEET15* 和 *AcSWEET13* 可能参与猕猴桃的蔗糖转运和积累。

关键词: 猕猴桃; *SWEET* 基因; 基因家族; 基因表达分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837 (2024) 05-0612-12

Identification and expression analysis of the *AcSWEET* gene family in *Actinidia chinensis* Planch.

Zheng Shuai^{1,2#}, Han Shiming^{2#}, Zheng Hao¹, Xu Ming³, Yuan Xinyu¹,
Dong Jiaqi^{1,4}, Zhong Caihong^{1*}, Zhang Qiong^{1*}

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences/Chinese Academy of Sciences Engineering Laboratory for Kiwifruit Industrial Technology, Wuhan 430074, China; 2. School of Biological Science and Technology Liupanshui Normal University, Liupanshui, Guizhou 553004, China; 3. Shaanxi Rural Science and Technology Development Center, Xi'an 710054, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The sugar will eventually be exported transporters (SWEET) are a recently discovered group of sugar transporters in plants, which play important roles in various physiological processes, such as plant growth, development, and abiotic and biotic stress. This study aimed to characterize the *Actinidia chinensis* Planch. *SWEET* gene family and analyze its expression during fruit development using bioinformatics methods. A total of 29 *AcSWEET* genes were identified, and their amino acid quantity, relative molecular

收稿日期: 2023-11-07, 接受日期: 2023-12-04。

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDA24030404); 果树种质创新与利用湖北省重点实验室开放课题 (GSSZ202301); 贵州省高等学校猕猴桃资源开发与利用重点实验室项目 (黔教技 [2022]054); 六盘水市科技计划项目 (52020-2020-0906); 陕西省重点研发计划项目 (2023-ZDLNY-24); 六盘水师范学院项目 (LPSSY2023XKTD09, Lpssyzxm202304)。

作者简介: 郑帅 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为猕猴桃果树品质 (E-mail: 1792649816@qq.com); 韩世明 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为果树育种及栽培技术 (E-mail: 94684382@qq.com)。

共同作者。

* 通信作者 (Authors for correspondence. E-mail: zhongch@wbcas.cn; qiongzhang@wbcas.cn)。

weights, isoelectric points, instability coefficients, subcellular localizations, and hydrophilicity indices were analyzed. Results showed that the 29 *AcSWEET* genes encoded proteins with amino acid lengths ranging from 680 to 906 residues, molecular weights between 7.531 kDa and 101.266 kDa, and isoelectric points between 6.95 and 9.9. Most proteins were relatively stable hydrophobic, and localized on the cell membrane, containing 1–2 MtN3 domains. Additionally, gene structure, conserved motifs, evolutionary relationships, *cis*-regulatory elements, and expression patterns at different developmental stages of fruit development were systematically analyzed. Results indicated that the *AcSWEET* genes had 4–6 exons. Phylogenetic analysis revealed that the kiwifruit *SWEET* gene family was divided into four subgroups, responsible for transporting glucose, fructose, and sucrose. Genes within the same subgroup shared similar intron-exon structures and conserved motifs. Expression pattern analysis during kiwifruit development indicated that the *AcSWEET* genes exhibited stage-specific expression. We speculated that *AcSWEET26*, *AcSWEET7*, *AcSWEET15*, and *AcSWEET13* may be involved in sucrose transport and accumulation in kiwifruit.

Key words: *Actinidia chinensis*; *SWEET* gene; Gene family; Gene expression analysis

糖类不仅可作为植物体的能源物质和结构物质,同时也是决定果实品质的重要因素之一。猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 是猕猴桃科猕猴桃属 (*Actinidia*) 的一种多年生藤本落叶果树,具有重要的营养和经济价值,商业化推广以来逐渐成为全球消费的流行水果。由于富含维生素 C、膳食纤维、矿物质元素以及其他营养成分,猕猴桃也被誉为“水果之王”^[1, 2]。猕猴桃果实的甜度及酸度是评价果实品质的重要因素。在植物中,糖最初在源器官(叶片)中通过光合作用生成,再通过韧皮部筛管和伴胞长距离输送到库器官(花、果实以及种子)供植物生长发育^[3]。在此过程中,转运蛋白起着重要作用。目前已经在植物体中发现了3种糖转运蛋白:单糖转运蛋白(MST)^[4]、蔗糖转运蛋白(SUT)^[5, 6]以及糖外排转运蛋白(Sugars will eventually be exported transporters, *SWEET*)^[7, 8]。

SWEET 是一类新发现的、不依赖能量的糖转运蛋白^[9, 10]。*SWEET* 蛋白首先在海鞘中被发现,后被发现存在于所有生物体中,包括高等真核生物、原生动物、后生动物、真菌、细菌和古细菌等,在不同生物中具有不同的生理作用^[11]。植物中,*SWEET* 蛋白首先在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) 中被鉴定^[7]。真核生物的 *SWEET* 蛋白结构具有7次跨膜 α 螺旋(TM_H),由两个连续的MtN3和其中一个连接的TM_H组成(3+1+3)^[12, 13]。最初被称为MtN3蛋白,后来发现该蛋白在糖转运中起作用,因而改名为 *SWEET*

蛋白。系统发育分析表明, *SWEET* 蛋白被分为4个亚族,亚族 I 和 II 负责转运已糖^[10, 12],亚族 III 负责转运蔗糖^[14],亚族 IV 主要负责转运果糖^[15]。

随后,对植物中 *SWEET* 基因的研究也逐步深入。小麦 (*Triticum aestivum* L.) 基因组中共鉴定出59个 *SWEET* 基因,这些基因对茎锈病可能具有一定的作用^[16]。番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 基因组中鉴定出29个 *SWEET* 基因,其中 *SISWEET7a* 和 *SISWEET14* 编码产物定位于质膜上,参与果实中果糖、葡萄糖和蔗糖的运输和积累^[17]。棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 和玉米 (*Zea mays* L.) 基因组中分别鉴定出55和24个 *SWEET* 基因,且发现大部分基因可能增强植物对各种非生物胁迫的适应性^[18, 19]。从菠萝 (*Ananas comosus* (L.) Merr) 基因组中鉴定出39个 *SWEET* 基因,其中 *AnmSWEET5* 和 *AnmSWEET11* 在果实发育过程中表现出最高的转录水平^[20]。在两个二倍体和1个六倍体甘薯 (*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill) 中,共鉴定出79个 *SWEET* 基因,发现同源基因在种间存在差异性,并在植物生长、块根发育、类胡萝卜素积累、激素串扰和非生物胁迫反应中起重要作用^[21]。通过同源比对,在柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 中鉴定出27个 *SWEET* 基因,其中, *CitSWEET1~CitSWEET4*、*CitSWEET7*、*CitSWEET25* 和 *CitSWEET27* 具有组织特异性, *CitSWEET3* 在 EMY4000 酵母菌株中转运葡萄糖^[22]。在核桃 (*Juglans regia* L.) 中鉴定到25个 *SWEET* 基因,发现 *SWEET* 介导的宿

主糖易位不是核桃枯萎病发展的触发因素^[23]。从黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 基因组中发现 17 个 *SWEET* 基因, 其中, *CsSWEET7a*、*CsSWEET7b* 和 *CsSWEET15* 可能参与了果实中糖的积累^[24]。在梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehder) 基因组中鉴定出 18 个 *SWEET* 基因, 其中 *PbSWEET5* 与果实发育过程中蔗糖的积累呈负相关^[25]。此外, 李 (*Prunus salicina* Lindl.)^[26]、橡胶 (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.)^[27]、石榴 (*Punica granatum* L.)^[28] 以及龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.)^[29] 等的 *SWEET* 基因家族也相继被报道。最近研究发现, 在猕猴桃果实发育过程中, 随着 *SWEET9b* 基因表达量的提高, 果实中蔗糖的含量也在不断地升高, 表明 *SWEET* 转运蛋白在猕猴桃果实生长过程中对糖转运及积累具有一定的作用^[30]。因此, 鉴定猕猴桃 *AcSWEET* 基因, 探究其在不同发育阶段的表达模式, 对研究猕猴桃糖转运具有重要意义。

目前, 猕猴桃中仅有 *SWEET9b* 基因在蔗糖积累中的分子作用机制比较明晰。为了进一步发掘更多与猕猴桃果实糖转运相关的 *AcSWEET* 基因, 深入研究糖转运的分子机制, 本文对猕猴桃基因组进行了分析鉴定, 获得 29 个 *AcSWEET* 基因; 并通过转录组数据分析, 了解它们在不同发育时期果实中的表达情况, 以期进一步解析 *AcSWEET* 基因参与猕猴桃果实糖转运的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料及取样

‘东红’猕猴桃采自中国科学院武汉植物园猕猴桃种质资源圃。根据资源圃历年考种数据, 采集‘东红’猕猴桃花后 20、60、100 和 140 d 共 4 个发育时期的果实, 每个发育时期选择 3 棵长势相近且管理水平相同的果树, 随机选取 30 个无机械损伤和病虫害的果实, 每 10 个果实为一组。将每组果肉切成小块混匀, 存于 -80 °C 冰箱, 用于转录组测序和荧光定量实验。

1.2 猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族成员的鉴定及基因结构分析

从拟南芥数据库 (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) 下载 17 个 *AtSWEET* 蛋白序列作

为查询序列。从 Kiwifruit Omics 数据库下载‘东红’猕猴桃基因组及注释信息, 利用 TBtools 软件^[31] 在猕猴桃基因组蛋白序列中进行搜索, 获得 *AcSWEET* 基因家族的候选序列。确定基因家族成员后, 利用 TBtools 软件中的 Protein Paramter Calc 功能进行蛋白理化性质的分析。使用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 在线软件预测 *AcSWEET* 家族成员的跨膜结构域。此外, 从 NCBI 上分别下载拟南芥、水稻 (*Oryza sativa* L.) *OsSWEET* 蛋白的氨基酸序列用于后续的序列比对。使用 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件分析 *AcSWEET* 基因家族的基因结构。

1.3 猕猴桃 *AcSWEET* 蛋白结构域、保守基序分析

利用 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>) 对猕猴桃 *AcSWEET* 蛋白的 Motifs 进行识别, Motifs 的最大设置值为 10。使用在线工具 NCBI conserved domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 进一步分析蛋白的保守结构域。利用 TBtools 软件对结果进行可视化处理。通过 WoLF-PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 网站进行亚细胞定位预测。

1.4 进化分析及染色体共线性分析

利用 Clustal X 软件将拟南芥、水稻、猕猴桃 *SWEET* 家族的氨基酸序列进行比对, 然后基于 MEGA11 软件中的邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树, 参数使用默认值, Bootstrap 值设置为 1 000 次。利用 TBtools 软件进行染色体共线性分析。

1.5 顺式作用元件分析

用 TBtools 软件提取 *AcSWEET* 基因转录起始位点上游 2 000 bp 的序列, 然后利用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件进行顺式作用元件分析, 利用 TBtools 软件进行可视化。

1.6 猕猴桃 *SWEET* 基因家族蛋白互作 (PPI) 网络分析

使用在线数据库 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 对猕猴桃 *AcSWEET* 蛋白进行蛋白质互作网络分析, 有机体选择为自动检测后再选择拟

南芥进行比对, 得到可视化结果。

1.7 猕猴桃 *AcSWEET* 基因表达分析

对‘东红’猕猴桃花后 20、60、100 和 140 d 共 4 个发育时期的果实构建转录组数据库, 采用 HTSeq 软件对样品进行基因表达水平分析, 统计猕猴桃果实 *AcSWEET* 基因的表达丰度 FPKM (Fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)。利用 TBtools 软件基于 log2 (FPKM) 值绘制基因表达热图。

1.8 荧光定量实验

利用 HiPure Plant RNA Mini Kit 试剂盒 (Magen, 广州) 提取猕猴桃果实的总 RNA, 利用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 北京) 进行反转录获得 cDNA。使用 Premire 5.0 软件设计候选基因的引物, 以猕猴桃 *Actin* 作为内参基因^[32] (表 1)。使用 Quant Studio6-Flex 平台进行荧光定量实验, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算表达量。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族成员的鉴定及结构分析

对猕猴桃全基因组数据库进行筛选, 共鉴定出 29 个 *AcSWEET* 基因家族成员, 根据其在染色体上的位置及顺序, 依次命名为 *AcSWEET1*~*AcSWEET29* (图 1)。*AcSWEET* 基因家族成员编码的氨基酸数在 68~906 aa。29 个成员中, 有 20 个定位在质膜, 4 个定位在液泡, 3 个定位在叶绿体, 1 个定位在细胞质, 1 个定位在细胞核。编码

蛋白的等电点为 6.95 (*AcSWEET2*) ~9.91 (*AcSWEET10*), 相对分子量在 7 531.83~101 266.08 Da。此外, 分析发现, *AcSWEET11*、*AcSWEET20* 和 *AcSWEET27* 为脂溶不稳定蛋白, *AcSWEET11* 和 *AcSWEET20* 为亲水不稳定蛋白 (表 2)。

对不同成员的基因结构进行分析 (附图 1¹⁾), 发现 *AcSWEET* 基因间的结构差异较大, 其外显子数量为 2 (*AcSWEET1*、*AcSWEET11*) ~16 个 (*AcSWEET20*), 大部分成员的外显子数量为 4~6 个, 而 *AcSWEET20* 则具有 16 个外显子。

2.2 猕猴桃 *AcSWEET* 蛋白结构域、保守基序分析

MtN3 和 PQ-loop 是 *AcSWEET* 家族成员蛋白的保守结构, 均具有糖转运的功能。经鉴定, *AcSWEET* 蛋白大多具有这两种结构。除了 *AcSWEET10* 蛋白不具有此结构, *AcSWEET1*、*AcSWEET9*、*AcSWEET11*、*AcSWEET12*、*AcSWEET16*、*AcSWEET25* 和 *AcSWEET28* 仅有 1 个 MtN3 或 PQ-loop 结构域外, 其他蛋白均具有两个 MtN3 或 PQ-loop 结构域, 同时, *AcSWEET20* 蛋白还含有 1 个 Bromodomain 超家族结构 (附图 2²⁾)。

利用 MEME 在线工具分析保守区域基序, 发现猕猴桃 *AcSWEET* 家族成员含有 10 个基序, 分别称其为 Motif1~Motif10。其中, *SWEET1*、*SWEET11* 和 *SWEET28* 仅含有 1~2 个 Motif。大多数家族成员含有共同的 Motif, 其中 *AcSWEET7*、*AcSWEET13*、*AcSWEET15*、*AcSWEET18*、*AcSWEET26*、*AcSWEET29* 含有 9 个相同的 Motif,

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Quantitative real-time polymerase chain reaction primers

基因名称 Gene name	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer
<i>AcSWEET7</i>	TAGTCGTTGGATGGGTTTGC	TGCGGTCATTGTAAGGAAAA
<i>AcSWEET13</i>	ATAAGAAGAAATCAACCGAAGG	GCAGCAAATACGCTCACAGA
<i>AcSWEET15</i>	GAGTCACGATTGTCGGATGG	TTGGAGCTTCACTTCTGGTAGA
<i>AcSWEET26</i>	CACCCTTCTCATCACCATCA	TAGGCAAATCCAACCAACAA
<i>AcSWEET29</i>	CACATCCCTATTATCAAACG	AAATTCTGGTAGAACCTGCT
<i>Actin</i>	GTGCTCAGTGGTGTTCAA	GACGCTGTATTTCTCTCAG

1~2) 如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

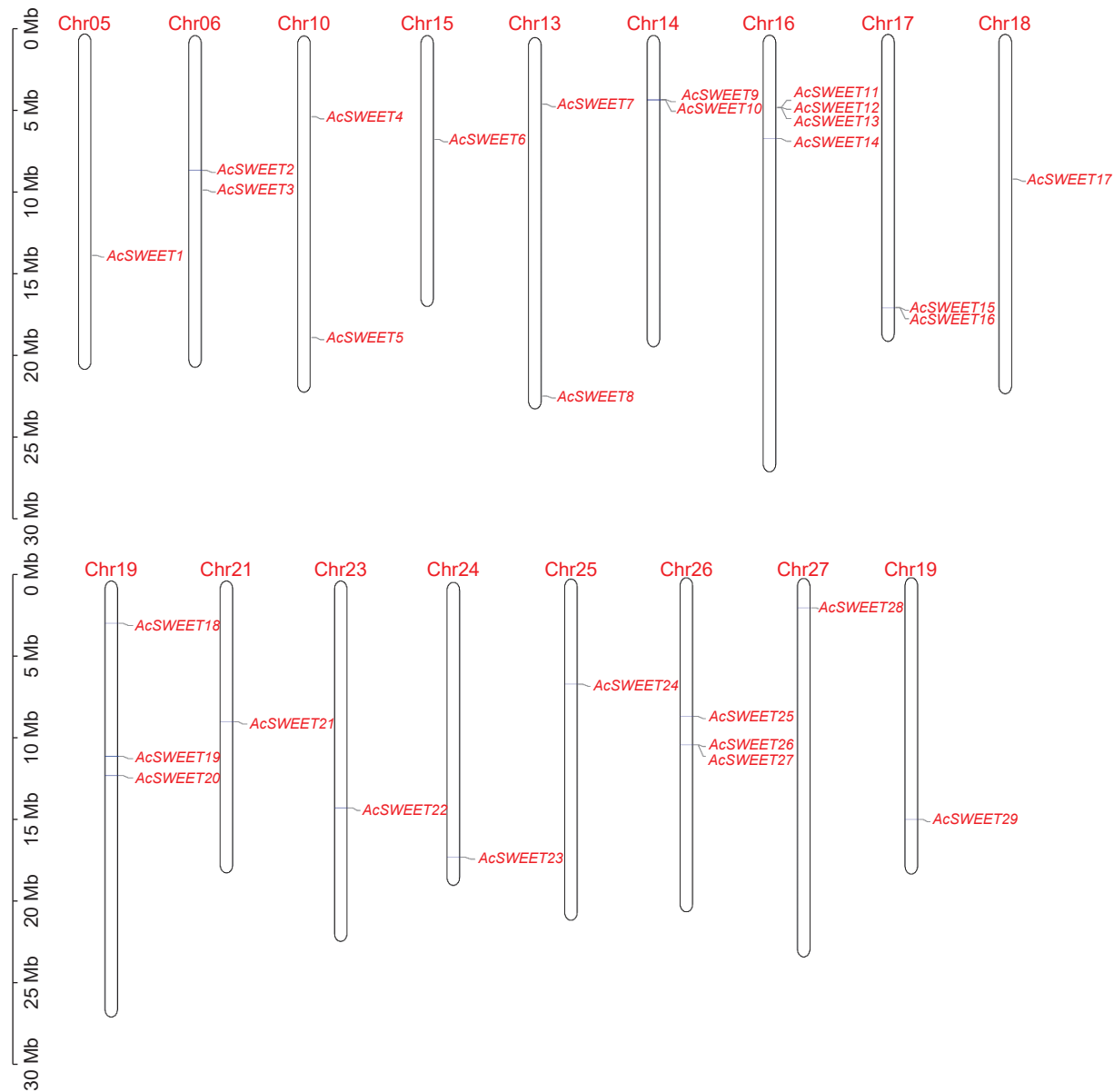


图 1 *AcSWEET* 基因在染色体上的分布
Fig. 1 Distribution of *AcSWEET* genes on chromosomes

保守性最强。*AcSWEET2*~*AcSWEET4*、*AcSWEET19*、*AcSWEET21*~*AcSWEET24*、*AcSWEET27* 含有 8 个 Motif，且只有 *AcSWEET4* 的 Motif 种类与其他成员不同，保守性次之。*AcSWEET6*、*AcSWEET8*、*AcSWEET14*、*AcSWEET17* 均含有 7 个 Motif，且仅有 *AcSWEET8* 的 Motif 种类与其他三者不同（附图 3¹⁾），保守性较强。整体上看，这 26 个成员的氨基酸序列保守性较强。

对 29 个 *AcSWEET* 家族成员的氨基酸序列进

行跨膜区预测，结果显示，*AcSWEET11* 没有跨膜区，为非跨膜蛋白。其余 *AcSWEET* 蛋白均含有多个跨膜区，属于跨膜蛋白。

2.3 进化分析及共线性分析

为了研究猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族的进化关系，利用拟南芥和水稻的 *SWEET* 家族蛋白序列构建了系统进化树。结果表明，这些 *SWEET* 基因被分成 4 个亚族（图 2）。绝大多数成员被聚类在亚族 I 和 II 中，其中，亚族 I 包含 3 个 *AtSWEET* 基因、7 个 *OsSWEET* 基因和 6 个 *AcSWEET* 基

1) 如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站（<http://www.plantscience.cn>）查看本期文章。

表 2 *AcSWEET* 基因家族成员信息
Table 2 Information on *AcSWEET* gene family members

基因 Gene	序列 ID Sequence ID	蛋白质长度 Number of amino acids	分子量 MW / Da	等电点 Theoretical pI	不稳定性指数 Instability index	脂溶性指数 Aliphatic index	亲水指数 Hydrophobicity scales	亚细胞定位 Subcellular localization	染色体位置 Chromosome location
<i>AcSWEET1</i>	<i>Ach05g06950DH</i>	68	7 531.83	8.03	29.09	117.65	0.469	叶绿体	5
<i>AcSWEET2</i>	<i>Ach06g07770DH</i>	245	2 7196.90	6.95	47.57	103.39	0.568	质膜	6
<i>AcSWEET3</i>	<i>Ach06g08520DH</i>	236	26 023.09	9.36	35.65	119.36	0.876	液泡膜	6
<i>AcSWEET4</i>	<i>Ach10g04100DH</i>	253	27 658.05	9.57	29.51	114.82	0.590	质膜	10
<i>AcSWEET5</i>	<i>Ach10g10290DH</i>	236	26 340.97	9.31	35.04	95.42	0.163	细胞核	10
<i>AcSWEET6</i>	<i>Ach11g04370DH</i>	252	27 746.95	9.37	34.26	109.44	0.512	质膜	11
<i>AcSWEET7</i>	<i>Ach13g04100DH</i>	288	32 042.07	6.99	36.66	120.14	0.694	质膜	13
<i>AcSWEET8</i>	<i>Ach13g17010DH</i>	234	25 814.53	8.80	36.02	111.58	0.684	质膜	13
<i>AcSWEET9</i>	<i>Ach14g03170DH</i>	198	21 765.16	9.71	29.99	120.51	0.703	质膜	14
<i>AcSWEET10</i>	<i>Ach14g03210DH</i>	186	20 525.26	9.91	31.15	117.96	0.334	质膜	14
<i>AcSWEET11</i>	<i>Ach16g04520DH</i>	103	11 850.58	4.93	40.50	73.79	-0.449	细胞质	16
<i>AcSWEET12</i>	<i>Ach16g04530DH</i>	136	15 558.83	9.44	31.10	129.78	0.856	质膜	16
<i>AcSWEET13</i>	<i>Ach16g04540DH</i>	287	32 139.66	9.39	38.65	117.46	0.778	质膜	16
<i>AcSWEET14</i>	<i>Ach16g06160DH</i>	238	26 764.96	9.10	37.01	115.46	0.671	质膜	16
<i>AcSWEET15</i>	<i>Ach17g10410DH</i>	275	30 968.82	7.61	35.74	111.35	0.656	质膜	17
<i>AcSWEET16</i>	<i>Ach17g10420DH</i>	132	14 617.52	9.08	49.24	108.71	0.679	叶绿体	17
<i>AcSWEET17</i>	<i>Ach18g07250DH</i>	250	28 204.71	9.37	44.39	115.76	0.554	质膜	18
<i>AcSWEET18</i>	<i>Ach19g02550DH</i>	296	33 224.04	8.46	35.78	130.57	0.841	质膜	19
<i>AcSWEET19</i>	<i>Ach19g10330DH</i>	304	33 198.18	9.49	29.29	111.48	0.346	质膜	19
<i>AcSWEET20</i>	<i>Ach19g11300DH</i>	906	101 266.08	9.61	46.80	86.35	-0.272	质膜	19
<i>AcSWEET21</i>	<i>Ach21g07220DH</i>	252	27 533.77	9.59	28.91	114.17	0.663	质膜	21
<i>AcSWEET22</i>	<i>Ach23g12130DH</i>	235	26 009.82	9.30	45.47	118.64	0.802	液泡膜	23
<i>AcSWEET23</i>	<i>Ach24g12310DH</i>	244	27 010.81	8.48	35.30	116.23	0.618	质膜	24
<i>AcSWEET24</i>	<i>Ach25g05410DH</i>	259	28 487.96	9.63	43.00	115.52	0.558	液泡膜	25
<i>AcSWEET25</i>	<i>Ach26g07610DH</i>	183	20 725.66	8.49	41.84	114.48	0.680	液泡膜	26
<i>AcSWEET26</i>	<i>Ach26g09140DH</i>	290	32 463.83	8.77	38.39	114.93	0.722	质膜	26
<i>AcSWEET27</i>	<i>Ach26g09150DH</i>	340	38 910.41	9.24	48.76	88.85	0.107	质膜	26
<i>AcSWEET28</i>	<i>Ach27g01830DH</i>	81	9 064.60	9.30	39.94	101.11	0.251	叶绿体	27
<i>AcSWEET29</i>	<i>Ach28g11120DH</i>	261	29 612.67	8.97	37.55	117.36	0.777	质膜	28

注：亲水指数为负值表示亲水性，正值表示疏水性；不稳定性指数大于 40 为不稳定蛋白；脂溶性指数小于 100 为脂溶蛋白。

Notes: For total average hydrophilicity, a negative value indicates hydrophilicity, while a positive value indicates hydrophobicity; Instability index greater than 40 indicates an unstable protein; Lipid solubility index less than 100 indicates lipid soluble protein.

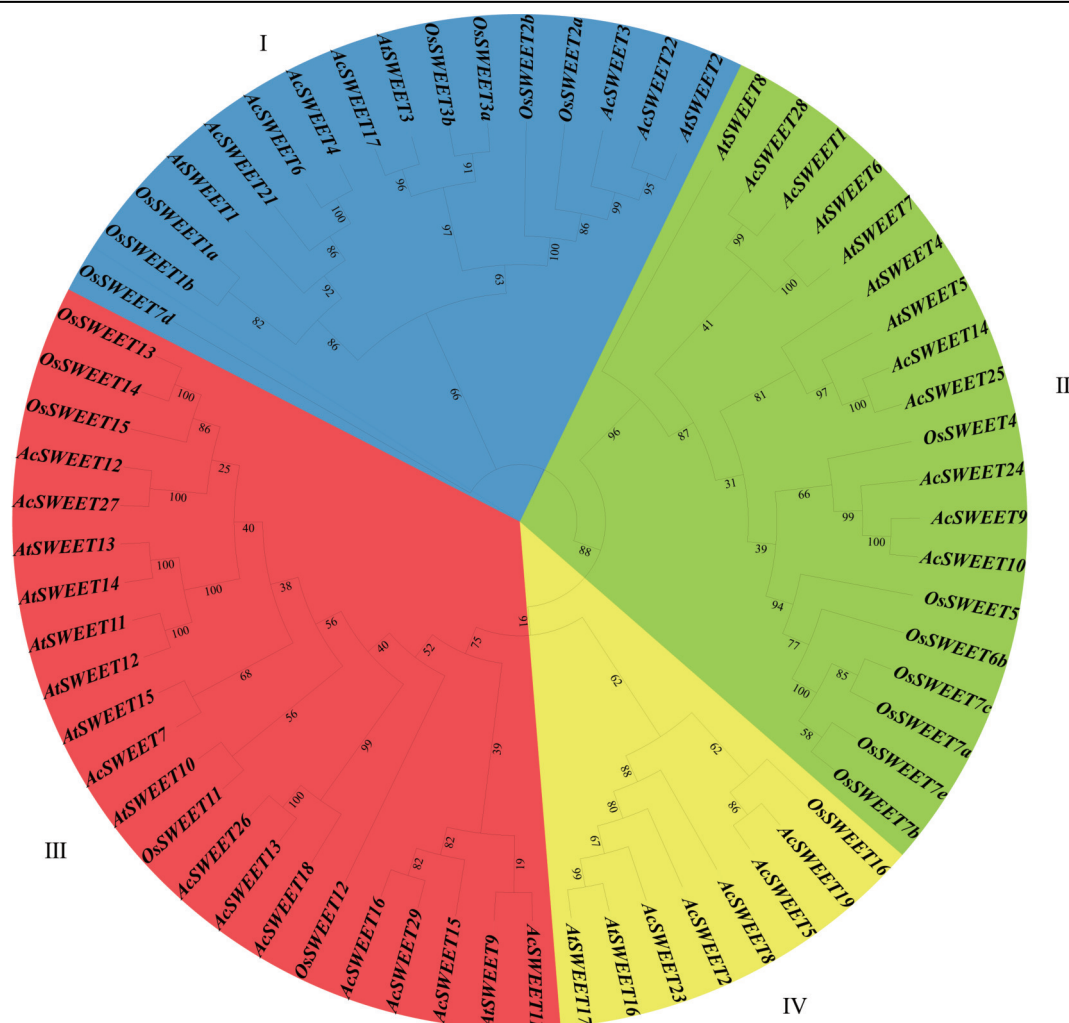


图 2 *SWEET* 基因家族系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of *SWEET* gene family

因。亚族 II 包含 5 个 *AtSWEET* 基因、7 个 *OsSWEET* 基因和 7 个 *AcSWEET* 基因。亚族 III 包含 7 个 *AtSWEET*、5 个 *OsSWEET* 和 9 个 *AcSWEET*。而亚族 IV 的成员最少，包含来自拟南芥的 3 个、水稻的 1 个和猕猴桃的 5 个成员。从进化树中可以看出，猕猴桃的 *SWEET* 蛋白序列与拟南芥的相似度较高。

猕猴桃 29 个 *AcSWEET* 基因分布在 29 条染色体中的 17 条上，其中，Chr16 上包含的基因数量最多，为 4 个；Chr19 和 Chr26 上各有 3 个；而 Chr01~Chr04、Chr07~Chr09、Chr12、Chr15、Chr20、Chr22 和 Chr29 上没有 *AcSWEET* 基因的分布（附图 4¹⁾）。同时，共线性分析结果发现，

AcSWEET 基因家族存在 16 个片段重复事件，说明在进化过程中存在基因复制。此外，29 个 *AcSWEET* 基因家族成员中共存在 16 个共线性基因对。

2.4 顺式作用元件

顺式作用元件分析结果表明（图 3），*AcSWEET* 基因家族启动子区域含有较多与植物激素响应相关的元件。如茉莉酸响应 MeJA 和脱落酸响应 ABRE，以及水杨酸反应、赤霉素反应、生长素响应等相关元件。此外还含有很多逆境相关元件，如干旱、低温、厌氧等。同时还发现了一些植物生长协调过程中的元件，如昼夜调节，细胞周期、胚乳表达和种子特异性调节等。由此可知，*AcSWEET*

1) 如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站（<http://www.plantscience.cn>）查看本期文章。

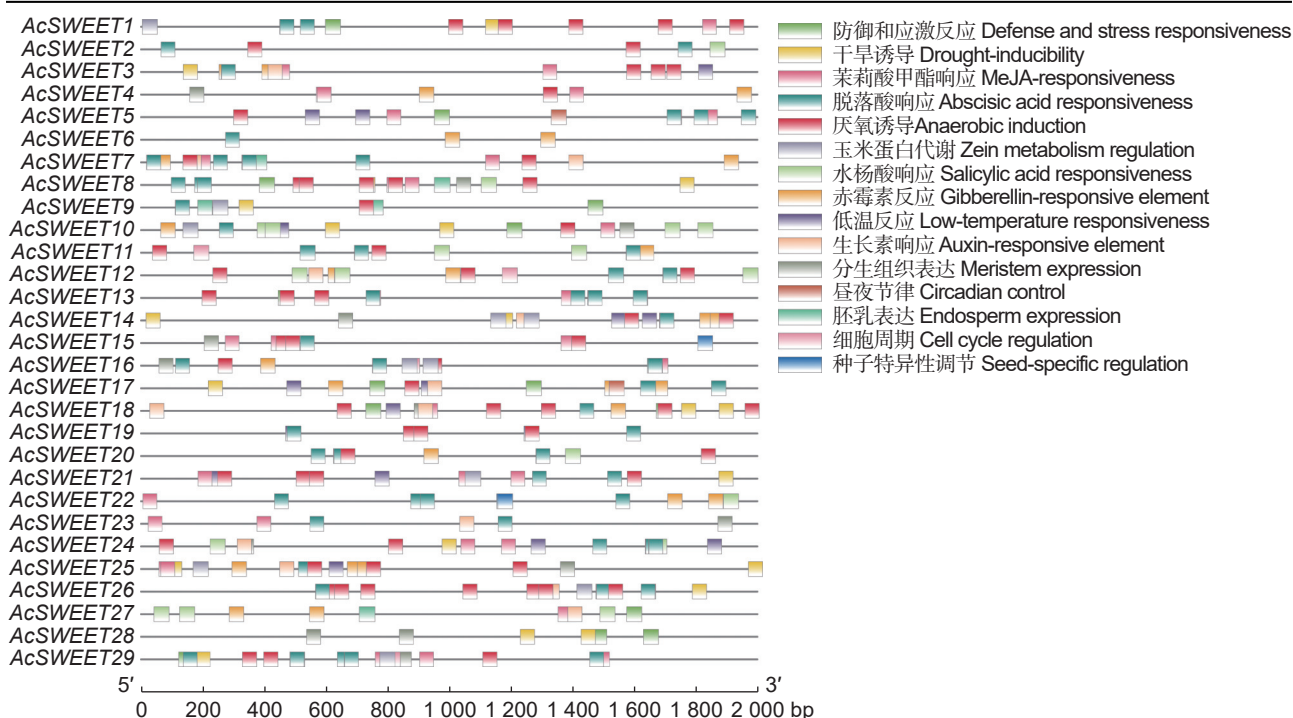


图 3 *AcSWEET* 基因家族启动子顺式作用元件
Fig. 3 Cis-regulatory elements of *AcSWEET* gene family promoters

SWEET 基因启动子区域顺式作用元件众多，可能在不同条件下调控 *AcSWEET* 基因的功能。

2.5 猕猴桃 *AcSWEET* 家族蛋白质互作 PPI 网络分析

利用分子互作网络检索工具预测 *AcSWEET* 蛋白互作特性，结果显示整个蛋白互作网络共有 9 个节点，节点间存在 8 组蛋白互作关系。每个蛋白节点与其他蛋白节点都有一定的互作关系（附图 5¹⁾），其中 *AcSWEET8* 位于整个家族蛋白互作网络的中心，分别与 7 个家族成员蛋白产生相互作用。值得注意的是，*AcSWEET8* 与 *AcSWEET6* 和 *AcSWEET29* 蛋白两两互作。此外，*AcSWEET7* 与其他蛋白家族成员没有互作关系。

2.6 猕猴桃 *AcSWEET* 基因在果实不同时期的表达特征分析

为进一步分析基因在果实发育不同时期的表达特征，根据‘东红’猕猴桃果实开花后 20、60、100 和 140 d 的转录组测序数据，对 *AcSWEET* 基因的表达量进行了分析（图 4）。结果发现，*AcSWEET6*、*AcSWEET19*、*AcSWEET23*、*AcSWEET27*、*AcSWEET18*、*AcSWEET28* 在果实

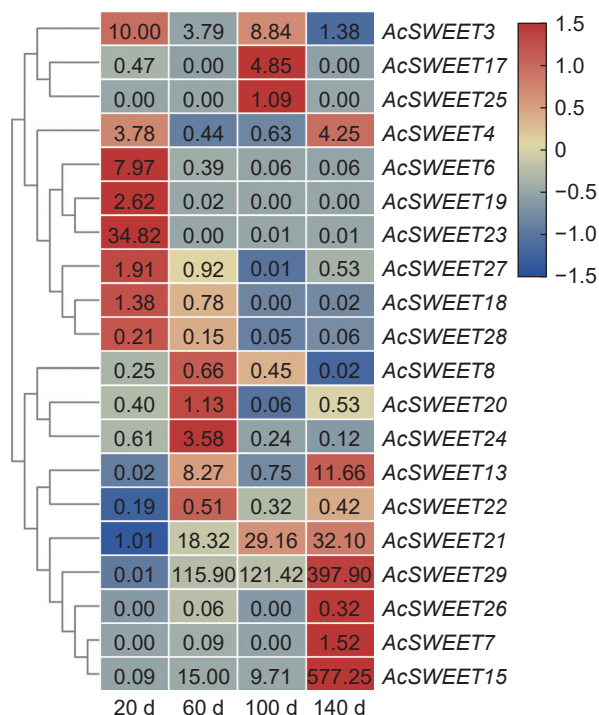


图 4 不同发育阶段猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族表达量分析
Fig. 4 Expression levels of *AcSWEET* gene family at different developmental stages

发育 20 d 时表达量最高，此后随着时间的增加，表达量降低；随着果实的发育，*AcSWEET8*、*Ac-*

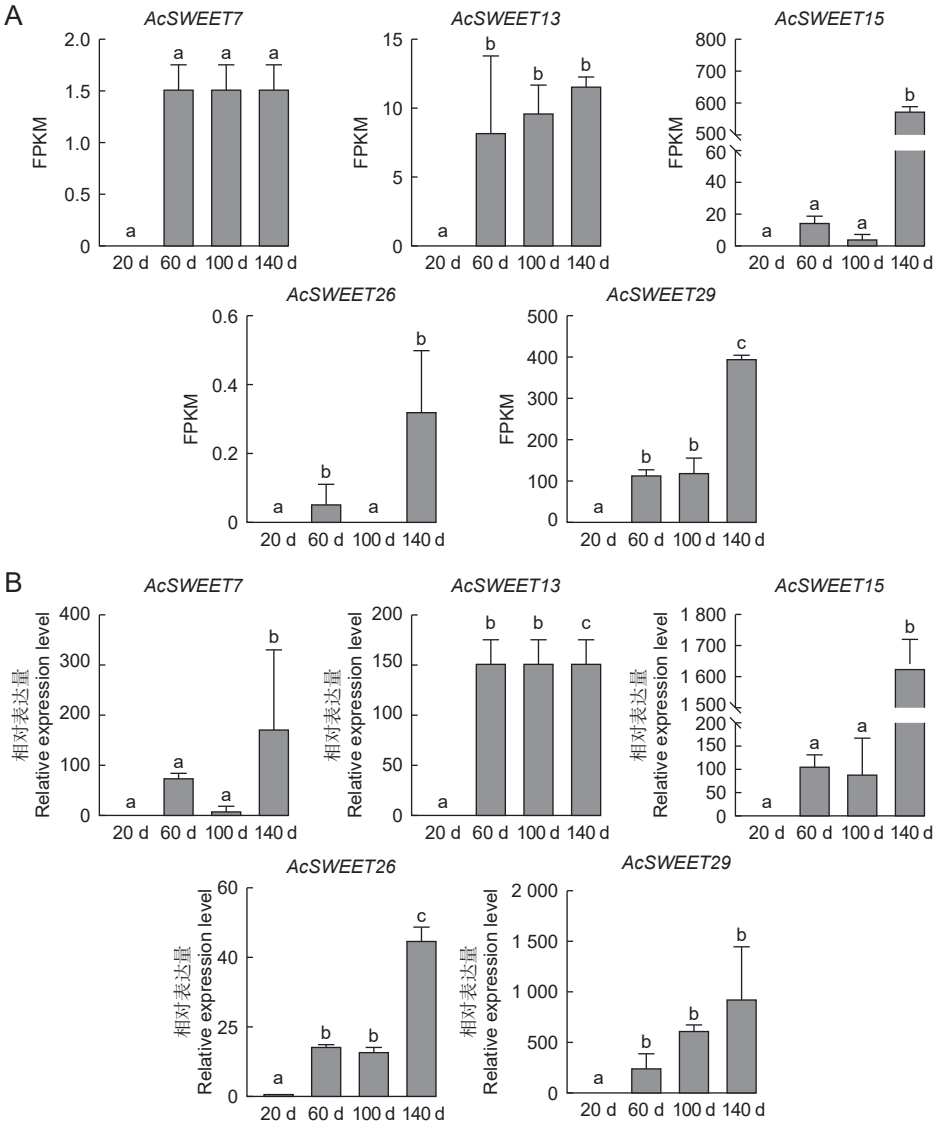
1) 如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

SWEET20、*AcSWEET24*、*AcSWEET22* 的表达量逐渐增加，至 60 d 后开始降低。值得注意的是，*AcSWEET7* 和 *AcSWEET25* 在果实发育早期和后期几乎不表达，而在花后 100 d 时表达量达到最高。*AcSWEET13*、*AcSWEET21*、*AcSWEET29*、*AcSWEET26*、*AcSWEET7*、*AcSWEET15* 在整个果实发育过程中的表达量呈上升趋势，并在 140 d 时达到最高。

2.7 荧光定量 PCR 分析

对猕猴桃 *AcSWEET* 基因家族成员进行序列比对，发现本研究中根据在染色体上的位置，顺

序命名的 *AcSWEET29* 基因与前人报道的猕猴桃 *SWEET9b* 为同一基因^[30]。此外，系统进化分析结果表明，*AcSWEET26*、*AcSWEET7*、*AcSWEET15*、*AcSWEET13* 与 *AcSWEET29* 为同一个亚族，且表达水平相近，因此这 4 个基因可能与 *AcSWEET29* 具有相似的功能。为了验证转录组数据的准确性，本文通过荧光定量 PCR 实验对这 5 个基因进行了表达量分析，并将其相对表达水平与各自的 FPKM 值进行比较。结果表明，转录组数据中的表达量与 qRT-PCR 得到的相对表达量变化趋势基本符合（图 5）。



A 为 FPKM 值，B 为荧光定量 PCR 结果。不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。
A shows FPKM values, B shows result of qRT-PCR. Different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level.

图 5 *AcSWEET* 基因在猕猴桃果实不同发育时间的表达分析
Fig. 5 Expression analysis of *AcSWEET* genes at different developmental stages

2.8 猕猴桃果实糖含量和组分测定及相关性分析

不同发育时期果实糖含量及组分的测定结果表明,随着猕猴桃果实的发育,葡萄糖、果糖及蔗糖含量均呈逐渐增加的趋势(图 6)。葡萄糖含量最高,果糖含量次之,蔗糖含量最低,且 3 种糖含量之间的相关性显著。将糖含量与候选基因进行相关性分析,结果显示 *AcSWEET29* 与 3 种糖含量之间显著正相关(表 3),此外, *AcSWEET7*、*AcSWEET13*、*AcSWEET15* 与 3 种糖含量也呈显著正相关。而 *AcSWEET26* 与 3 种糖含量的关系不显著,但与 *AcSWEET15* 呈显著正相关。

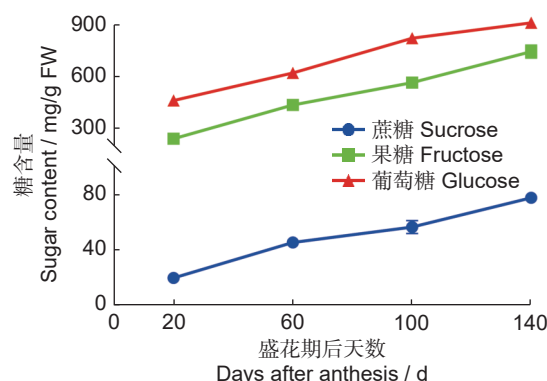


图 6 ‘东红’猕猴桃果实蔗糖、果糖及葡萄糖含量
Fig. 6 Sucrose, fructose and glucose contents in ‘Donghong’ fruit

表 3 猕猴桃果实发育过程中糖含量及候选基因的相关性
Table 3 Correlation of sugar content and candidate genes at different developmental stages

指标 Item	蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose	<i>AcSWEET7</i>	<i>AcSWEET13</i>	<i>AcSWEET15</i>	<i>AcSWEET26</i>	<i>AcSWEET29</i>
蔗糖	1							
葡萄糖	0.960**	1						
果糖	0.977**	0.975**	1					
<i>AcSWEET7</i>	0.754**	0.664*	0.751**	1				
<i>AcSWEET13</i>	0.677*	0.698*	0.694*	0.466	1			
<i>AcSWEET15</i>	0.773**	0.686*	0.776**	0.972**	0.411	1		
<i>AcSWEET26</i>	0.541	0.467	0.549	0.542	0.397	0.693*	1	
<i>AcSWEET29</i>	0.904**	0.836**	0.915**	0.910**	0.566	0.934**	0.647*	1

Notes: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论

SWEET 家族蛋白结构保守,可介导韧皮部薄壁组织中的糖流入或流出质外体,进而将糖输送到植物各个器官和组织。研究表明 *SWEET* 基因在多种园艺作物果实发育和成熟过程中起糖转运作用。本研究从猕猴桃基因组数据库中鉴定到 29 个 *AcSWEET* 基因,不均匀地分布在 17 条染色体上。基因结构分析发现,这些基因的外显子数量在 5~7 个, Motif 数量多为 7~9 个,且具有相同的 Motif 种类,基因保守性较强。蛋白结构分析表明,29 个 *AcSWEET* 蛋白中共有 21 个具有两个 Mtn3 或 PQ-loop 结构域,7 个仅含有 1 个 Mtn3 或 PQ-loop 结构域,这可能是由于 *AcSWEET* 蛋白在进化过程中发生了复制、融合或遗传丢失。

分析猕猴桃与拟南芥以及水稻 *SWEET* 基因家族成员的系统进化关系,并进行聚类分析,发

现猕猴桃的 *SWEET* 基因家族成员可被分为 4 个亚族。其中亚族 I 包含 6 个基因,主要负责转运葡萄糖^[10];亚族 II 包含 7 个基因,也负责葡萄糖的转运^[12];亚族 III 包含 9 个基因,主要负责转运蔗糖^[14];亚族 IV 包含 5 个基因,主要负责转运果糖^[15],同一亚族成员具有相似的结构和功能。在进化过程中,基因家族通常会经历串联复制或大规模分段复制,以保持每个家族的进化性。本研究发现, *AcSWEET* 基因家族中 29 个成员之间共存在 16 个共线性基因对,表明家族成员在进化中发生了片段复制。杨 (*Populus przewalskii* Maxim) bZIP 家族中也出现过类似的基因片段重复事件^[33]。基因家族成员在不同染色体中具有多个片段复制,可能导致同一家族基因具有相似的功能。

基因的表达与上游启动子也有着密切的关系。苹果 (*Malus pumila* Mill.) 中 *MdFRK2* 是决定果糖激酶 (FRK) 活性和果糖代谢的关键基因,该基

因上游 1 730 bp 序列中存在众多与环境胁迫和光响应有关的作用元件,同时也包含与糖代谢相关的基序^[34]。本文通过对上游 2 000 bp 启动子的预测发现,猕猴桃 *AcSWEET* 基因成员至少具有 5 个激素响应的顺式作用元件,表明相应的激素处理可能对其具有调节作用。同时,这些基因启动子区域还存在低温反应以及干旱诱导相关的顺式作用元件,表明该基因家族成员可能在逆境反应中发挥一定的作用。此外,预测还发现启动子区域存在胚乳表达、细胞周期以及种子特异性相关的顺式作用元件,推测该基因家族可能在植物的生长发育过程中起调节作用。研究表明,互作蛋白可共同作用调控代谢途径,如玉米中 *BBX* 家族成员 *ZmBBX15*、*ZmBBX24* 和 *ZmBBX33* 可与 5 个以上其他 *ZmBBX* 成员互作,这些 *BBX* 与 *COP40* 的 *WD1* 基序结合,从而调节光形态发生的不同亲和力^[35]。

猕猴桃 *SWEET* 家族蛋白互作预测结果表明, *AcSWEET29*、*AcSWEET6* 和 *AcSWEET8* 之间存在两两互作,而 *AcSWEET29* 是一个定位于细胞膜的蔗糖转运蛋白,且 *AcSWEET29* 的表达量随着果实成熟和蔗糖含量的升高而逐渐增加^[30]。据此推测, *AcSWEET6* 和 *AcSWEET8* 可能也在猕猴桃果实的糖转运过程中起作用。值得注意的是,这两个基因分别在果实发育 20 和 60 d 时表达量最高,在果实发育后期表达量逐渐降低,这与 *AcSWEET29* 的表达趋势相反,因此, *AcSWEET6* 和 *AcSWEET8* 可能在猕猴桃果实发育的前期起作用。

基因表达分析结果表明,在猕猴桃果实不同发育时期, *AcSWEET* 基因的表达水平差异明显。表达水平聚类分析发现,在果实发育 20 和 140 d 时,分别有 7 个基因的表达水平最高,推测 *AcSWEET* 基因主要在果实发育初期和成熟期发挥调控功能。在果实发育 60 和 100 d 时,也有 *AcSWEET* 基因表现出较高的表达水平,可能该基因家族在糖积累过程中都起重要作用。此外,分析候选基因表达水平与糖含量之间的关系,发现 *AcSWEET26*、*AcSWEET7*、*AcSWEET15*、*AcSWEET13* 及 *AcSWEET29* 与蔗糖、果糖及葡萄糖含量之间均存在显著正相关,推测这些基因可能在猕猴桃果实发育过程中起糖积累的作用,但

其具体功能还有待深入研究。本研究鉴定的 *AcSWEET* 基因可为该家族的功能研究和猕猴桃品质改良提供分子基础。

参考文献:

- [1] 黄宏文. 中国猕猴桃种质资源 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2013: 10–27.
- [2] Zhang L, Tang ZM, Zheng H, Zhong CH, Zhang Q. Comprehensive analysis of metabolome and transcriptome in fruits and roots of kiwifruit[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (2): 1299.
- [3] Ruan YL. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 33–67.
- [4] Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, et al. Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters *SUC4* and *TMT1/2*[J]. *Plant J*, 2011, 68 (1): 129–136.
- [5] Kühn C, Grof CPL. Sucrose transporters of higher plants[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13 (3): 287–297.
- [6] Ayre BG. Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning[J]. *Mol Plant*, 2011, 4 (3): 377–394.
- [7] Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens[J]. *Nature*, 2010, 468 (7323): 527–532.
- [8] Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi[J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17 (7): 413–422.
- [9] Chen LQ. *SWEET* sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition[J]. *New Phytol*, 2014, 201 (4): 1150–1155.
- [10] Eom JS, Chen LQ, Sosso D, Julius BT, Lin IW, et al. *SWEETs*, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 25: 53–62.
- [11] Hamada M, Wada S, Kobayashi K, Satoh N. *Ci-Rga*, a gene encoding an Mtn3/saliva family transmembrane protein, is essential for tissue differentiation during embryogenesis of the ascidian *Ciona intestinalis*[J]. *Differentiation*, 2005, 73 (7): 364–376.
- [12] Xuan YH, Hu YB, Chen LQ, Sosso D, Ducat DC, et al. Functional role of oligomerization for bacterial and plant *SWEET* sugar transporter family[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (39): E3685–E3694.
- [13] Liu HT, Lyu WY, Tian SH, Zou XH, Zhang LQ, et al. The *SWEET* family genes in strawberry: identification and expression profiling during fruit development[J]. *South Afr J*

- Bot*, 2019, 125: 176–187.
- [14] Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, *et al.* Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport[J]. *Science*, 2012, 335 (6065): 207–211.
- [15] Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens PAW, Spinner L, *et al.* Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*[J]. *Curr Biol*, 2013, 23 (8): 697–702.
- [16] Gao Y, Wang ZY, Kumar V, Xu XF, Yuan DP, *et al.* Genome-wide identification of the SWEET gene family in wheat[J]. *Gene*, 2018, 642: 284–292.
- [17] Feng CY, Han JX, Han XX, Jiang J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato[J]. *Gene*, 2015, 573 (2): 261–272.
- [18] Li W, Ren ZY, Wang ZY, Sun K, Pei XY, *et al.* Evolution and stress responses of *Gossypium hirsutum* SWEET genes[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (3): 769.
- [19] Guo CY, Li HY, Xia XY, Liu XY, Yang L. Functional and evolution characterization of SWEET sugar transporters in *Ananas comosus*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496 (2): 407–414.
- [20] Zhu JL, Zhou L, Li TF, Ruan YY, Zhang A, *et al.* Genome-wide investigation and characterization of SWEET gene family with focus on their evolution and expression during hormone and abiotic stress response in maize[J]. *Genes*, 2022, 13 (10): 1682.
- [21] Dai ZR, Yan PY, He SZ, Jia LC, Wang YN, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of SWEET family genes in sweet potato and its two diploid relatives[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (24): 15848.
- [22] Yao TS, Xie RJ, Zhou Y, Hu JH, Gao Y, Zhou CY. Genome-wide identification of SWEET gene family and its response to abiotic stresses in Valencia sweet orange[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2021, 39 (3): 546–556.
- [23] Jiang SJ, Balan B, de A. B. Assis R, Sagawa CHD, Wan XQ, *et al.* Genome-wide profiling and phylogenetic analysis of the SWEET sugar transporter gene family in walnut and their lack of responsiveness to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* infection[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (4): 1251.
- [24] Hu LP, Zhang F, Song SH, Tang XW, Xu H, *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the SWEET gene family in cucumber[J]. *J Integr Agric*, 2017, 16 (7): 1486–1501.
- [25] Li JM, Qin MF, Qiao X, Cheng YS, Li XL, *et al.* A new insight into the evolution and functional divergence of sweet transporters in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58 (4): 839–850.
- [26] Wen ZY, Li MY, Meng J, Li P, Cheng TR, *et al.* Genome-wide identification of the SWEET gene family mediating the cold stress response in *Prunus mume*[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13273.
- [27] Sui JL, Xiao XH, Qi JY, Fang YJ, Tang CR. The SWEET gene family in *Hevea brasiliensis*-its evolution and expression compared with four other plant species[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7 (12): 1943–1959.
- [28] Zhang XH, Wang S, Ren Y, Gan CY, Li BB, *et al.* Identification, analysis and gene cloning of the SWEET gene family provide insights into sugar transport in pomegranate (*Punica granatum*) [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (5): 2471.
- [29] Fang T, Rao Y, Wang MZ, Li Y, Liu YJ, *et al.* Characterization of the SWEET gene family in longan (*Dimocarpus longan*) and the role of *DISWEET1* in cold tolerance[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (16): 8914.
- [30] Han X, Zhang YL, Zhang Q, Ma N, Liu XY, *et al.* Two haplotype-resolved, gap-free genome assemblies for *Actinidia latifolia* and *Actinidia chinensis* shed light on the regulatory mechanisms of vitamin C and sucrose metabolism in kiwifruit[J]. *Mol Plant*, 2023, 16 (2): 452–470.
- [31] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Mol Plant*, 2020, 13 (8): 1194–1202.
- [32] Ampomah-Dwamena C, McGhie T, Wibisono R, Montefiori M, Hellens RP, Allan AC. The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit[J]. *J Exp Bot*, 2009, 60 (13): 3765–3779.
- [33] Zhao K, Chen S, Yao WJ, Cheng ZH, Zhou BR, Jiang TB. Genome-wide analysis and expression profile of the bZIP gene family in poplar[J]. *BMC Plant Biol*, 2021, 21 (1): 122.
- [34] Yang JJ, Zhan RL, Jin YR, Song JY, Li DX, *et al.* Functional analysis of the promoter of the *MdFRK2* gene encoding a high-affinity fructokinase in apple (*Malus × domestica*) [J]. *Sci Hortic*, 2020, 265: 109088.
- [35] Xu XH, Li WL, Yang SK, Zhu XZ, Sun HW, *et al.* Identification, evolution, expression and protein interaction analysis of genes encoding B-box zinc-finger proteins in maize[J]. *J Integr Agric*, 2023, 22 (2): 371–388.