

孙博瀚, 杨丹, 王斐, 等. 沙漠植物羽毛针禾(*Stipagrostis pennata*)糖转运蛋白基因 *SpSWEET3* 的克隆与表达[J]. 中国沙漠, 2023, 43(5): 129–138.

沙漠植物羽毛针禾(*Stipagrostis pennata*)糖转运蛋白基因 *SpSWEET3* 的克隆与表达

孙博瀚^a, 杨丹^a, 王斐^{abc}, 李榕^{abc}, 李鸿彬^{abc}

(石河子大学 a.生命科学学院, b.绿洲城镇与山盆系统生态兵团重点实验室, c.新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要: 糖转运蛋白(SWEET)在植物生长发育和逆境胁迫响应中发挥着重要作用。本研究旨在克隆和分析羽毛针禾(*Stipagrostis pennata*)糖转运蛋白 *SpSWEET3* 基因的表达特征,为进一步探究其影响羽毛针禾根部沙套发育的机制及功能奠定基础。利用分子克隆技术克隆获得羽毛针禾 *SpSWEET3* 基因的全长开放阅读框序列;利用生物信息学方法分析 *SpSWEET3* 基因的理化性质;利用 qRT-PCR 分析基因的表达特征;利用激光共聚焦显微镜观察分析其亚细胞定位。从羽毛针禾中克隆获得 576 bp 的 *SpSWEET3* 基因的全长开放阅读框,该基因编码一个含有 191 个氨基酸的碱性疏水性蛋白,相对分子质量为 21.619 kD。 *SpSWEET3* 属于 PQ-loop 超家族并含有典型的 MtN3_slv 结构域,发挥催化胞内糖外排的功能。亚细胞定位分析显示该基因定位于质膜,暗示其可能作为跨膜蛋白发挥功能。qRT-PCR 结果显示 *SpSWEET3* 基因在羽毛针禾根组织中具有较高的累积表达,表明其对于沙套发育的重要作用; *SpSWEET3* 基因的表达显著受到 PEG 干旱胁迫的诱导表达,表明其对于干旱适应的重要作用。蛋白质相互作用分析显示 *SpSWEET3* 可能通过与参与维持核酸结构稳定、转录因子、跨膜转运等蛋白质相互作用进而发挥转运糖的作用。本研究结果为深入研究 *SWEET* 基因的功能及其调控植物组织发育和适应逆境的机制奠定了基础。

关键词: 羽毛针禾(*Stipagrostis pennata*); *SpSWEET3*; 糖转运蛋白; 生物信息学分析; 亚细胞定位; 根鞘; 干旱响应

文章编号: 1000-694X(2023)05-129-10

DOI: 10.7522/j.issn.1000-694X.2023.00037

中图分类号: Q943

文献标志码: A

0 引言

新疆是中国典型的干旱、半干旱地区,是中国沙漠化土地面积最大、分布最广、受害最严重的地区。新疆约有 70% 的沙漠区域为流动沙丘^[1]。土地风蚀由沙漠化直接造成,地表继而出现风沙流、流沙堆积和沙丘前移,对人类生产、生活等方面造成严重危害。沙漠植物羽毛针禾(*Stipagrostis pennata*)是古尔班通古特沙漠中的固沙先锋植物^[2],羽毛针禾的根具有特殊的沙套结构,对于其发挥防风固沙、适应沙漠干旱环境等功能具有关键作用。

可溶性糖在植物生长发育和逆境胁迫响应调控中发挥着重要作用。在逆境胁迫下,植物为了维持细胞渗透势的平衡,通过对体内可溶性糖进行再

分配,从而利于植物在逆境胁迫下维持正常生长^[3]。植物沙套的形成需要沙粒和根表分泌物的共同作用^[4]。沙套代谢组学研究显示,在干旱胁迫处理后,根部大多数糖类物质和部分氨基酸在沙套根中高度积累^[5];尤其是糖类物质在干旱处理的根中表现出显著的累积,表明其与干旱条件下的沙套生成密切相关^[6]。糖转运蛋白是调控可溶性糖再分配的关键因子,能够响应多种逆境胁迫,与植物逆境适应密切相关。SWEET(Sugars will Eventually be Exported Transporter)是一种新型糖转运蛋白,广泛存在于动植物中^[7]。SWEET 糖转运蛋白具有 7 个跨膜结构域,SWEET 蛋白的结构同源性比较高,在结构上高度保守^[8]。在植物体内,SWEET 糖转运蛋白

收稿日期:2023-02-07; 改回日期:2023-04-12

资助项目:兵团科技计划项目(2020BC002);国家自然科学基金项目(32060082);石河子大学科技计划项目(KX008505)

作者简介:孙博瀚(1997—),男,吉林白山人,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail: s982862899@163.com

通信作者:李榕(E-mail: lirong@shzu.edu.cn);李鸿彬(E-mail: lihongbin@shzu.edu.cn)

的存在很好地解释了糖分转运模式,研究表明 SWEET 转运蛋白可以促进糖类顺浓度梯度扩散以及调控植物体内糖类化合物的运输^[9-11]。也有研究表明, *SWEET* 基因家族成员在植物应对干旱胁迫过程中发挥重要作用。在拟南芥中,在干旱胁迫条件下, *AtSWEET11*、*AtSWEET12* 和 *AtSWEET15* 在叶片中的表达量上调,提高蔗糖转运效率,促进糖向根系转移,从而降低根系渗透压,提高根系吸水量^[12]。

目前对于羽毛针禾的研究主要在种群特性、生态适应性及根部微生物等方面,还未有从植物自身发育的角度解析沙套发育机制的相关研究。我们在实验室种植羽毛针禾的过程中,通过收集材料对比发现,羽毛针禾根部沙套发育 30 天(30D)、60 天(60D)、90 天(90D)以及 90 天无沙套根(90D-F)发育具有明显的阶段性。我们前期的研究发现糖转运蛋白基因 *SpSWEET3* 在沙套整个发育过程中均显著高表达,表明其与沙套发育的紧密联系。本研究对 *SpSWEET3* 的全长开放读码框序列进行克隆,并对其组织表达特异性和响应干旱胁迫的表达特征进行分析,为进一步解析 *SpSWEET3* 在羽毛针禾沙套发育的功能及适应极端干旱的机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为在沙漠生长的羽毛针禾(图 1)。使用的羽毛针禾种子是在新疆维吾尔自治区石河子市莫索湾水库附近沙漠采集的野外生长的羽毛针禾成熟种子。本试验使用的农杆菌菌株 GV3101 为新疆石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室保存,大肠杆菌感受态菌株 DH5 α 购自北京全式金生物公司。

pMD-19T 克隆载体、LA taq 酶、Real time PCR 试剂购自 TaKaRa 生物公司;RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司;cDNA 第一链反转录试剂盒、T4 连接酶、快速限制性内切酶购自 Fermentas 生物公司;RNA 反转录试剂盒、LA Taq DNA Polymerase、T4-DNA Ligase 等相关试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;Xba I、Xma I 等相关酶购自 Fermentas 公司;2 \times Taq PCR Master Mix, DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取微量试剂盒购自 TIANGEN 公司;试验所用卡那霉素、庆大霉素、MES、乙酰丁香酮、MgCl₂ 及培养基配制等化学试剂均为国产分析纯,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 所用引物的合成和 DNA 测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 羽毛针禾的培育及种植

将野外采集回来的羽毛针禾种子烘干,选择饱满的籽粒,去除颖果果皮后放入 0.05% 的 GA3 溶液中浸泡 24 h。将从野外带回的沙土装满铺垫有两层报纸的花盆中,浇灌自来水后,用镊子底端按出深度约 1 cm 的沙坑,将使用 GA3 浸泡后的种子用镊子夹起放入沙坑中,并用适量沙子覆盖,最后放入 37 $^{\circ}$ C 环境下培养,观察发芽情况,适时收取组织样本备用。

1.2.2 羽毛针禾总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

参照 Omega 公司的植物总 RNA 提取试剂盒的说明书进行羽毛针禾样品总 RNA 的提取,经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后,用反转录试剂盒合成 cDNA。

1.2.3 *SpSWEET3* 基因的克隆

在实验室前期的研究基础上,参照转录组测序结果,设计引物 *SpSWEET3-F* 和 *SpSWEET3-R* 以及

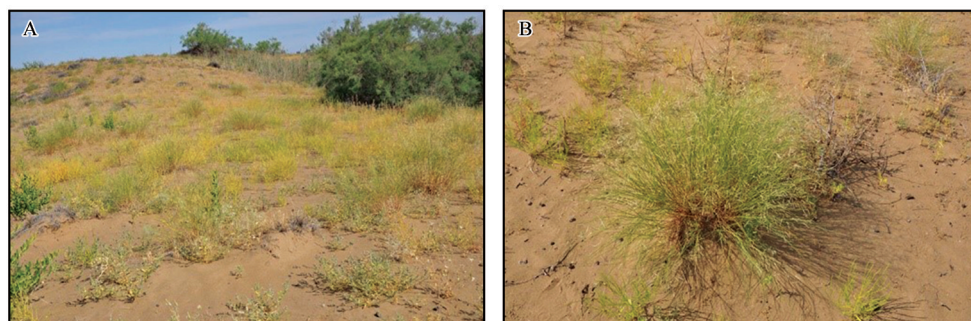


图 1 羽毛针禾及其野外生长环境

Fig.1 *Stipagrostis pennata* plants and the wild growth environment.

含有 *Xba* I 和 *Xma* I 酶切位点的引物 *SpSWEET3-EF* 和 *SpSWEET3-ER* (表 1), 以野生型羽毛针禾的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 反应体系如下: cDNA (50 ng·μL⁻¹) 1 μL, 2×Taq PCR Master Mix 10 μL, 引物 *SpSWEET3-F* 0.5 μL, 引物 *SpSWEET3-R* 0.5 μL, ddH₂O 8 μL, 共 20 μL。扩增程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。使用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物经后, 并回收目的条带, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序和验证正确的 *SpSWEET3* 核酸序列提交至 GenBank 数据库(编号为: OQ784243)。

表 1 本研究使用的引物序列
Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')	引物功能
<i>SpSWEET3-F</i>	ATGATCACTGGCATAACGC	基因克隆
<i>SpSWEET3-R</i>	AGATAACATAGCTGTGTATTTACTACT	
<i>SpSWEET3-EF</i>	GCTCTAGAATGATCACTGGCATAACGC	
<i>SpSWEET3-ER</i>	TCCCCCGGGAGATAACATAGCTGTGTATTTACTACT	
<i>q-ELF-F</i>	ACTACCATCCCTATGAGCCAAC	基因表达分析
<i>q-ELF-R</i>	ATCACTGCCAGCCTGAAGACA	
<i>q-GAPDH-F</i>	AGTCCGTCGCCATCGTCA	
<i>q-GAPDH-R</i>	CGTGCCCATGCCTTCTGT	
<i>q-APR6-F</i>	TCAATTCCAAGAAATGGCTCG	
<i>q-APR6-R</i>	TGGGTTCCACCAGTAACAAGG	
<i>q-SpSWEET3-F</i>	TGACATTTAAAAGAGTGATA	
<i>q-SpSWEET3-R</i>	AGAACTCACAACCTGGAAGGC	

1.2.4 *SpSWEET3* 基因的序列分析

序列比对分析使用序列分析软件 DNAMAN 完成。羽毛针禾 *SpSWEET3* 的保守结构域分析使用 NCBI 网站在线工具 Conserved Domains 完成。使用 ExPSAy 在线服务器中的 PortParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件分析计算 *SpSWEET3* 编码蛋白质的理化参数; 使用 PortParam 在线软件对该蛋白质进行疏水性分析; 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线软件分析预测蛋白质二级结构; 使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线预测蛋白质三级结构; 使用 ProtComp-Version9.0 (<http://linux1.softberry.com/>) 在线软件对该蛋白质的亚细胞定位进行分析; 使用 TBtools 对其进行蛋白的进化及保守域分析。

1.2.5 *SpSWEET3* 基因的表达特征分析

收取羽毛针禾根、节、叶、花、种子, 以及不同 PEG6000 浓度处理过的根等组织, 提取这些组织的 RNA, 反转录得到 cDNA, 以反转录 cDNA 为模板, 分别以羽毛针禾 *ELF*、*GAPDH*、*APR6* 基因为内参基

因^[13]。利用 Premier 5.0 软件设计内参基因 *ELF*、*GAPDH*、*APR6* 以及 *SpSWEET3* 引物 (表 1), 参照荧光定量试剂盒说明书 (加拿大, ABM) 进行 qRT-PCR (Quantitative real-time polymerase chain reaction) 反应, 每个样本进行 3 个技术重复。反应结束后, 根据目的基因和内参基因 Ct 值, 使用 2^{-ΔΔCt} 方法^[14]计算目的基因的表达量。

1.2.6 植物表达载体的构建

把 *SpSWEET3* 基因连接到 *pMD19-T* 载体上, 再转入 DH5α 大肠杆菌的感受态细胞; 将其中的阳性单菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司进行检测, 将测序正确的单菌落摇菌并提取质粒即可得到含有 *SpSWEET3* 基因的阳性质粒溶液。将得到的阳性质粒使用 Fermentas 公司的 *Xba* I 和 *Xma* I 进行双酶切验证, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行分离, 回收纯化后的线性 *SpSWEET3* 基因。再将包含有 35S 启动子的 *pCAMBIA1300-GFP* 克隆载体用 *Xba* I 和 *Xma* I 进行双酶切。将得到的 *SpSWEET3* 基因和线性载体进行连接。得到重组质粒后转化 DH5α 大肠杆菌感受态, 将培养饱和的大肠杆菌进行质粒提取, 对重

组质粒进行PCR以及双酶切,验证无误后,将35S::*SpSWEET3-GFP*重组质粒进行农杆菌GV3101的转化。转化后,对其阳性单菌落进行PCR验证,将结果正确的菌落进行保存,待用。

1.2.7 *SpSWEET3*的洋葱亚细胞定位

将购买的新鲜洋葱底部浸泡在水中,待洋葱根长出5 cm左右,在超净工作台把洋葱内表皮细胞用剪刀剪成1 cm×1 cm左右小方块正面朝上平铺在MS固体培养基上,暗培养2天。将转化成功的35S::*SpSWEET3-GFP*重组质粒根癌农杆菌在含有硫酸卡那霉素、利福平、庆大霉素的LB液体培养基中200 r·min⁻¹、28℃震荡培养8 h;5 000 r·min⁻¹进行10 min菌体离心收集菌体沉淀;而后用含有100 mmol·L⁻¹ MES (pH=5.7)、10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、100 μmol·L⁻¹ AS的MS液体重悬液重悬菌体至OD₆₀₀=0.8,然后将暗培养两天的洋葱上表皮细胞与根癌农杆菌重悬液在220 rpm、28℃震荡培养条件下共培10~15 min。再用滤纸将洋葱上表皮浸染液吸干,正面朝上放置在铺有滤纸的MS固体培养基上,常温避光条件下培养2天,在激光共聚焦显微镜下观察洋葱表皮细胞。

1.2.8 *SpSWEET3*蛋白质相互作用网络构建

将上述得到的羽毛针禾*SpSWEET3*蛋白序列利用STRING数据库(<https://string-db.org/>)预测与*SpSWEET3*存在潜在互作关系的蛋白质。

2 结果

2.1 *SpSWEET3*的克隆与序列分析

以羽毛针禾的叶片cDNA为模板进行*Sp*-

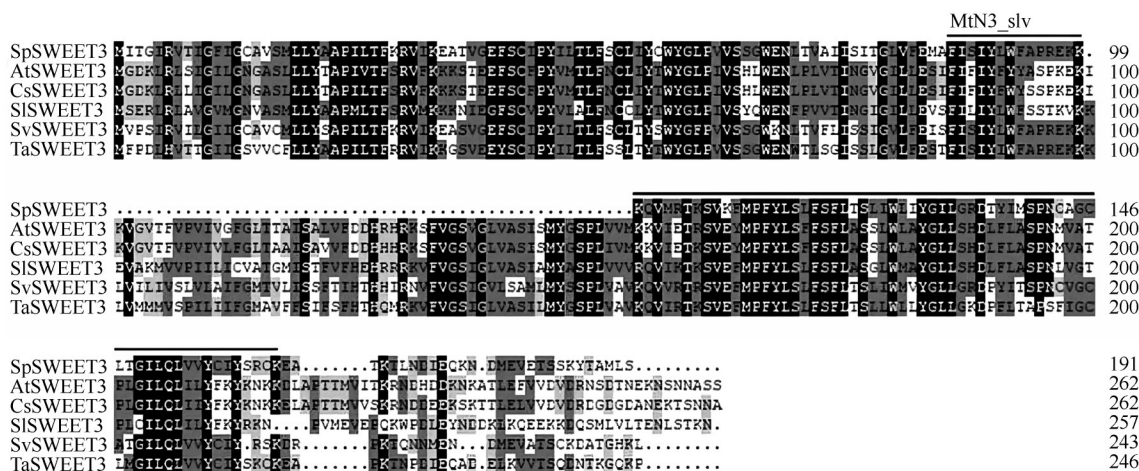
*SWEET3*基因的PCR扩增(图2),PCR电泳条带长度符合预期,经序列测定后,成功克隆获得羽毛针禾*SpSWEET3*基因的全长开放读码框,该基因包含576个核苷酸,编码一个含有191个氨基酸的碱性疏水性蛋白。*SpSWEET3*蛋白含有典型的MtN3_slv跨膜结构域,主要发挥催化胞内糖外排的功能(图3)。



图2 *SpSWEET3*基因克隆凝胶电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis diagram of *SpSWEET3* gene cloning

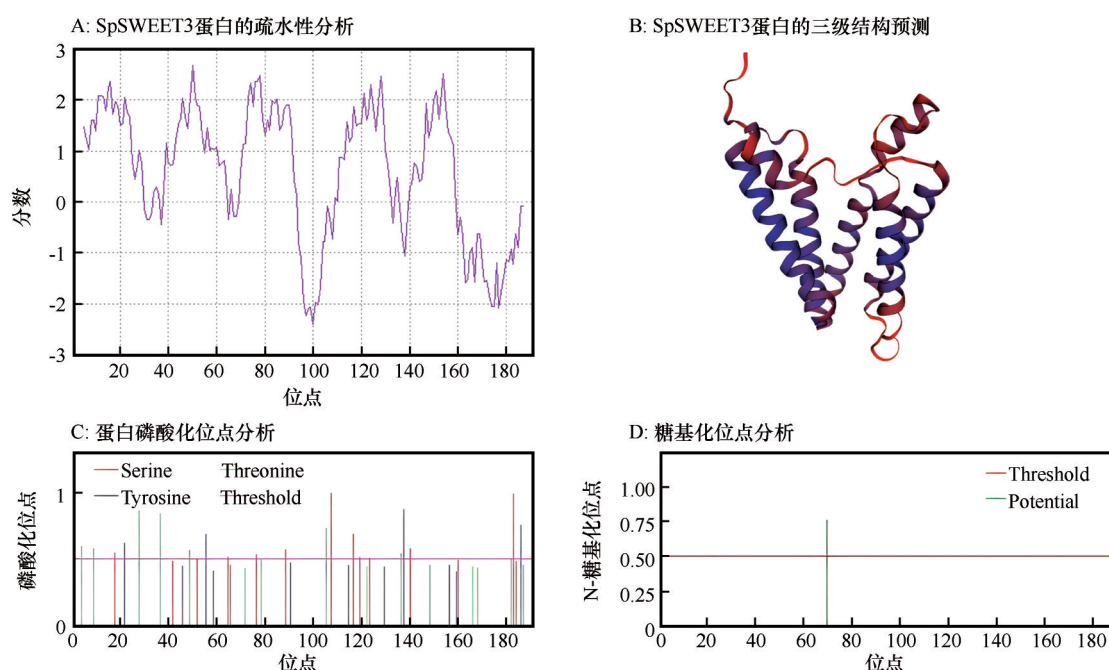
利用ExPSAy在线服务器中的PortParam在线软件对*SpSWEET3*进行疏水性分析(图4)。*SpSWEET3*蛋白的亲水性总平均值(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为0.635 (GRAVY在-2与2之间,大于0为疏水性,小于0为亲水性),脂溶指数



不同颜色字体代表相同或相似氨基酸残基。MtN3_slv保守结构域用实线标出

图3 *SpSWEET3*的序列分析

Fig.3 Sequence analysis of *SpSWEET3* protein

图4 羽毛针禾糖转运蛋白基因 *SpSWEET3* 的生物信息学分析Fig.4 Bioinformatic analysis of *SpSWEET3*

(Aliphatic index, AI)为110.73。分析结果显示 *SpSWEET3* 蛋白具有强疏水性和高脂溶性;亚细胞定位预测结果显示其定位于质膜。*SpSWEET3* 蛋白包含11个 α -螺旋,其余皆为无规卷曲,主要由这两种二级结构组成。对 *SpSWEET3* 蛋白的磷酸化和糖基化位点分析结果显示:*SpSWEET3* 含有41个磷酸化位点,包含15个丝氨酸位点、15个苏氨酸位点和11个酪氨酸位点。*SpSWEET3* 含有1个潜在的糖基化位点。

将 *SpSWEET3* 蛋白与拟南芥 (*AtSWEET*) 和水稻 (*OsSWEET*) 的 *SWEET* 基因成员进行蛋白的进化及保守域分析。进化树和结构域的结果显示, *SpSWEET3* 蛋白与水稻的 *OsSWEET3a* 蛋白同源性较高,这可能是由于两个物种皆为单子叶植物,因此在进化上有更近的关系(图5);*SpSWEET3* 含有一个 PQ-loop 结构域超家族,这个超家族包含 MtN3_slv 结构域及一些保守的 *SWEET* 结构域。这些结构域与 *SpSWEET3* 的功能发挥密切相关。

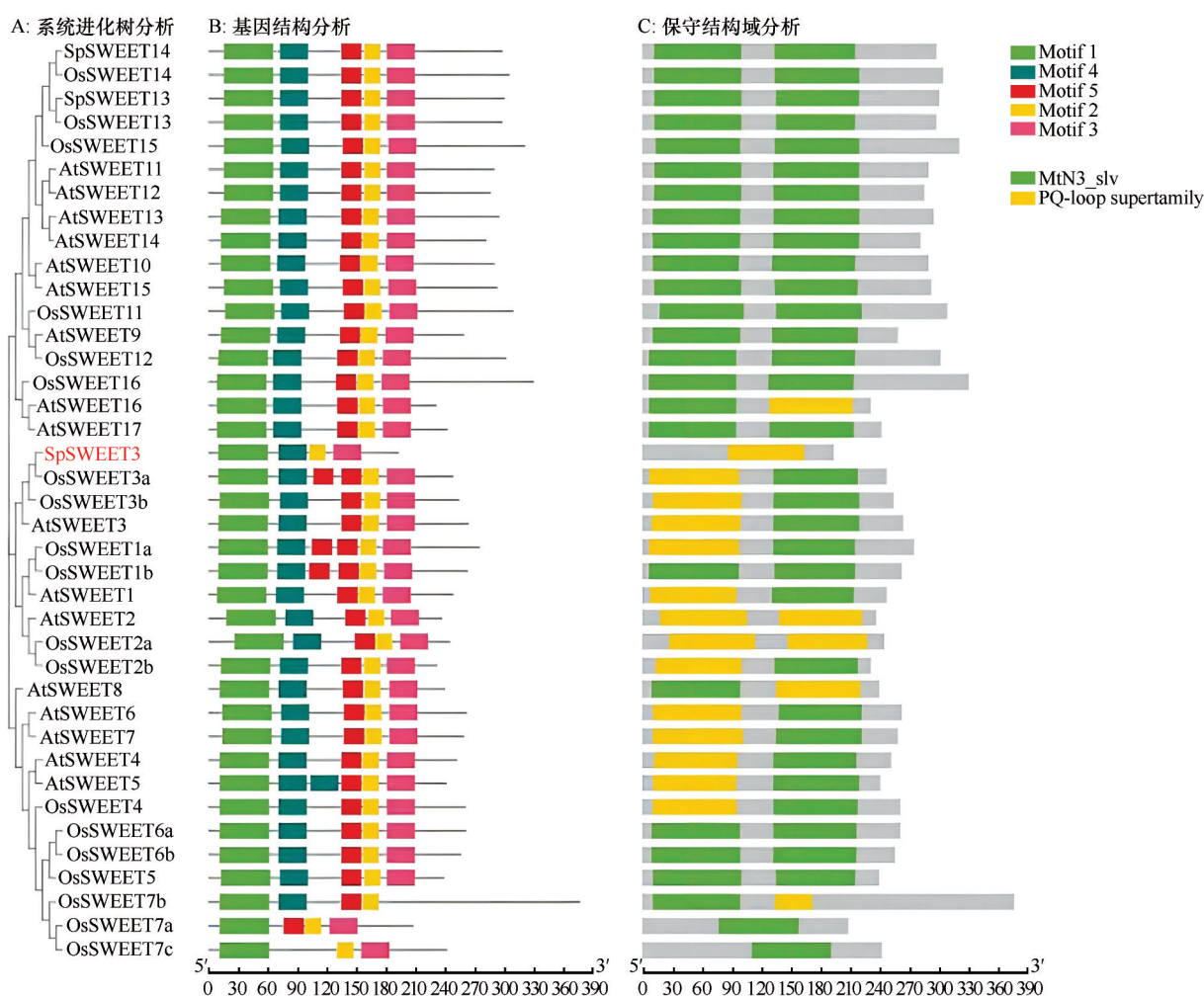
2.2 *SpSWEET3* 的表达特征分析

实验室前期研究已初步界定了羽毛针禾沙套发育的3个阶段,即播种后30天(30D)、60天(60D)和90天(90D)。同时在90D还出现了无沙套形成的根组织(90D-F)。*SpSWEET3* 基因在羽毛针禾沙套发育的不同时期的表达结果分析表明:该基

因主要在沙套发育的第二个阶段(60D,羽毛针禾沙套发育的快速形成阶段)和第三个阶段(90D)具有显著的累积表达(图6)。这表明 *SpSWEET3* 基因在羽毛针禾沙套发育过程中发挥着重要作用。组织特异性表达分析显示:*SpSWEET3* 基因在羽毛针禾的各个组织中均有一定表达,主要在根、根结节中显著优势表达。沙套是羽毛针禾适应沙漠干旱环境的重要组织,为了深入探究 *SpSWEET3* 基因对羽毛针禾适应干旱的重要作用,使用聚乙二醇(PEG6000)模拟干旱对羽毛针禾进行胁迫处理,收集处理后的羽毛针禾根组织进行基因表达量分析。结果显示:*SpSWEET3* 基因在不同 PEG 浓度处理下表现出显著的诱导表达,表达量出现先升高再降低的趋势,随着 PEG 处理浓度的不断升高, *SpSWEET3* 基因表达量逐渐升高,在15%PEG处理下的表达量达到最大值,表明 *SpSWEET3* 基因在羽毛针禾对干旱胁迫的响应过程中发挥重要作用。

2.3 35S:: *SpSWEET3*-GFP 载体的构建和亚细胞定位分析

将用 *Xba* I 和 *Xma* I 酶切后获得的 *SpSWEET3* 片段与包含有35S启动子的 *pCAMBIA1300-GFP* 载体连接、转化,提取重组质粒进行双酶切鉴定,成功构建 35S:: *SpSWEET3*-GFP 载体(图7)。将重组质

图 5 *SpSWEET3* 的基因结构和保守结构域分析Fig.5 Gene structure and conserved motif analysis of *SpSWEET3*

粒转化洋葱,利用激光共聚焦显微镜进行亚细胞定位观察,结果显示 35S::GFP 空载体在洋葱表皮细胞的质膜和细胞核都有表达,羽毛针禾糖转运蛋白 *SpSWEET3* 在洋葱表皮细胞的质膜表达如图 8 所示。

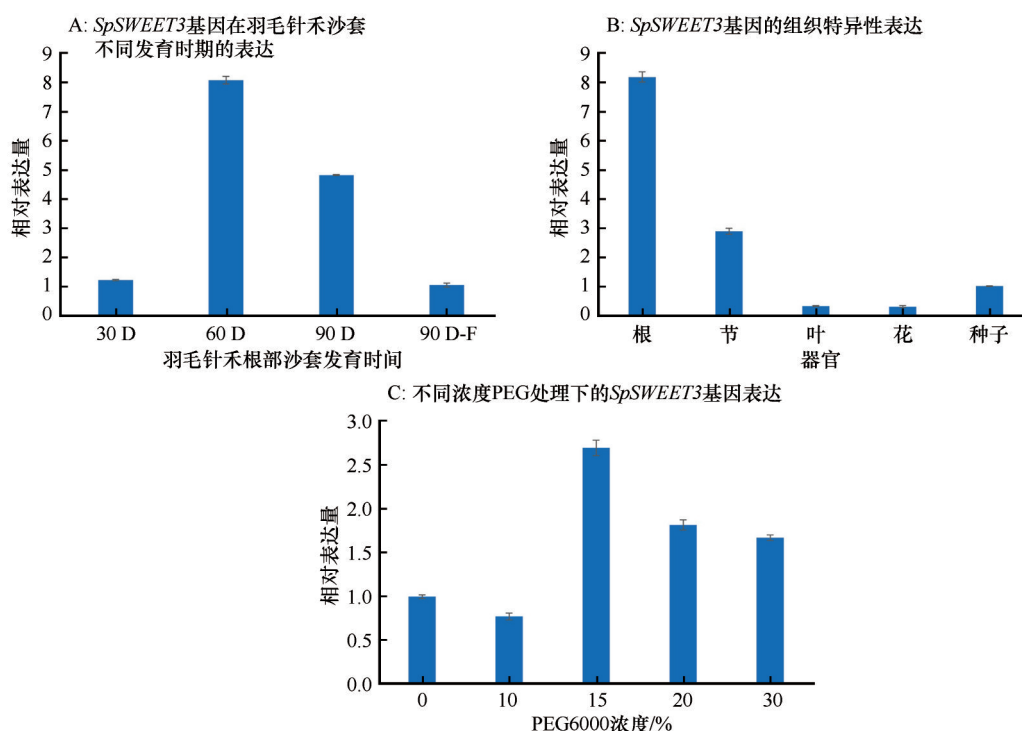
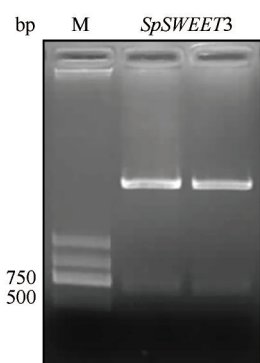
2.4 *SpSWEET3* 蛋白质相互作用分析

利用 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 对羽毛针禾 *SpSWEET3* 进行蛋白互作分析。结果显示:*SWEET3* 可能与 10 个蛋白质之间存在相互作用,分别为 AT2G34350、TFL2、PUM23、FKF1、Rb-cX1、AT1G79890、YY1、ZIP6、VPS34、VLN1(图 9)。这些互作蛋白参与维持核酸结构稳定、转录因子调控基因表达、跨膜转运等,表明 *SpSWEET3* 可能通过与这些蛋白质相互作用进一步发挥转运糖的作用。

3 讨论

干旱是影响植物生长和作物产量的重要环境因素,近年来全球性的气候变化更加剧了干旱胁迫对环境、作物生产的影响^[15]。新疆生态环境脆弱,沙漠化问题严重影响着人们的生产生活。新疆的沙漠主要为流动沙丘,羽毛针禾主要生长在流动半流动沙地,是沙漠中的固沙先锋植物^[16]。羽毛针禾具有抗旱、耐风蚀、耐沙埋等特点,尤其是根部具有一种特殊的沙套结构,对于其适应沙漠极端干旱环境具有重要作用。

SWEET 糖转运蛋白是近年来新发现的一类新型糖运输蛋白家族,参与调控植物生长发育和逆境胁迫响应^[17]。*SWEET* 蛋白家族被定义为一类不依赖于 pH 的糖转运蛋白^[18],其跨膜结构域最初发现于苜蓿根部结瘤素,此后,在人、小鼠、海鞘及拟南芥、橡胶草、水稻、番茄、桉树、木薯等动植物中都发

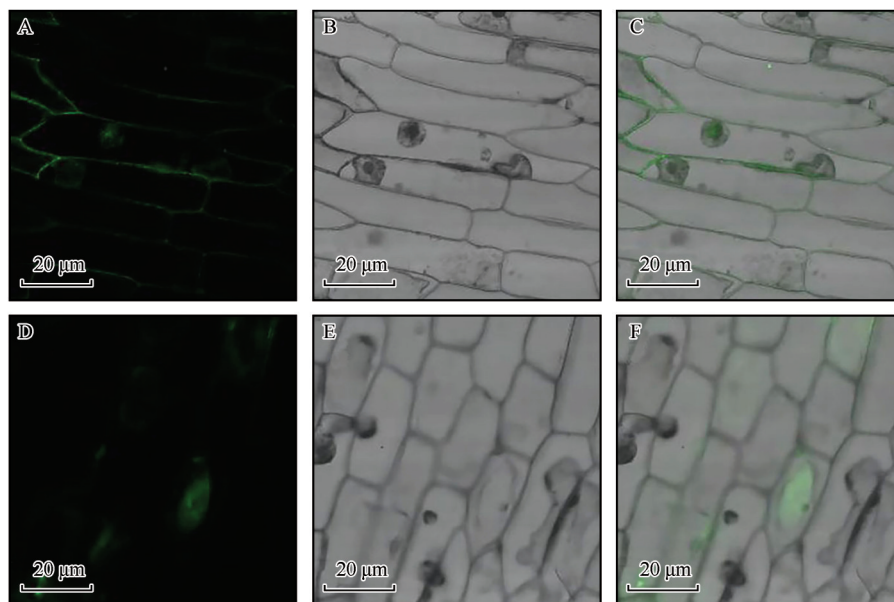
图6 *SpSWEET3*的表达特征分析Fig.6 Expression pattern analysis of *SpSWEET3*图7 *SpSWEET3*质粒双酶切鉴定Fig.7 Double enzymatic identification of *SpSWEET3* recombinant plasmid

现了该蛋白^[19],但关于羽毛针禾中 *SWEET* 基因的研究鲜有报道。本研究克隆获得一个羽毛针禾 *SWEET* 基因为 *SpSWEET3* (图2),该基因全长开放读码框为 576 bp,编码包含 191 个氨基酸、相对分子质量为 21.619 kD 的蛋白质。*SpSWEET3* 定位于质膜,为碱性、强疏水性、跨膜蛋白(图4)。*SpSWEET3* 基因具有保守的基因序列和结构域(图3、5),推测其可能发挥转运糖的功能。

SWEET 基因在植物生长发育和胁迫响应过程中发挥重要作用。在拟南芥中,*AtSWEET4* 参与根的生长与花的发育^[20],*AtSWEET13/14* 参与花粉发

育^[21],*AtSWEET16* 参与根的生长以及低温胁迫应答^[22]。在油菜中,*BrSWEET11-LF* 与 *BrSWEET17-MF1* 均被报道参与了抗盐胁迫^[23]。在木薯中,*MeSWEET10* 被报道参与抗病原物胁迫^[24]。本研究中,qRT-PCR 分析表明该基因主要在根组织中显著累积,尤其在根组织沙套发育的快速形成期优势表达(图6),暗示其与根部沙套发育之间的密切联系。在 PEG6000 处理的干旱胁迫条件下,*SpSWEET3* 基因的表达受到显著的诱导(图6),暗示 *SpSWEET3* 基因与沙漠极端干旱环境适应之间的紧密联系。

基因的亚细胞定位与功能发挥之间具有紧密的联系^[25]。有研究发现,拟南芥中的 *AtSWEET11* 和 *AtSWEET12* 以及水稻中的 *OsSWEET11* 和 *OsSWEET14* 定位于质膜,负责将叶片中的蔗糖转运至维束管中^[26]。拟南芥中的 *AtSWEET2*、*AtSWEET16* 和 *AtSWEET17* 则定位在液泡膜,对液泡中糖的储存起着关键作用^[27-28]。本研究中,羽毛针禾 *SpSWEET3* 基因编码的蛋白质定位于质膜(图8),在质膜作为跨膜蛋白发挥功能。同时,在蛋白互作网络分析图中发现,*SpSWEET3* 存在与具有跨膜转运功能的蛋白质相互作用(图9),暗示 *SpSWEET3* 可能与相关的其他蛋白质共同发挥糖转运的作用。羽毛针禾 *SpSWEET3* 蛋白的保守结构域可能具有转



A: GFP通道下的空载体; B: 在明场视野下的空载体; C: 复合场下的空载体; D: GFP通道下的SpSWEET3; E: 在明场视野下的SpSWEET3; F: 复合场下的SpSWEET3

图8 糖转运蛋白SpSWEET3亚细胞定位分析(质壁分离条件下的观察)

Fig.8 Subcellular localization analysis of SpSWEET3

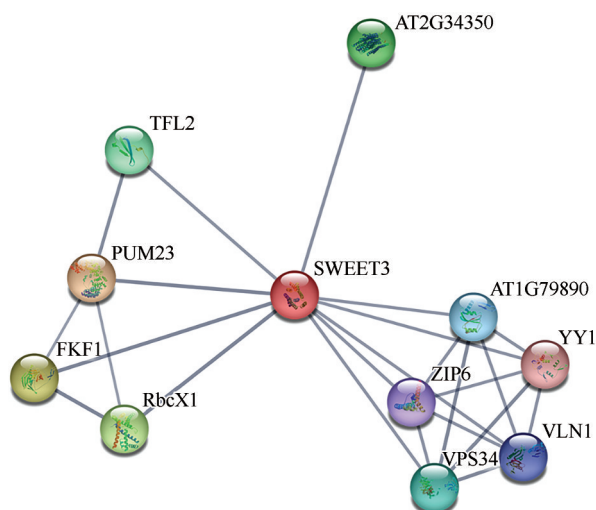


图9 SpSWEET3蛋白质相互作用分析

Fig.9 Protein interaction analysis of SpSWEET3

运植物激素赤霉素的作用,其影响沙套发育是否与赤霉素存在调控关系,值得进一步进行研究。

4 结论

本研究克隆获得羽毛针禾糖转运蛋白基因 *Sp-SWEET3*, 该基因定位在质膜, 主要在根组织中优势表达并显著受到干旱胁迫的诱导。本研究为进一步解析羽毛针禾 *SWEET* 基因影响沙套发育的功能和调控机制解析提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 路丽宁, 张定海, 李功麟. 古尔班通古特沙漠固沙灌木的冠幅预测模型[J]. 生态科学, 2022, 41(5): 81-89.
- [2] 龙丽红, 王慧, 马晓丽, 等. 古尔班通古特沙漠羽毛针禾 (*Stipagrostis pennata*) 种群种子雨特征[J]. 干旱区研究, 2014, 31(3): 516-522.
- [3] Yamada K, Osakabe Y, Mizoi J, et al. Functional analysis of an Arabidopsis thaliana abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides[J]. Biochemistry & Molecular Biology, 2010, 285(2): 1138-1146.
- [4] Mahmood T, Mehnaz S, Fleischmann F, et al. Soil sterilization effects on root growth and formation of rhizosheaths in wheat seedlings[J]. Pedobiologia, 2014, 57(3): 123-130.
- [5] Nambiar E. Uptake of Zn65 from dry soil by plants[J]. Plant and Soil, 1976, 44(1): 267-271.
- [6] Liu T Y, Chen M X, Zhang Y, et al. Comparative metabolite profiling of two switchgrass ecotypes reveals differences in drought stress responses and rhizosheath weight[J]. Planta, 2019, 6: 1432-2048.
- [7] 陈慧敏, 李威, 马雄风, 等. 植物 SWEET 基因家族的相关研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(19): 34-39.
- [8] Chen L Q, Hou B H, Lalonde S, et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens[J]. Nature, 2010, 468(7323): 527.
- [9] Baker R F, Leach K A, Brauan D M. SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants[J]. Molecular Plant, 2012, 5(4): 766-768.

- [10] Chen L Q. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition [J]. *New phytologist*, 2014, 201 (4): 1150–1155.
- [11] Chandran D. Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(7): 461–471.
- [12] Durand M, Porcheron B, Hennion N, et al. Water deficit enhances c export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(3): 1460–1479.
- [13] Li R, Cui K, Xie Q, et al. Selection of the reference genes for quantitative gene expression by RT-qPCR in the desert plant *Stipagrostis pennata* [J]. *Scientific Reports*, 2021(1): 21711.
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C (T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [15] 金玉环. 新疆荒漠环境典型短命植物小鼠耳芥 (*Arabidopsis pumila*) 快速生长与耐逆性机制 [D]. 新疆石河子: 石河子大学, 2021.
- [16] 张丽霞, 张霞, 王绍明, 等. 公路阻碍作用对古尔班通古特沙漠南缘羽毛针禾种群基因流的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(9): 104–109.
- [17] Li X, Si W, Qin Q Q, et al. Deciphering evolutionary dynamics of SWEET genes in diverse plant lineages [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 13440.
- [18] Yuan M, Wang S. Rice MtN3/Saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6: 665–674.
- [19] Yuan M, Chu Z, Li X. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 3164–3176.
- [20] Liu X, Zhang Y, Yang C, et al. AtSWEET4, a hexose facilitator, mediates sugar transport to axial sinks and affects plant development [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24563.
- [21] Engel M L, Holmes-Davis R, McCormick S, et al. Identification of male gamete promoters in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(4): 2124–2133.
- [22] Guo W J, Nagy R, Chen H Y, et al. SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the Tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves [J]. *Plant Physiology*, 2013, 164 (2): 777–789.
- [23] Miao L M, Lv Y X, Kong L J, et al. Genome-wide identification, phylogeny, evolution, and expression patterns of Mt N3/saliva/SWEET genes and functional analysis of BcNS in *Brassica rapa* [J]. *Molecular plant Pathology*, 2018, 19(1): 174–181.
- [24] Liu Q, Yuan M, Zhou Y, et al. A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice [J]. *Plant Cell Environment*, 2011, 34 (11): 1958–1969.
- [25] 申龙斌, 李瑞梅, 段瑞军, 等. 海马齿 *Spmet* 基因表达产物的亚细胞定位及其组织表达特异性分析 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(27): 213–217.
- [26] Chen L Q, Qu X Q, Hou B H, et al. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport [J]. *Science*, 2012, 335: 207–211.
- [27] Xuan Y H, Hu Y B, Chen L Q, et al. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family [J]. *PNAS*, 2013, 110(39): E3685–3694.
- [28] Klemens P A W, Patzke K, Deitmer J, et al. Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(3): 1338–1352.

Cloning and expression analysis of sugar transporter gene *SpSWEET3* from the desert plant *Stipagrostis pennata*

Sun Bohan^a, Yang Dan^a, Wang Fei^{abc}, Li Rong^{abc}, Li Hongbin^{abc}

(a. College of Life Science / b. Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Oasis Town and Mountain-basin System Ecology / c. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization of Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract: Sugar transporter (SWEET) plays an important role in plant growth and development and stress response. The purpose of this study is to clone and analyze the expression characteristics of *Stipagrostis pennata* sugar transporter *SpSWEET3* gene, and lay a foundation for further exploring the mechanism and function of its influence on the development of *S. pennata* root sand trap. The full-length open reading frame sequence of *S. pennata SpSWEET3* gene was cloned by molecular cloning technology; The physical and chemical properties of *SpSWEET3* gene were analyzed by bioinformatics; The gene expression characteristics were analyzed by qRT-PCR; The subcellular localization was observed and analyzed by laser confocal microscope. *SpSWEET3* was cloned from the desert plant *S. pennata*, which includes a 576-bp full-length open reading frame and encodes a basic strongly hydrophobic protein containing 191 amino acids with a relative molecular mass of 21.619 kD. *SpSWEET3* belongs to the PQ-loop superfamily and contains the typical MtN3_slv transmembrane domain that catalyzes intracellular sugar efflux. Subcellular localization analysis revealed localization of the gene to the plasma membrane, implying that it may function as a transmembrane protein. qRT-PCR results showed that the *SpSWEET3* gene had a higher cumulative expression in *S. pennata* root tissues, indicating its important role for sand rhizosheath development. Expression of the gene *SpSWEET3* was significantly induced by drought stress with PEG, indicating its importance for drought adaptation. Protein interaction analysis showed that *SpSWEET3* may transport sugar by interacting with proteins involved in the maintenance of nucleic acid structural stability, transcription factors, and transmembrane transport. The results of this study provide a foundation for in-depth investigation of the functions of *SWEET* genes and the mechanisms by which they regulate plant tissue development and adaptation to stress.

Key words: *Stipagrostis pennata*; *SpSWEET3*; sugar transporter gene; bioinformatics analysis; subcellular localization; rhizosheath; drought response