

## 休眠期间油桃花芽碳水化合物代谢及其相关基因的表达变化

王慧\*, 李玲\*, 谭钺, 李冬梅, 谭秋平, 陈修德, 高东升\*\*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

**摘要:** 以十年生大田和三年生盆栽‘曙光’油桃花芽为材料, 分别测定了其休眠期碳水化合物含量、糖代谢相关基因的季节性表达及低温处理下相关基因的表达变化, 旨在探讨碳水化合物及低温与休眠的关系。结果表明: 休眠期间可溶性糖(主要是蔗糖)含量逐渐增加, 淀粉含量则呈相反趋势。糖代谢相关基因表达明显不同: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因(*AGPase*)无明显变化; 组氨酸H3基因(*HisH3*)和己糖激酶1基因(*HK1*)在进入内休眠前有明显上升, 蔗糖合酶基因(*SuSy*)则与之相反; 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(*UGPase*)表达总体上呈上调趋势, 在进入内休眠后稍有下调。表明进入内休眠后, 依赖HK1的糖信号转导途径起重要作用。在4℃处理后, 与细胞分裂有关的基因*HisH3*含量急剧升高, 而后下降, 说明细胞分裂的减少并不是休眠期间抑制生长的原因; *UGPase*表现出与内休眠期一致的变化趋势, 说明对低温有一定的适应性。

**关键词:** 休眠; 碳水化合物; 低温; 基因表达; 油桃花芽

## Changes in Carbohydrate Metabolism and Related Gene Expression in Nectarine Floral Buds during Dormancy

WANG Hui\*, LI Ling\*, TAN Yue, LI Dong-Mei, TAN Qiu-Ping, CHEN Xiu-De, GAO Dong-Sheng\*\*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

**Abstract:** To determine relationships among carbohydrate, low temperature and dormancy, the carbohydrate content, the seasonal expression of sugar metabolism related genes and transcript expression of related genes under low temperature were examined using floral buds of ten-year-old field-grown and three-year-old potted ‘Shuguang’ nectarine (*Prunus persica* var. *nectariana* cv. ‘Shuguang’), respectively. The results indicated that soluble sugar (mainly sucrose) contents in floral buds increased gradually during dormancy; while starch content showed an inverse decreasing pattern. The transcripts of genes involved in sugar metabolism were differentially regulated. The expression of *HisH3* (*histone H3*) and *HK1* (*hexokinase 1*) was distinctly up-regulated before endo-dormancy, while *SuSy* (*sucrose synthase*) displayed a contrary expression pattern. The expression of *AGPase* (*adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase*) showed no significant change and the expression of *UGPase* (*uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase*) was increased during dormancy. The results demonstrate that HK1-dependent sugar signaling pathway may play an important role after entering endo-dormancy. The expression of cell division related gene *HisH3* increased dramatically and then decreased after low temperature treatment, indicating that inhibition of growth during endo-dormancy was not a consequence of reduced cell division availability. *UGPase* has an adaptability to low temperature to some extent for it shows a parallel trend between endo-dormant period and low temperature treatment.

**Key words:** dormancy; carbohydrate; low temperature; gene expression; nectarine floral buds

休眠是一种复杂的生命现象, 伴随着生长停止、叶片衰老及对秋冬低温的适应。休眠性状的表达是一系列基因表达的综合体现, 涉及到一系列复杂的生理生化反应和信号转导过程。碳水化合物是休眠期间生命活动的主要能量来源(Sherison等2003), 其中蔗糖和葡萄糖作为主要的可溶性碳水化合物, 在植物的信号转导中起着重要作用。桃芽中淀粉和可溶性糖质量分数变化趋势与

其内休眠进程密切相关(王海波等2009)。高东升等(1999)研究发现, 低温条件下淀粉的降解和可溶性糖的增加标志着内休眠的结束。Gonzalez-Rossia

收稿 2011-03-02 修定 2011-05-11

资助 国家“863”项目(2005AA247041)和国家“十一五”重点工程科技支撑项目(2006BAD07B06)。

\* 同等贡献作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: dsgao@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8249659)。

等(2008)研究认为山梨醇、果糖和葡萄糖是桃树皮中主要的糖类,蔗糖和棉子糖则含量较低,但随着低温对休眠的诱导,山梨醇和淀粉含量下降,葡萄糖和果糖含量升高。在休眠期间,桃树花芽及芽下方组织有明显的蔗糖吸收活动,而且这种吸收活动比非休眠组织活跃(Gevaudant等2001)。

关于桃树休眠期间碳水化合物代谢,生理水平的研究较多,而分子水平的研究报道不多。为了进一步揭示在转录水平上碳水化合物代谢、低温与休眠的关系,我们探讨了桃树花芽休眠期间糖代谢相关基因及低温条件下休眠相关基因的差异表达,从分子水平为休眠机制的研究提供理论依据。

## 材料与方 法

### 1 材 料

实验于2009年9月~2010年3月在山东农业大学进行。实验材料为群星园艺场十年生‘曙光’油桃(*Prunus persica* var. *nectariana* cv. ‘Shuguang’),生长势一致,试验期间正常管理。采集树冠外围生长一致且健壮的一年生枝条上的花芽,液氮冷冻,−80 °C冷藏,用于测定桃树体内碳水化合物含量及其相关基因的变化。在2009年10月6日,挑选3盆三年生盆栽‘曙光’油桃放入人工气候室,进行低温实验。人工气候室条件为:温度4 °C;昼/夜为16 h/8 h,光照强度约350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;处理时间15 d。分别采集0、1、2、4、7、15 d的油桃花芽,液氮冷冻后放入−80 °C冷藏。

休眠期的确定参照王孝娣(2008)的方法。从9月8日起大约每7 d采集10条树冠外围生长健壮一致的新梢,去掉叶和新梢上部5 cm顶芽,在光照培养箱内采用清水培养法确定休眠状态。此条件下

培养约8周后,桃芽无萌芽现象,确定进入内休眠期。

### 2 方 法

#### 2.1 RNA提取、鉴定及纯化

用改良CTAB法进行(Gambino等2008)。RNA提取用到的所有玻璃仪器(包括研钵)清洗干净后在200 °C下烘6~8 h,塑料制品用0.1%的焦碳酸二乙酯(DEPC)于37 °C过夜浸泡后高压灭菌。液体试剂配好后加入0.1%的DEPC高压灭菌(Tris-HCl用DEPC处理且灭菌的ddH<sub>2</sub>O配制)。最后去除基因组DNA,参照TaKaRa DNase I (RNase free)使用说明书。

#### 2.2 荧光定量PCR分析

cDNA合成参照TaKaRa Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H)使用说明书进行。从NCBI上查得各基因的数据信息如下:己糖激酶1(hexokinase 1, HK1)基因从桃(AF367451)获得,蔗糖合酶(sucrose synthase, SuSy)基因从桃(AF367450)获得,腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, AGPase)基因从桃(DY641336)获得,尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase, UGPase)基因从梨(AB069659)和大豆(BT093526)等作物获得,组氨酸H3(histone H3, HisH3)基因从豌豆(AJ002555)和番茄(EF661028)等作物获得。按照标准qPCR引物设计原则设计‘曙光’油桃碳水化合物代谢关键酶基因的qPCR引物(表1),其中内参基因Actin的正向引物为:5'-GTTATTCTTCATCGGCGTCTTCG-3',反向引物为5'-CTTCACCATTCAGTTCCATTGTC-3'。反应在Bio-Rad IQ™ 5 Optical Module荧光定量PCR仪上进行,反应体系配制参照TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect

表1 ‘曙光’油桃碳水化合物代谢关键酶基因表达的qPCR引物及序列

Table 1 The primers and their sequences used for the qPCR analysis of the relative gene expression involved in carbohydrate metabolic pathway in ‘Shuguang’ nectarine

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	退火温度/°C	循环数
AGPase	TCTGTATGATGGCTACTGGGAAGA	GGGTGTAGATTGGGGAGGAAC	60	40
HK1	CTTGATATGCGTGTGTCTGCTCT	ACAACATCCCCATTGACATACCT	58	40
HisH3	AGGAGTCAAGAAGCCCCACA	TGGGCAATTCACGAACAAG	57	40
SuSy	TTTCTCCCCACGGCTATTTT	TAAGCATCTCAGTCTCCAAGCAC	59	40
UGPase	GTTCCATCCCTAAAGAATAGCGGC	CAGCACCAAGTTGTCCGAGTTAGC	63	40

Real Time)使用说明书。

### 2.3 碳水化合物含量的测定

可溶性糖和淀粉的测定参照赵世杰等(2002)的方法进行。

单糖的测定参考Gesch等(2002)的方法。取4 g样品,液氮研磨后加入50 mL离心管,离心管内加入15 mL 85%的乙醇;75 °C水浴30 min,2 600×g离心,吸取上清液,加入85%的乙醇,75 °C水浴30 min(重复3次);用85%的乙醇过滤,定容至50 mL;吸取10 mL至50 mL离心管,于75 °C下彻底烘干后加2 mL超纯水;用0.45 μm微孔滤膜过滤至1.5 mL离心管内,用高效液相色谱法(HPLC)测定蔗糖、葡萄糖、果糖的含量。数据分析用SPSS 16.0 ANOVA分析系统中的Duncan's multiple range test (DMRT) ( $\alpha=0.05$ )处理。

## 结果与讨论

### 1 RNA纯度和完整性的检测

改良CTAB法提取的RNA经核酸紫外分光光度计检测,  $A_{260}/A_{280}$ 在2.0~2.1之间,产率较高,琼脂糖凝胶电泳结果显示18S和28S条带清晰,无明显降解(图1),可以满足后续实验的要求。

### 2 油桃芽体休眠时间的确定

自然条件下生长的桃树,由于日照长度变短

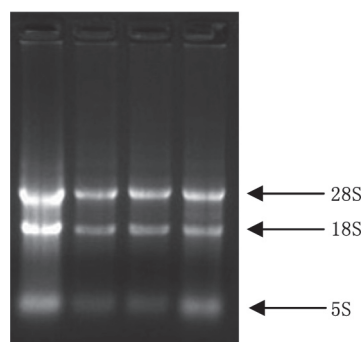


图1 ‘曙光’油桃花芽总RNA的1%琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel (1%) electrophoresis of total RNA in ‘Shuguang’ nectarine floral buds

和温度降低,新梢生长速度逐渐降低并最终停止生长。9月8日采集的芽体发芽时间为11.5 d,表明油桃芽体开始进入休眠诱导期。随着环境的变化,休眠程度进一步加深,11月3日时采集的芽体不再萌发,认为芽体已进入内休眠。

### 3 碳水化合物含量的变化

植物体内贮藏物质的流动是植物的一般特征,芽内的贮藏物质一般是碳水化合物(Ley等1997)。在整个休眠期间,可溶性总糖的变化趋势与淀粉相反(表2),前者在休眠诱导后期及内休眠前期有一个低点,进入内休眠后及在生态休眠期含量持续升高,后者总体呈下降趋势,这主要与可溶性糖

表2 ‘曙光’油桃花芽碳水化合物含量的变化

Table 2 Changes in carbohydrate contents in ‘Shuguang’ nectarine floral buds

日期(月-日)	淀粉	可溶性糖	蔗糖	葡萄糖	果糖
09-08	18.32±0.50*	11.32±0.27*	1.57±0.79*	2.41±0.05*	2.83±0.09*
09-15	19.27±0.37*	10.19±0.19*	0.78±0.01*	2.97±0.03*	3.78±0.03*
09-22	22.71±0.07*	10.99±0.15*	1.59±0.01*	1.72±0.01*	2.32±0.01*
09-29	21.85±0.29*	11.78±0.13*	1.70±0.01*	1.80±0.01*	1.99±0.01*
10-06	21.72±0.28*	15.04±0.09*	2.21±0.07*	1.92±0.00*	1.37±0.01*
10-13	19.65±0.34*	14.27±0.18*	2.78±0.01*	2.20±0.02*	1.02±0.03*
10-20	20.86±0.43*	14.27±0.16*	3.23±0.01*	2.35±0.02*	2.06±0.02*
10-27	21.28±0.12*	11.10±0.84*	3.04±0.01*	2.26±0.01*	2.05±0.03*
11-03	15.55±0.28*	9.99±0.22*	3.28±0.01*	2.51±0.03*	1.46±0.03*
11-10	21.03±0.13*	13.38±0.09*	5.02±0.04*	2.74±0.01*	1.75±0.03*
11-17	21.31±0.08*	13.13±0.09*	7.53±0.02*	2.89±0.01*	2.04±0.03*
11-28	20.05±0.23*	14.50±0.15*	8.91±0.01*	3.01±0.03*	2.57±0.02*
12-10	19.32±0.16*	15.13±0.80*	6.52±1.02*	1.89±0.02*	1.92±0.01*
12-24	18.55±0.23*	15.67±0.14*	4.66±0.00*	1.73±0.01*	1.66±0.03*
12-31	17.35±0.20*	17.04±0.11*	4.50±0.03*	1.70±0.02*	1.57±0.02*

表中取样时间为2009年,9月8日~10月27日为休眠诱导期,11月3~28日为内休眠期,12月10~31日为生态休眠期。\*表示同列数据在  $P<0.05$ 水平上差异显著。

可以提高低温下的渗透调节作用有关(Tabaei-Aghdaei等2003), 进而增强了植株抵御低温的能力。Horvath等(2002)认为, 可溶性糖(主要是蔗糖和葡萄糖)含量升高会抑制植株新梢的生长。表2显示, 蔗糖含量在休眠诱导后期及进入内休眠时期后明显升高, 在内休眠后期达到最高点, 葡萄糖变化较平稳, 果糖含量在休眠诱导期尤其是诱导前期较高, 进入内休眠期后稍有降低; 这与Panneerselvam等(2007)和Xu等(2006)的研究相似。

#### 4 与碳水化合物代谢有关的基因表达变化

在植物休眠过程中, 淀粉向可溶性糖类转化, 因此其相应的基因也表现出与之相适应的变化趋势(Anderson等2005)。图2列出了与碳水化合物代谢有关的几个主要基因的变化。*AGPase*是淀粉合成的关键基因, 在观测的整个过程中含量较稳定, 没有显著变化, 说明环境和糖信号的变化对其影响较小(图2-A)。*SuSy*是催化蔗糖向尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-Glc)和果糖转化的关键基因, *Geigen-*

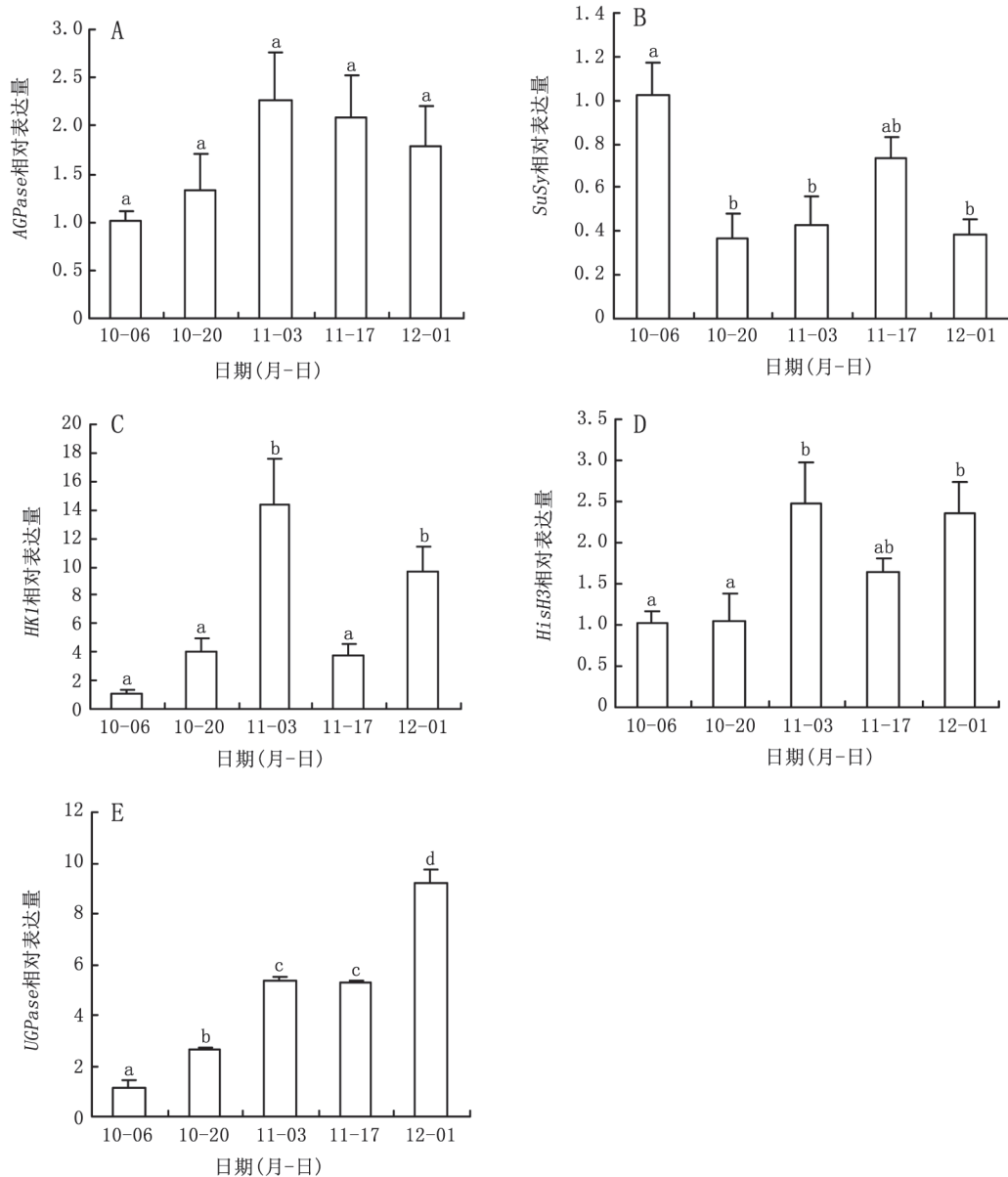


图2 ‘曙光’油桃花芽休眠期间与碳水化合物代谢有关的基因表达变化

Fig.2 Transcript expression of carbohydrate metabolism related genes in ‘Shuguang’ nectarine floral buds during dormant period. Different small letters represent significant differences at  $P < 0.05$  level. 10月6~20日是休眠诱导期, 11月3~17日是内休眠期, 12月1日以后是生态休眠期。

berger等(2004)研究表明*SuSy*在与糖或者其他信号转导途径有关的蛋白激酶或磷酸酶的作用下被活化。本文结果显示*SuSy*基因表达量总体表现为下调(图2-B), 说明在内休眠期植物体内以蔗糖为主要贮藏物质。

HK1是催化己糖磷酸化(如葡萄糖转化为6-磷酸葡萄糖)的关键酶。植物体内存在多种依赖HK或不依赖HK的糖信号转导途径(Smeekens 2000; Sheen等1999; Jang等1997), Sheen等(1999)认为HK具有双重功能, 即酶活性和作为糖信号转导途径中的感受器(依赖HK的信号传导途径)。图2-C显示, *HK1*基因表达量变化较大, 在整个休眠期间表现出上调趋势。11月3日的淀粉含量较低, 蔗糖含量开始升高, 此时HK的高活性主要表现为较高的酶活性; 在12月1日, 蔗糖和葡萄糖含量较高, 此时HK主要表现的是糖感受器活性(表2和图2-C)。进入内休眠时期及生态休眠期后, *HK1*的表达量上调, 可能是依赖HK1的信号转导途径起主要作用。

*HisH3*是细胞分裂周期S期的一个标志基因, Anderson等(2005)认为这是一个休眠相关基因, 在乳浆大戟植物中被广泛用来指示细胞的分裂进程, 它受糖类、环境刺激、植物激素等物质的影响(Horvath等2003)。休眠的解除是由于在G<sub>1</sub>-S期间起作用的*Histones*等基因的表达量上调引起的

(Freeman等2003; Horvath等2003), 而糖类尤其是蔗糖可以诱导细胞分裂周期蛋白的表达, 是细胞分裂时细胞周期过程中不可缺少的。*HisH3*在进入内休眠期及生态休眠期后基因表达量均表现为上调(图2-D), 11月3日进入内休眠期后上调幅度最大(为2.42倍), 说明此时植物体内与细胞分裂有关的转录水平并未降低, 进而证明休眠期内生长的停止并不是由于细胞分裂水平的下调引起的。另外, 经冷诱导后*HisH3*表达量变化明显(图3-A), 说明与蔗糖浓度的变化相比, *HisH3*对低温的变化更敏感。

UGPase可以催化UDP-Glc和1-磷酸葡萄糖(G1P)的相互转化。植物抗冻性的发展一直伴随着淀粉向蔗糖的转化, 并且低温可以促使淀粉的水解(Charrier和Ameglio 2011); Ciereszko等(2001)研究表明*UGPase*是一个冷诱导基因。由表2中蔗糖含量水平和图2-E中*UGPase*表达的变化趋势可知, 在进入内休眠和生态休眠期后, *UGPase*在催化G1P向UDP-Glc的转化中起着重要作用。*UGPase*表达量在进入内休眠期后稍下调(图2-E) (根据泰安市气象局的测定结果, 在11月份即桃树的内休眠期, 平均气温为3.8 °C), 与图3-B中低温处理后的表达相似, 说明*UGPase*基因对低温处理表现出了某种适应性。

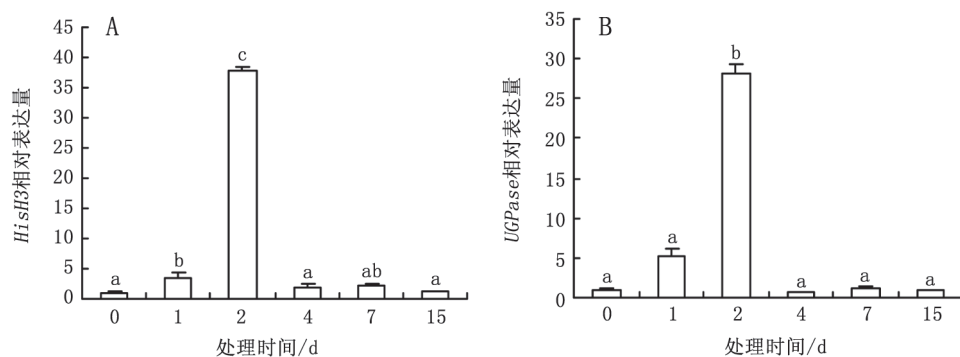


图3 ‘曙光’油桃花芽低温处理后*HisH3*和*UGPase*基因的表达变化

Fig.3 Changes in the expression of *HisH3* and *UGPase* genes in ‘Shuguang’ nectarine floral buds after low temperature treatment  
不同的小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。

### 参考文献

- 高东升, 夏宁, 王兴安(1999). 休眠桃树枝条中碳水化合物的含量变化和外界生长调节剂对破除休眠的效应. 植物生理学通讯, 35: 10~12
- 王海波, 王孝娣, 高东升, 王宝亮, 李疆, 刘凤之(2009). 不同需冷量桃品种芽休眠诱导期间的生理变化. 果树学报, 26: 445~449
- 王孝娣, 王海波, 高东升, 李疆, 杨荣光, 刘凤之, 聂继云(2008). 钙离子在‘春捷’桃芽自然休眠诱导、维持和解除中的作用. 植物生理学通讯, 44: 869~972

- 赵世杰, 史国安, 董新纯(2002). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科技出版社, 83~87
- Anderson JV, Gesch RW, Jia Y, Chao WS, Horvath DP (2005). Seasonal shifts in dormancy status, carbohydrate metabolism, and related gene expression in crown buds of leafy spurge. *Plant Cell Environ*, 28: 1567~1578
- Charrier G, Ameglio T (2011). The timing of leaf fall affects cold acclimation by interactions with air temperature through water and carbohydrate contents. *Environ Exp Bot*, doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.12.019
- Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA (2001). Sucrose and light regulation of a cold-induced UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem J*, 354: 67~72
- Freeman D, Riou-Khamlichi C, Oakenfull EA, Murray JAH (2003). Isolation, characterization and expression of cyclin and cyclin-dependent kinase genes in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *J Exp Bot*, 54: 303~308
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal*, 19: 520~525
- Geigenberger P, Stitt M, Fernie AR (2004). Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant Cell Environ*, 27: 655~673
- Gesch RW, Vu JCV, Boote KJ, Allen LH Jr, Bowes G (2002). Sucrose-phosphate synthase activity in mature rice leaves following changes in growth CO<sub>2</sub> is unrelated to sucrose pool size. *New Phytologist*, 154: 77~84
- Gevaudant F, Petel G, Guilliot A (2001). Differential expression of four members of the H<sup>+</sup>-ATPase gene family during dormancy of vegetative buds of peach trees. *Planta*, 212: 619~626
- Gonzalez-Rossia D, Reig C, Dovic V, Gariglio N, Agusti M (2008). Changes on carbohydrates and nitrogen content in the bark tissues induced by artificial chilling and its relationship with dormancy bud break in *Prunus* sp. *Sci Hort*, 118: 275~281
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME (2003). Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci*, 8: 534~540
- Horvath DP, Chao WS, Anderson JV (2002). Molecular analysis of signals controlling dormancy and growth in underground adventitious buds of leafy spurge. *Plant Physiol*, 128: 1439~1446
- Jang J-C, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, 9: 5~19
- Ley S, Dolger K, Appenroth KJ (1997). Carbohydrate metabolism as a possible physiological modulator of dormancy in turions of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden. *Plant Sci*, 129: 1~7
- Panneerselvam R, Jaleel CA, Somasundaram R, Sridharan R, Gomathinayagam M (2007). Carbohydrate metabolism in *Dioscorea esculenta* (Lour.) Burk. tubers and *Curcuma longa* L. rhizomes during two phases of dormancy. *Colloid Surface B*, 59: 59~66
- Sheen J, Zhou L, Jang J-C (1999). Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol*, 2: 410~418
- Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM (2003). Roles of cell wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 54: 525~531
- Smeekens S (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 49~81
- Tabaei-Aghdaei SR, Pearce RS, Harrison P (2003). Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. *J Exp Bot*, 54: 1565~1575
- Xu R-Y, Niimi Y, Han D-S (2006). Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy-release in bulbs of *Lilium rubellum*. *Sci Hort*, 111: 68~72