

兰州百合鳞茎可溶性酸性转化酶活性检测体系的建立

孙红梅*, 何 玲, 王微微, 王春夏, 李天来

(沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳 110866)

摘 要: 为深入研究百合鳞茎蔗糖代谢生理机制, 以兰州百合 (*Lilium davidii* var. *unicolor*) 鳞茎外层鳞片为试材, 研究了不同种类和 pH 值的缓冲液、反应时间和反应温度对可溶性酸性转化酶 (Soluble acid invertase, SAI, EC 3.2.1.26) 活性的影响, 建立了 SAI 活性的最佳检测体系。结果表明, 最适提取缓冲液为 pH 8.0 的 HEPES-NaOH; 最佳反应缓冲液为 pH 4.8 的 HAc-K₃PO₄, 最适反应温度为 40 °C, 最适反应时间为 30 min。

关键词: 百合; 鳞茎; 可溶性酸性转化酶; 提取条件; 反应条件

中图分类号: S 682.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2011) 06-1197-08

Establishment of Detection System for Soluble Acid Invertase Activity in *Lilium davidii* var. *unicolor* Bulb

SUN Hong-mei*, HE Ling, WANG Wei-wei, WANG Chun-xia, and LI Tian-lai

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Horticulture Key Laboratory of Ministry of Education, Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to make a thorough study in sucrose-metabolizing mechanism of lily bulb, the exterior scales of *Lilium davidii* var. *unicolor* bulb were used in present study to explore the effects of buffers with different sorts and pH values, reaction durations and reaction temperatures on SAI activity. Then SAI activity detection system was established. The results indicated that the optimal extraction and reaction buffers were HEPES-NaOH (pH 8.0) and HAc-K₃PO₄ (pH 4.8), respectively. And SAI has an optimum reaction duration and temperature of 30 min and 40 °C.

Key words: lily; bulb; soluble acid invertase; extraction condition; reaction condition

可溶性酸性转化酶 (Soluble acid invertase, SAI, EC 3.2.1.26) 是蔗糖代谢的关键酶, 存在于植物细胞的液泡中, 催化蔗糖水解成还原糖, 在高等植物蔗糖积累与分配过程中起着重要调控作用 (刘慧英和朱祝军, 2002; 史国安 等, 2009)。在百合鳞茎中, 蔗糖不仅是可以直接利用的可溶性糖的主要形式, 而且是鳞茎内部碳水化合物长距离运输的主要形态 (孙红梅 等, 2005; 郑慧俊 等, 2006), 系统研究蔗糖代谢对于明确百合鳞茎的发育机理、生产优质种球具有重要意义。因此, 建立百合鳞茎中 SAI 检测体系, 不仅是研究鳞茎中蔗糖代谢的基础, 也是系统研究鳞茎发育机理的关键。

收稿日期: 2010-12-21; 修回日期: 2011-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972023); 中国博士后科学基金项目 (20090451280); 辽宁省重点实验室项目 (LS2010148)

* E-mail: hmbh@sina.com

早在 1913 年, Michaelis 和 Mentens 就对植物转化酶进行了研究 (潘秋红, 2003)。目前 SAI 已经在多种植物如苹果 (Pan et al., 2005)、番茄 (Konno et al., 1993; Ohyama et al., 1994)、竹 (Liu et al., 2006)、柿 (Iwatsubo et al., 1992)、烟草 (武忠亮, 2007)、甘薯 (唐云明 等, 1996)、大豆 (张振清和夏叔芳, 1984)、甘蔗 (Altaf et al., 2008)、薄荷 (郭小路 等, 2008)、一串红 (杜泓璇, 2009)、接骨草 (褚波 等, 2005)、柑 (唐云明, 1995) 和梨 (Hashizume et al., 2003) 中被分离纯化, 关于该酶的生化特性、基因结构与功能 (Elliott et al., 1993; Xu et al., 1995; Tymowska & Kreis, 1998a) 以及表达与调控 (Roitsch et al., 1995; Ehness & Roitsch, 1997; Tymowska & Kreis, 1998b) 等方面的研究均取得了重要进展。然而, 目前关于百合鳞茎 SAI 的研究尚少, Shin 等 (2002) 参照其他植物中 SAI 的活性测定方法对低温处理过程中东方百合和亚洲百合试管鳞茎的 SAI 活性进行了测定; Legnani 等 (2010) 参照其研究小组 1998 年对麝香百合花器官中 SAI 的研究方法, 对缺氧及低氧条件下贮藏的亚洲百合种球 SAI 活性进行了测定。但针对百合鳞茎的高效稳定的 SAI 活性检测体系尚未建立, 并且百合鳞茎富含多糖和酚类物质, 上述物质对 SAI 的提取和活性检测有较大干扰。影响 SAI 活性检测的因素主要有缓冲液种类及 pH 值、反应温度和反应时间。由于不同作物 SAI 检测方法中上述因素的水平各不相同, 本试验中在前人所用的 SAI 测定条件基础上 (Shin et al., 2002; 潘秋红, 2003; 成善汉 等, 2004; Ordóñez et al., 2005; 邱文伟, 2005; Xiong et al., 2008; 苑智华 等, 2008; 周生茂, 2009; Legnani et al., 2010), 以兰州百合鳞茎外层鳞片为试材, 研究了 SAI 的提取和测定条件, 建立了 SAI 活性检测体系, 旨在为深入研究百合鳞茎蔗糖代谢生理机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2009 年 4—10 月在沈阳农业大学园艺科研基地进行。选取兰州百合 (*Lilium davidii* var. *unicolor*) 质量为 (23 ± 1) g, 无病虫害和其它损伤的独头鳞茎种植, 将花蕾在透色即将开放时摘除, 常规栽培管理。分别在栽种期 (A)、出苗期 (B)、展叶期 (C)、现蕾期 (D)、开花期 (E)、花后 20 d (F)、花后 40 d (G)、植株半枯期 (H) 和植株枯萎期 (I) 取样。每次取鳞茎 5 个, 由外至内 1~2 层的鳞片作为外部鳞片, 混合取样, 迅速液氮冷冻, 于 -80 °C 保存备用。

1.2 不同取样时期供试材料的筛选

母鳞茎作为百合萌发阶段的代谢源, 其外部鳞片是代谢更为活跃的部位 (孙红梅 等, 2005)。因此, 分别取各时期的外部鳞片各 1 g, 各加入 0.3 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 5 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 在冰浴条件下迅速研磨, 4 层纱布过滤, 4 °C 下 $12\,000$ r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液转入透析袋, 用稀释 10 倍的提取缓冲液 (不含 PVP) 透析 20 h ($0 \sim 4$ °C), 即得粗酶液。

SAI 活性测定参照姜晶等 (2007) 的方法, 以提前杀死酶活的酶液为对照。

1.3 提取缓冲液的选择

配制 pH 值为 7.0、7.2、7.5、7.8 和 8.0 的 Tris-HCl、Hepes-NaOH 缓冲液以及 pH 值为 4.5、4.8、5.0、5.2 和 5.5 的 HAc-NaAc 缓冲液, 进行 SAI 粗酶液提取。

1.4 测定条件的选择

根据 L_{16} (4^4) 正交表, 对不同反应缓冲液、pH 值、反应时间和反应温度进行 4 因素 4 水平的试验设计 (表 1)。

1.5 测定条件的优化

根据试验结果分别对反应 pH 值、反应温度进一步优化，将反应 pH 值设置为 4.0、4.2、4.5、4.8 和 5.2，5 个水平；反应温度设定为 37 °C、40 °C、45 °C 和 50 °C 4 个水平，进行完全试验（表 4）。采用统计软件 SPSS16.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 试验材料的选择

由图 1 可知，栽种期的外层鳞片的 SAI 活性最高，故选此时期的外层鳞片为本研究的试材。

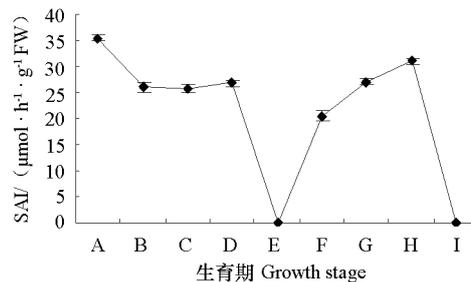


图 1 兰州百合鳞茎发育过程中外部鳞片 SAI 活性变化

A. 栽种期; B. 出苗期; C. 展叶期; D. 现蕾期; E. 开花期; F. 花后 20 d; G. 花后 40 d; H. 植株半枯期; I. 植株枯萎期。

Fig. 1 Changes of SAI activity in exterior scales of *Lilium davidii* var. *unicolor* bulb during bulb development

A. Planting stage; B. Plantlet stage; C. Leaf unfolding stage; D. Visible bud stage; E. Anthesis stage; F. 20 d after anthesis; G. 40 d after anthesis; H. Half withered; I. Withered stage.

2.2 不同提取缓冲液对 SAI 活性影响

由图 2 可知，提取缓冲液 Hepes-NaOH pH 8.0 提取的 SAI 活性最高，与缓冲液 Tris-HCl pH 7.2、Tris-HCl pH 8.0、NaAc-HAc pH 4.5、NaAc-HAc pH 5.5 提取的 SAI 活性之间无显著差异，但显著高于其它缓冲液，故确定 pH 8.0 的 Hepes-NaOH 作为 SAI 的提取缓冲液。

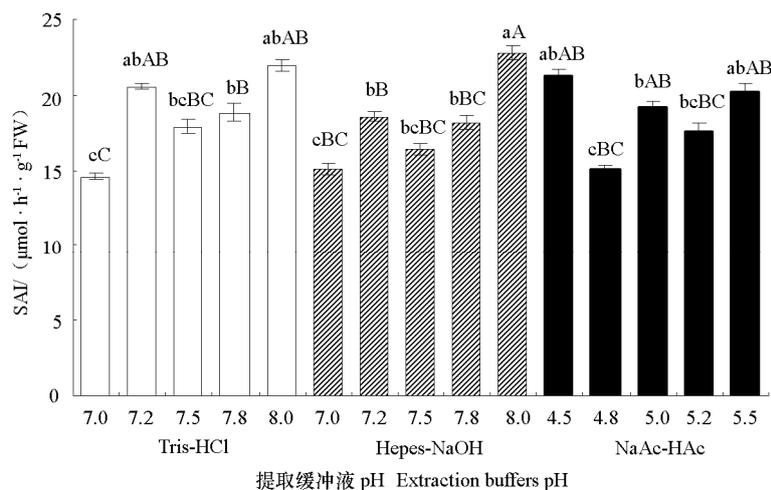


图 2 提取缓冲液对 SAI 活性影响

大、小写字母分别表示 0.01 ($P < 0.01$) 和 0.05 ($P < 0.05$) 水平的差异显著性。下同。

Fig. 2 Effects of different extraction buffers on SAI activities

The capitals and lowercases mean significant difference at 0.01 and 0.05 level, respectively. The same below.

2.3 不同反应条件对 SAI 活性的影响

方差分析结果表明, 各因素对 SAI 活性影响主次顺序为: 反应温度 > 反应时间 > 反应缓冲液 > 反应 pH 值, 其中反应缓冲液、反应时间及温度对 SAI 活性的影响达到极显著水平, 反应 pH 值对 SAI 活性影响达到显著水平。

各因素显著性测验结果表明 (表 2), 以 HAc-K₃PO₄、Mes-NaOH 及 CA-KH₂PO₄ 为缓冲液所测得的 SAI 活性无显著性差异, 但极显著高于 HAc-NaAc 缓冲液, 其中当缓冲液为 HAc-K₃PO₄ 时, SAI 有最高酶活性, 故确定反应缓冲液为 HAc-K₃PO₄。在 pH 4.5、pH 4.8 下测得的酶活性无显著性差异, 其中 pH 4.5 时酶活性较高且均显著高于 pH 5.2、pH 5.5 的酶活性, 因此本试验进一步设置了较低的 pH 值, 以期挑选出最佳的反应 pH 值。在 40 °C 下测得的酶活性极显著高于 25、30 和 35 °C 下的酶活性, 40 °C 是所设温度的上限, 为挑选出更优的反应温度, 进行了较高温度的选择试验。反应 30 min 的 SAI 活性极显著高于其它反应时间的酶活性, 故选择 30 min 作为最佳反应时间。

在多因素正交试验中, 由于发生了主效和互作的混杂, 故必须对各处理组合进行显著性测验, 结果表明 (表 1), 组合 11 (HAc-K₃PO₄、pH 5.2、30 min、40 °C) 测得的 SAI 活性极显著高于其他组合, 此时反应 pH 值为 5.2, 因此, 需对 SAI 的反应 pH 值进一步优化。

表 1 不同反应条件对 SAI 活性的影响

Table 1 Effects of reaction conditions on SAI activity

处理编号 Treatment No.	反应缓冲液 Reaction buffer	pH	反应时间/min Reaction duration	反应温度/°C Temperature	酶活性/($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$) SAI activity
1	HAc-NaAc	4.5	30	25	24.99 gF
2	HAc-NaAc	4.8	40	30	20.60 hG
3	HAc-NaAc	5.2	50	35	17.23 iG
4	HAc-NaAc	5.5	60	40	23.55 gFG
5	Mes-NaOH	4.5	40	40	41.03 cC
6	Mes-NaOH	4.8	30	35	45.99 bB
7	Mes-NaOH	5.2	60	30	14.36 jH
8	Mes-NaOH	5.5	50	25	14.99 jH
9	HAc-K ₃ PO ₄	4.5	50	30	16.11 jH
10	HAc-K ₃ PO ₄	4.8	60	25	14.36 jH
11	HAc-K ₃ PO ₄	5.2	30	40	50.35 aA
12	HAc-K ₃ PO ₄	5.5	40	35	37.77 dC
13	CA-KH ₂ PO ₄	4.5	60	35	31.72 eDE
14	CA-KH ₂ PO ₄	4.8	50	40	32.83 eD
15	CA-KH ₂ PO ₄	5.2	40	25	18.74 hiG
16	CA-KH ₂ PO ₄	5.5	30	30	28.72 fE

表 2 反应条件各因素显著性测验

Table 2 Significance test of reaction condition factors

因素 Factor	水平 Level	酶活性/($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$) SAI activity	因素 Factor	水平 Level	酶活性/($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$) SAI activity
缓冲液 Buffer	HAc-K ₃ PO ₄	29.65 aA	温度/°C Temperature	25	19.95 cC
	Mes-NaOH	29.09 aA		30	18.27 cC
	CA-KH ₂ PO ₄	28.00 aA		35	33.18 bB
	HAc-NaAc	21.59 bB		40	36.94 aA
pH	4.5	28.46 a	时间/min Duration	30	37.51 aA
	4.8	28.44 a		40	29.53 bB
	5.2	25.17 b		50	20.29 cC
	5.5	26.26 b		60	21.00 cC

2.4 反应条件的优化

由表 3 可知, 在各反应温度下测得的 SAI 活性之间无显著性差异, 但以 40 °C 下的酶活性最高, 故选择 40 °C 作为最适反应温度; 当反应 pH 值为 4.0 和 4.2 时, 在不同温度下测得的酶活性均为 0, pH 4.5 和 pH 4.8 测得的 SAI 活性无显著性差异, 但均极显著高于 pH 5.2 的酶活性, 其中以 pH 4.8 的酶活性最高, 故为最佳反应 pH 值。

对各处理所测得的 SAI 活性进行显著性分析 (表 4), 组合 1、组合 2、组合 4、组合 5、组合 7、组合 10、组合 11 所测得的 SAI 活性之间无显著性差异, 其中组合 5 (40 °C、pH 4.8) 所测得 SAI 活性最高, 与其他组合差异显著, 这与显著性测验所得的结果一致。

表 3 反应温度和 pH 值对 SAI 活性影响的显著性测验

Table 3 Significance test of different temperature and pH value on SAI activity

温度/°C Temperature	酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$) SAI activity	pH	酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$) SAI activity
37	19.28 a	4.5	21.25 aA
40	21.53 a	4.8	21.53 aA
45	19.32 a	5.2	19.94 bB
50	19.68 a		

表 4 反应温度和 pH 值对 SAI 活性的影响

Table 4 Effects of different temperature and pH value on SAI activity

处理编号 Treatment No.	温度/°C Temperature	pH	酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$) SAI activity
1	37	4.5	20.02 abAB
2	37	4.8	21.32 abAB
3	37	5.2	16.51 bB
4	40	4.5	21.67 abAB
5	40	4.8	24.06 aA
6	40	5.2	18.33 bAB
7	45	4.5	22.61 abAB
8	45	4.8	19.58 bAB
9	45	5.2	15.78 bB
10	50	4.5	20.71 abAB
11	50	4.8	21.19 abAB
12	50	5.2	17.15 bB

3 讨论

目前对于 SAI 的提取缓冲液, 大多数研究者 (Shin et al., 2002; 潘秋红, 2003; 成善汉 等, 2004; 邱文伟, 2005; 苑智华 等, 2008; 周生茂, 2009) 选用的是 HEPES-NaOH、Tris-HCl 缓冲液, 且 pH 值均在 7.0~8.0 之间, Ordóñez 等 (2005) 和 Xiong 等 (2008) 选用了 HAc-NaAc 缓冲液, 其 pH 值在 SAI 最适反应范围 (pH 3.8~5.5) 内。本研究中对 3 种提取缓冲液 HEPES-NaOH (pH 7.0~8.0)、Tris-HCl (pH 7.0~8.0)、HAc-NaAc (pH 4.5~5.5) 进行试验比较, 最终确定 pH 8.0 的 HEPES-NaOH 为百合鳞茎 SAI 的最适提取缓冲液, 说明百合鳞茎的 SAI 活性在中性偏碱的环境里比较稳定。

本试验中所确定的 SAI 最适反应缓冲液为 HAc-K₃PO₄, 最适反应时间为 30 min。研究发现随着反应时间的延长, 酶活性呈急剧下降的趋势, 可能由于时间延长, 反应底物消耗殆尽, 生成的产物不再增加, 从而使单位时间内计算的生成产物量减少。

SAI 最适 pH 值范围在 3.8~5.5 之间, 大多数植物的 SAI 最适 pH 值为 4.5~5.0 (Liu et al., 2005;

Altaf et al., 2008; 郭小路 等, 2008; 杜泓璇, 2009; 高旭 等, 2010)。本研究表明, 百合鳞茎中 SAI 的最适反应 pH 值为 4.8, 介于大多数植物的最适 pH 值范围内, 但远低于甜菜块根的 pH 5.5 (曾宪彬 等, 1993)。当反应 pH 值为 4.0 和 4.2 时, 测得百合鳞茎 SAI 活性为 0。武忠亮 (2007) 对烟草叶片中 SAI 进行研究, 认为 pH 4.0 为其最适反应 pH 值, 褚波等 (2005) 认为接骨草叶中 SAI 同工酶 III 在 pH 3.9 ~ 4.2 活性最大, 说明不同作物的 SAI 对 pH 的敏感度不同, 反应缓冲液 pH < 4.5 使百合鳞茎中 SAI 迅速失活。

百合鳞茎中 SAI 最适反应温度为 40 °C, 与高旭等 (2010) 对苹果、梨和桃果实研究的结果相同, 高于甜菜块根的 SAI 最适温度 35 °C (曾宪彬 等, 1993), 但低于大多数植物的 SAI 最适温度, 如大豆叶片 60 °C (张振清 等, 1984)、接骨草叶片 48 ~ 52 °C/50 ~ 55 °C (褚波 等, 2005)、烟草叶片 45 °C (武忠亮, 2007)、甘蔗茎 55 °C (Altaf et al., 2008)、薄荷叶 55 °C (郭小路 等, 2008)、一串红叶 55 ~ 60 °C (杜泓璇, 2009) 等。说明不同植物 SAI 对温度的敏感度存在一定的差异。本研究中兰州百合鳞茎 SAI 的最适反应温度远高于 Shin 等 (2002)、Legnani 等 (2010) 分别测定亚洲百合、东方百合以及麝香百合鳞茎中 SAI 所用的 25 °C 和 30 °C, 其中 Shin 的测定方法参照了其他植物, 而 Legnani 则参照了麝香百合花器官 SAI 的测定方法。由于百合花器官和地下变态器官的糖类物质含量以及成分差别甚远, 且不同百合品系之间也存在较大差别, 因此建立百合及不同品系百合鳞茎 SAI 活性检测体系十分重要。

本试验中初步建立了百合鳞茎 SAI 检测体系: 取鳞片 1 g, 加入 0.3 g PVP, 5 mL pH 8.0 HEPES-NaOH 缓冲液, 在冰浴条件下迅速研磨, 4 层纱布过滤, 4 °C 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液, 转入透析袋, 用稀释 10 倍的提取缓冲液 (不含 PVP) 透析 20 h (0 ~ 4 °C), 即得粗酶液。于 25 mL 试管中加入 0.6 mL 0.1 mol · L⁻¹ HAc-K₃PO₄ 缓冲液 (pH 4.8) 和 0.2 mL 0.1 mol · L⁻¹ 蔗糖, 再加入 0.2 mL 粗酶液, 40 °C 条件下反应 30 min, 用 3,5 - 二硝基水杨酸法测定生成的还原糖含量, 以提前杀死酶活的酶液为对照, 酶的活性单位用 μmol · h⁻¹ · g⁻¹FW 表示。

SAI 作为蔗糖代谢中的关键酶, 其活性受多种因素的影响, 除以上条件外, 金属离子、鳞茎本身的发育状况、各种矿质元素的含量等, 直接或间接对 SAI 活性造成影响, 要充分了解百合鳞茎中 SAI 性质, 还需进一步对其酶学性质进行研究。

References

- Altaf H, Muhammad H R, Raheela P, Muhammad A. 2008. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (3): 188 - 194.
- Cheng Shan-han, Su Zhen-hong, Xie Cong-hua, Liu Jun. 2004. Effects of variation in activities of starch-sugar metabolic enzymes on reducing sugar accumulation and processing quality of potato tubers. *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (12): 1904 - 1910. (in Chinese)
- 成善汉, 苏振洪, 谢从华, 柳俊. 2004. 淀粉—糖代谢酶活性变化对马铃薯块茎还原糖积累及加工品质的影响. *中国农业科学*, 37 (12): 1904 - 1910.
- Chu Bo, Wu Zhong-liang, Tang Yun-ming. 2005. Isolation, purification and some properties of the isozymes of invertase in *Sambucus chinensis* Lindl. *Journal of Southwest China Normal University: Natural Science*, 30 (6): 1116 - 1121. (in Chinese)
- 褚波, 武忠亮, 唐云明. 2005. 接骨草蔗糖酶同工酶的分离纯化及其部分性质研究. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 30 (6): 1116 - 1121.
- Du Hong-xuan. 2009. Purification, some properties and modification of groups and immobilization of the sucrase from *Salvia splendens* Ker-Gawl leaves [M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 杜泓璇. 2009. 一串红蔗糖酶的分离纯化、部分性质与功能基团研究和固定化条件优化 [硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Ehness R, Roitsch T. 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *The Plant Journal*, 11 (3): 539 - 548.
- Elliott K J, Butler W O, Dickinson C D, Konno Y, Vedvick T S, Fitzmaurice L, Mirkov E. 1993. Isolation and characterization of fruit vacuolar

- invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 21: 3, 515 - 524.
- Gao Xu, Wang Yong-zhang, Li Pei-huan, Liu Cheng-lian, Yuan Yong-bing. 2010. Effects of temperature, pH and metal ions on invertase activities in different fruits. *Tianjin Agricultural Sciences*, 16 (3): 16 - 19. (in Chinese)
- 高旭, 王永章, 李培环, 刘成连, 原永兵. 2010. 温度、pH 和金属离子对不同果实转化酶活性的影响. *天津农业科学*, 16 (3): 16 - 19.
- Guo Xiao-lu, Zhang Wan-qiu, Que Rui-qi, Qiu Hui, Tang Yun-ming. 2008. Isolation and purification of invertase from *Mentha haplocalyx* Briq and some its properties. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 30 (2): 90 - 94. (in Chinese)
- 郭小路, 张万秋, 阙瑞琦, 邱慧, 唐云明. 2008. 薄荷幼叶蔗糖酶的分离纯化与部分性质. *西南大学学报: 自然科学版*, 30 (2): 90 - 94.
- Hashizume H, Tanase K, Shiratake K, Mori H, Yamaki S. 2003. Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit. *Phytochemistry*, 63 (2): 125 - 129.
- Iwatsubo T, Takahashi T, Nakagawa H, Ogura N, Sato T. 1992. Purification and some properties of acid invertase of persimmon fruits. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (Japan)*, 56 (12): 1959 - 1961.
- Jiang Jing, Li Tian-lai, Lu Shao-wei, Guo Jin-mei. 2007. Effects of acetylic salicylic acid on the activities of sucrose metabolism related enzymes during fruit development of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Physiology Communications*, 43 (4): 649 - 652. (in Chinese)
- 姜晶, 李天来, 鲁少尉, 郭金妹. 2007. 乙酰水杨酸在番茄果实发育期间对蔗糖代谢相关酶活性的影响. *植物生理学通讯*, 43 (4): 649 - 652.
- Konno Y, Vedvick T, Fitzmaurice L, Mirkov T E. 1993. Purification, characterization, and subcellular localization of soluble invertase from tomato fruit. *Journal of Plant Physiology*, 141 (4): 385 - 392.
- Legnani G, Watkins C B, Miller W B. 2010. Effects of hypoxic and anoxic controlled atmospheres on carbohydrates, organic acids, and fermentation products in Asiatic hybrid lily bulbs. *Postharvest Biology and Technology*, 56: 85 - 94.
- Liu C C, Huang L C, Chang C T, Sung H Y. 2006. Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. *Food Chemistry*, 96 (4): 621 - 631.
- Liu Hui-ying, Zhu Zhu-jun. 2002. Advances on the studies of invertase on sucrose metabolism in higher plant. *Chinese Bulletin of Botany*, 19 (6): 666 - 674. (in Chinese)
- 刘慧英, 朱祝军. 2002. 转化酶在高等植物蔗糖代谢中的作用研究进展. *植物学通报*, 19 (6): 666 - 674.
- Ohyama A, Hirai M, Nishimura S. 1994. Purification and biochemical characterization of acid invertase in tomato fruit. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. Series A: Vegetables and Ornamental Plants*, 9: 61 - 67.
- Ordóñez R M, Vattuone M A, Isla M I. 2005. Changes in carbohydrate content and related enzyme activity during *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. fruit maturation. *Postharvest Biology and Technology*, 35: 293 - 301.
- Pan Qiu-hong. 2003. Study on fruit acid invertases [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 潘秋红. 2003. 果实酸性转化酶研究 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Pan Q H, Zou K Q, Peng C C, Wang X L, Zhang D P. 2005. Purification, biochemical and immunological characterization of acid invertases from apple fruit. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47 (1): 50 - 59.
- Qiu Wen-wei. 2005. Studies on the sucrose-metabolizing enzymes in navel orange fruit from different habitats [M. D. Dissertation]. Ya'an: Sichuan Agricultural University. (in Chinese)
- 邱文伟. 2005. 不同生境下脐橙果实蔗糖代谢相关酶的研究 [硕士论文]. 雅安: 四川农业大学.
- Roitsch T, Bittner M, Godt D E. 1995. Induction of apoplasmic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol*, 108: 285 - 294.
- Shi Guo-an, Guo Xiang-feng, Zhang Guo-hai, Bao Man-zhu. 2009. Analysis of sugar metabolism during florescence and flower senescence of tree peony petal. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (8): 1184 - 1190. (in Chinese)
- 史国安, 郭香凤, 张国海, 包满珠. 2009. 牡丹开花和衰老期间花瓣糖代谢的研究. *园艺学报*, 36 (8): 1184 - 1190.
- Shin K S, Chakrabarty D, Paek K Y. 2002. Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulbets

- regenerated *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 96: 195 - 204.
- Sun Hong-mei, Li Tian-lai, Li Yun-fei. 2005. Changes of carbohydrate and amylase in lily bulb during bulb development. *Bulletin of Botanical Research*, 25 (1): 59 - 63. (in Chinese)
- 孙红梅, 李天来, 李云飞. 2005. 百合鳞茎发育过程中碳水化合物含量及淀粉酶活性变化. *植物研究*, 25 (1): 59 - 63.
- Tang Yun-ming. 1995. Isolation, purification and some properties of invertase from leaves of mandarin orange. *Acta Botanica Sinica*, 37 (8): 594 - 600. (in Chinese)
- 唐云明. 1995. 柑叶片蔗糖酶的分离纯化及其部分性质的研究. *植物学报*, 37 (8): 594 - 600.
- Tang Yun-ming, Li Nan, Chen Ding-fu. 1996. Isolation, purification and some properties of invertase from sweet potato. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 22 (1): 45 - 50. (in Chinese)
- 唐云明, 黎南, 陈定福. 1996. 甘薯叶片蔗糖酶的分离纯化及其部分性质. *植物生理学报*, 22 (1): 45 - 50.
- Tymowska L Z, Kreis M. 1998a. The plant invertases: Physiology, biochemistry and molecular biology. *Advances in Botanical Research*, 28: 71 - 117.
- Tymowska L Z, Kreis M. 1998b. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta*, 207 (2): 259 - 265.
- Wu Zhong-liang. 2007. Purification and some properties of sucrase from tobacco (*Nicotiana tobacum* L.) leaves [M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 武忠亮. 2007. 烟草叶片蔗糖酶的分离纯化及部分性质研究 [硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Xiong Zhi-ting, Wang Ting, Liu Kun, Zhang Zhi-zhen, Gan Jin-hua, Huang Yu, Li Ming-jing. 2008. Differential invertase activity and root growth between Cu-tolerant and non-tolerant populations in *Kummerowia stipulacea* under Cu stress and nutrient deficiency. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 17 - 27.
- Xu J, Pemberton G H, Almira E C, Almira E C, Mccarty D R, Koch K E. 1995. The *Ivr1* gene for invertase in maize. *Plant Physiol*, 108 (3): 1293 - 1294.
- Yuan Zhi-hua, He Xiu-li, Xu Zhe, Yi Ming-fang. 2008. Metabolism and related enzymes activities of sucrose and starch in the stages of bulb formation of *Gladiolus hybridus*. *Scientia Silvae Sinicae*, 44 (8): 47 - 51. (in Chinese)
- 苑智华, 何秀丽, 徐哲, 义鸣放. 2008. 唐菖蒲球茎形成期蔗糖和淀粉代谢及其相关酶活性. *林业科学*, 44 (8): 47 - 51.
- Zeng Xian-bin, Cao Xian-zu, Liang Jian-sheng. 1993. Dynamic characteristics of invertase of sugarbeet roots (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Jiangsu Agricultural College*, 14 (1): 21 - 25. (in Chinese)
- 曾宪彬, 曹显祖, 梁建生. 1993. 甜菜块根中蔗糖酶的若干动力学性质. *江苏农学院学报*, 14 (1): 21 - 25.
- Zhang Zhen-qing, Xia Shu-fang. 1984. Isolation, purification and some properties of invertase from soybean leaves. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 10 (1): 19 - 27. (in Chinese)
- 张振清, 夏淑芳. 1984. 大豆叶片蔗糖酶的分离纯化及其特性. *植物生理学报*, 10 (1): 19 - 27.
- Zheng Hui-jun, Xia Yi-ping, Huang Chun-hui, Chai Ming-liang. 2006. Studies on bulblet development and carbohydrates metabolism in bulbs of *Lilium* Oriental hybrids grown in mountainous region. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science*, 32 (5): 535 - 540. (in Chinese)
- 郑慧俊, 夏宜平, 黄春辉, 柴明良. 2006. 东方百合鳞茎的山地膨大发育与养分积累研究. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 32 (5): 535 - 540.
- Zhou Sheng-mao. 2009. Studies on biosyntheses, regulations, and gene isolations involved in carbohydrates and phenols in underground tubers of different genotypes of yams [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 周生茂. 2009. 山药不同基因型地下块茎糖类和酚类物质形成、调控及相关基因分离的研究 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.