

山药块茎膨大期淀粉积累及淀粉合成相关基因表达分析

索宁宁, 张艳芳, 高圆丽, 赵令敏, 葛明然, 刘杰才, 霍秀文

(内蒙古农业大学园艺与植物保护学院 呼和浩特 010019)

摘要:为探讨山药块茎膨大期淀粉的积累机制,以大和长芋山药为试验材料,测定了块茎膨大期各类淀粉含量、淀粉合成关键酶活性以及淀粉合成相关基因的表达水平。结果表明,山药块茎膨大期总淀粉、直链淀粉及支链淀粉的积累呈先增加后降低的趋势,种植后 150 d 支链淀粉占总淀粉含量的 88.35%,总淀粉含量的增加主要是支链淀粉的积累;ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)、淀粉分支酶(SBE)与支链淀粉的积累呈极显著正相关,是直接参与支链淀粉积累的重要功能酶。AGPase、SSII、SSIII、SBEII 基因的表达量与支链淀粉含量呈极显著正相关,是支链淀粉积累的关键因素。SBE 对淀粉积累表现为直接正效应,AGPase 和束缚态淀粉合成酶(GBSS)在直链淀粉积累中体现为直接正效应。这些研究对揭示山药块茎淀粉合成的分子机制具有重要意义。

关键词:山药块茎;淀粉积累;淀粉合成关键酶;基因表达

中图分类号:S632.1

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2023)03-069-08

Analysis of starch accumulation and starch synthesis-related gene expression during tuber expansion stage of yam

SUO Ningning, ZHANG Yanfang, GAO Yuanli, ZHAO Lingmin, GE Mingran, LIU Jiecai, HUO Xiuwen

(College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, Inner Mongolia, China)

Abstract: In order to explore the accumulation mechanism of starch during the expansion stage in yam tubers, we investigated the changes in starch content of various types, activity of key enzymes in starch synthesis and gene expression patterns of starch synthesis key enzymes in Dahechangyu yam tubers. The results showed that the accumulation of total starch, amylose and amylopectin showed a trend of increasing first and then decreasing during tuber expansion stage of yam, and amylopectin accounts for 88.35% of the total starch content 150 days after planting. The increase of total starch content mainly results from amylopectin accumulation. Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (AGPase) and starch-branching enzyme (SBE) have significant positive correlation with the accumulation of amylopectin, and are important functional enzymes directly involved in the accumulation of amylopectin. The gene expression level of AGPase, SSII, SSIII, SBEII was positively correlated with amylopectin content, which was the key factor of amylopectin accumulation in yam tubers. SBE showed a directly positive effect on starch accumulation, AGPase and granule bound starch synthase have directly positive effect on amylose accumulation. These studies are of great significance to reveal the molecular mechanism of starch synthesis in yam tubers.

Key words: Yam tuber; Starch accumulation; Starch synthesis key enzyme; Gene expression

山药 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 是薯蓣科 (Dioscoreaceae) 薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 一年生或多年生缠绕性草质藤本, 为单子叶植物^[1]。山药块茎中含有丰富的淀粉(70%)、蛋白质(9%)、还富含矿物质、尿囊素、皂苷等活性物质, 并且与其他作物如

马铃薯、木薯和甘薯相比, 山药有着更好的感官特性, 近年来对山药的需求量逐年增多^[2]。

淀粉是山药块茎中最丰富的碳水化合物, 含量约占块茎干质量的 80% 左右。淀粉积累不仅影响块茎膨大, 对山药直接经济效益的产生和品质形成

收稿日期: 2022-11-01; 修回日期: 2023-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(31860558); 内蒙古自治区科技计划项目(2020GG0044)

作者简介: 索宁宁, 男, 在读硕士研究生, 主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究。E-mail: 2608336940@qq.com

通信作者: 刘杰才, 男, 副教授, 主要从事蔬菜栽培研究。E-mail: jiecailiu@163.com

霍秀文, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究。E-mail: huoxiuwen@imau.edu.cn

也具有重要作用。前人通过对马铃薯块茎的研究发现,叶片光合作用产生的同化物以蔗糖的形式通过韧皮部输送到块茎内,然后经由 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (glucose-1-phosphate adenylyltransferase, AGPase)、可溶性淀粉合成酶 (starch synthase, SSS)、束缚态淀粉合成酶 (granule bound starch synthase, GBSS)、淀粉分支酶 (starch-branching enzyme, SBE) 等淀粉合成关键酶的协同作用催化淀粉的合成^[3]。AGPase 催化形成淀粉合成的底物 ADPG, 是途径中的关键酶和限速酶。据前人报道, 利用 Patatin 启动子驱动马铃薯 *AGPase* 表达, 转基因马铃薯的淀粉含量较野生型提高了 35%^[4]。利用基因沉默抑制 *AGPase* 表达, 马铃薯淀粉含量比对照低 4%~35%^[5]。马铃薯块茎中 *AGPase* 的下调会引起 *GBSSI* 的表达^[6]。*GBSS* 主要负责直链淀粉的合成, 还未有其他合酶可以取代该功能。Kitahara 等^[7]利用 RNAi 技术抑制 *GBSSI* 表达, 发现 *GBSS* 不仅有助于直链淀粉的积累, 而且还参与支链淀粉长链的合成。根据氨基酸序列的相似性, *SSS* 被分成多种异构体, 在块茎作物中主要是指 *SSII* 和 *SSIII*, 其在支链淀粉的合成中起重要作用^[8-9]。拟南芥 *SSII* 的缺失不会影响叶片生长速度和淀粉的含量, 但抑制了中等长度支链淀粉的合成, 这在马铃薯块茎的研究中也得到了类似的结果^[10-11]。*SSIII* 的过表达会使细胞中产生大量的小淀粉粒, 中心位置通常有裂纹^[10]。*SBE* 主要包含两类同工酶 *SBEI* 和 *SBEII*; 主要影响支链淀粉的分支^[12]。抑制 *SBEII* 的表达, 马铃薯淀粉粒结构发生改变, 支链淀粉和直链淀粉的含量增加; 抑制 *SBEI* 的表达对直链淀粉含量的影响不显著; 而同时下调 *SBEI* 和 *SBEII*, 马铃薯中直链淀粉含量增加 75%^[13-14]。异淀粉酶、普鲁兰酶 (pullulanase, PUL) 及蔗糖合成酶 (sucrose synthase, SUS) 也参与了淀粉合成。增强转基因马铃薯中 SUS 的活性, 块茎的淀粉含量和产量也得到提高^[15]。此外, 一些代谢物如 3-磷酸甘油酸、焦磷酸盐等可以激活或抑制淀粉合成相关酶的活性进而影响淀粉积累^[16]。近年来, 基于山药块茎的生长分析、营养成分分析、细胞学特征分析或分子水平评价等对山药的淀粉积累特性和淀粉代谢调控方面的研究逐渐变多^[17-19]。然而, 迄今关于山药块茎淀粉合成关键酶与其编码基因表达量的综合性分析却鲜有研究, 诸多未知点有待进一步挖掘。

为此, 笔者以田间条件下内蒙古主栽山药品种大和长芋为试验材料, 研究块茎膨大期淀粉的积累

及相关淀粉合成关键酶的基因表达和活性变化; 分析淀粉积累与相关淀粉合成关键酶活性和基因表达的相关性; 通过通径分析进一步探索其对各类淀粉积累的影响。这不仅有助于揭示山药块茎淀粉合成的分子机制, 而且对旨在获得高淀粉含量、高品质性状的山药育种目标具有实践指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

山药品种为大和长芋山药 (*Dioscorea opposita* 'Dahechangyu'), 为笔者所在课题组上一年收获的自留种, 于 2021 年 5 月初至 10 月末种植在内蒙古农业大学山药种质资源圃。试验选取 15 cm 左右晾晒好的的山药栽子播种, 采用搭架栽培、双行种植的方式, 行距 60 cm, 株距 20 cm, 于 5 月 7 日人工种植, 常规田间管理。

1.2 方法

内蒙古地区大和长芋山药约在种植后 75 d 块茎开始膨大, 165 d 截止。试验于种植后的 90、105、120、135、150、165 d 取样, 每个时期设置 3 次生物学重复, 每次重复随机挖取 3 株长势一致的山药进行地下块茎采样。去除残留土壤后, 从块茎中部称取 2 g, 3 株等量混样, 用锡纸包裹并标记, 液氮速冻, -80 °C 冻存。

1.3 项目测定

1.3.1 山药块茎形态指标的测定 用游标卡尺和软尺测量清洗干净后块茎的直径和长度, 电子秤称取块茎质量。

1.3.2 淀粉含量的测定 参照崔晋^[20]等利用双波长法测定块茎淀粉含量。支链淀粉含量测定以 538 nm 为测定波长, 758 nm 为参比波长; 直链淀粉含量测定以 624 nm 为测定波长, 410 nm 为参比波长。总淀粉含量/%=直链淀粉含量(%)+支链淀粉含量(%).

1.3.3 淀粉形成关键酶活性的测定 称取约 1.0 g 左右的块茎, 在预冷的研钵中磨成粉末, 加入 5 mL 提取液 [含 100 mmol·L⁻¹ pH 7.5 的 HEPES-NaOH, 2 mmol·L⁻¹ EDTA, 8 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 12.5% 甘油; 50 mmol·L⁻¹ β-巯基乙醇, 1% PVP-40], 再次研磨后, 在 4 °C 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清液作为测定 AGPase、SSS 和 SBE 活性的粗酶液。沉淀中再次加入 5 mL 提取液, 振荡悬浮均匀后作为测定 GBSS 活性的粗酶液。参考程方民等^[21]的方法测定 AGPase、SSS 和 GBSS 活性。SBE 活性测定参照李

太贵等^[22]和赵法茂等^[23]的方法。

1.3.4 淀粉形成关键酶的基因表达量 从-80 °C冻存的块茎样品中提取总 RNA。吸取 2 μg 提取出的总 RNA 利用反转录试剂盒 (PrimeScript™II 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 合成单链 cDNA。从笔者课题组前期山药转录组测序结果中获得 *AG-*

Pase、*SSII*、*SSIII*、*GBSSI*、*SBEI*、*SBEII* 的基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计用于实时荧光定量 PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 的引物(表 1)。以合成的 cDNA 为模板, 山药的 *18S* 为内参基因, 利用 *Tag* SYBR®Green qPCR Kit (Bio- Rad) 试剂盒进行

表 1 用于 qRT-PCR 的引物序列

基因名称	正向引物	反向引物
<i>AGPase</i>	TCCCTTCTTCACTTCCCCT	TCATAGTAGTCGGCACCCAT
<i>SSII</i>	ATACTGAACCTCAAGCGACTGG	CGATGGCGAAAAATAGGACT
<i>SSIII</i>	AAATCTGCCAGCATCGTCAC	CCACTCTCCCATCTCTTCTCT
<i>GBSSI</i>	AACTGGAGGGCTTGGTGA	CCTTGACTGATCGTAGCGTG
<i>SBEI</i>	CCACAGTCACGCAAGCAAC	TATGATAGCCCCTCTCCCC
<i>SBEII</i>	CCAGATGCCGTTGGTACTAC	GCCATACTCAAAGCGAGAG
<i>18S</i>	GATCGGAGTAATGATTAACAG	TTATGGTTGAGACTAGGACG

qRT-PCR。扩增反应结束后, 绘制熔解曲线以确保引物的特异性。每个基因分析设置 3 次重复, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

1.4 数据分析

采用 Microsoft Excel 2021 进行试验数据分析及制图, 采用 SPSS v27.0 软件进行方差分析、相关性分析及通径分析。

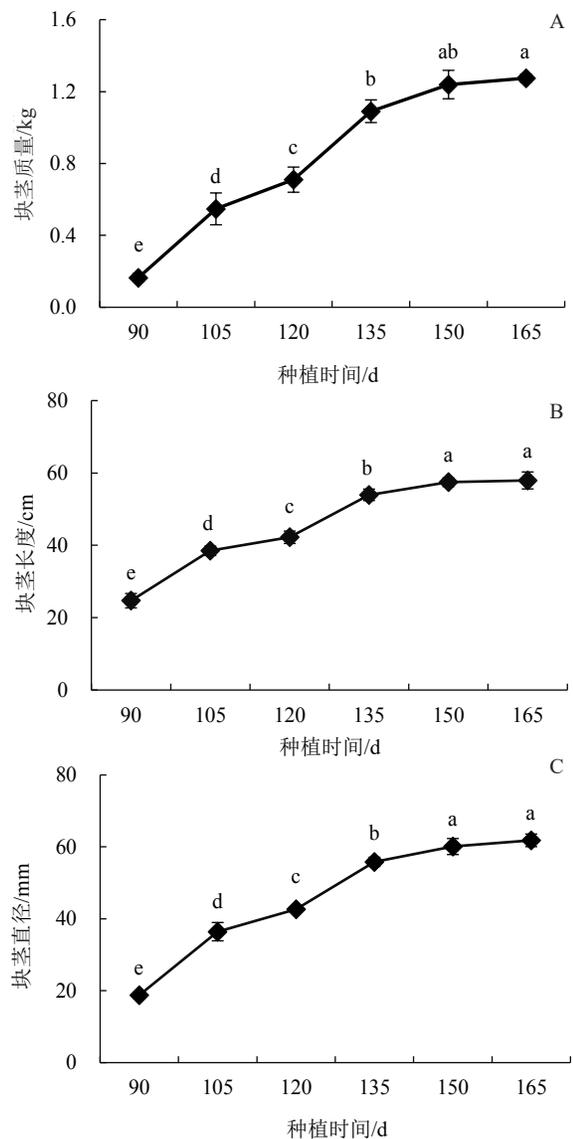
2 结果与分析

2.1 山药块茎形态指标的变化

由图 1 可知, 整体来看, 块茎质量、直径和长度的生长曲线呈“S”形变化。随着块茎的膨大, 其质量、长度和直径不断增加, 种植后 90~150 d 是其快速增长期, 完成整个膨大期质量、长度和直径增长的 80%左右, 150 d 后其生长速度放缓, 进入平台期。

2.2 山药块茎中淀粉含量的变化

由图 2-A 可知, 块茎总淀粉含量随时间推进呈升高趋势, 且 90、105、120 d 间差异显著, 这段时期淀粉积累迅速, 而 135 d 以后淀粉积累基本进入平台期。直链淀粉在整个膨大期含量较低, 最高时 (135 d) 约占总淀粉含量的 10% (图 2-B)。支链淀粉含量变化的总体趋势与总淀粉含量相似, 种植后 135~165 d 差异不显著 (图 2-C)。山药种植后 90 d 淀粉直/支比为 0.253, 而 150 d 时直/支比减少为 0.132 (图 2-D); 150 d 时, 支链淀粉的积累达到峰值, 占总淀粉含量的 88.35%。因此, 山药块茎总淀粉含量的增加主要是由于支链淀粉的积累。



注: 不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

图 1 山药块茎形态指标的变化

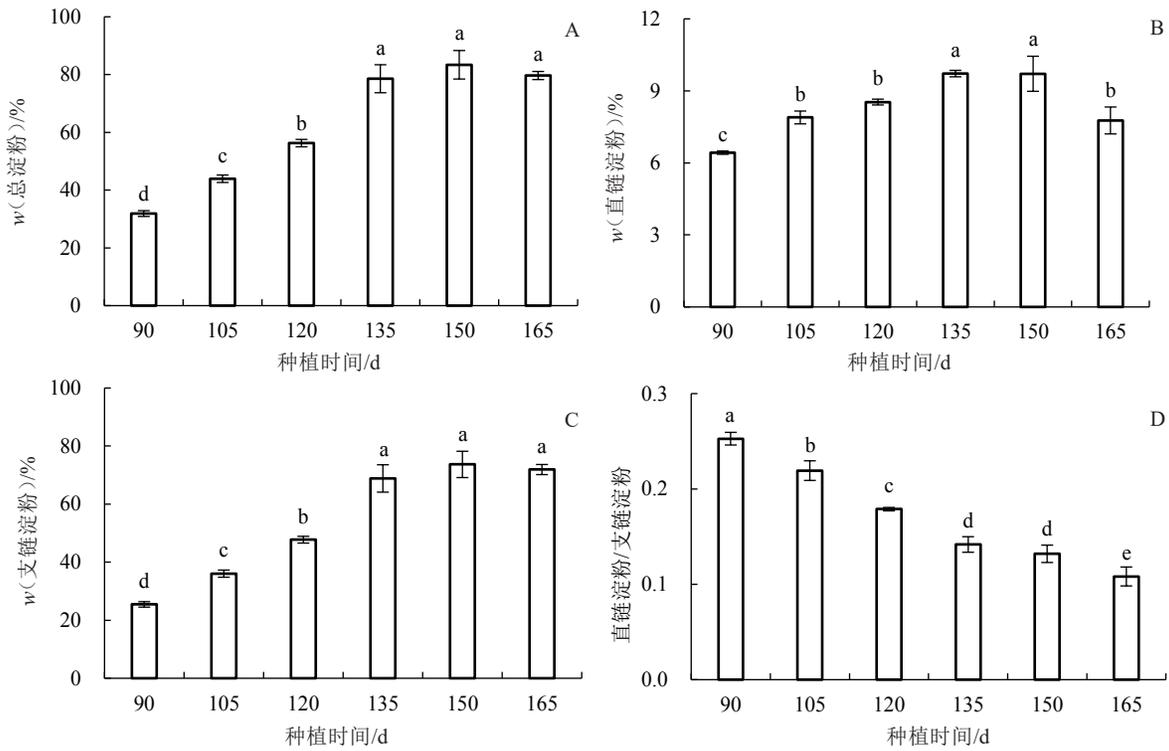


图2 山药块茎中淀粉含量的变化

2.3 山药块茎中淀粉形成关键酶活性的变化

随着种植时间的推移,山药块茎中淀粉形成关键酶 AGPase、SSS、GBSS 和 SBE 活性变

化基本一致,均在 90~135 d 酶活性提高,并且都在 135 d 时达到峰值,135~165 d 又显著降低(图3)。

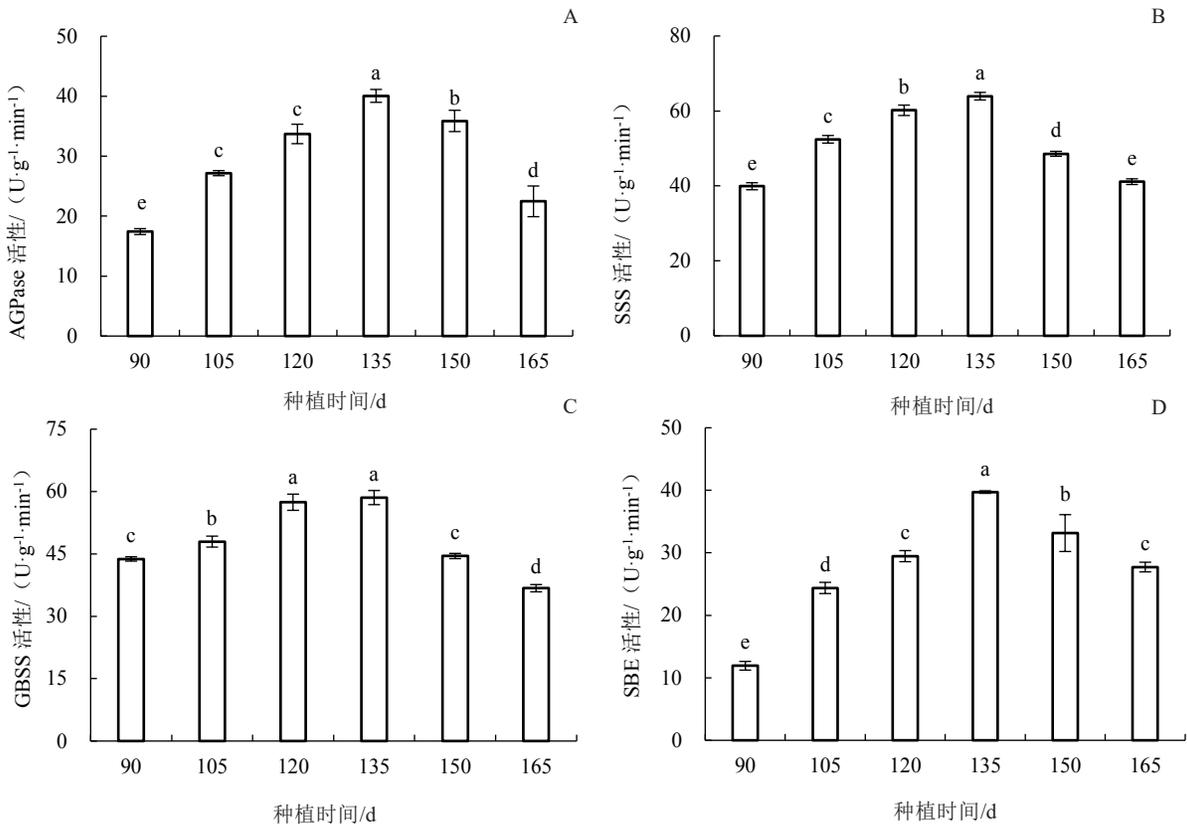
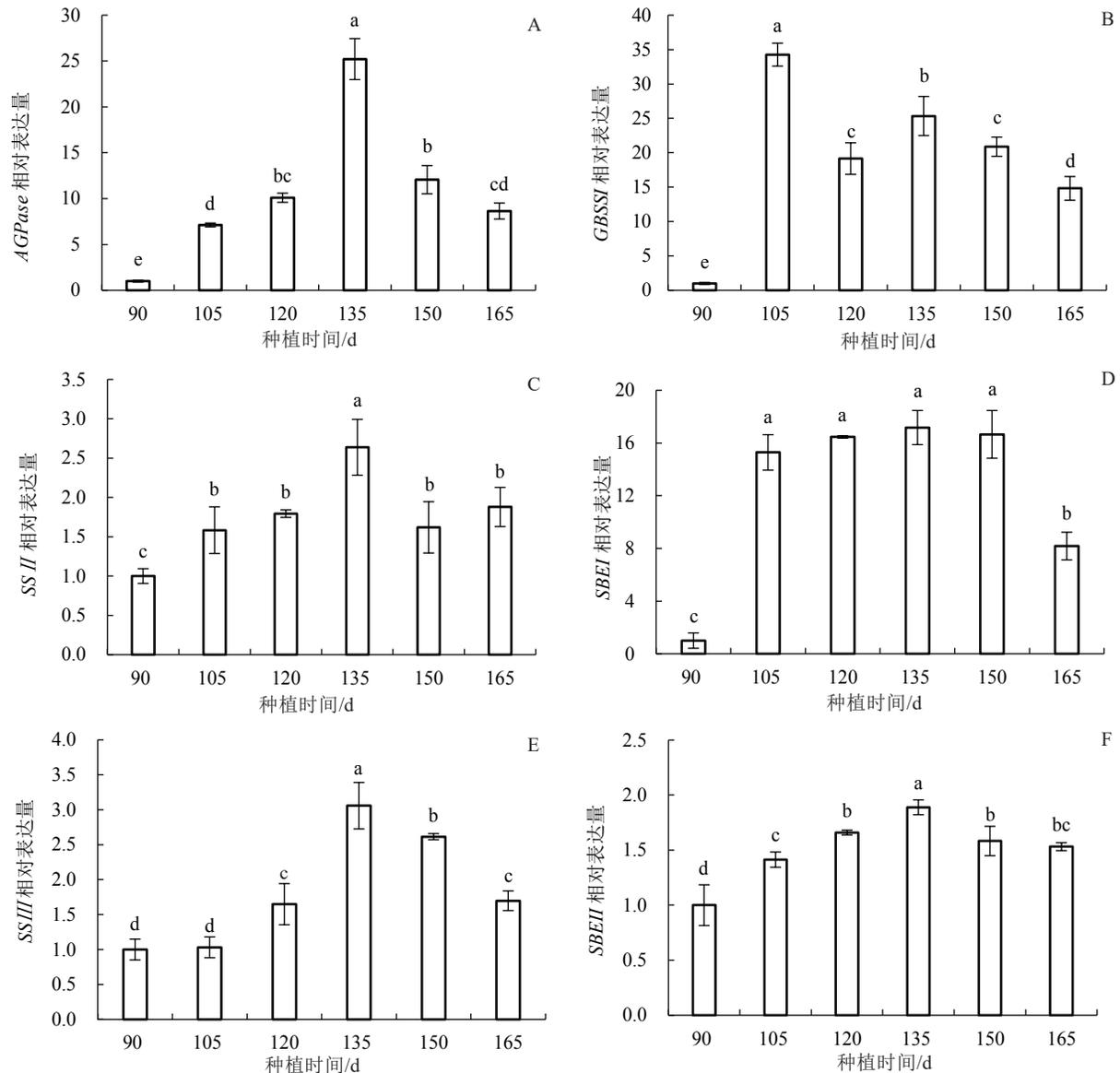


图3 山药块茎中淀粉形成关键酶活性的变化

2.4 山药块茎中淀粉合成关键酶的基因表达量

为进一步了解块茎中淀粉合成关键酶相关基因的表达及其在块茎发育中的作用,采用 qRT-PCR 对 6 个基因的转录水平进行了研究。*AGPase* 的表达量在 135 d 之前显著增加,然后在 150 d 后显著下降到 120 d 前的水平(图 4-A)。*SSII* 在块茎中的表达量基本稳定,135 d 时有显著高表达(图 4-B)。*SSIII* 在 90~105 d 的表达量较低,且无显著差异;

120 d 后 *SSIII* 的表达量显著升高,135 d 达到最大值后又显著降低(图 4-C)。*GBSSI* 在块茎中的表达量呈“升-降-升-降”波浪变化趋势,且在 105 d 的表达量显著高于其他时期(图 4-D)。*SBEI* 基因从 105 d 显著升高后一直保持在恒定的高表达量水平,然后在 165 d 显著降低(图 4-E)。*SBEII* 与 *SSII* 的表达模式相似,在整个膨大期保持恒定的高表达量水平(图 4-F)。



注:各基因在 90 d 的表达量为 1。

图 4 山药块茎中淀粉合成关键酶的基因表达变化

2.5 山药块茎淀粉积累的相关性分析

笔者的研究中,块茎淀粉含量与淀粉合成关键酶活性及其基因表达呈正相关(表 2)。块茎总淀粉含量与 *AGPase*、*SBE* 活性呈极显著正相关。支链淀粉含量与 *AGPase*、*SBE* 活性也呈极显著正相关,与 *SSS* 活性呈正相关。直链淀粉含量与 4 种淀粉

合成关键酶活性均呈正相关。说明 *AGPase*、*SSS*、*GBSS*、*SBE* 等活性在块茎淀粉合成中发挥了重要作用。因此,在一定范围内,当参与山药块茎淀粉合成的这些酶的活性越高,越有利于淀粉的积累。块茎总淀粉含量与 *AGPase*、*SSII*、*SSIII*、*SBEII* 等基因的表达量呈极显著正相关,与 *SBEI* 基因的表达量

表2 块茎淀粉积累的相关性分析

项目	淀粉合成关键酶活性				淀粉合成关键酶基因的表达量					
	AGPase 活性	SSS 活性	GBSS 活性	SBE 活性	AGPase	SSII	SSIII	GBSSI	SBEI	SBEII
直链淀粉含量	0.910**	0.661*	0.447	0.884**	0.782**	0.623**	0.826**	0.544*	0.809**	0.795**
支链淀粉含量	0.592**	0.202	-0.062	0.811**	0.640**	0.604**	0.806**	0.239	0.480*	0.692**
总淀粉含量	0.621**	0.233	-0.031	0.829**	0.659**	0.615**	0.821**	0.262	0.508*	0.709**

注:*表示在 0.05 水平差异显著;**表示在 0.01 水平差异极显著。

呈显著正相关。与总淀粉含量一致,支链淀粉含量与 *AGPase*、*SSII*、*SSIII*、*SBEII*等基因的表达量也呈极显著正相关,与 *SBEI*基因的表达量呈显著正相关。直链淀粉含量与淀粉合成关键酶基因的表达量均为显著或极显著正相关,表明这些编码淀粉合成关键酶的

基因表达量与山药块茎淀粉的积累有密切的联系。

2.6 山药块茎淀粉积累的途径分析

借助途径分析进一步研究淀粉合成关键酶及其相对基因表达量对总淀粉、支链淀粉和直链淀粉积累的影响(表3)。直接途径系数表明,*SBE*(*S4*)

表3 块茎淀粉积累的途径分析

作用因子	直接系数	间接途径系数										合计	
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
总淀粉	$R^2=0.974$												
S1	-0.254		-0.176	-0.192	0.785	-0.045	0.013	0.273	-0.111	0.158	0.172	0.877	
S2	-0.229	-0.195		-0.300	0.634	-0.040	0.012	0.163	-0.115	0.149	0.155	0.463	
S3	-0.326	-0.150	-0.211		0.421	-0.032	0.009	0.109	-0.073	0.112	0.109	0.294	
S4	0.897	-0.222	-0.162	-0.153		-0.047	0.014	0.271	-0.111	0.156	0.187	-0.067	
S5	-0.053	-0.218	-0.171	-0.197	0.798		0.015	0.272	-0.093	0.126	0.179	0.711	
S6	0.018	-0.178	-0.155	-0.156	0.709	-0.046		0.221	-0.088	0.105	0.186	0.598	
S7	0.319	-0.217	-0.117	-0.112	0.762	-0.045	0.012		-0.045	0.106	0.157	0.501	
S8	-0.187	-0.151	-0.141	-0.127	0.535	-0.026	0.008	0.076		0.155	0.121	0.450	
S9	0.187	-0.215	-0.182	-0.195	0.748	-0.036	0.010	0.181	-0.155		0.164	0.320	
S10	0.209	-0.209	-0.170	-0.170	0.801	-0.045	0.016	0.240	-0.108	0.147		0.502	
直链淀粉	$R^2=0.891$												
S1	0.978		-0.078	0.114	0.883	-0.431	-0.312	-0.067	0.146	-0.698	0.376	-0.067	
S2	-0.102	0.752		0.178	0.713	-0.376	-0.302	-0.040	0.152	-0.655	0.340	0.762	
S3	0.193	0.577	-0.094		0.473	-0.304	-0.215	-0.027	0.096	-0.493	0.240	0.253	
S4	1.009	0.856	-0.072	0.091		-0.448	-0.353	-0.066	0.147	-0.687	0.409	-0.123	
S5	-0.503	0.838	-0.076	0.117	0.898		-0.384	-0.067	0.122	-0.555	0.393	1.286	
S6	-0.447	0.684	-0.069	0.093	0.797	-0.433		-0.054	0.116	-0.461	0.407	1.080	
S7	-0.078	0.837	-0.052	0.066	0.858	-0.430	-0.309		0.059	-0.468	0.344	0.905	
S8	0.246	0.581	-0.063	0.075	0.601	-0.250	-0.211	-0.019		-0.681	0.265	0.298	
S9	-0.824	0.828	-0.081	0.115	0.842	-0.339	-0.250	-0.044	0.203		0.360	1.634	
S10	0.458	0.803	-0.076	0.101	0.901	-0.432	-0.397	-0.059	0.142	-0.647		0.336	
支链淀粉	$R^2=0.976$												
S1	-0.329		-0.180	-0.209	0.765	-0.020	0.033	0.290	-0.126	0.211	0.156	0.920	
S2	-0.234	-0.253		-0.326	0.618	-0.017	0.032	0.173	-0.131	0.198	0.141	0.435	
S3	-0.354	-0.194	-0.216		0.410	-0.014	0.023	0.116	-0.083	0.149	0.099	0.290	
S4	0.874	-0.288	-0.165	-0.166		-0.020	0.037	0.288	-0.126	0.208	0.170	-0.062	
S5	-0.023	-0.282	-0.175	-0.214	0.778		0.040	0.290	-0.105	0.168	0.163	0.663	
S6	0.047	-0.230	-0.158	-0.170	0.690	-0.020		0.235	-0.100	0.139	0.169	0.555	
S7	0.339	-0.282	-0.119	-0.122	0.743	-0.020	0.033		-0.051	0.141	0.143	0.466	
S8	-0.212	-0.195	-0.144	-0.138	0.521	-0.011	0.022	0.081		0.206	0.110	0.452	
S9	0.249	-0.279	-0.186	-0.212	0.729	-0.016	0.026	0.193	-0.175		0.149	0.229	
S10	0.190	-0.270	-0.174	-0.185	0.780	-0.020	0.042	0.255	-0.123	0.195		0.500	

注:S1.AGPase;S2.SSS;S3.GBSS;S4.SBE;S5.AGPase;S6.SSII;S7.SSIII;S8.GBSSI;S9.SBEI;S10.SBEII。

是对总淀粉和支链淀粉积累唯一表现为直接正效应(0.897,0.874)的淀粉合成关键酶;通过 SBE 的间接影响,AGPase(S1)、SSS(S2)、GBSS(S3)对总淀粉和支链淀粉积累又表现了一定的间接正效应(0.785、0.634、0.421;0.765、0.618、0.410)。AGPase、SSS 虽然对支链淀粉积累表现为负效应(-0.329,-0.234),但其通过 GBSS、SBE 等其他因子对支链淀粉积累产生了间接正效应(合计 0.920,0.435),抵消了它们的直接负效应。AGPase 和 GBSS 对直链淀粉积累直接贡献作用仅次于 SBE。

AGPase(S5)、SSII(S6)、SSIII(S7)、GBSSI(S8)、SBEI(S9)、SBEII(S10)对块茎总淀粉和支链淀粉积累的影响均为间接途径系数大于直接途径系数,说明这些作用因子都通过其剩余因子的间接作用来调控淀粉积累。AGPase 和 GBSSI 两类基因的表达量对支链淀粉积累表现为直接负效应(-0.023,-0.212)。GBSSI 和 SBEII 对直链淀粉积累表现了一定的直接正效应(0.246,0.458),又表现了间接正效应(0.298,0.336)。

3 讨论与结论

淀粉是植物体内主要的碳水化合物储存库,广泛存在于光合组织以及非光合组织中,是农业生产研究的重点^[9]。在山药块茎中,淀粉是含量最丰富的碳水化合物,种植后 90~150 d 是其快速增长期,与此同时,块茎也在快速膨大,所以,块茎的膨大与淀粉的积累密切相关,淀粉是山药块茎质量、长度、粗度变化的重要贡献因子^[17]。然而,目前关于山药块茎淀粉生物合成的机制尚不明晰。淀粉有直链淀粉和支链淀粉两种存在形式,通过直链淀粉与支链淀粉含量的比值能够快速评判粮食作物食味品质的优劣^[24]。成熟山药块茎中支链淀粉约占总淀粉含量的 80%,直链淀粉占 20%左右^[20]。支链淀粉含量高的淀粉往往黏性也较高,口感柔软;糯玉米淀粉主要由支链淀粉组成,直链淀粉很少^[25]。在笔者的试验中,块茎膨大期间直/支比呈逐渐下降的趋势,支链淀粉含量变化的总体趋势与总淀粉含量相似,总淀粉含量的增加主要是支链淀粉含量的增加,这与柳强娟等^[3]在马铃薯上的研究结果一致;甘薯块茎膨大期淀粉直/支比呈现波浪状曲线的变化趋势,与笔者研究中直/支比呈显著下降的趋势略有不同,这可能是与物种、气候条件差异有关;但柳强娟等^[3]发现在甘薯种植后 80~110 d 直/支比显著下降,有可能是这段时期直链淀粉积累速率明显小于

支链淀粉的缘故,这与笔者的研究结果一致^[26]。

淀粉合成开始于 1-磷酸葡萄糖和 ATP 在 AGPase 的催化下合成 ADPG,该反应是淀粉合成的中枢纽速步骤,催化淀粉底物的合成,决定着淀粉合成和积累的速率^[27]。SBE 基因的表达模式和活性对支链淀粉的合成有重要影响,对最终淀粉积累及贮藏器官的生长发育有关键作用^[28]。据报道,同时抑制 SBEI 和 SBEII 小麦直链淀粉含量从 25.5% 提高到 70.0%^[29];而 SBE 的过表达可使转基因水稻支链淀粉分支数增加^[30]。笔者研究发现,淀粉形成关键酶 AGPase、SSS、SBE 在山药块茎淀粉积累过程中活性变化基本一致,呈先不断升高后显著降低的趋势,种植后 135 d 时活性都达到最大值,AGPase、SBE 与支链淀粉的积累呈极显著正相关,这与马铃薯^[3]、葛根^[31]等的试验结果相符。前人研究发现马铃薯块茎形成过程中淀粉合成关键酶基因 AGPase、SSII、SSIII、SBEII 的相对表达量均呈不断上升的趋势^[32]。笔者研究中 AGPase、SSII、SSIII、SBEII 基因的相对表达水平在 135 d 前持续增高,并与支链淀粉含量呈极显著正相关,这与苏旺等^[32]的研究结果一致。

已有前人研究指出支链淀粉的合成需要淀粉合成相关酶之间一定程度的协调配合来实现^[33]。对小麦胚乳支链淀粉的试验表明,支链淀粉合成中一些关键酶的磷酸化使其形成蛋白异聚复合物。前人对玉米淀粉体的研究表明,SSI、SSII 和 SBEII 之间存在蛋白-蛋白相互作用,复合物的形成依赖于蛋白质磷酸化^[34]。SSI-SBEIIa、SSI-SBEIIb 和 SSI-Ia-SBEIIb 蛋白质的相互作用在小麦、玉米、水稻中很常见^[33]。水稻中还报道了 SBEI 与 PUL 的相互作用^[35]。山药作为一种具有双子叶植物特征的单子叶植物,淀粉的积累主要在地下块茎中进行而不是玉米、小麦、水稻等作物的胚乳,这可能导致与其相比,淀粉合成和积累的功能机制不同。笔者研究中参与淀粉积累的关键酶都同时表达;SBE 是对支链淀粉和总淀粉积累表现为直接正效应的淀粉合成关键酶,而通过 SBE 的间接影响,AGPase、SSS、GBSS 对支链淀粉积累又表现出一定的间接正效应,SBE 与支链淀粉的积累呈极显著正相关也印证了这一点,推测 SBE 可能是通过与其他酶的协同作用促进块茎中支链淀粉的积累,具体机制还有待进一步研究。

综上所述,大和长芋山药块茎中总淀粉含量的增加主要是由于支链淀粉的积累,直链淀粉含量较少,种植后 135 d 淀粉积累基本进入平台期;AGPase、SSS、SBE 对山药块茎淀粉的积累是必要的,

AGPase、SBE 可能是直接参与支链淀粉积累的重要功能酶; *AGPase*、*SSII*、*SSIII*、*SBEII* 基因正向调控块茎支链淀粉的积累。另外, SBE 对各类淀粉积累均表现为直接正效应, *AGPase*、*GBSS* 对直链淀粉积累的直接贡献也较大。

参考文献

- [1] 陈跃华, 许云, 吴文婧, 等. 参薯 *DaANS* 基因克隆及表达差异分析[J]. 植物生理学报, 2015, 51(6): 853-859.
- [2] CHANDRASEKARA A, KUMAR T J. Roots and tuber crops as functional foods: A review on phytochemical constituents and their potential health benefits[J]. International Journal of Food Science, 2016, 2016: 3631647.
- [3] 柳强娟, 康建宏, 吴佳瑞, 等. 施氮量对宁夏旱区马铃薯块茎淀粉形成和产量的影响[J]. 核农学报, 2021, 35(5): 1196-1208.
- [4] STARK D M, TIMMERMAN K P, BARRY G F, et al. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase[J]. Science, 1992, 258(5080): 287-292.
- [5] MULLER-ROBER B, SONNEWALD U, WILLMITZER L. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes[J]. The EMBO Journal, 1992, 11(4): 1229-1238.
- [6] LLOYD J R, SPRINGER F, BULEON A, et al. The influence of alterations in ADP- glucose pyrophosphorylase activities on starch structure and composition in potato tubers[J]. Planta, 1999, 209(2): 230-238.
- [7] KITAHARA K, HAMASUNA K, NOZUMA K, et al. Physicochemical properties of amylose-free and high-amylose starches from transgenic sweetpotatoes modified by RNA interference[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69(2): 233-240.
- [8] ABEL G J W, SPRINGER F, WILLMITZER L, et al. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Plant Journal, 1996, 10(6): 981-991.
- [9] MARSHALL J, SIDEBOTTOM C, DEBET M, et al. Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers[J]. Plant Cell, 1996, 8(7): 1121-1135.
- [10] ZHANG X L, SZYDLOWSKI N, DELVALLE D, et al. Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8: 96.
- [11] EDWARDS A, FULTON D C, HYLTON C M, et al. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers[J]. Plant Journal, 1999, 17(3): 251-261.
- [12] WANG J, HU P, CHEN Z C, et al. Progress in high-amylose cereal crops through inactivation of starch branching enzymes[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 469.
- [13] JOBLING S A, SCHWALL G P, WESTCOTT R J, et al. A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms of SBE A[J]. Plant Journal, 1999, 18(2): 163-171.
- [14] SCHWALL G P, SAFFORD R, WESTCOTT R J, et al. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(5): 551-554.
- [15] BAROJA-FERNANDEZ E, MUNOZ F J, MONTERO M, et al. Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(9): 1651-1662.
- [16] TUNCEL A, CAKIR B, HWANG S K, et al. The role of the large subunit in redox regulation of the rice endosperm ADP- glucose pyrophosphorylase[J]. FEBS Journal, 2014, 281(21): 4951-4963.
- [17] 罗海玲, 龚明霞, 周芸伊, 等. 山药块茎发育过程中淀粉积累及差异蛋白分析[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(6): 61-69.
- [18] 王金鑫, 季祥, 高圆丽, 等. *CDPK20* 基因表达及其对山药块茎膨大调控作用研究[J]. 西北植物学报, 2021, 41(2): 189-196.
- [19] 梁任繁, 李创珍, 张娟, 等. 山药块茎发育中物质积累及相关代谢酶变化[J]. 作物学报, 2011, 37(5): 903-910.
- [20] 崔晋, 李建军, 马艳弘, 等. 双波长法测定山药中直链和支链淀粉含量[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(13): 150-154.
- [21] 程方民, 蒋德安, 吴平, 等. 早籼稻籽粒灌浆过程中淀粉合成酶的变化及温度效应特征[J]. 作物学报, 2001, 27(2): 201-206.
- [22] 李太贵, 沈波, 陈能, 等. Q 酶在水稻籽粒蛋白形成中作用的研究[J]. 作物学报, 1997, 23(3): 338-344.
- [23] 赵法茂, 齐霞, 肖军, 等. 测定淀粉分支酶活性方法的改进[J]. 植物生理学报, 2007, 43(6): 1167-1169.
- [24] 徐锡明, 张欣, 施利利, 等. 直链淀粉含量偏低型杂交粳稻组合的稻米品质评价[J]. 作物杂志, 2016(6): 44-48.
- [25] HANYU H Y, JIANG H X, BLANCO M, et al. Characterization of normal and waxy corn starch for bioethanol production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(2): 379-386.
- [26] 夏之凯, 李玲, 徐锡明, 等. 甘薯块根膨大过程中质构特性和淀粉直/支比的研究[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(8): 144-150.
- [27] 马玮, 张蒙, 史玉滋, 等. 早春栽培的印度南瓜果实淀粉积累相关酶的活力[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(1): 24-31.
- [28] 董伟清, 刘莉莉, 蒋慧萍, 等. 芋淀粉分支酶(SBE)基因的鉴定、生物信息学及表达分析[J]. 热带作物学报, 2022. [2022-11-01]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.s.20220916.1645.006.html>.
- [29] REGINA A, BIRD A, TOPPING D, et al. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(10): 3546-3551.
- [30] KIM W S, KIM J, KRISHNAN H B, et al. Expression of *Escherichia coli* branching enzyme in caryopses of transgenic rice results in amylopectin with an increased degree of branching[J]. Planta, 2005, 220(5): 689-695.
- [31] 郭丽君, 羽健宾, 肖冬, 等. 葛根淀粉合成关键酶活性动态及其与块根产量和淀粉积累的相关性研究[J]. 广西植物, 2022, 42(4): 639-647.
- [32] 苏旺, 胡禄华, 王舰. 垄沟集雨覆盖对旱作马铃薯块茎淀粉合成关键酶活性、基因表达及淀粉累积的影响[J]. 核农学报, 2021, 35(3): 737-744.
- [33] TETLOW I J. Starch biosynthesis in developing seeds[J]. Seed Science Research, 2010, 21(1): 5-32.
- [34] LIU F S, MAKHMOUDOVA A, LEE E A, et al. The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(15): 4423-4440.
- [35] CROFTS N, ABE N, OITOME N F, et al. Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(15): 4469-4482.