



山药异淀粉酶基因克隆及其在淀粉代谢中的作用

赵令敏¹, 张艳芳¹, 邢丽南¹, 葛明然¹, 刘小燕², 霍秀文^{1*}

(1 内蒙古农业大学 园艺与植物保护学院, 内蒙古自治区野生特有蔬菜种质资源与种质创新重点实验室, 呼和浩特 010019; 2 鄂尔多斯市农牧业科学研究院, 内蒙古鄂尔多斯 017000)

摘 要: 为了明确异淀粉酶基因(*ISA3*)在山药淀粉代谢中的作用, 该研究以‘毕克齐’和‘大和长芋’山药为试验材料, 测定了块茎中淀粉及组分含量和异淀粉酶活性等; 采用 RT-PCR 技术克隆了 *ISA3*, 并进行生物学分析及山药块茎不同膨大期和不同组织间 *ISA3* 基因的表达等。结果表明: (1) 山药‘大和长芋’的直链淀粉、支链淀粉和总淀粉含量均显著高于‘毕克齐’, 且两品种的淀粉含量随生长发育的变化均呈先升高后降低的趋势, 并均于种植后 120 d 时达到最高, 但‘毕克齐’的异淀粉酶(*ISA*)活性在整个膨大期均高于‘大和长芋’。(2) 成功克隆获得山药 *ISA3* 开放阅读框长 1 584 bp, 编码 527 个氨基酸; *ISA3* 为亲水性蛋白。(3) 不同品种块茎在膨大时期的 *ISA3* 基因表达趋势不同, ‘毕克齐’中呈先显著上调随后下调, 而在‘大和长芋’中表达总体下调, 且在山药的叶、茎和块茎中均有表达, 存在明显的组织特异性。(4) *ISA* 活性与山药淀粉及支链淀粉含量呈显著和极显著正相关关系, 但 *ISA* 活性与 *ISA3* 的表达量呈负相关关系。研究表明, 异淀粉酶参与了山药块茎中淀粉的合成, 且主要对支链淀粉的合成起关键作用, *ISA3* 基因的表达可能对异淀粉酶活性和淀粉的合成起负调控作用。

关键词: 山药; 异淀粉酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785; Q789; S632.1 **文献标志码:** A

Cloning of Isoamylase Gene in Yam and Its Role in Starch Metabolism

ZHAO Lingmin¹, ZHANG Yanfang¹, XING Li'nan¹, GE Mingran¹,
LIU Xiaoyan², HUO Xiuwen^{1*}

(1 Inner Mongolia Key Laboratory of Wild Peculiar Vegetables Germplasm Resources and Germplasm Enhancement, College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; 2 Ordos Agricultural and Animal Husbandry Research Institute, Ordos, Inner Mongolia 017000, China)

Abstract: In order to study the role of the isoamylase gene (*ISA3*) in the metabolism of yam tuber starch, we used Bikeqi yam and Dahechangyu yam as the measure to determine the starch and its component content and isoamylase (*ISA*) activity. The RT-PCR technology has been used to clone the open reading frame of *ISA3*. The bioinformatics analysis were performed. Expression of *ISA3* gene in different swelling stages tuber and among different tissues of yam was analyzed. The results showed that: (1) the amylose, amylopectin and total starch contents of Dahechangyu yam are significantly higher than Bikeqi yam, and the starch content of the two varieties showed a trend of first increase and then decrease with the change of growth and development, it reached the highest level at 120 d after planting. However, the *ISA* activity of Bikeqi yam was higher than that of Dahechangyu yam during the whole expansion period. (2) We successfully isolated an isoamylase gene (*ISA3*) from yam variety Bikeqi and Dahechangyu. Its se-

收稿日期: 2022-05-20; 修改稿收到日期: 2022-09-22

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

作者简介: 赵令敏(1994—), 女, 博士研究生, 主要从事蔬菜种质资源与育种方面的研究。E-mail: 1844632035 @qq.com

* 通信作者: 霍秀文, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事蔬菜种质资源与育种方面的研究。E-mail: huoxiuwen@imau.edu.cn

quence length is 1 584 bp and encodes 527 amino acids. ISA3 is a hydrophilic protein and non-transmembrane structure. (3) In different periods of yam tuber expansion of 2 varieties with different starch contents, ISA3 gene expression increases first and then decreases in Bikeqi yam, but gradually decreases in Dahechangyu yam. It is expressed in the leaves, stem and tuber, and there is obvious tissue specificity. (4) ISA activity was extremely significantly and significantly positively correlated with yam starch content and amylose content. Nevertheless, ISA activity was negatively correlated with the expression of ISA3. This result suggests that ISA is involved in the synthesis of starch in tubers and play a key role in the synthesis of amylose, and ISA3 expression may play negative regulation of ISA activity and starch synthesis.

Key words: yam; isoamylase; gene cloning; expression analysis

山药 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 为薯蓣科 (*Dioscoreaceae*) 薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 具有双子叶特性的单子叶植物^[1]。山药是世界上十大根茎类作物之一, 为全球超过 3 亿人提供粮食和经济来源^[2]。山药以块茎为主要的产品器官^[3-4], 其中淀粉作为山药块茎的主要成分, 也是主要的热量来源, 约占干物质含量的 80%^[5]。淀粉不仅可以提供山药生长发育所需要的物质和能量, 在生物工业中也有广泛的应用^[6]。

山药块茎内淀粉积累、直链淀粉和支链淀粉比例调控对山药品质改良有积极意义^[7]。支链淀粉主要由可溶性淀粉合成酶 (starch synthases, SSS)、淀粉分支酶 (starch-branching enzymes, SBE) 和淀粉去分支酶 (starch debranching enzyme, DBE) 催化^[8]。DBEs 根据催化底物的不同可分为普鲁蓝酶 (pullulanase, PUL) (EC3. 2. 1. 41) 和异淀粉酶 (isoamylase, ISA) (EC3. 2. 1. 68)。异淀粉酶是植物器官中淀粉结构和数量的关键决定因素, 在一定程度上决定淀粉支链和直链的比例^[9]。异淀粉酶最早是在细菌中发现的, 催化水解支链淀粉分支点上的 (1, 6)- α -葡萄糖基键。此外, 对异淀粉酶基因的功能已经在多种植物中研究。例如, 在水稻^[10]、拟南芥^[11]、马铃薯^[12]、大麦^[13]、甜玉米^[14] 作物中均被证明 ISA 基因的缺失会导致淀粉颗粒的形成。异淀粉酶有 3 种同工型酶, ISA1、ISA2、ISA3, 形成 3 种同工酶聚合物行使其功能, ISA 基因引起支链淀粉的积累异常, 从而参与淀粉的生物合成。

迄今, 已经有大量的 ISA 基因在植物中被克隆和研究, 而山药中的 ISA 基因还没有被充分发掘。本研究通过测定山药块茎淀粉及其组分含量、ISA 活性, 并基于本课题组前期的山药转录组测序结果, 克隆得到 ISA3 基因并对其进行生物信息学分析, 分析其在山药块茎膨大不同时期及其不同组织的表达情况, 进一步探讨了不同淀粉含量的山药块茎淀粉积累规律与淀粉代谢相关酶 ISA 活性及 ISA3 基

因表达量之间的相关性, 挖掘影响块茎淀粉积累的关键因子, 为进一步研究 ISA3 基因在山药块茎淀粉代谢中的功能和发掘调控淀粉代谢相关基因提供重要参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以内蒙古‘毕克齐’(B1) 和‘大和长芋’(DHCY) 山药为试验材料, 于 2021 年 5 月初种植于内蒙古农业大学山药种质资源圃。取样时期为种植后的第 90 天、105 天、120 天、135 天和 150 天。取样时选择长势均匀一致的植株, 每个品种各选取 3 株混样作为一个生物学重复, 共 3 次重复。分别取山药的块茎、茎及幼嫩叶片各 1 g, 用锡箔纸包裹, 液氮中速冻, 置于 -80 °C 冰箱, 用于 RNA 的提取及酶活性测定。

1.2 试验方法

1.2.1 淀粉含量及异淀粉酶活性测定 参考何洁等^[15] 双波长法对山药块茎不同膨大时期的淀粉、直链淀粉和支链淀粉含量进行测定。参考 Liang 等^[16] 的方法对异淀粉酶活性进行测定, 以支链淀粉为底物, 用 DNS 法测定山药块茎中异淀粉酶活性。每个样品 3 次重复。

1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成 采用 RNA 提取试剂盒 (MiniBest Plant RNA Extraction Kit) 分别提取 B1、DHCY 不同发育时期块茎、茎及幼嫩叶片的总 RNA, 通过试剂盒 (PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 反转录成单链 cDNA。

1.2.3 ISA3 的 ORF 克隆 根据本课题组前期高通量测序获得的山药转录组结果筛选异淀粉酶基因-ISA3 (Unigene0001496)。通过 Primer Premier 5.0 软件在 ISA3 的开放阅读框 (ORF) 两端设计引物进行 PCR 扩增 (表 1)。反应体系为: Extaq 25 μ L, ISA3-ORF-F/R (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。反应程序为: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s; 56 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 2

min;30 个循环;72 ℃延伸 10 min。扩增产物经回收、连接转化后,将阳性克隆送至华大基因测序。

1.2.4 生物信息学分析 在 NCBI 数据库中查找和翻译 ISA3 基因 cDNA 序列的 CDS;利用在线分析软件 Prot Scale(<http://www.expasy.org/tools/protscale/>)进行疏水性、亲水性预测;利用 Prot Param(<http://www.expasy.org/tools/protparam/>)在线分析软件对 ISA3 编码的蛋白进行理化性质分析;利用 NCBI 的 CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行保守结构域分析;运用 SOPMA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测 ISA3 蛋白的二级结构;将 NCBI 数据库中的 BLAST 氨基酸序列进行同源搜索和比对;利用 MEGA5.0 构建系统进化树。

1.2.5 ISA3 基因表达分析 采用 TB Green™Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus),Bulk 试剂盒。以山药的 18S 为内参基因,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。反应体系为:cDNA 2 μL(200 ng·L⁻¹),ISA3-qF/R 各 1 μL(10 μmol·L⁻¹),TB Green Premix Ex Taq II 25 μL,ddH₂O 1 μL。反应程序:95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,共 40 个循环;溶解曲线:95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s;每个样品重复检测 3 次。利用 2^{-ΔΔCT} 法计算基因的相对表达量。

1.2.6 相关性分析 将淀粉及其组分含量、异淀粉酶活性及其 ISA3 基因的表达量进行相关性分析。采用 Excel 2010 应用软件进行数据处理和绘图,采用 SPSS25.0 统计分析软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 山药块茎淀粉含量及异淀粉酶活性

对 2 个品种山药块茎不同膨大时期的直链淀粉、支链淀粉和总淀粉含量进行测定,结果表明,2 个品种山药的总淀粉含量在块茎膨大过程中总体呈先升高后降低的变化趋势,但其淀粉含量差异较大:‘毕克齐’(B1)的淀粉含量范围为 28%~82%,最高可达 81.31%,且在 120 d 时期淀粉含量显著高于其他时期;‘大和长芋’(DHCY)的淀粉含量范围为 55%~95%,最高可达 94.06%,同样在 120 d 时期淀粉含量显著高于其他时期。

同时期品种间比较发现(图 1, I),除 135 d 外,其余时期 DHCY 的淀粉含量均显著高于 B1。在块茎膨大过程中,B1 和 DHCY 的直链和支链淀粉含量

表 1 ISA3 基因的引物序列		
Table 1 Primer sequences of ISA3		
引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	引物序列 Prime sequence(5'→3')
ORF	ISA3-ORF-F	ATGAGTCTCCGCTCATTACAG
	ISA3-ORF-R	TGGTTTGTCTCCATAAGAACA
qRT-PCR	ISA3-qF1	GATTGGACTCGAGCATTTGTGGTAG
	ISA3-qR1	GCTTCTCAGGAGTTCAAGCAGATGG
18S rRNA	18S F1	GATCGGAGTAATGATTAACAG
	18S-R1	TTATGGTTGAGACTAGGACG

也呈先上升后降低的变化趋势。支链淀粉含量变化较大,在 T₁ 已经进入快速积累期,在 T₃ 时 B1 和 DHCY 的支链淀粉含量均显著高于其他时期,T₁~T₅ 期间 DHCY 的支链淀粉含量均显著高于 B1(图 1, II)。但 2 个品种山药块茎直链淀粉含量均一直维持较低水平,且在 2 品种之间变化趋势不明显,DHCY 的直链淀粉含量高于 B1,但未达到显著水平(图 1, III)。

2 个品种山药块茎不同膨大时期的异淀粉酶 (ISA)活性测定结果(图 1, IV)显示,在整个膨大期,B1 的酶活性均高于 DHCY,酶活性从 T₁ 开始增加,至 T₃ 开始下降,且仅在 T₃ 时期 2 个品种山药的 ISA 活性呈显著性差异。

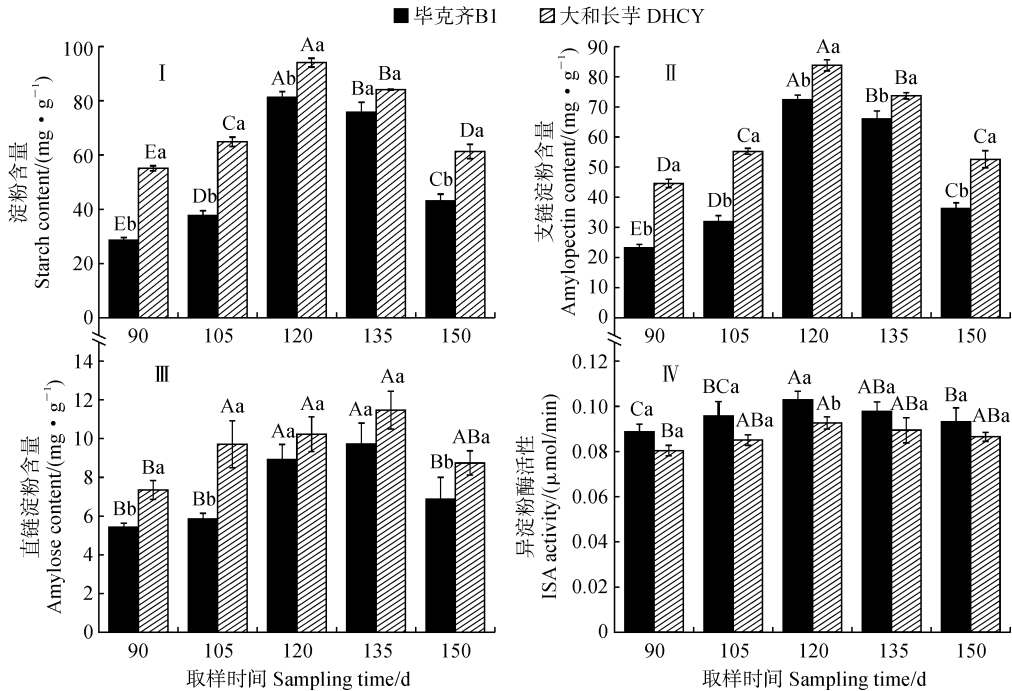
2.2 ISA3 基因的克隆

以山药块茎总 RNA 反转录 cDNA 为模板,使用 ISA3-ORF-F 和 ISA3-ORF-R 为引物,进行 PCR 扩增,获得大小约为 1 500 bp 的条带(图 2)。经测序后表明 ISA3 基因的 ORF 片段长 1 584 bp,共编码 527 个氨基酸(图 3)。

2.3 ISA3 蛋白序列和进化分析

对山药 ISA3 蛋白理化性质分析,预测 ISA3 基因编码蛋白的理论分子量为 60.21 kD,分子式为 C₂₇₀₃H₄₀₅₄N₇₄₀O₇₈₃S₂₄,总原子数 8 304,等电点为 6.15。ISA3 蛋白的总平均疏水性为-0.484,预测为亲水性蛋白。CDD 分析显示,ISA3 蛋白含有 AmyAc_Glg_debranch(alpha amylase catalytic domain found in glycogen debranching enzymes)结构域。SOPMA 分析预测 ISA3 蛋白的二级结构,该蛋白主要由 α 螺旋(h)、β 转角(t)、无规则卷曲(c)和延伸链构成,其中无规则卷曲最多,占氨基酸序列的 51.04%,其次为 α 螺旋(24.10%)和延伸链(18.60%),β 转角最少(6.20%)。

选取 NCBI 中 Blastp 搜索与其序列一致性较高的单子叶和双子叶植物 ISA3,以及广泛研究的水稻、玉米等物种的 ISA3 蛋白,构建系统进化树(图 4)。结果表明,山药 ISA3 蛋白与同为薯蓣科的几内

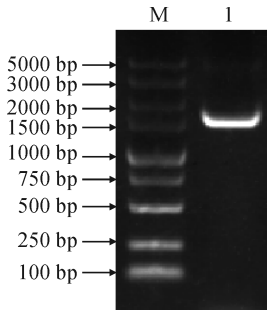


取样时期为种植后的天数;不同大写字母表示同一品种不同取样时间之间的显著差异($P<0.05$);
不同小写字母表示不同品种同一取样时间的显著差异($P<0.05$);图 5 同

图 1 山药块茎膨大期淀粉组分含量及异淀粉酶活性的变化

Different capital letters indicate significant differences among different sampling times of the same variety ($P<0.05$);
Different normal letters indicate significant differences among different varieties at the same sampling time ($P<0.05$); The same as Fig. 5

Fig. 1 Changes of starch and component contents and starch debranching enzyme activity during
the expansion stage of yam tubers



M. DL5000; 1. PCR 产物

图 2 ISA3 的 ORF 扩增

M. DL5000; 1. PCR product

Fig. 2 ISA3 open reading frame amplification

亚山药和参薯的 ISA3 蛋白聚在一个分支。从系统进化树(图 4)可以看出,山药 ISA3 蛋白与小果野蕉、椰子和海枣等单子叶植物遗传距离较近,与辣椒、莲和野大豆等双子叶植物遗传距离较远,而野生稻、小麦和玉米等禾本科单子叶植物则形成另一个分支。

2.4 ISA3 基因的表达分析

对 2 个品种山药 ISA3 基因在不同膨大时期以及不同组织中的表达模式进行分析。结果(图 5)表明,在 B1 中,ISA3 基因的表达量呈先上升后降低

的趋势, $T_1 \sim T_2$ 时期的表达量显著升高随后下降,在 T_2 时期的表达量显著高于其余各时期。而 DHCY 山药中 ISA3 基因的表达呈下降的趋势,在 T_1 之后的表达量显著降低,且其余时期无显著变化(图 5)。2 个品种山药 ISA3 基因不同组织的表达情况(图 6)表明,在 B1 中 ISA3 基因的表达量为块茎>叶片>茎,在 DHCY 中 ISA3 基因的表达量为茎>叶>块茎。结果说明,不同品种山药 ISA3 在不同组织存在特异性表达。

2.5 相关性分析

在山药块茎膨大过程中,分别分析了 2 个品种山药直链淀粉含量、支链淀粉含量、淀粉含量、ISA 酶活性及 ISA3 基因表达之间的相关性。结果(表 2)发现,在 B1 和 DHCY 山药块茎内,淀粉含量与支链淀粉含量、直链淀粉含量之间呈极显著正相关关系。在 2 个品种山药块茎中,ISA 活性与淀粉含量、直链淀粉含量和支链淀粉含量之间均为正相关关系。在 B1 中,ISA 活性与淀粉和支链淀粉含量呈显著正相关关系($r=0.560, 0.565, P<0.05$)。在 DHCY 中,ISA 活性与淀粉和支链淀粉含量呈极显著正相关关系($r=0.775, 0.781, P<0.01$)。在 B1

1 ATGAGTCTCCGCTCATTACAGCTGATGAATCAAGTGGATTGGACTCGAGCATTTGTGGTAGCTATCTTGGTGTATTGAAAAGATCCCA
1 M S L R S F T A D E S S G L D S S I C G S Y L G V I E K I P
91 CATCTTGTGGAAGCTGGGATTAATGCTGTGGAGCTCTTGCAGTTTTTGAGTTGATGAGTTGGAATTCAGAGGTTCCAATCCTAGA
31 H L V E L G I N A V E L L P V F E F D E L E F K R F P N P R
181 GATCACATGATTAAACATGGGGATATCCACAATGAATTTTTTGTCTCTATGAGTCGGTATGCTAGTCTGCTAGTGGAGCTTTGGGT
61 D H M I N T W G Y S T M N F F A P M S R Y A S A G S G A L G
271 GCTTCTCAGGAGTTCAAGCAGATGGTGAAAGCTTTGCATAACCGTGGAAATGAGGTAATTTTGATGTGTGTTATAACCATCAAAATGAA
91 A S Q E F K Q M V K A L H N A G I E V I L D V V Y N H T N E
361 GCTGATGATGAGCACCCTATAACACTTCTTTTGTGGCATTGACAATAAGGTTTACTACATGATGAATTTTGATAACAAAGCGGAATTG
121 A D D E H P Y T T S F R G I D N K V Y Y M M N F D N K A E L
451 CTTAATTTTGTGGCTGTGGAAACACATTAACTGCAACCATCCCATGTGCTGGAACCTGTACTTGACAGTTTGGCGCATTTGGTTAAG
151 L N F A G C G N T L N C N H P I V M E L V L D S L R H W V K
541 GAATACCATGTGGATGTTTCCGCTTTGATCTTGCCAGCGTCTTTTGTCGAGGAAGTGGGACACCTCTTAATGCGCCCCCACTTATT
181 E Y H V D G F R F D L A S V L C R G T D G T P L N A P P L I
631 AAGGCAATTGCTAAGGATCTGCAATGTTCAGATGTAAATAATGCTGAAACATGGGATGTGCTGGAATTTTCTAGTCGGAAGTTT
211 K A I A K D P A L S R C K I I A E P W D C A G L Y L V G S F
721 CCAAATGGGACAGGTGGCTGAATGGAATGGAAATATCGTGATGATATCCGTCGGTTTATAAAGGTGACCTGGTATGAGGGCACT
241 P N W D R W A E W N G K Y R D D I R R F I K G D P G M K G T
811 TTTGCCATAGGATCTCGGATCAGCTGATCTGTATCAGGTGAATAAGGGAAGCCTTATCATAGCATCAACTTTGTCATTGACATGAT
271 F A T R I S G S A D L Y Q V N K R K P Y H S I N F V I A H D
901 GGTCTTCTGTGTATGACCTTGTCTTCTACAATAACAAGCATAAATGAGGCAATGGAGAAAAGGCGAGGATGGAATGACAATTTT
301 G L S L Y D L V S Y N N K H N E A N G E K G R D G C N D N F
991 AGCTGGAATTTGGTTTGAAGGAGAGACAGATGATGTTAATATCACTCATTACGCGCAGCAAAATGAGAAGCTTTCACGTGGCACTA
331 S W N C G F E G E T D D V N I N S L R A R Q M K N F H V A L
1081 ATGATTTCTCAGGGCACCAATGATGTTGATGGGAGATGAATATGGCCACACTCGTTACGGGAACAATAATAGCTATGGGCATGATACT
361 M I S Q G T P M M L M G D E Y G H T R Y G N N N S Y G H D T
1171 TTCTTAATCATTTCAGTGGAACAGTTGGAAGCTAAAAAGGGTAGCCATTTCAGATTTTCTCAGAGATGATAAAGTTTCGTCAACAC
391 F L N H F Q W K Q L E A K K G S H F R F F S E M I K F R H N
1261 CATCTATACTAGGCGTGACAGATTCTTGGCAAAATGATATTACATGGCATGAAGCAGCTGGGTGAACCTGAAAGCAATTCCTC
421 H P I L R R D R F L G K N D I T W H E D D W G N P E S K F L
1351 GCATTTAGCTCCATGATGATAAATTTGGAATGACATCTACTTGGCATCAACGGCATGACTACTTTGCAAGGCTGCAATACCTGTG
451 A F T L H D D K F G N D I Y L A F N A H D Y F V K A A I P V
1441 CCACCGCATAAAAGCAATGGCACCCTGTGGTCGATACAAATCTCAAGTCTCTGATGATTTGTTAGGGAAGGTGACCATCTCTAAA
481 P P H K K Q W H R V V D T N L K S P D D F V R E G V P F S K
1531 GATACGTATAGTCTGTCTCATATTCTCTGTCTTATGGAAGCAAAACATAA
511 D T Y S L A P Y S S V L M E A K P *

图3 ISA3 的 CDS 序列及其推导的氨基酸序列
Fig.3 CDS and its deduced amino acid sequences of ISA3

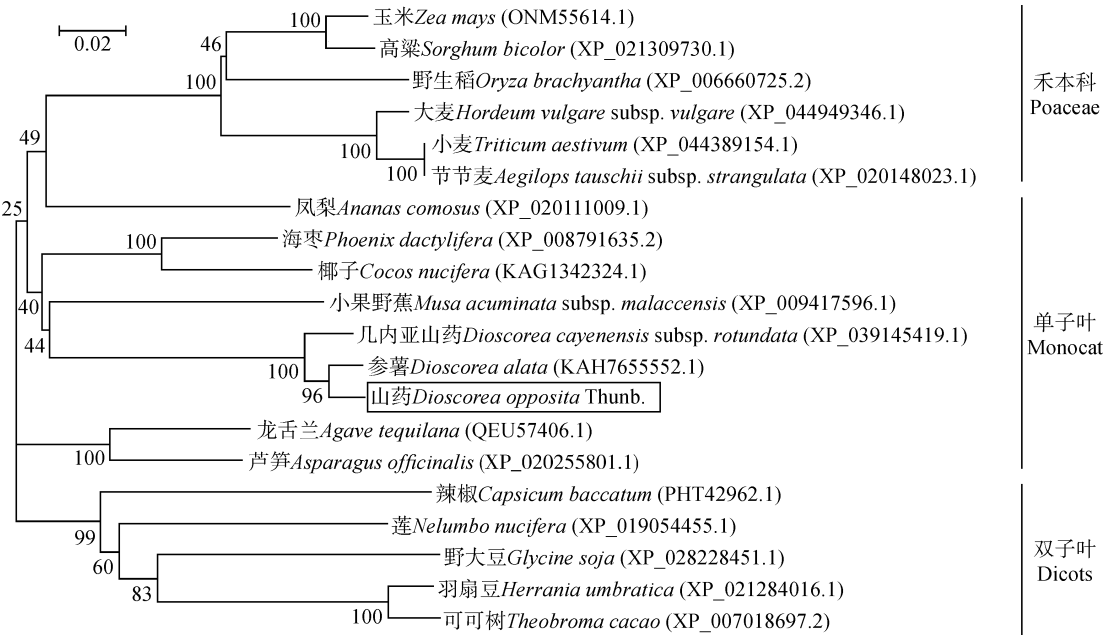


图4 山药 ISA3 氨基酸序列与其他物种同源序列的进化树分析

Fig.4 Evolutionary tree analysis of the amino acid sequence of yam ISA3 and homologous sequences of other species

表 2 山药块茎膨大期淀粉合成关键酶活性及其基因表达量与淀粉含量的相关性

Table 2 Correlation between key enzyme activities of starch synthesis and gene expression and starch content in yam tuber expansion stage						
品种名称 Variety name	指标 Index	直链淀粉含量 Amylose content	支链淀粉含量 Amylopectin content	淀粉含量 Starch content	ISA 活性 ISA activity	ISA 表达量 ISA3 expression
毕克齐 B1	直链淀粉含量 Amylose content	1				
	支链淀粉含量 Amylopectin content	0.907 **	1			
	淀粉含量 Starch content	0.921 **	0.999 **	1		
	ISA 活性 ISA activity	0.457	0.565 *	0.560 *	1	
	ISA 表达量 ISA3 expression	-0.427	-0.346	-0.356	-0.002	1
大和长芋 DHCY	直链淀粉含量 Amylose content	1				
	支链淀粉含量 Amylopectin content	0.676 **	1			
	淀粉含量 Starch content	0.724 **	0.999 **	1		
	ISA 活性 ISA activity	0.485	0.781 **	0.775 **	1	
	ISA 表达量 ISA3 expression	-0.717 **	-0.550 *	-0.580 *	-0.672 **	1

注：* 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上显著相关
Note: * and ** indicate significant correlation at 0.05 and 0.01 levels, respectively

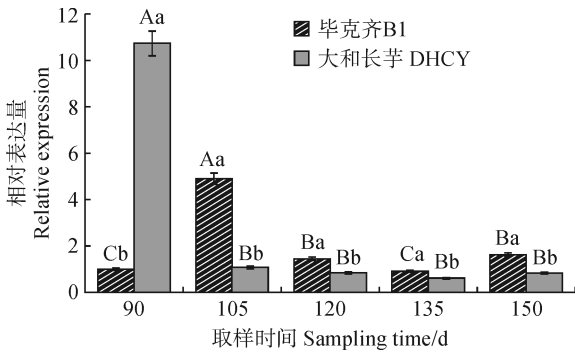
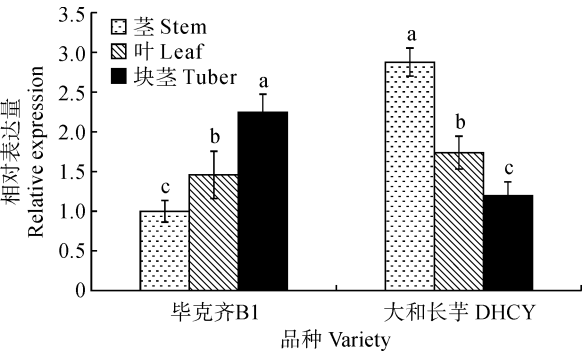


图 5 山药块茎膨大期 ISA3 的表达变化
Fig.5 Changes of ISA3 expression during the tuber expansion of yam



不同小写字母表示不同组织间差异显著
图 6 山药不同组织中 ISA3 的表达
The normal letters mean significance difference among different tissues

Fig. 6 Expression of ISA3 in different tissues of yam

中,ISA 基因表达量与 ISA 活性呈负相关关系,且在 DHCY 中达到极显著负相关关系。

3 讨论

淀粉的合成降解代谢与植物器官的发育密切相关^[17],是影响块茎产量和品质的重要因素^[18]。淀粉在食品以及工业生产上都有着极大的经济价值,因此,对于淀粉的生物合成和降解机理也越来越受到研究者的关注^[19-20]。异淀粉酶是淀粉代谢过程中的关键酶,直接参与支链淀粉的合成^[21]。本研究中 2 个品种山药 ISA 与支链淀粉和淀粉含量呈显著和极显著正相关关系,且在淀粉含量高的品种 DHCY 中的相关性系数高于淀粉含量低的品种 B1。在水稻灌浆过程中非糯品种与糯稻品种异淀粉酶活性变化特性不同,非糯品种呈单峰曲线变化,并且直链淀粉含量低的品种灌浆各时期的酶活性显著高于含量高的品种,胚乳中较高的异淀粉酶活性有利于支链淀粉的合成,而支链淀粉的合成积累却降低了直链淀粉的积累^[22]。野生型拟南芥异淀粉酶的缺失可导致突变系中淀粉的积累减少 90%,并且糖原的积累也减少 90%^[23]。说明异淀粉酶活性有利于支链淀粉的合成,而支链淀粉的合成积累对直链淀粉的积累起到相对抑制的作用。

ISA 编码的 3 种亚型基因已经在很多作物及藻类中分离出来^[24-25],其中包含将淀粉储存在籽粒中的水稻^[26]、玉米^[27]、大麦等^[28],以及淀粉集中在块根(茎)中的木薯、甘薯和山药等作物^[29-30]。本研究采用转录组测序和 RT-PCR 方法,从山药中分离鉴定了 ISA3 基因,蛋白序列分析表明,山药 ISA3 蛋白在结构上含有糖原脱支酶中的 α 淀粉酶催化的

结构域,表明 ISA3 蛋白有淀粉酶催化、降解支链淀粉为糖原等功能。Pawnee 等^[31]克隆了木薯异淀粉酶异构体 3(*MeISA3*)的全长基因,并在大肠杆菌 SoluBL21(DE3)中进行了克隆和表达。在马铃薯中,已经发现了 3 个参与淀粉合成的 ISA 同工酶,分别是 *Stisa1*、*Stisa2*、*Stisa3*,他们分别由 *ISA1*、*ISA2*、*ISA3* 基因编码,*Stisa1* 和 *Stisa2* 通过形成复合体的形式催化水解淀粉,而 *Stisa3* 能够单独参与淀粉的分解过程^[32],因此,由 *ISA3* 基因编码的 *Stisa3* 在淀粉代谢过程中起着至关重要的作用。这些结果表明,*ISA3* 基因参与调控多种不同植物的淀粉代谢。研究发现,不同淀粉含量作物品种的异淀粉酶同工型具有不同的基因表达模式。*ISA3* 的表达量在山药块茎膨大时期呈双峰趋势,与 ISA 酶活性、支链淀粉和淀粉含量变化趋势相反,呈负相关和极显著负相关关系,推测 *ISA3* 基因对 ISA 活性起着负调控作用,从而影响支链淀粉结构及淀粉的合成。*ISA3* 表达模式具有很强的组织特异性,在叶、茎与块茎组织中均有表达,且在不同品种不同组织之间存在特异表达。侯夫云等^[33]为研究甘薯块根淀粉合成酶基因的表达特征,以淀粉含量不同的 2 个品种为试验材料,利用转录组数据克隆了甘薯异

淀粉酶 *IbISA* 的 cDNA 片段,并对块根不同生长期淀粉合成相关酶基因 *IbISA* 的表达进行研究,表明 *IbISA* 基因表达量呈双峰曲线变化,在栽插后 100 d 时表达量达到高峰,低淀粉品种的 *IbISA* 表达量显著高于高淀粉品种。这与本研究结果一致。在玉米的淀粉合成通路中分离 ISA 基因在 30 d 时上调表达,同时也检测到该基因所对应的蛋白也在 30 d 时上调表达,促进支链淀粉的合成^[34]。这与本研究结果不一致,可能是物种不同或 ISA 家族不同基因行使的功能不同所致。Zhu 等^[35]对 *NnISAs* 基因的在莲不同部位的表达模式进行分析表明,*NnISAs* 转录表达水平在叶、叶柄、地下茎、种子和根组织中均可检测到,且 *NnISA3* 的表达模式与 *NnISA1* 和 *NnISA2* 的表达趋势有明显的不同,在叶柄中转录水平较高。不同植物中的 *ISAs* 表达模式也不一定相同,*ISAs* 基因正在从不同的植物中被克隆鉴定,*ISA* 虽不决定植物器官形成,但可能参与调控支链淀粉和淀粉的合成,从而调控植物生长发育的过程。而 *ISA* 在山药中怎样与下游蛋白互作、与哪些通路相关联从而影响山药块茎内淀粉的合成及其在淀粉结构中的功能还需进一步研究。

参考文献:

- [1] EPPING J, LAIBACH N. An underutilized orphan tuber crop—Chinese yam; A review[J]. *Planta*, 2020, **252**(4): 58-62.
- [2] AKAKPO R, SCARCELLI N, CHAÏR H, *et al.* Molecular basis of African yam domestication: Analyses of selection point to root development, starch biosynthesis, and photosynthesis related genes[J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**(1): 782.
- [3] SHAO Y, ZHANG Y F, GUO S C, *et al.* Enhanced carbohydrate metabolism and salinity tolerance of tobacco plants over-expressing a vacuolar H^{+} -ATPase subunit B2 (*DoVHAb2*) gene from yam (*Dioscorea opposita* Thunb.)[J]. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2021, **15**(4): 504-513.
- [4] 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.
WANG J X, JI X, GAO Y L, *et al.* Regulation of *CDPK20* on tuber enlargement of yam[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(2): 189-196.
- [5] ZHANG B, GUO K, LIN L S, *et al.* Comparison of structural and functional properties of starches from the rhizome and bulbil of Chinese yam[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2018, **23**(2): 427.
- [6] 臧玉文, 蒋芳玲, 程雅琪, 等. 红香芋试管球茎膨大过程中主要碳水化合物含量以及淀粉合成相关酶活性的动态研究[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(4): 700-705.
- [7] ZANG Y W, JIANG F L, CHENG Y Q, *et al.* Study on the dynamic changes of the major carbohydrate content and the related enzyme activities during the microcorm development of *Colocasia esculenta* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(4): 700-705.
- [8] PFISTER B, ZEEMAN S C. Formation of starch in plant cells [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, **73**(14): 2 781-2 807.
- [9] SMITH A M. Starch biosynthesis and degradation in plants [J]. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2016, **15**(2): 1-10.
- [10] GOUS P W, FOX G P. Review: Amylopectin synthesis and hydrolysis-Understanding isoamylase and limit dextrinase and their impact on starch structure on barley (*Hordeum vulgare*) quality [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, **62**: 23-32.
- [11] NAGAMATSU S, WADA T, MATSUSHIMA R, *et al.* Mutation in *BE1b* mitigates the negative effect of the mutation in *ISA1* on grain filling and amyloplast formation in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2022, **108**(4): 497-512.
- [12] COSTAIN C. Effects of altered starch metabolism on growth and development of *Arabidopsis thaliana* [D]. University of Guelph, 2020.
- [13] HOU J, LIU T F, REID S, *et al.* Silencing of α -amylase

StAmy23 in potato tuber leads to delayed sprouting[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, **139**: 411-418.

[13] COLLINS H M, BETTS N S, DOCKTER C, *et al.* Genes that mediate starch metabolism in developing and germinated barley grain[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **12**: 1-15.

[14] FACON M, LIN Q H, AZZAZ A M, *et al.* Distinct functional properties of isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves[J]. *Plant Physiology*, 2013, **163**(3): 1 363-1 375.

[15] 何 洁, 闫飞燕, 黄 芳, 等. 双波长法测定薯芋类农产品中直链淀粉和支链淀粉的含量[J]. *食品工业科技*, 2022, **43**(7): 303-309.

HE J, YAN F Y, HUANG F, *et al.* Determination of amylose and amylopectin contents in yam and taros by dual-wavelength spectrophotometry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, **43**(7): 303-309.

[16] LIANG J S, ZHANG J H, CAO X Z. Grain sink strength may be related to the poor grain filling of indica-japonica rice (*Oryza sativa*) hybrids[J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, **112**(4): 470-477.

[17] 胡添翼, 许婷婷, 魏 强, 等. 厚竹高生长过程中竹秆淀粉粒的变化规律[J]. *西北植物学报*, 2021, **41**(11): 1 843-1 852.

HU T Y, XU T T, WEI Q, *et al.* Starch granule changes in bamboo shoots during the elongation growth of *Phyllostachys edulis* ‘pachyloen’[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(11): 1 843-1 852.

[18] 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.

LUO H L, GONG M X, ZHOU Y Y, *et al.* Analysis of starch accumulation and differentially expressed proteins during the development of Chinese yam tuber[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2018, **39**(6): 61-69.

[19] ZHANG Y F, GUO S C, SHAO Y, *et al.* Transcriptome analysis molecular mechanism of starch synthesis during tuber development in Chinese yam (*Dioscorea opposita*) [J]. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2021, **15**(5): 589-597.

[20] 何虎翼, 唐洲萍, 杨 鑫, 等. 马铃薯淀粉合成与降解研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, **35**(4): 101-107.

HE H Y, TANG Z P, YANG X, *et al.* Research progress on potato starch synthesis and degradation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, **35**(4): 101-107.

[21] BLENNOW A, SKRYHAN K, TANACKOVIC V, *et al.* Non-GMO potato lines, synthesizing increased amylose and resistant starch, are mainly deficient in isoamylase debranching enzyme [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, **18**(10): 2 096-2 108.

[22] 朱立楠, 刘海英, 孙璐璐, 等. 水稻灌浆过程中胚乳异淀粉酶基因家族表达特性及其与淀粉含量间关系分析[J]. *中国水稻科学*, 2015, **29**(5): 528-534.

ZHU L N, LIU H Y, SUN L L, *et al.* Analysis of expression characteristics of isoamylase and the correlation with starch content during grain filling in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2015, **29**(5): 528-534.

[23] WATTEBLED F, DONG Y, DUMEZ S, *et al.* Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyglycogen and an abnormal form of amylopectin[J]. *Plant Physiology*, 2005, **138**(1): 184-195.

[24] DESCHAMPS P, MOREAU H, WORDEN A Z, *et al.* Early gene duplication within chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts [J]. *Genetics*, 2008, **178**(4): 2 373-2 387.

[25] STREB S, DELATTE T, UMHANG M, *et al.* Starch granule biosynthesis in *Arabidopsis* is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase[J]. *The Plant Cell*, 2008, **20**(12): 3 448-3 466.

[26] KIM S H, HAMADA T, OTANI M, *et al.* Cloning and characterization of sweetpotato isoamylase gene (*IbIsa1*) isolated from tuberous root[J]. *Breeding Science*, 2005, **55**(4): 453-458.

[27] TAKAHASHI S, KUMAGAI Y, IGARASHI H, *et al.* Biochemical analysis of a new sugary-type rice mutant, Hemisugary1, carrying a novel allele of the *sugary-1* gene[J]. *Planta*, 2020, **251**(1): 1-10.

[28] HUSSAIN H, MARTIN C. Comparative analysis of primary and secondary structure for pea isoamylase isoforms predicts different catalytic properties against glucan substrates[J]. *Starch - Stärke*, 2009, **61**(10): 570-577.

[29] BEYENE D, BAGUMA Y, MUKASA S B, *et al.* Characterisation and role of *Isoamylase1* (*Meisa1*) gene in cassava [J]. *African Crop Science Journal*, 2010, **18**(1): 1-8.

[30] LIN Q H, FACON M, PUTAUX J L, *et al.* Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the *Zea mays* leaf[J]. *The New Phytologist*, 2013, **200**(4): 1 009-1 021.

[31] PANPETCH P, FIELD R A, LIMPASENI T. Cloning of the full-length isoamylase3 gene from cassava *Manihot esculenta* Crantz ‘KU50’ and its heterologous expression in *E. coli*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, **132**: 281-286.

[32] BUSTOS R, FAHY B, HYLTON C M, *et al.* Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**(7): 2 215-2 220.

[33] 侯夫云, 李 丰, 秦 桢, 等. 甘薯淀粉合成相关酶基因的克隆与表达分析[J]. *分子植物育种*, 2019, **17**(23): 7 663-7 668.

HOU F Y, LI F, QIN Z, *et al.* Cloning and expression analysis of starch synthesis related enzyme gene in sweetpotato[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17**(23): 7 663-7 668.

[34] WANG W, NIU S Z, DAI Y, *et al.* The *Zea mays* mutants opaque2 and opaque16 disclose lysine change in waxy maize as revealed by RNA-Seq[J]. *Scientific Reports*, **9**(1): 1-12.

[35] ZHU F L, CHENG N, SUN H, *et al.* Molecular cloning and characterization of a gene encoding soluble starch synthase III (SSS III) in lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. *Biologia*, 2020, **75**(2): 279-288.