

曾文丹, 罗兴录. 2 个淀粉含量不同木薯品种 *SS II* 基因序列及不同生育期淀粉含量比较[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 35–38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.010

2 个淀粉含量不同木薯品种 *SS II* 基因序列 及不同生育期淀粉含量比较

曾文丹^{1,2,3}, 罗兴录³

(1. 广西农业科学院经济作物研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007;

3. 广西大学农学院, 广西南宁 530005)

摘要:以高淀粉木薯品种 FX 01 和低淀粉木薯品种 SC 124 为材料, 探讨可溶性淀粉合成酶基因 *SS II* 序列以及在不同生育期其淀粉特性的差异。结果表明: 在 *SS II* 的编码区发现了 2 个差异位点, 这 2 个位点的突变导致了基因编码的蛋白发生了改变, 分别由谷氨酰胺变成精氨酸和亮氨酸变成苯丙氨酸。在淀粉积累的各个时期, 高淀粉木薯品种 FX 01 的支链淀粉、直链淀粉、总淀粉含量均显著高于低淀粉木薯品种 SC 124。

关键词:木薯; 可溶性淀粉合成酶; 基因; 淀粉

中图分类号: S533.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0035-04

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 别称树薯、木番薯, 是一种富含淀粉的块根作物, 因而有“淀粉之王”“地下粮仓”等美称^[1], 与马铃薯、甘薯并称为世界三大薯类作物。近年来, 由于全球环境、粮食、能源危机的不断加剧, 新兴绿色能源产业越来越受到人们的重视。木薯作为清洁、可再生的新兴生物质能源的代表, 已成为中国绿色能源发展战略的新焦点^[2]。木薯淀粉中直链淀粉约占 17%, 支链淀粉约占 83%, 而高比例的支链淀粉可转变为变性淀粉, 是生产加工的重要原料。因此如何提高木薯支链淀粉的含量是研究的主要目标之一。

已有研究表明, 可溶性淀粉合成酶 (SSS) 在 α -1,4-糖苷键的作用下, 将 ADPG 中的葡萄糖加到侧链的非还原端, 使支链淀粉的分支链进一步延伸和加长, 因此可溶性淀粉合成酶 (SSS) 的主要作用是参与支链淀粉的合成^[3]。可溶性淀粉合成酶基因 (*SS II*) 负责中等长度支链淀粉的合成, 该基因在淀粉构成中发挥着重要作用, 是支链淀粉积累过程中的关键因子^[4-5]。本试验中高淀粉木薯品种 FX 01 是以低淀粉木薯品种 SC 124 为材料, 经过辐射诱变而获得的高淀粉突变体。2 个品种之间除块根淀粉含量有较大差异外, 其他农艺性状相似。本试验探讨高低木薯淀粉品种 *SS II* 基因序列和淀粉特性的差异, 以期对木薯支链淀粉生物合成和分子调控的机理提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 国家“973”计划 (编号: 2010CB126601); 广西壮族自治区自然科学基金 (编号: 2010GXNSFD013025); 广西壮族自治区南宁市科技攻关 (编号: 201109044B)。

作者简介: 曾文丹 (1982—), 女, 湖北随州人, 硕士, 实习研究员, 从事木薯遗传育种研究工作。E-mail: wdzeng08@163.com。

通信作者: 罗兴录, 博士, 教授, 博士生导师, 从事木薯育种和种质资源利用及栽培生理研究工作。E-mail: luoxinglu@sina.com。

供试材料为高淀粉木薯品种 FX 01 和低淀粉木薯品种 SC 124, 种植于广西大学农学院科研教学基地。于 2012 年 4 月下种。2 个品种设 3 次重复, 随机排列, 田间管理与常规大田生产管理相同。

1.2 取样时间与方法

指标采样时间于木薯块根形成期 (下种后 120 d)、块根膨大期 (下种后 180 d)、块根成熟期 (下种后 240 d)、收获期 (下种后 300 d) 采样。采集鲜样后, 105 ℃ 杀青 30 min 左右, 75 ℃ 烘干至恒质量后粉样过筛。

1.3 *SS II* 基因克隆

1.3.1 RNA 的提取 参照潘华清等的异硫氰酸胍-过柱法^[6]略有修改。

1.3.2 引物设计 根据 GenBank 中木薯 *SS II* 基因 (登录号为 EF667961.1) 序列, 设计引物。*SS II* 上游引物 (p1): 5'-ATGGCATTATAGGATCACTTCCT-3'; *SS II* 下游引物 (p2): 5'-TCACCACTGCTACTTGGCTGCA-3'。

1.3.3 RT-PCR 扩增 cDNA 第一链的合成按照 M-MLV 逆转录酶的操作说明进行, 引物使用随机引物 olig (dT) 18; PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L、p1 和 p2 各 1 μ L、2 \times Gold-Star Best Master Mix 10 μ L、加 RNase free 的 ddH₂O 至 20 μ L; PCR 反应程序: 95 ℃ 预变性 10 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 35 个循环; 再在 72 ℃ 下延伸 10 min。扩增产物加核苷染料后在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。用凝胶回收试剂盒回收目的条带。

1.3.4 PCR 扩增产物的连接及转化 将回收的目的条带与 PUC-TA 进行连接载体。连接体系: 回收产物 1 μ L、PUC-T 载体 1 μ L、Solution Buffer 5 μ L、ddH₂O 3 μ L。将上述组分振荡混匀, 22 ℃ 连接 2 h。将上述连接产物加入到 50 μ L 的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 随机挑取菌液经鉴定后送上海生物工程有限公司测序。

1.4 淀粉含量的测定

淀粉含量测定参照何照范的双波长法^[7]。支链淀粉、直

链淀粉含量测定的波长参照闵义等的方法^[8],直链淀粉含量测定波长为 570 nm,参比波长为 486 nm;支链淀粉含量测定波长为 532 nm,参比波长为 766 nm。用 UV-2501 型紫外分光光度计测定吸光度。

1.5 数据分析

采用 SPSS 18.0 和 Excel 2003 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的检测

以木薯的叶、茎、根混合样为材料提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳(图 1),检测 RNA 的质量。本试验提取的总 RNA 的 28S、18S 条带清楚完整,无拖尾,且 28 S 条带亮度大约是 18 S 条带的 2 倍,点样孔及附近无亮斑,表明 RNA 完整性好,无蛋白质和多糖等杂质污染。核酸蛋白检测仪测定 RNA 的纯度和浓度, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的平均值为 1.87,浓度为 3 100 ng/ μL 。数据表明所提取的 RNA 纯度较高,能够满足后续试验的要求。

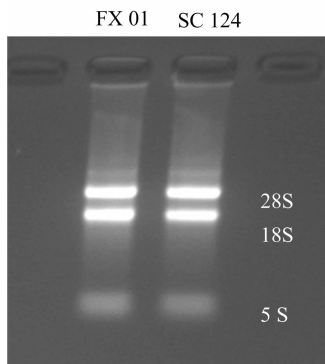


图1 木薯总 RNA 电泳检测

2.2 RT-PCR 扩增产物的鉴定

以逆转录所得的 cDNA 为模板,加引物 p1、p2 进行 PCR 扩增。将扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,如图 2 所示。PCR 产物大小约为 2 200 bp,PCR 产物大小与预期目的片段大小符合。

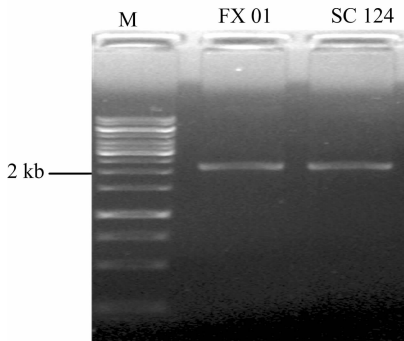


图2 木薯SSII基因的 PCR 扩增

将扩增获得的 SSII 基因与 T 载体连接,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。从转化后的平板随机挑选单菌落震荡培养 3~4 h 后进行菌液 PCR 检测。如图 3、图 4 所示菌液扩增片段大小为 2 200 bp,与 RT-PCR 结果一致,表明为阳性克隆。将阳性菌液送往上海生物工程技术服务有限公司进行测序比对。

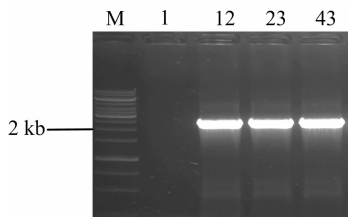


图3 FX 01 的 SSII 基因阳性克隆

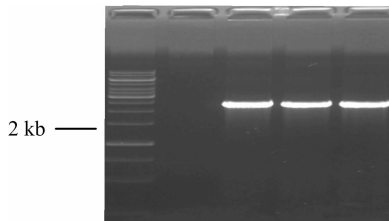


图4 SC 124 的 SSII 基因阳性克隆

2.3 FX 01 和 SC 124 中 SSII 序列的差异分析

在引物和 PCR 条件不变的情况下,以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。凝胶电泳结果显示,从 FX 01 和 SC 124 中扩增的条带大小相同,表明 SSII 在 FX 01 和 SC 124 中大小相同。通过测序分析,发现在 SSII 的编码区存在 2 个位点差异,分别在 +272 和 +1800 处,其中 +272 处 SC 124 为 A,而 FX 01 则突变为 G;在 +1800 上,SC 124 为 G,而 FX 01 突变为 T(图 5),这 2 个位点的突变导致了基因编码的蛋白也发生了改变,分别由谷氨酰胺变成精氨酸、由亮氨酸变成苯丙氨酸(图 6),蛋白由极性变成非极性。

2.4 木薯块根淀粉含量的变化

FX 01 和 SC 124 直链淀粉、支链淀粉和总淀粉含量的变化均是随着生育期的推移而不断增加(表 1)。整个生育期内,FX 01 块根直链淀粉、支链淀粉及总淀粉含量均高于 SC 124。在木薯块根形成期,高低木薯品种 FX 01 与 SC 124 块根的直链淀粉、支链淀粉及总淀粉含量差异均不显著,而在木薯的块根快速膨大期、块根成熟期及收获期,FX 01 块根直链淀粉、支链淀粉及总淀粉含量均极显著高于 SC 124。

3 讨论与结论

SS 基因在支链淀粉合成中起着重要的作用,研究表明,如果 SS 基因发生突变或通过转入反义 SS 基因,该基因的结构将发生改变,从而引起可溶性淀粉合成酶的活性降低,最终导致支链淀粉含量也随之变化^[9]。谭彩霞等通过 RNAi 技术转化马铃薯,其结果表明马铃薯中淀粉粒的结构和形态也随之发生了改变,与此同时马铃薯中 SSIII 基因的表达量减少,从而使 SSS 酶活性也受到影响,最终造成直链淀粉含量上升而支链淀粉含量却迅速下降^[3]。对拟南芥 SSIV 突变体的研究发现其淀粉含量有所减少但支链淀粉和直链淀粉的比例并未发生变化,链长分布也未发生改变^[10-11]。王平荣等用 EMS 诱变获得的突变体植株中,有 3 个突变体的 OsDVR 碱基突变位点和数目不同,从而导致编码蛋白的氨基酸发生突变,造成了它们在叶绿素含量、叶绿素组成、植株表型以及主要农艺性状和单株产量极显著差异^[12]。

本试验中,在 SSII 的编码区发现了 2 个位点差异,在

SC124	1	ATGGCATTATAGGATCACTTCCTTTATTATCCAAACCAAGCAGAAAGTTCTGCTCTT	60
FX01	1	60
SC124	61	CTCCATGACAAAAACCTACAGCGATCCAGATTCTCCGTTTTCCCATGTAGATCACAAC	120
FX01	61	120
SC124	121	TCTTTTAATTTAGCCGTTTCGTTATCTTTGAGTTTAAAGCCTGTAAGAGCTACAGGTAAG	180
FX01	121	180
SC124	181	GAAGGCCGTATAGTGGTGATGGGTCAGAGGATACACTTCAAGCCACCATCGAGAAAAGCAAG	240
FX01	181	240
SC124	241	AAAGTTCTCGCCTTGCAAAGGACCTACTTCAGAAGATTGCTGAAAGAAGGAAATTTGGTT	300
FX01	241G.....	300
SC124	301	TCTTCTATACAAAGTAGTGTGGTGACCACGACACAAACAAACTTCTCATGAACAGAGG	360
FX01	301	360
SC124	361	GAAAACTCTTGCCAAATTCAGATAATACTTCAACTAGTGATGTGAATATGCACCAACAG	420
FX01	361	420
SC124	421	CAAAATGGCCAGTTCTTCCGAGTAGCTATGTCCATTCAACTGCAGATGAGGTATCAGAA	480
FX01	421	480
SC124	481	ACTGCATCTCGGCTATTAATAGAGGTGATGCTAAAGATGATAAGGAACCTGAACAACAT	540
FX01	481	540
SC124	541	GCATCTCTAGAACAGCCTTTGTTAAGAATTCTACCAACAGTTTAAAGAGATGGATTCT	600
FX01	541	600
SC124	601	GAGAACTACAGACAGATGAGATACCATCTTTCTTTCAAAACCCACAGATATTCCACT	660
FX01	601	660
SC124	661	ATAAATGAAGAAAATAGTGAACATTCAAATGAATCAACCTCACCTATGGTTGACATTTT	720
FX01	661	720
SC124	721	GAAAGTGATTCTATGACTGAAGACATGAAGCCACCTCCTTTGGCTGGGACAAATGTCATG	780
FX01	721	780
SC124	781	AATGTTATTTTGGTAGTCGAGAATGTGCTCCATGGTCCAAAACAGTGGCCTTGGTGAT	840
FX01	781	840
SC124	840	GTCGCTGGATCTTTACCAAAGCCTTGGCTCGGCGTGGACATCGGGTTATGGTTGGCA	900
FX01	841	900
SC124	901	CCGCGATATGGCAACTATGTTGAACCTCAGGATACTGGAGTCGAAAGAGGTATAAGGTG	960
FX01	901	960
SC124	961	GATGGTCAGGATTTTGAAGTATCATACTCCAAGCCTTCATTGATGGGGTTGATTTGTA	1020
FX01	961	1020
SC124	1021	TTCATTGACAGTCCTATGTTTCGCCACATAGGGAATGATATATATGGAGGAAACAGAATG	1080
FX01	1021	1080
SC124	1081	GATATATTAAAGAGGATGGTATTATTTTGCAAAGCTGCTGTTGAGGTTCTTGGCATGTC	1140
FX01	1081	1140
SC124	1141	CCATGTGGTGGAGTCTGCTATGGGGATGGAAATTTGGCTTCATTGCAAAATGATGGCAT	1200
FX01	1141	1200
SC124	1201	ACAGCATTTGTTGCCAGTGTATCTGAAGGCATATTATCGGGATAATGGTTTAAATGCAATAT	1260
FX01	1201	1260
SC124	1261	ACAAGATCTGTTCTTGTAAATTCATAACATAGCTCACCAGGGTCGGGGTCCAGTGGATGAT	1320
FX01	1261	1320
SC124	1321	TTCTCTACGTTGGTCTACCAGAACATTACATTGATCTCTTCAAACATGCATGATCCGATT	1380
FX01	1321	1380
SC124	1381	GGTGGTGACCACTTCAATATCTTTGCAGCTGGTCTTAAGGTGGCAGATCGTGTGGTTACT	1440
FX01	1381	1440
SC124	1441	GTTAGTCATGGATACGCTGGAGCTTAAACATCTGAAGGTGGTTGGGGTCTGCACAAT	1500
FX01	1441	1500
SC124	1501	ATCATAAATGAGAACGACTGGAAATTGCAGGGCATTGTTAATGGGATTGATGCCAAAGAA	1560
FX01	1501	1560
SC124	1561	TGGAATCCACAGTTTGATAATCAACTGACATCAGATGGTTATACTAACTATTCCCTGGAA	1620
FX01	1561	1620
SC124	1621	ACACTTGATACTGGCAAGCCTCAGTGAAGGCAGCCTTACAGAAGGAGCTTGGTTTGCCC	1680
FX01	1621	1680
SC124	1681	ATCCGTCCAGATGTCCTGTTATTGGGTTTCATTGGAAGGTTGGATTATCAGAAAGGTGTC	1740
FX01	1681	1740
SC124	1741	GATCTCATAGCTGAGGCAATTCCTGGATGGTGGGTGAGGATGTGCACTAGTAATGTTG	1800
FX01	1741T.....	1800
SC124	1801	GGTACTGGCAGACAAGACTTGAAGAGATGCTTAGACAATTTGAAACCAACATAGAGAT	1860
FX01	1801	1860
SC124	1861	AAAGTGAGGGGATGGGTGGTTTTCTGTGAAGACAGCTCACAGGATAACTGCTGGTGCA	1920
FX01	1861	1920
SC124	1921	GATATTTTGCTCATGCCATCAAGATTGAACCATGTGGGTAAACCAGTTATATGCTATG	1980
FX01	1921	1980
SC124	1981	ATGTACGGGACGATTCTGTAGTGCACGCTGTGGGTGGACTAAGGGACACGGTCAACCT	2040
FX01	1981	2040
SC124	2041	TTCGATCCATTTAATGAGTCGGGGCTTGGGTGGACATTTGATAGCGCTGAATCACATAAA	2100
FX01	2041	2100
SC124	2101	CTGATACATGCATTAGGCAATTGCTTGCTCACTTACCGAGAGTACAAGAAGAGCTGGGAA	2160
FX01	2101	2160
SC124	2161	GGACTGCAGAGAAGAGGGATGACTCAAAACCTCAGCTGGGACCATTGCTGCTGAGAAATAT	2220
FX01	2161	2220
SC124	2221	GAGGAGACTCTTG	2256
FX01	2221	2256

图5 FX 01和SC 124 SS// 序列比较

SC124	1	MAFIGSLPFI IQTKAESSVLLHDKNLQRSRFSVFPQRSQNSFNLA VLSLSFKPVRATGK	60
FX01	1	60
SC124	61	EGVSGDGEDTLQATIEKSKKVLALQRDLLQKIAERRKLVS SIQSSVGDHDTNKTSHEQR	120
FX01	61 R.....	120
SC124	121	ENSLPNSDNTSTSDVNMHQQNGPVLPS SYVHSTADEVSETASSAINRGHAKDDKELEQH	180
FX01	121	180
SC124	181	ASPRTAFVKNSTKQFKEMDSEKLQTDEIPSFLSNTTDISTINEENSEHSNESTSPMVDIF	240
FX01	181	240
SC124	241	ESDSMTEDMKPPPLAGDNVMNVILVAAECAPWSKTGG LGDVAGSLPKALARRGHRVMVVA	300
FX01	241	300
SC124	301	PRYGYVEPQDTGVRKRYKVDGQDFEVS YFQAFIDGVDFVFIDSPMFRHIGNDIYGGNRM	360
FX01	301	360
SC124	361	DILKRMVLFCKAAVEVPWHVPCGGVCYGDGNLAFIANDWHTALLPVYLKAYYRDNGLMQY	420
FX01	361	420
SC124	421	TRSVLVIHNIAHQGRGPVDDFSYVGLPEHYIDLFLHDP IGGDHFNIFAAGLKVADRVVT	480
FX01	421	480
SC124	481	VSHGYAWELKTSEGGWGLHNIINENDWKLQGIVNGIDAKEWNPQFDIQLTSDGYTNYSLE	540
FX01	481	540
SC124	541	TLDTGKPQCKAALQKELGLPIRPDVPVIGFIGRLDYQKGVDLIAEAI PVMVGQDVQLVML	600
FX01	541 F	600
SC124	601	GTGRQDLEMLRQFENQHRDKVRGVWGF SVKTAHRITAGADILLMPSEFCPLNQLYAM	660
FX01	601	660
SC124	661	MYGTIPVHAVGGLRDTVQPFDPFNESGLGWTFS AESHKL IHALGNCLLT YREYKKSWE	720
FX01	661	720
SC124	721	GLQRRGMTQNLSDWHA AEKYEETLVAAKYQW	751
FX01	721	751

图6 FX 01和SC 124 SS // 编码蛋白序列比较

表 1 不同木薯品种在不同生育期干样直链淀粉含量												%
品种	直链淀粉含量(%)				支链淀粉含量(%)				总淀粉含量(%)			
	120 d	180 d	240 d	300 d	120 d	180 d	240 d	300 d	120 d	180 d	240 d	300 d
FX01	11.5a	14.8Aa	16.8Aa	17.2Aa	48.9a	65.2Aa	72.4Aa	75.2Aa	60.4a	80.0Aa	89.2Aa	92.4Aa
SC124	10.3a	12.0Bb	13.3Bb	13.5Bb	43.0a	55.8Bb	57.6Bb	59.1Bb	53.3a	67.8Bb	70.9Bb	72.6Bb

注:同列数据后不同大、小写字母分别表示处理间差异达 0.01、0.05 显著水平。

+272 上,SC 124 为 A,而 FX 01 则突变为 G;在 +1 800 上,SC 124 为 G,而 FX01 突变为 T,这 2 个位点的突变导致了密码子发生改变从而导致其编码的氨基酸发生变化,分别由谷氨酰胺变成精氨酸、由亮氨酸变成苯丙氨酸,最终导致蛋白由极性变成非极性。这可能是导致从块根形成期到收获期,高淀粉木薯品种 FX 01 的支链淀粉、直链淀粉、总淀粉含量均显著高于低淀粉品种 SC124 的原因之一。至于其他淀粉合成关键酶基因有何变化还有待进一步研究。

参考文献:

[1]李永锋,赵光龙,张志强,等. 国内木薯淀粉化学改性的研究进展[J]. 热带农业科学,2007,27(5):64-67,72.

[2]袁圣勇,罗兴录,曾文丹,等. 高低淀粉木薯品种可溶性糖转运、分配与块根淀粉积累的关系研究[J]. 中国农学通报,2013,29(33):153-157.

[3]谭彩霞,封超年,陈静,等. 作物淀粉合成关键酶及其基因表达的研究进展[J]. 麦类作物学报,2008,25(5):912-919.

[4]Dian W,Jiang H,Ping W. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2005,56(412):623-632.

[5]Ling K H, Loos S, Roslir, et al. In silico identification and characterization of a putative phosphatidylinositol 4 - phosphate 5 - kinase (PIP5K) gene in *Eimeria tenella*[J]. In Silico Biology, 2007,7(1):115-121.

[6]潘华清,何龙飞,何海旺. 3 种飞机草总 RNA 提取方法比较研究[J]. 广西农业科学,2009,40(8):957-960.

[7]何照范. 粮油籽粒品质及其分析技术[M]. 北京:农业出版社, 1985:144-150.

[8]闵义,王静,胡新文,等. 遮阴对木薯块根淀粉含量和品质的影响[J]. 热带作物学报,2010,31(7):1057-1062.

[9]余春梅,陈佩季,李季华. 小麦胚乳淀粉合成酶基因研究进展[J]. 麦类作物学报,2004,24(4):123-128.

[10]Roldan I, Wattedled F, Lucas M, et al. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation[J]. The Plant Journal,2007,49(3):492-504.

[11]Szydowski N,Ragel P,Raynaud S, et al. Starch granule initiation in arabidopsis requires the presence of either class IV or class III starch synthases[J]. Plant Cell,2009,21(8):2443-2457.

[12]王平荣,马晓智,李春梅,等. 三个水稻联乙烯还原酶基因突变体的比较研究[J]. 中国农业科学,2013,46(7):1305-1313.