

王立, 殷剑美, 韩晓勇, 等. 芋可溶性淀粉合成酶 *CeSS* 基因家族的克隆和表达分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(4): 939-946.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.04.003

# 芋可溶性淀粉合成酶 *CeSS* 基因家族的克隆和表达分析

王立, 殷剑美, 韩晓勇, 蒋璐, 郭文琦, 金林, 张培通

(江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为探索芋淀粉合成机理, 本研究从靖江香沙芋中克隆获得了 3 个芋可溶性淀粉合成酶 (*CeSS*) 家族基因。3 个基因 *CeSSI*、*CeSSII*、*CeSSIII* 碱基序列全长分别为 1 932 bp、2 409 bp、3 606 bp, 编码形成 3 个亲水性蛋白质。系统进化分析结果显示, 3 个蛋白质 *CeSSI*、*CeSSII*、*CeSSIII* 与海枣、芦笋、药用稻等单子叶植物的亲缘关系较近。表达分析结果表明, 这 3 个 *CeSS* 基因广泛存在于芋的叶片、叶柄、母芋和子芋中。*CeSSI* 和 *CeSSII* 的表达水平随芋球茎的发育而显著增加, 在种植 150 d 达到峰值, 而 *CeSSIII* 在成熟后期(种植 180 d)的芋球茎中表达量较高。

**关键词:** 芋; 可溶性淀粉合成酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S632.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)04-0939-08

## Cloning and expression analysis of three soluble starch synthase genes in taro

WANG Li, YIN Jian-mei, HAN Xiao-yong, JIANG Lu, GUO Wen-qi, JIN Lin, ZHANG Pei-tong

(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To explore the mechanism of starch synthesis in taro, three genes of soluble starch synthase (*CeSS*) family were isolated from Jingjiang Xiangsha taro. The three genes, *CeSSI*, *CeSSII* and *CeSSIII*, were 1 932 bp, 2 409 bp and 3 606 bp in length, respectively, and encoded three hydrophilic proteins. Phylogenetic analysis results showed that three proteins, *CeSSI*, *CeSSII* and *CeSSIII*, were closely related to monocotyledonous plants such as date palm, asparagus and medicinal wild rice. The results of expression analysis indicated that these three *CeSS* genes were widely existed in leaves, petioles, main corms and lateral cormels of taro. The expression levels of *CeSSI* and *CeSSII* increased significantly with the development of taro corms, and reached the peak at 150 d after planting, while the expression level of *CeSSIII* was higher in taro corms at the late maturity stage (180 d after planting).

**Key words:** *Colocasia esculenta* (L.) Schott; soluble starch synthase; gene cloning; expression analysis

淀粉是储存在叶片叶绿体或储存器官中的主要化合物, 被用作种子休眠和植物生长的能量来源, 也

是人类和动物最重要的能量来源, 并被广泛用作工业生产的原料。植物主要合成支链淀粉和直链淀粉, 两者的结构和比例决定了淀粉的理化特性, 如溶胀、溶解性、可塑性和黏度等<sup>[1-2]</sup>。

研究结果显示, 可溶性淀粉合成酶 (SSS) 通过催化形成  $\alpha$ -1,4 糖苷键延长合成具有不同长度的支链淀粉, 决定支链淀粉的链条长度和链长分布, 从而影响支链淀粉的理化性质以及淀粉粒的结构和品质<sup>[2-3]</sup>。SSS 主要存在于植物叶片和贮藏组织, 主要

收稿日期: 2022-06-02

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501776); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20201238); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBGs(2021)010]

作者简介: 王立(1985-), 男, 河南郑州人, 博士, 副研究员, 主要从事芋头遗传育种研究。(E-mail) wljaas@163.com

通讯作者: 张培通, (E-mail) ptzhang1965@163.com

分为4个亚家族,即 *SSI*、*SSII*、*SSIII* 和 *SSIV*,大多存在于质体基质中。*SSI* 主要参与支链淀粉的短链产生,*SSII* 和 *SSIII* 参与支链淀粉的链条延伸<sup>[3]</sup>。研究结果显示,*SSI* 在马铃薯块茎淀粉合成中的酶活性较弱,而在水稻和玉米胚乳中具有较强的活性;下调 *SSII* 的转录水平会影响马铃薯块茎中的链长分布,改变淀粉结构和其他淀粉合成酶活性<sup>[2,4-5]</sup>。此外,*SSS* 每个亚家族又含有同工酶,但是这些同工酶如何影响植物中合成的支链淀粉的数量和组成尚待阐明。目前关于芋可溶性淀粉生物合成的研究相对较少,对于淀粉合成酶的功能尚不清楚。

本研究在靖江香沙芋转录组测序基础上,克隆获得3个芋可溶性淀粉合成酶 *CeSS* 家族基因,通过分析氨基酸序列、蛋白质结构和亲缘进化关系,检测3个基因的转录表达谱,探索其与淀粉丰度形成的关系,从而加快芋可溶性淀粉合成机理的深入研究。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

供试材料为靖江香沙芋,种植于江苏省农业科

表1 *CeSS* 家族基因特异引物

Table 1 Primers of *CeSS* family genes

基因	引物 F		引物 R		用途
	名称	序列(5' → 3')	名称	序列(5' → 3')	
<i>CeSSI</i>	F1	ATGGAGTTCTACGGGTAGCACGCC	R1	TCATCTGACATAAGGAGGATCTAT	基因克隆
<i>CeSSII</i>	F2	ATGGCATCTTTGGGACGAGCTGGGA	R2	TCACCACTGGTACTTGGCAGCAACA	基因克隆
<i>CeSSIII</i>	F3	ATGGATATCTCTCTTCATGCCAGA	R3	CTACTTGGCGGCAGAGTAGTATAGC	基因克隆
<i>CeSSI</i>	F4	GATGGTCGCTGCATTCTTGT	R4	GCCTGGATCAAGAGCATGTG	基因表达
<i>CeSSII</i>	F5	CCATTCCTGATGGTCAGT	R5	TTAACAGGACGTCTGCACCT	基因表达
<i>CeSSIII</i>	F6	GAGCCACAGAATGGCATGTT	R6	ATCCGGGTGAGATCTCTCT	基因表达
<i>Actin</i>	F7	TCTGGCACCACCTTCTAC	R7	GACACACCGTCACCAGAGTC	基因表达

### 1.4 氨基酸序列和进化分析

采用 DNAMAN 完成氨基酸序列同源性比较,在 MEGA v4.0 中构建系统进化树。采用 SMART 在线数据库 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白质结构域预测,在 ExPASy 网站 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 计算等电点和相对分子质量,采用 Cell-PLoc 2.0 package 预测亚细胞定位。

### 1.5 转录表达分析

以 *Actin* 基因为内参基因。采用 SYBR Premix Ex Taq Kit 进行 qRT-PCR 检测,按照试剂盒说明书操作。

学院六合试验基地。分别在种植 60 d、90 d、120 d、150 d 和 180 d 取样。地上部组织取样部位为叶片和叶柄,地下部组织取样部位为母芋、子芋和根。叶片打孔取样,叶柄切段取样,球茎去皮取样,根洗去杂质取样,统一贮存于 -80 °C 冰箱。每个组织取样质量约 1.5 g,设 3 份重复。

### 1.2 cDNA 合成

采用 RNAPrep Pure Plant Kit[天根生化科技(北京)有限公司产品]提取样品 RNA,cDNA 合成采用宝生物工程(大连)有限公司 PrimeScript RT reagent Kit 和 RNA PCR Kit,试验方法参照试剂盒说明书。

### 1.3 基因克隆

根据已获得的靖江香沙芋转录组数据,通过 BLASTx 方法比对获得 *CeSS* 基因信息,使用 Primer Premier 5.0 设计基因克隆引物和基因表达引物(表 1)。PCR 扩增方法参考王立等<sup>[6]</sup>的方法。PCR 扩增产物送北京鼎国科技公司完成序列测定。

定量 RT-PCR 反应体系为 20 μl,程序如下:95 °C 30 s;每循环 95 °C 3 s,60 °C 30 s,40 个循环;最后 95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,每个样品 3 次重复。参考 Livak 等<sup>[7]</sup>的方法计算基因相对表达量。

### 1.6 支链淀粉含量测定

采用何洁等<sup>[8]</sup>双波长法测定芋球茎中的支链淀粉含量。取播种后不同时期球茎干燥样品,质量为 0.1 g,用 1 ml 无水乙醇+9 ml 1 mol/L KOH 研磨,沸水浴加热溶解 10 min,冷却后定容至 100 ml。检测 535 nm、757 nm 下的吸光值,计算支链淀粉含量。

1.7 数据处理

使用 Microsoft Excel 2010 软件和 SPSS 17.0 软件进行试验数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 芋可溶性淀粉合成酶家族基因克隆及序列分析

经过 BLAST 比对, 共鉴定获得 3 个芋可溶性淀粉合成酶 *SS* 基因, 分别命名为 *CeSSI*、*CeSSII*、*CeSSIII*。*CeSSI* 基因碱基序列全长为 1 932 bp, 编码

643 个氨基酸(图 1), 蛋白质相对分子质量和理论等电点分别为 70 795 和 6.02(表 2)。*CeSSII* 基因碱基序列全长为 2 409 bp, 编码 802 个氨基酸(图 2), 蛋白质相对分子质量和理论等电点分别为 88 702 和 5.75(表 2)。*CeSSIII* 基因碱基序列全长为 3 606 bp, 编码 1 202 个氨基酸(图 3), 蛋白质相对分子质量和理论等电点分别为 136 248 和 5.47(表 2)。蛋白质亲水性预测和亚细胞定位预测结果(表 2)显示, 3 个 *CeSS* 蛋白均为亲水性蛋白质, 且均定位在叶绿体。

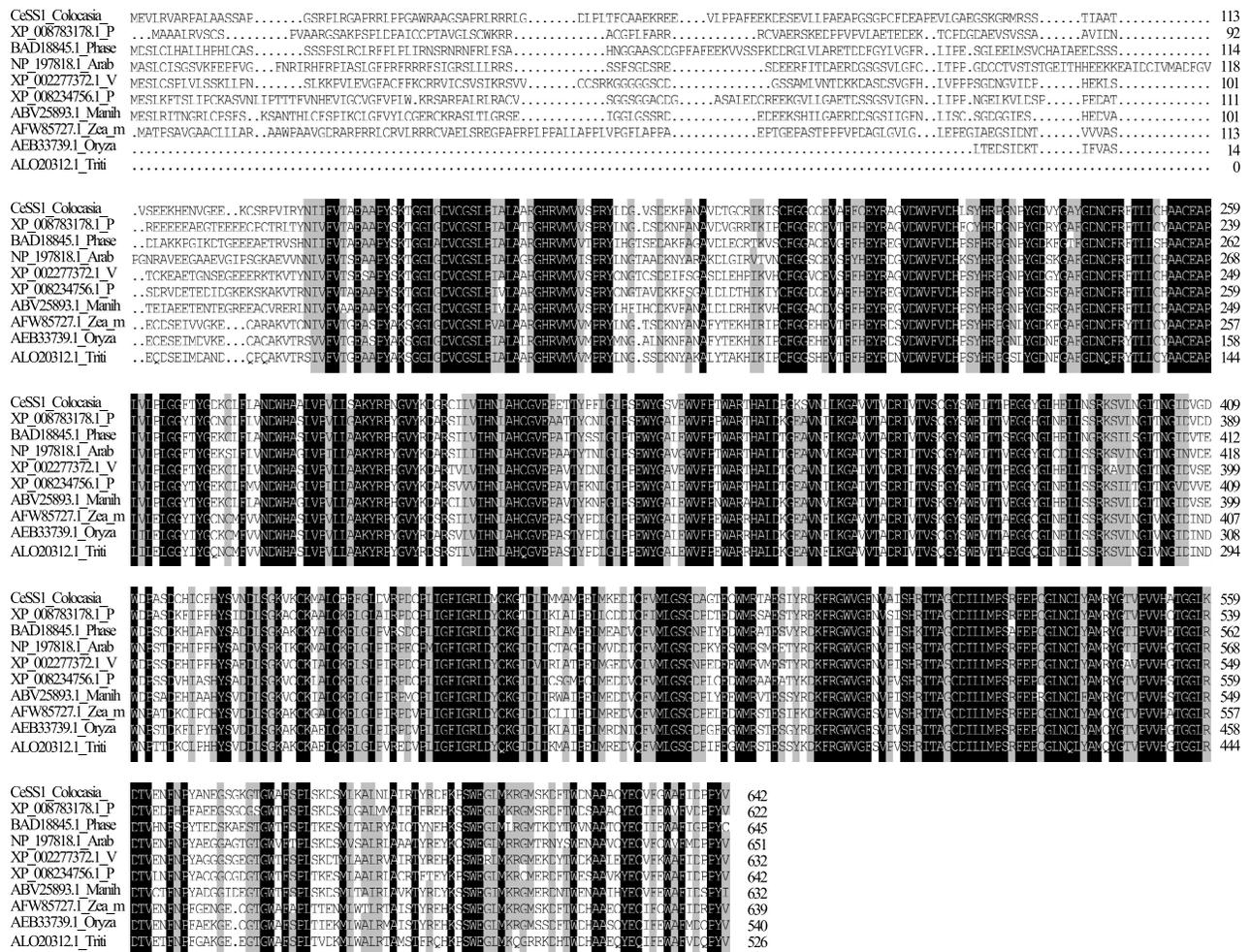


图 1 *CeSSI* 氨基酸序列分析

Fig.1 Amino acid sequence analysis of *CeSSI*

表 2 *CeSS* 基因家族及其编码蛋白质的生化特性

Table 2 Biochemical characteristics of *CeSS* gene family members and their encoded proteins

基因	编码区大小(bp)	氨基酸长度(aa)	蛋白质相对分子质量	理论等电点	疏水指数
<i>CeSSI</i>	1 932	643	70 795	6.02	-0.210
<i>CeSSII</i>	2 409	802	88 702	5.75	-0.350
<i>CeSSIII</i>	3 606	1 202	136 248	5.47	-0.537





55.5%,其次是玉米(*Zea mays*, AFW59498.1)和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP\_172637.2)。

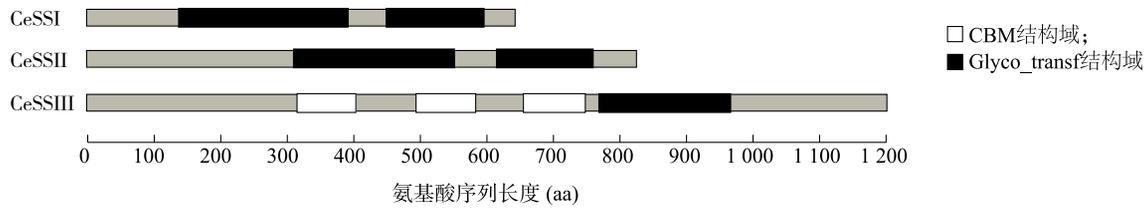
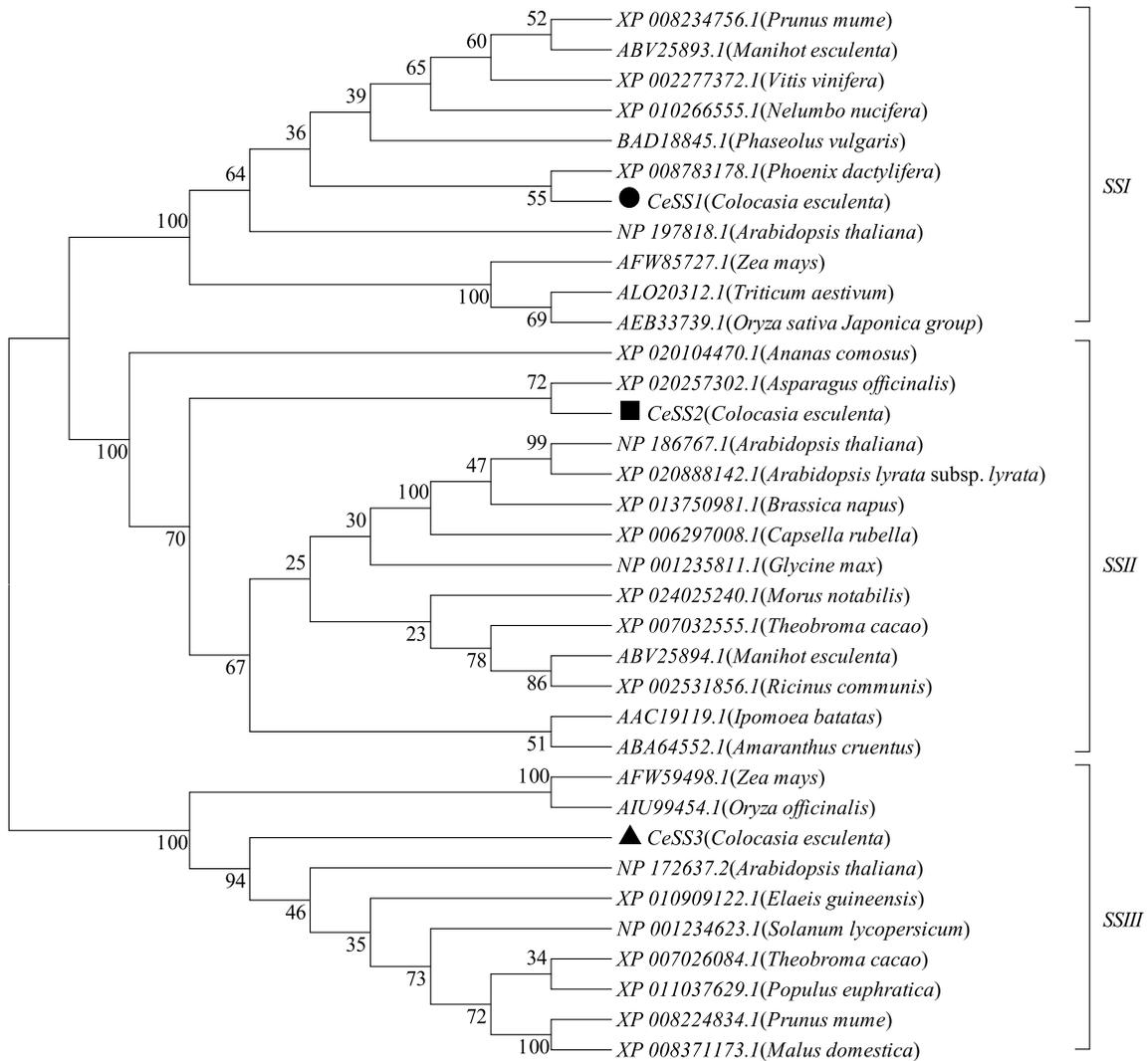


图4 CeSS 蛋白 Pfam 结构分析

Fig.4 Pfam structure of CeSS protein



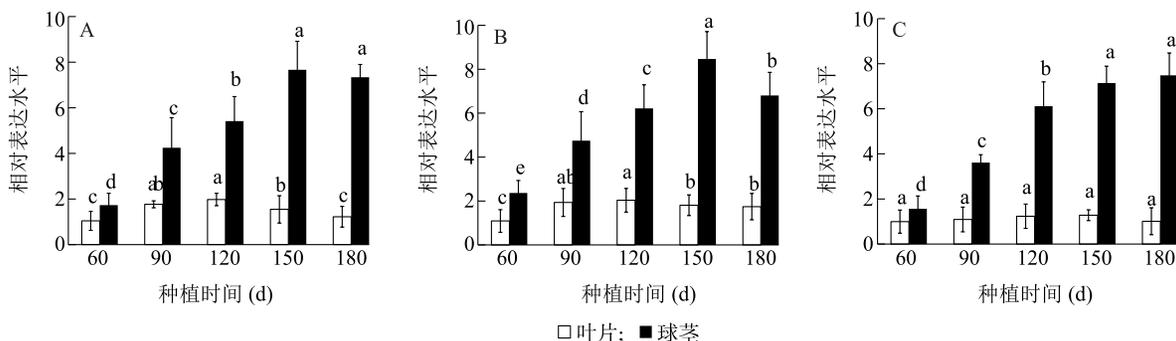
*Amaranthus cruentus*: 繁穗苋; *Ananas comosus*: 菠萝; *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*: 拟南芥琴亚科; *Arabidopsis thaliana*: 拟南芥; *Asparagus officinalis*: 芦笋; *Brassica napus*: 甘蓝型油菜; *Capsella rubella*: 芥菜; *Colocasia esculenta*: 芋; *Elaeis guineensis*: 油棕; *Glycine max*: 大豆; *Ipomoea batatas*: 甘薯; *Malus domestica*: 苹果; *Manihot esculenta*: 木薯; *Morus notabilis*: 川桑; *Nelumbo nucifera*: 莲; *Oryza officinalis*: 药用稻; *Oryza sativa Japonica group*: 粳稻; *Phaseolus vulgaris*: 菜豆; *Phoenix dactylifera*: 海枣; *Populus euphratica*: 胡杨; *Prunus mume*: 梅花; *Ricinus communis*: 蓖麻; *Solanum lycopersicum*: 番茄; *Theobroma cacao*: 可可; *Triticum aestivum*: 小麦; *Vitis vinifera*: 葡萄; *Zea mays*: 玉米。

图5 不同植物 SS 家族基因系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of SS family genes in different plant species

### 2.3 芋可溶性淀粉合成酶家族基因的表达水平分析

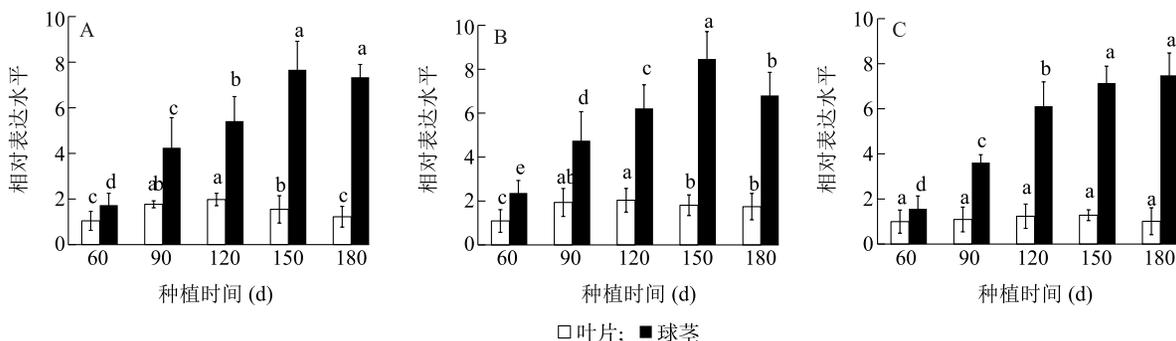
图6显示,芋可溶性淀粉合成酶家族的3个基因 *CeSSI*、*CeSSII*、*CeSSIII* 在芋的不同组织中均有表达,但在母芋和子芋中高表达,在根、叶片和叶柄中低表达,说明同一基因的组织表达谱差异较大;而在同一组织中,尤其是母芋和子芋中,*CeSSII* 基因表达量最高,其次是 *CeSSI* 和 *CeSSIII*。图7显示,在芋发育过程中,叶片中 *CeSSI*、*CeSSII*、*CeSSIII* 基因表达趋势基本不变,而球茎中的表达水平均高于叶片。球茎中的 *CeSSI*、*CeSSII* 基因在种植60 d后表达量开始提高,在种植150 d表达水平达到峰值,随后略有下降;而 *CeSSIII* 基因在种植60 d后在球茎中表达量开始上调,在种植120 d时表达增速最快,随后表达水平趋缓,在种植180 d时表达水平最高。



同一基因不同组织间不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图6 *CeSSI*、*CeSSII* 和 *CeSSIII* 在不同芋组织中的表达

Fig.6 Expression of *CeSSI*, *CeSSII* and *CeSSIII* in different tissues of taro



同一组织间不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图7 *CeSSI* (A)、*CeSSII* (B) 和 *CeSSIII* (C) 在芋不同发育时期的表达

Fig.7 Expression of *CeSSI* (A), *CeSSII* (B) and *CeSSIII* (C) at different developmental stages of taro

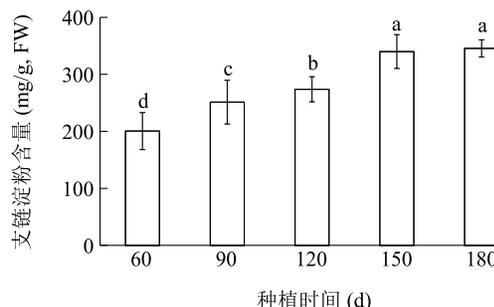
### 2.4 *CeSSIII* 的基因表达与芋球茎支链淀粉含量相关性分析

图8显示,芋球茎支链淀粉含量呈持续增长趋势,在种植120~150 d增长速率最高,球茎支链淀粉含量在种植180 d达到较大值。相关性分析结果显示,芋球茎 *CeSSIII* 的表达水平与支链淀粉含量之间存在明显正相关性。

## 3 讨论

### 3.1 芋可溶性淀粉合成酶家族成员具有各自独特功能

在植物叶片和贮藏组织中已经发现了4种形式的淀粉合成酶: *SSI*、*SSII*、*SSIII* 和 *SSIV*<sup>[1,9]</sup>。在马铃薯上的研究结果显示, *SSI* 和 *SSII* 是主要淀粉合酶,会影响淀粉含量和结构, *SSIII* 是支链淀粉主要合成酶,其活性占块茎可溶性淀粉合成酶活性的



不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图8 不同发育时期芋球茎中支链淀粉含量分析

Fig.8 Amylopectin contents in corms of taro at different development stages

80%<sup>[3]</sup>。本研究结果显示,靖江香沙芋中存在3个可溶性淀粉合成酶,均具有类似的 Glyco\_transf 结构域,它们与腺苷二磷酸(ADP)葡萄糖结合,催化合成淀粉,而 *CeSSIII* 中除了同样的 Glyco\_transf 结构域以外,还包含3个 CBM\_25 结构域,具有淀粉结合

特性,可能与淀粉链长有关<sup>[2]</sup>。前人研究发现,SSI 氨基末端区域高度保守的 KXGGL 基序,是可溶性淀粉合成的起始酶,与糖原合成酶底物 ADP-葡萄糖结合,可能对芋的短支链淀粉合成具有重要作用<sup>[10]</sup>。SSII 可影响支链淀粉的分支合成,改变淀粉粒的晶体层结构和淀粉糊化温度<sup>[11]</sup>。SSIII 中含有的六肽基序(RYGTVPVV)与 14-3-3 蛋白结合位点基序相关<sup>[1, 11]</sup>,后者通过负调控拟南芥中可溶性淀粉合成酶活性,进而影响拟南芥叶片中淀粉积累,说明 CeSSIII 与芋淀粉储藏密切相关<sup>[2]</sup>。

### 3.2 3个芋可溶性淀粉合成酶基因与淀粉合成紧密相关

本研究结果表明,CeSSI、CeSSII 和 CeSSIII 主要在芋球茎中表达,但在芋的不同发育阶段,3个基因表现出不同的表达模式。CeSSI 和 CeSSII 在未成熟的芋球茎中表达水平较高,与马铃薯中的转录表达趋势相似,即在种植 90 d 左右明显上调表达,表明 CeSSI 和 CeSSII 更趋向于参与芋球茎中瞬时淀粉的合成<sup>[2, 5]</sup>;而 CeSSIII 的转录上调时间相对较迟,在种植 120 d 时上调速率最高,在种植 180 d 的成熟球茎中表达水平最高,与在香蕉中的表达模式基本一致,说明 CeSSIII 更倾向于参与贮藏淀粉的合成<sup>[12]</sup>。

本研究发现,在芋发育过程中,芋球茎中支链淀粉含量持续增加,在种植 180 d 达到较大值,而且芋球茎中 CeSSIII 基因表达量与芋球茎中支链淀粉含量呈正相关,表明 CeSSIII 与芋球茎中淀粉贮藏有关。该结果与在马铃薯上的研究结果类似,马铃薯块茎中 SSIII 活性占总 SS 活性的 80%,与贮藏淀粉的合成密切相关<sup>[3]</sup>。

本研究结果表明,芋可溶性淀粉合成酶基因家族的 3 个基因与球茎淀粉合成密切相关,其中 CeSSI 和 CeSSII 参与芋球茎中瞬时淀粉的合成,而 CeSSIII 更倾向于参与贮藏淀粉的合成。今后需要对芋可溶

性淀粉合成酶基因进行深入研究,以明确和验证 CeSSI、CeSSII 和 CeSSIII 基因功能。

### 参考文献:

- [1] 姚 姝,张亚东,路 凯,等. 水稻可溶性淀粉合成酶基因 *SSI-Ia* 和 *SSIIIa* 的功能、等位变异及其互作研究进展[J]. 中国水稻科学,2022,36(3):227-236.
- [2] 李 丰. 甘薯淀粉合成相关基因的克隆与分子标记开发[D]. 济南:山东大学,2017.
- [3] 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.
- [4] CHEN J, ZENG B, ZHANG M, et al. Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development[J]. Plant Physiology, 2014, 166(1): 252-264.
- [5] SCHREIBER L, NADER-NIETO A C, SCHÖNHALS E M, et al. SNPs in genes functional in starch-sugar interconversion associate with natural variation of tuber starch and sugar content of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2014, 4(10): 1797-1811.
- [6] 王 立,殷剑美,韩晓勇,等. 芋淀粉合成酶 *AGPase* 基因的克隆及表达分析[J]. 园艺学报,2016,43(6):1117-1125.
- [7] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [8] 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.
- [9] 马 岚,李育先,刘 颖,等. 谷子淀粉合成酶家族分析[J]. 分子植物育种,2020,18(16):5213-5220.
- [10] PFISTER B, ZEEMAN S C. Formation of starch in plant cells[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(14): 2781-2807.
- [11] LOZANO-DURÁN R, ROBATZEK S. 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(5): 511-518.
- [12] 苗红霞,孙佩光,刘菊华,等. 香蕉果实可溶性淀粉合成酶基因 *MaSSIII-1* 的分子特征与时空表达模式[J]. 中国农学通报,2019,35(1):75-79.

(责任编辑:陈海霞)