

芋淀粉分支酶 (SBE) 基因的鉴定、生物信息学及表达分析

董伟清¹, 刘莉莉², 蒋慧萍¹, 邱祖杨², 何芳练^{1*}

1. 广西壮族自治区农业科学院生物技术研究所, 广西南宁 530007; 2. 荔浦市农业农村局, 广西荔浦 546600

摘要: 淀粉分支酶 (starch branching enzyme, SBE) 在支链淀粉生物合成中发挥关键作用, 直接影响淀粉的含量和结构。芋 (*Colocasia esculenta*) 是一种主要的块茎类作物, 在世界上热带和亚热带地区广泛栽培。目前, SBE 在芋中的研究很少, 对 SBE 基因在芋中的数量、分子结构特征和表达模式还不清楚。本研究首次对芋 SBE 基因进行了全面分析, 鉴定了 3 个 SBE 基因 (*CeSBE1*、*CeSBE2* 和 *CeSBE3*)。CeSBE1、CeSBE2 和 CeSBE3 蛋白氨基酸数量分别为 828、845 和 598, 分子质量分别为 92 956.71、95 625.13、69 169.16 Da, 等电点分别为 5.22、5.41 和 7.36。系统进化分析显示 3 个 CeSBE 蛋白分别在 3 个不同的亚群。基因结构分析显示, *CeSBE1*、*CeSBE2* 和 *CeSBE3* 外显子数量分别为 16、22、10; 保守结构域分析表明, CeSBE1 和 CeSBE2 均具有 alpha-amylase_C 和 alpha-amylase 结构域及 7 个 motif, 而 CeSBE3 具有 alpha-amylase 和 CBM_48 结构域及 3 个 motif。*CeSBE* 基因启动子区域顺式作用元件分析表明, 共预测到 55 个顺式作用元件, 其中 29 个具有功能注释, 涉及光响应、激素响应、植物生长发育及环境压力等相关元件。在不同组织中, 3 个 *CeSBE* 基因均能在所有组织中表达, 其中 *CeSBE2* 在球茎和叶片显著表达 ($P < 0.05$); 在球茎不同发育阶段中, *CeSBE2* 在所有的发育阶段均有较高的表达量, 呈现先升高后降低的表达趋势, 在球茎发育 120 d 的表达量达到峰值。球茎不同发育阶段总淀粉和支链淀粉含量增加与 *CeSBE2* 表达量趋势一致, 说明 *CeSBE2* 可能是芋支链淀粉生物合成的关键基因。本研究结果可为芋的产量、品质和营养性状的遗传改良提供基础。

关键词: 芋; 淀粉分支酶; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S632.3 文献标识码: A

Identification, Bioinformatics and Expression Analysis of Taro Starch Branching Enzyme Genes

DONG Weiqing¹, LIU Lili², JIANG Huiping¹, QIU Zuyang², HE Fanglian^{1*}

1. Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China; 2. Lipu Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Lipu, Guangxi 546600, China

Abstract: Starch branching enzyme (SBE) play a key role in amylopectin biosynthesis and directly influence the content and structure of starch. Taro is a major tuber crop, widely cultivated in tropical and subtropical regions of the world. At present, there are few studies on SBE in taro, and the number, molecular structural characteristics and expression patterns of SBE genes in taro are not clear. In this study, a comprehensive analysis of taro SBE genes was conducted for the first time, and three SBE genes (*CeSBE1*, *CeSBE2* and *CeSBE3*) were identified. The amino acid numbers of CeSBE1, CeSBE2 and CeSBE3 proteins was 828, 845 and 598, respectively, with molecular mass of 92 956.71 Da, 95 625.13 Da and 69 169.16 Da, and isoelectric point of 5.22, 5.41 and 7.36, respectively. Phylogenetic analysis showed that the three CeSBE proteins were divided into three different subgroups. Gene structure analysis showed that the number of *CeSBE1*, *CeSBE2* and *CeSBE3* exons was 16, 22 and 10, respectively. Conservative structural domain analysis showed that both CeSBE1 and CeSBE2 proteins had α -amylase_C and α -amylase structural domains and 7 motifs, while CeSBE3 protein

收稿日期 2022-08-03; 修回日期 2022-09-05

基金项目 广西重点研发计划项目 (桂科 AB20297041); 广西自然科学基金项目 (No. 2022GXNSFAA035493, No. 2021GXNSFBA196012)。

作者简介 董伟清 (1981—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 芋种质资源创新利用与遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 何芳练 (HE Fanglian), E-mail: hefanglian048@163.com。

had α -amylase and CBM_48 structural domains and 3 motifs. Analysis of *cis*-acting elements in the promoter region of *CeSBE* gene showed that a total of 55 *cis*-acting elements were predicted, 29 of which were functionally annotated, involving elements related to light response, hormone response, plant growth and development, and environmental stress. The three *CeSBE* genes were expressed in all tissues, with *CeSBE2* being significantly expressed in corms and leaves ($P < 0.05$). At different developmental stages of the corm, *CeSBE2* had high expression at all developmental stages, showing a trend of increasing and then decreasing expression, with peak expression at 120 d of corm development. The increase in total starch and amylopectin content at different developmental stages of the corm was consistent with the trend of *CeSBE2* expression, suggesting that *CeSBE2* may be a key gene for amylopectin biosynthesis in taro. The study would enhance the understanding of *CeSBE* gene family members and provide the basis for genetic improvement of yield, quality and nutritional traits in taro.

Keywords: taro; starch branching enzyme; bioinformatics analysis; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.07.007

淀粉是高等植物主要的储存多糖，由直链淀粉和支链淀粉构成，是人们日常饮食中碳水化合物的主要来源^[1-2]。淀粉通常存在于谷类作物和块茎类作物中，如水稻（*Oryza sativa*）、小麦（*Triticum aestivum*）、玉米（*Zea mays*）、马铃薯（*Solanum tuberosum*）、木薯（*Manihot esculenta*）和芋（*Colocasia esculenta*）等^[3-8]。支链淀粉是淀粉的主要组分，占总淀粉的 75%~85%^[9]。支链淀粉生物合成涉及的酶有淀粉合成酶（starch synthase, SS）、淀粉分支酶（starch branching enzyme, SBE）和淀粉脱分支酶（starch debranching enzyme, DBE）^[10]，其中 SBE 在淀粉含量、结构以及物理特性方面起着关键作用^[1, 11]。SBE 属于 α -淀粉酶家族，具有 α -淀粉酶催化结构域（A 结构域）、氨基 N-末端和羧基 C-末端结构域，主要分类为 3 种类型（SBE1、SBE2 和 SBE3），其中 SBE1 和 SBE2 的功能研究得较为清楚^[11]。SBE1 将直链淀粉浓缩成长的葡聚糖链，SBE2 主要利用短葡聚糖链为底物合成支链淀粉，而 SBE3 的功能仍然不明确^[12]。

许多 *SBE* 基因表达和功能研究揭示了其在支链淀粉生物合成和植物生长发育中的作用。例如，板栗（*Castanea mollissima*）*SBE* 基因在果实发育过程中表达量显著增加，与支链淀粉的合成和果实发育密切相关^[13]；在缺乏 *SBEIIa* 的玉米（*Z. mays*）中，叶片淀粉的分支急剧减少，叶片表现出严重的类似衰老的表型^[14]；在水稻（*O. sativa*）中，通过抑制 *SBEI* 和 *SBEIIb* 基因的表达，降低了支链淀粉含量，将直链淀粉含量从 25% 提高到约 60%，但同时由于淀粉结构的改变，抑制了水稻幼苗的生长^[9, 15]；在木薯（*M. esculenta*）中，通过抑制 *SBE1* 和 *SBE2* 的表达，降低

了支链淀粉含量，增加了直链淀粉和抗性淀粉的含量^[16-17]。

芋是一种主要的块茎类作物，在热带和亚热带地区广泛栽培^[18]。淀粉是芋球茎的主要碳水化合物，占干物质含量的 70%~80%^[19]，而支链淀粉又是总淀粉的主要组成部分^[8, 20]。芋支链淀粉的生物合成和积累对芋球茎的产量、品质以及营养价值具有重要的意义。因此，有必要在全基因组范围内鉴定与支链淀粉生物合成有关的关键候选基因，以促进芋产量的提高和品质改良。本研究从芋基因组中鉴定了 3 个 *SBE* 基因，对其分子特征、系统发育关系、保守结构、基因结构、顺式作用元件和时空表达模式进行分析，为芋的产量、品质和营养性状的遗传改良提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试芋材料为芋新品种荔浦芋 1 号，该品种为魁芋类型（槟榔芋），以母芋为主要食用器官，具有产量高、品质优和耐储藏等特点。选择播种 90 d 的叶片、叶柄、球茎和根用于 *CeSBE* 基因的空间表达分析；选择播种 30 d（S₁）、60 d（S₂）、90 d（S₃）、120 d（S₄）、150 d（S₅）、180 d（S₆）、210 d（S₇）、240 d（S₈）的球茎用于 *CeSBE* 基因的时序性表达分析。所有样品均设置 3 次生物学重复，液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 *CeSBE* 蛋白的鉴定和系统发育分析 分别从 TAIR 数据库（<http://www.arabidopsis.org>）和 RGAP 数据库（<http://rice.plantbiology.msu.edu>）下载拟南芥和水稻的 *SBE* 家族蛋白序列，使用 HMMER 3.0 软件以拟南芥和水稻 *SBE* 家族蛋白

序列为模板构建隐马尔可夫模型。通过建立的模型搜寻芋参考基因组 (Niu2, <https://db.cngb.org/search/project/PRJNA328799/>) 的所有蛋白序列, 找出潜在的 CeSBE 蛋白。此外, 使用 BLASTp 软件 (版本: 2.10.1) 将拟南芥和水稻 SBE 蛋白序列与芋所有的蛋白序列进行比对, E -value 设为 $1E-20$ 。将上述获得的 CeSBE 蛋白序列进行合并去冗余, 去冗余后的蛋白序列作为候选的 CeSBE 家族蛋白序列。使用 NCBI 保守结构域数据库 (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 Pfam 数据库 (<https://pfam.xfam.org/>) 进一步验证候选 CeSBE 蛋白序列的保守结构域。使用 mafft 软件 (版本: v7.427) 对来自芋 (*C. esculenta*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*O. sativa*)、马铃薯 (*S. tuberosum*)、玉米 (*Z. mays*)、小麦 (*T. aestivum*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 和葡萄 (*Vitis vinifera*) 的 SBE 蛋白进行多序列比对, 然后利用 MEGA 7 软件的邻接法构建系统发育树 (Bootstrap 值为 1000)。

1.2.2 CeSBE 蛋白特性和基因结构分析 使用 ExPASy-ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 CeSBE 蛋白的理化性质; 使用 MEME 5.4.1 软件 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 预测 CeSBE 蛋白的保守 motif, 然后使用 InterProScan 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对预测的 motif 进行功能注释; 使用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 预测 CeSBE 蛋白的保守结构域; 使用 GSDS 2.0 软件 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 预测 CeSBE 基因的结构特征; 使用 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对 CeSBE 基因上游 2 kb 序列预测启动子区域的顺式作用元件。

1.2.3 CeSBE 基因的转录组分析 对 CeSBE 基因在不同组织、球茎不同发育阶段的转录表达情况进行分析。课题组前期对芋发育 90 d 的叶片、叶柄、球茎和根开展了转录组测序, 从转录组数据中提取 CeSBE 基因的 FPKM 值, 分析 CeSBE 基因在不同组织的表达差异; 同时, 在前期研究中, 课题组还对球茎发育 30、60、90、120、150、240 d 的球茎组织开展了转录组研究^[8], 从球茎发育的转录组数据中提取 CeSBE 基因的 FPKM 值, 分析 CeSBE 基因在球茎不同发育阶段的表达差异。利

用 CeSBE 基因的 FPKM 值, 在百迈克云平台 (<https://international.biocloud.net/zh/software/tools/detail/small/305>) 绘制 CeSBE 基因在不同组织和球茎不同发育阶段的聚类热图。

1.2.4 CeSBE 基因的荧光定量 RT-PCR 分析 使用植物多糖多酚总 RNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, DP441] 提取所有样品的总 RNA, 使用 TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, KR107] 将提取的总 RNA 反转录成 cDNA 第一链。以不同组织和球茎不同发育阶段的 cDNA 为模板, 使用 AnalytikJena qTOWERE2.2 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 RT-PCR 试验。根据芋 CeSBE 基因序列信息, 利用 Primer 5.0 软件设计荧光定量 RT-PCR 引物 (表 1), 以芋 Actin 基因为内参基因^[21]。使用 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司, Q711-02) 进行荧光定量 RT-PCR 试验。反应体系为: SYBR Green Master Mix 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 模板 cDNA 1.0 μ L, 双蒸水补足 20.0 μ L。荧光定量 RT-PCR 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 每循环 95 $^{\circ}$ C 15 s, 57 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 45 个循环, 每个样品 3 次重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量^[22]。

表 1 CeSBE 基因的荧光定量 RT-PCR 引物
Tab. 1 Fluorescent quantitative RT-PCR primers for CeSBE gene

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
CeSBE1	F: GCATTAGGAGGCGAAGGCTAT R: CCACTGACGGCGACACTTAT
CeSBE2	F: CGGAAGCACGCACCTTATGA R: GCTGGACAGGCTGAAGTAACA
CeSBE3	F: ACACCATTGCGTCACCATTCC R: CTGCCTTGCTCACCTCTCC
Actin	F: TCTGGCACACACCTTCTAC R: GACACACCGTCACCAGAGTC

2 结果与分析

2.1 CeSBE 蛋白的鉴定和系统发育分析

在芋基因组 (Niu2) 中共鉴定到 3 个 SBE 基因, 分别命名为 CeSBE1 (*Taro_034516*)、CeSBE2 (*Taro_009230*) 和 CeSBE3 (*Taro_053106*)。CeSBE1、CeSBE2 和 CeSBE3 蛋白氨基酸数量分别为 828、845、598, 分子质量分别为 92 956.71

Da、95 625.13 Da、69 169.16 Da, 等电点分别为 5.22、5.41 和 7.36。CeSBE 蛋白在氨基酸数量、分子质量和等电点的差异可能反映其在各种生物过程中的功能差异。

为了研究芋 CeSBE 蛋白的进化关系, 将 27 个 SBE 蛋白进行系统进化分析, 包括 3 个芋 CeSBE、2 个拟南芥 AtSBE、3 个水稻 OsSBE、3 个马铃薯 StSBE、3 个玉米 ZmSBE、7 个小麦 TaSBE、3 个番茄 SISBE 和 3 个葡萄 VvSBE。系统进化分析显示(图 1), 27 个 SBE 蛋白被分为 3 个群组(Group I、Group II 和 Group III)。Group I 包含 10 个 SBE 蛋白, 包括芋 CeSBE1、水稻 OsSBE1、马铃薯 StSBE1、玉米 ZmSBE1、小麦 TaSBE1.1/1.2/1.3/1.4、番茄 SISBE1 和葡萄 VvSBE1; Group II 包含 11 个 SBE 蛋白, 包括芋 CeSBE2、水稻 OsSBE2、拟南芥 AtSBE2.1/2.2、马铃薯 StSBE2、玉米 ZmSBE2、小麦 TaSBE2.1/2.2/2.3、番茄 SISBE2 和 1 个葡萄 VvSBE2; Group III 包含 6 个 SBE 蛋白, 包括芋 CeSBE3、水稻 OsSBE3、马铃薯 StSBE3、玉米 ZmSBE3、番茄 SISBE3 和葡萄 VvSBE3。

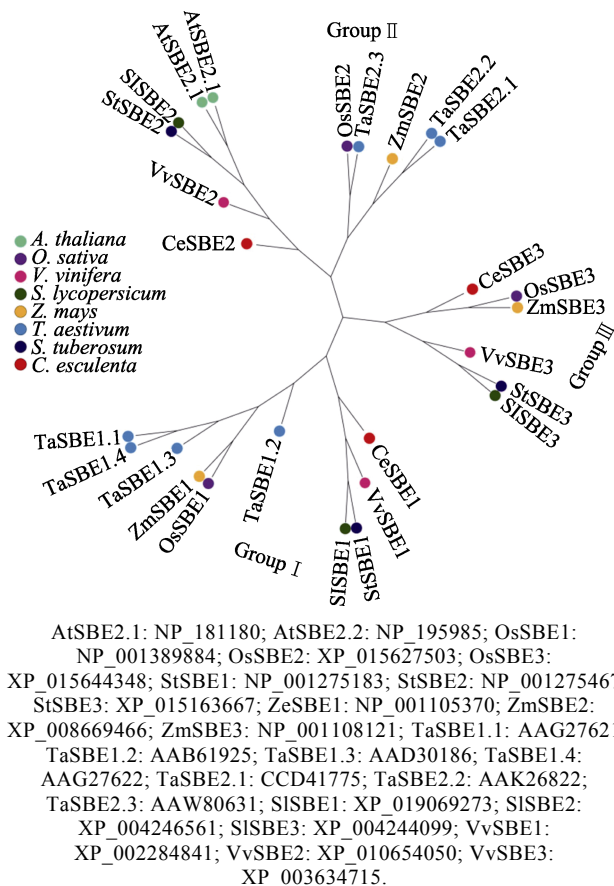


图 1 SBE 蛋白的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of SBE proteins

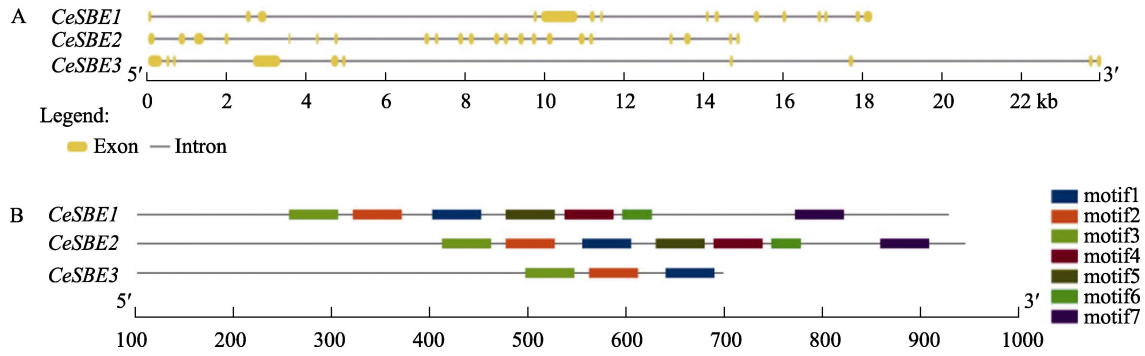
在芋 3 个 CeSBE 中, CeSBE1、CeSBE2 和 CeSBE3 分别归属于 Group I、Group II 和 Group III (图 1)。在 Group I 中, CeSBE1 与番茄 SISBE、马铃薯 StSBE 和葡萄 VvSBE 形成的分支聚在一起; 在 Group II 中, CeSBE2 处于拟南芥 AtSBE2.1/2.2、马铃薯 StSBE2、番茄 SISBE2 和葡萄 VvSBE2 形成分支的根部; 在 Group III 中, CeSBE3 与水稻 OsSBE3 和 ZmSBE3 形成的分支聚在一起。

2.2 芋 CeSBE 基因结构和保守 motif 分析

外显子-内含子结构特征分析进一步支持了 CeSBE 基因的进化特征(图 2A)。CeSBE1、CeSBE2 和 CeSBE3 外显子数量分别为 16、22、10, 说明 3 个 CeSBE 基因在进化和功能上发生了差异。为了进一步探究 CeSBE 蛋白结构多样性和预测其功能, 使用 MEME 5.4.1 软件在 3 个 CeSBE 蛋白中鉴定了 7 个保守的 motif, 并在 InterPro 数据库中进行了注释, 所有 motif 均注释为 1,4- α -葡聚糖分支酶(1,4-alpha-glucan-branching enzyme, IPR037439)(图 2B、表 2)。CeSBE1 和 CeSBE2 均包含所有的 7 个 motif, 而 CeSBE3 只有 3 个 motif(motif1、motif2、motif3)(图 2B)。使用 NCBI 数据库和 Pfam 数据库对芋 CeSBE 的保守结构域进行预测, 结果显示 CeSBE1 包含 alpha-amylase_C 和 alpha-amylase 结构域, CeSBE2 包含 alpha-amylase_C、alpha-amylase 和 CBM_48 结构域, CeSBE3 包含 alpha-amylase 和 CBM_48 结构域(表 3)。3 个 CeSBE 在外显子数量、保守 motif 和保守结构域的差异, 可能反映了 3 个 CeSBE 之间不同的进化历史和功能差异。

2.3 芋 CeSBE 基因启动子区域顺式作用元件分析

提取 3 个芋 CeSBE 基因 CDS 上游 2 kb 序列, 使用 PlantCARE 数据库预测该区域的顺式作用元件, 共预测到 55 个顺式作用元件, 其中 29 个具有功能注释。将具有功能注释的顺式作用元件分为 6 类, 包括响应光、激素的元件以及与环境压力、结合位点、生长发育和启动子相关的元件(表 4)。响应光的顺式作用元件有 10 个, 其中 G-box 是 3 个 CeSBE 基因共有的, 其他如 Box 4、GT1-motif、GATA-motif 等在其中的 1 个或 2 个基因出现。响应激素的顺式作用元件有 7 个, 其中 AuxRR-core 和 TGA-element 为生长素响应元件, TGACG-motif 和 CGTCA-motif 为茉莉酸甲酯



A: 基因结构分析; B: 保守 motif 分析。

A: Gene structure analyses; B: Conserved motif analyses.

图 2 芋 *CeSBE* 基因结构和保守 motif 分析

Fig. 2 Gene structure and conserved motif analyses of taro *CeSBE* genes

表 2 芋 *CeSBE* 蛋白保守 motif 及功能注释

Tab. 2 Conserved amino acid motifs and functional annotation of taro *CeSBE* proteins

名称 Name	E 值 E-value	氨基酸个数 Number of amino acid residues	motif 序列 Motif sequence	注释 Annotation
motif 1	2.20E-36	50	HKLWDSRLFNYGNWEVLRFLLSNLRWWLEEYKFDG FRFDGVTSMJYTHHG	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (IPR037439)
motif 2	2.30E-33	50	MEHSYYASFGYHVTNFFAVSSRFGTPEDLKNLIDKAH GLGLLVLMDIVHS	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (IPR037439)
motif 3	2.10E-17	50	WDPPPEEKYKFKHPRPPKPKALRIYEAHIGMSGSEPKI SSYRDFADDVLP	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (IPR037439)
motif 4	3.10E-16	50	QWGMGEIVWSLTNRRWLEKCIAYAESHDAQJVGDKT IAFWLMDKEMYDGM	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (IPR037439)
motif 5	4.00E-08	50	MLVNDLIHGJFPEAVVIGEDVSGMPTFCRPVEEGVG FDHRLAMAIPDKW	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (IPR037439)
motif 6	9.50E-08	30	IDRGIALHKMIRFITMGLGGEGYLNFMGNE	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (IPR037439)
motif 7	4.40E-06	50	MIVFEREDLVVFVFNFWENSYEGHKVGC DKPGKYKV VLDSDDKEFGGFGR	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (IPR037439)

表 3 芋 *CeSBE* 蛋白的保守结构域分析

Tab. 3 Conserved domains analysis of taro *CeSBE* proteins

蛋白名称 Protein name	登录号 Accession No.	结构域 Structural domain	功能描述 Function description	位置 Position	E 值 E-value
CeSBE1	c133494	PLN02447 super family	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	70~786	0.0E+00
	PF02806	alpha-amylase_C	alpha amylase, C-terminal all-beta domain	668~764	2.9E-23
	PF00128	alpha-amylase	alpha amylase, catalytic domain	211~315	7.4E-11
CeSBE2	PLN02447	PLN02447	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	110~845	0.0E+00
	PF02806	alpha-amylase_C	alpha amylase, C-terminal all-beta domain	748~842	1.3E-23
	PF02922	CBM_48	carbohydrate-binding module 48 (Isoamylase N-terminal domain)	210~294	4.5E-18
	PF00128	alpha-amylase	alpha amylase, catalytic domain	357~537	1.7E-12
CeSBE3	c133608	PLN02960 super family	alpha-amylase	22~598	0.0E+00
	PF00128	alpha-amylase	alpha amylase, catalytic domain	440~557	3.6E-10
	PF02922	CBM_48	carbohydrate-binding module 48 (Isoamylase N-terminal domain)	140~230	5.6E-08

(MeJA) 响应元件, ABRE 为脱落酸 (ABA) 响应元件, P-box 为赤霉素 (GA) 响应元件,

TCA-element 为水杨酸响应元件。其他类型顺式作用元件如与分生组织表达有关的顺式调节元件

表 4 芋 *CeSBE* 基因启动子区域顺式作用元件分析
Tab. 4 Analysis of *cis*-acting elements in promoter region of taro *CeSBE* genes

顺式作用元件类型	<i>CeSBE1</i>	<i>CeSBE2</i>	<i>CeSBE3</i>
光响应元件	Box 4, G-box, GATA-motif, GT1-motif, I-box, TCT-motif	G-Box, G-box, GATA-motif, GATT-motif, chs-CMA1a	AT1-motif, Box 4, G-box, TCT-motif
激素响应元件	CGTCA-motif, TCA-element, TGA-element, TGACG-motif	ABRE, AuxRR-core, CGTCA-motif, P-box, TGACG-motif	CGTCA-motif, TCA-element, TGACG-motif
结合位点相关元件		CCAAT-box, HD-Zip 3	AT-rich element, CCAAT-box
生长发育相关元件	RY-element	CAT-box, MSA-like	
启动子相关元件	CAAT-box, TATA-box	CAAT-box, TATA-box	CAAT-box, TATA-box
环境压力相关元件	AAGAA-motif, MBS	GC-motif	AAGAA-motif, AT-rich sequence, GC-motif, MBS

CAT-box, 参与干旱诱导的 MYB 响应元件 MBS, 转录起始位点上游 30 bp 附近的核心启动子元件 TATA-box 等。说明芋 *CeSBE* 基因可以响应各种环境变化并协调芋的生长发育, 但 3 个 *CeSBE* 基因在不同类型的响应元件中存在差异。

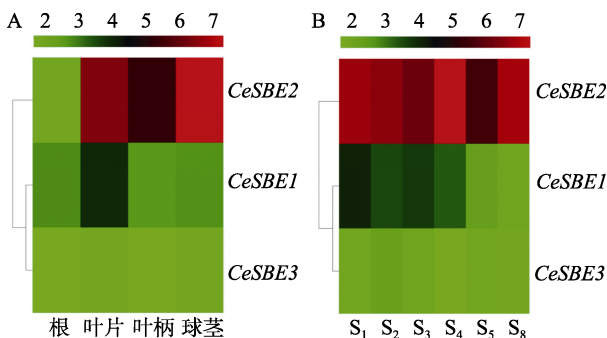
2.4 芋 *CeSBE* 基因表达模式分析

为了研究 *CeSBE* 基因在芋生长发育中的功能, 根据课题组前期对芋球茎淀粉的积累规律, 对植株发育 90 d 的不同组织 (叶片、叶柄、球茎和根) 和球茎不同发育阶段的样品进行了转录组测序, 从转录组数据中提取 3 个 *CeSBE* 基因的 FPKM 值, 对 *CeSBE* 基因在不同组织和球茎不同发育阶段的表达模式进行了分析 (图 3)。在不同组织中, *CeSBE2* 在球茎的表达量最高, FPKM 值为 203.27, 其次为叶片和叶柄, FPKM 值分别为 108.72 和 46.48, 根的表达量最低, FPKM 值仅为 3.95; *CeSBE1* 在叶片的表达量较高, FPKM 值为 17.86, 在球茎、叶柄和根的表达量较低,

FPKM 值均小于 10; *CeSBE3* 在所有的组织的表达量均较低, FPKM 值均小于 5 (图 3A)。在球茎不同发育阶段中, *CeSBE2* 在所有发育阶段均有较高的表达量, 其中表达量最高的为 S₄, FPKM 值为 128.71; *CeSBE1* 在球茎发育前期 (S₁~S₃) 的表达量相对略高, FPKM 值大于 9, 发育后期 (S₄~S₈) 表达量较低, FPKM 值小于 8; *CeSBE3* 的表达量在所有发育阶段均较低 (FPKM 值小于 4) (图 3B)。*CeSBE2* 在球茎中表达量最高, 且在球茎的所有发育阶段均表现持续的高表达, 说明其可能在芋球茎发育和淀粉积累中起关键作用。

2.5 芋 *CeSBE* 基因的 qRT-PCR 分析

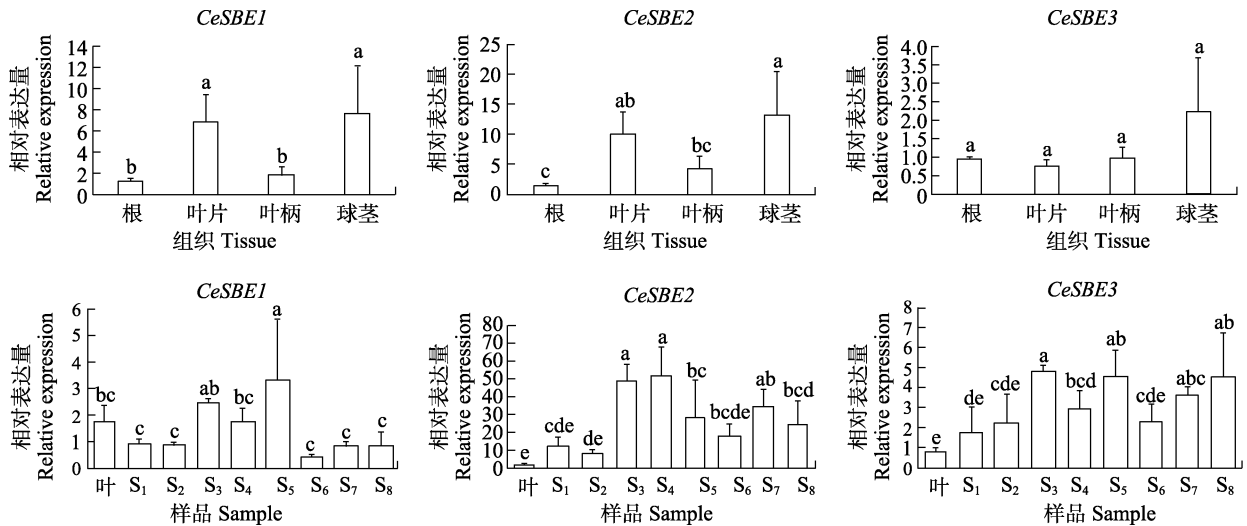
转录组测序结果显示, 3 个 *CeSBE* 基因在芋不同组织和球茎不同发育阶段表现出不同表达模式, 尤其是 *CeSBE2* 在球茎中的表达量最高, 且在球茎不同发育阶段持续高表达 (图 3)。因此, 本研究使用荧光定量 RT-PCR 进一步验证转录组数据的准确性 (图 4)。3 个 *CeSBE* 基因在不同组织中显示出不同水平的组织特异性表达。*CeSBE2* 在球茎和叶片显著高表达 ($P < 0.05$), *CeSBE1* 与 *CeSBE2* 类似, 在球茎和叶片显著表达 ($P < 0.05$), 但整体表达量较低, *CeSBE3* 在所有的组织中表达量均较低。在球茎不同发育阶段中, 以叶片的表达量为对照, *CeSBE2* 在球茎发育的所有阶段均有较高的表达量, 表达量呈现先升高后降低的趋势; *CeSBE3* 与 *CeSBE2* 类似, 在所有发育阶段的表达量均高于叶片, 但整体表达量均较低; *CeSBE1* 在球茎的 S₃~S₅ 阶段的表达量略高于其他发育阶段, 但整体表达量均较低。荧光定量 RT-PCR 与转录组测序分析保持一致的结果。



A: *CeSBE* 基因在根、叶片、叶柄和球茎的表达模式;
B: *CeSBE* 基因在球茎不同发育阶段的表达模式。

A: Expression patterns of *CeSBEs* in roots, leaves, petioles and corms; B: Expression patterns of *CeSBEs* at different developmental stages of the corm.

图 3 *CeSBE* 基因在不同组织和不同发育阶段的表达情况
Fig. 3 Expression of *CeSBEs* in various tissues and at various developmental stages



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 4 *CeSBE* 基因在芋不同组织和球茎不同发育阶段的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *CeSBEs* in different tissues and corms of taro at different developmental stages

2.6 芋球茎发育过程中 *CeSBE* 基因的表达与淀粉含量变化分析

在前期研究中,本课题组对芋球茎发育过程中总淀粉、支链淀粉和直链淀粉的含量进行了测定^[8]。总淀粉含量在球茎发育前期较低,从 3.95 g/100 g (30 d) 增加到 4.51 g/100 g (60 d),在球茎发育中期,淀粉含量迅速增加,从 14.5 g/100 g (90 d) 增加到 25.4 g/100 g (150 d);直链淀粉含量在球茎发育过程中缓慢增加,从 0.28 g/100 g (30 d) 增加到 3.76 g/100 g (240 d);支链淀粉含量变化与总淀粉含量变化趋势一致,在球茎发育前期较低,从 3.67 g/100 g (30 d) 增加到 3.77 g/100 g (60 d),在球茎发育中期,支链淀粉含量也迅速增加,从 13.4 g/100 g (90 d) 增加到 22.7 g/100 g (150 d) (图 5)。支链淀粉在球茎各发育阶段占总淀粉含量的 83.59%~92.91%,说明芋球茎总淀粉含量的增加主要由支链淀粉含量增加引起。在球茎发育过程中,*CeSBE2* 的表达量远高于 *CeSBE1* 和 *CeSBE3*,因此 *CeSBE2* 可能是支链淀粉合成的关键基因。在球茎发育前期,*CeSBE2* 表达量较低,此时球茎支链淀粉和总淀粉含量维持在较低水平;在球茎发育中期,*CeSBE2* 表达量迅速升高且在 120 d 达到峰值,此时支链淀粉和总淀粉含量迅速增加;在球茎发育后期,*CeSBE2* 表达量略有下降,支链淀粉和总淀粉含量缓慢增加。*CeSBE2* 表达量变化与球茎支链淀粉和总淀粉含量增加趋势一致。

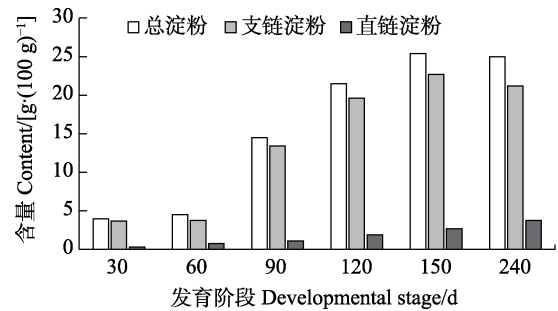


图 5 芋球茎发育过程中淀粉含量变化

Fig. 5 Changes in starch content during the development of taro corms

3 讨论

尽管芋也是高淀粉作物,但与其他高淀粉类作物如水稻 (*O. sativa*)、马铃薯 (*S. tuberosum*) 和木薯 (*M. esculenta*) 等的研究相比,芋的研究相对较少,特别是在支链淀粉生物合成和球茎发育方面^[9, 17, 23]。SBE 是支链淀粉生物合成的关键酶,影响淀粉的产量和结构,同时还在植物生长发育中发挥作用^[1, 11]。在本研究中,从芋基因组中鉴定了 3 个 *CeSBE* 基因,这与水稻 (*O. sativa*)、玉米 (*Z. mays*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、大麦 (*Hordeum vulgare*) 和马铃薯 (*S. tuberosum*) 等作物的 *SBE* 基因数量一致^[1, 12]。但同时也发现,与其他一些作物的 *SBE* 基因数量存在差异,如拟南芥 (*A. thaliana*) 有 2 个 *SBE* 基因,木薯 (*M. esculenta*) 有 6 个 *SBE* 基因,小麦 (*T. aestivum*) 有 7 个 *SBE* 基因,香蕉 (*Musa*

acuminata) 在不同的基因组中 *SBE* 基因也存在差异, A 基因组有 7 个 *SBE* 基因, B 基因组有 6 个 *SBE* 基因^[1, 12, 24]。根据系统发育分析, 3 个 *CeSBE* 蛋白分别在不同的群组, 这与大多数谷类作物和园艺作物的 *SBE* 分类一致^[11]。系统发育分析得到了基因结构和保守结构域分析的进一步支持。外显子-内含子结构特征分析显示 3 个 *CeSBE* 基因的外显子数量存在差异, 分别为 16、22、10, 与在香蕉 (*M. acuminata*) 上报道的一致^[12]。在保守结构域上, *CeSBE1* 和 *CeSBE2* 蛋白均包含 *alpha-amylase_C* 和 *alpha-amylase* 两个结构域, *CeSBE3* 只有 *alpha-amylase* 结构域, 这与其他作物上报道的一致, 均为 *SBE1* 和 *SBE2* 的结构域特征高度保守, 而 *SBE3* 缺乏部分保守结构域^[11]; 在保守 motif 上, *CeSBE1* 和 *CeSBE2* 均包含 7 个 motif, 而 *CeSBE3* 只有 3 个 motif, 与在木薯 (*M. esculenta*) 上报道的一致^[24]。

淀粉代谢受到植物内部时钟和外部昼夜变化的严格调节, *SBE* 基因的转录表达也呈现昼夜波动^[25-26]。在本研究中共有 10 个顺式作用元件为光响应元件, 与在苹果 (*Malus domestica*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*)、马铃薯 (*S. tuberosum*) 和拟南芥 (*A. thaliana*) 等作物上报道的一致^[11]。除了光响应元件外, 还有 7 个激素响应元件, 包括生长素、MeJA、ABA、GA 和水杨酸等, 与在木薯上报道的一致^[24]。*CeSBE* 基因上游包含的顺式作用元件说明该基因受环境和激素的调控。

已经有许多作物的研究表明, *SBE* 基因在贮藏器官的发育过程中发挥关键作用。例如, 甘薯 (*Ipomoea batatas*) 和板栗 (*C. mollissima*) *SBE* 基因在贮藏器官发育过程中表达量持续增加, 直至贮藏器官发育成熟^[13, 27]。在豌豆 (*Pisum sativum*) 中, *SBEII* 的缺失导致种子出现皱褶表型, 淀粉生物合成减少 50%^[28]。在本研究中, 只有 *CesBE2* 在球茎不同发育阶段均有较高的表达水平, 说明 *CeSBE2* 可能在球茎发育过程中发挥关键作用, 支链淀粉与总淀粉在球茎不同发育阶段的比例也印证了 *CeSBE2* 的作用, 与在苹果 (*M. domestica*) 和香蕉 (*M. acuminata*) 上报道的一致^[12, 29]。鉴于 *SBE* 基因在支链淀粉生物合成中的关键作用, 许多作物通过抑制 *SBE* 基因的表达来实现高直链淀粉新种质的创制, 目前已经在水稻 (*O. sativa*)、玉米 (*Z. mays*)、木薯 (*M. esculenta*) 及小麦 (*T. aestivum*) 等作物上获得成功, 创制

了高直链淀粉的种质^[9, 16-17, 30-31]。本研究结果为芋品种改良和高直链淀粉新种质的创制提供了很好的基础和思路。

参考文献

- [1] TETLOW I J, EMES M J. A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis[J]. IUBMB Life, 2014, 66(8): 546-558.
- [2] BAYSAL C, HE W, DRAPAL M, VILLORBINA G, MEDINA V, CAPELL T, KHUSH G S, ZHU C, FRASER P D, CHRISTOU P. Inactivation of rice starch branching enzyme IIb triggers broad and unexpected changes in metabolism by transcriptional reprogramming[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(42): 26503-26512.
- [3] CAI Y, LI S, JIAO G, SHENG Z, WU Y, SHAO G, XIE L, PENG C, XU J, TANG S, WEI X, HU P. OsPK2 encodes a plastidic pyruvate kinase involved in rice endosperm starch synthesis, compound granule formation and grain filling[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(11): 1878-1891.
- [4] WANG Z, MA S, SUN B, WANG F, HUANG J, WANG X, BAO Q. Effects of thermal properties and behavior of wheat starch and gluten on their interaction: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 177: 474-484.
- [5] ZHONG Y, LI Y, QU J, ZHANG X, SEYTAHMETOVNA S A, BLENNOW A, GUO D. Structural features of five types of maize starch granule subgroups sorted by flow cytometry[J]. Food Chemistry, 2021, 356: 129657.
- [6] TIESSEN A, HENDRIKS J H, STITT M, BRANSCHIED A, GIBON Y, FARRÉ E M, GEIGENBERGER P. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply[J]. Plant Cell, 2002, 14(9): 2191-2213.
- [7] DONG M Y, FAN X W, LI Y Z. Cassava *AGPase* genes and their encoded proteins are different from those of other plants[J]. Planta, 2019, 250(5): 1621-1635.
- [8] DONG W Q, HE F L, JIANG H P, LIU L L, QIU Z Y. Comparative transcriptome sequencing of taro corm development with a focus on the starch and sucrose metabolism pathway[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 771081.
- [9] WANG J, HU P, LIN L, CHEN Z, LIU Q, WEI C. Gradually decreasing starch branching enzyme expression is responsible for the formation of heterogeneous starch granules[J]. Plant Physiology, 2018, 176(1): 582-595.

- [10] ZHU J, YU W, ZHANG C, ZHU Y, XU J, LI E, GILBERT R G, LIU Q. New insights into amylose and amylopectin biosynthesis in rice endosperm[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 230: 115656-115662.
- [11] YU J, WANG K, BECKLES D M. Starch branching enzymes as putative determinants of postharvest quality in horticultural crops[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 479-494.
- [12] MIAO H, SUN P, LIU Q, LIU J, JIA C, ZHAO D, XU B, JIN Z. Molecular identification of the key starch branching enzyme-encoding gene *SBE2.3* and its interacting transcription factors in banana fruits[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1): 1354-1368.
- [13] CHEN L, LU D, WANG T, LI Z, ZHAO Y, JIANG Y, ZHANG Q, CAO Q, FANG K, XING Y, QIN L. Identification and expression analysis of starch branching enzymes involved in starch synthesis during the development of chestnut (*Castanea mollissima* Blume) cotyledons[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177792.
- [14] YANDEAU-NELSON M D, LAURENS L, SHI Z, XIA H, SMITH A M, GUILTINAN M J. Starch-branching enzyme IIa is required for proper diurnal cycling of starch in leaves of maize[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 479-490.
- [15] PAN T, LIN L, WANG J, LIU Q, WEI C. Long branch-chains of amylopectin with B-type crystallinity in rice seed with inhibition of starch branching enzyme I and IIb resist in situ degradation and inhibit plant growth during seedling development: degradation of rice starch with inhibition of SBEI/IIb during seedling development[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 9-19.
- [16] UTSUMI Y, UTSUMI C, TANAKA M, TAKAHASHI S, OKAMOTO Y, ONO M, NAKAMURA Y, SEKI M. Suppressed expression of starch branching enzyme 1 and 2 increases resistant starch and amylose content and modifies amylopectin structure in cassava[J]. *Plant Molecular Biology*, 2022, 108(4/5): 413-427.
- [17] LUO S, MA Q, ZHONG Y, JING J, WEI Z, ZHOU W, LU X, TIAN Y, ZHANG P. Editing of the starch branching enzyme gene *SBE2* generates high-amylose storage roots in cassava[J]. *Plant Molecular Biology*, 2022, 108(4/5): 429-442.
- [18] LU T J, LIN J H, CHEN J C, CHANG Y H. Characteristics of taro (*Colocasia esculenta*) starches planted in different seasons and their relations to the molecular structure of starch[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(6): 2208-2215.
- [19] NAGAR C K, DASH S K, RAYAGURU K, PAL U S, NEDUNCHEZHIAN M. Isolation, characterization, modification and uses of taro starch: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 574-589.
- [20] 顾绘, 陈赛男, 李良俊, 程立宝. 芋淀粉分支酶 *SBE* 基因的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2016, 43(10): 2049-2058.
- GU H, CHEN S N, LI L J, CHENG L B. Cloning and expression analysis of starch branching enzyme gene in taro (*Colocasia esculenta*)[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(10): 2049-2058. (in Chinese)
- [21] 王立, 殷剑美, 韩晓勇, 张培通, 郭文琦, 李春宏. 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.
- WANG L, YIN J M, HAN X Y, ZHANG P T, GUO W Q, LI C H. Gene cloning and expression analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Colocasia esculenta*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(6): 1117-1125. (in Chinese)
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] TAKEUCHI A, OHNUMA M, TERAMURA H, ASANO K, NODA T, KUSANO H, TAMURA K, SHIMADA H. Creation of a potato mutant lacking the starch branching enzyme gene *StSBE3* that was generated by genome editing using the CRISPR/dMac3-Cas9 system[J]. *Plant Biotechnology (Tokyo)*, 2021, 38(3): 345-353.
- [24] PEI J, WANG H, XIA Z, LIU C, CHEN X, MA P, LU C, WANG W. Phylogeny and expression pattern of starch branching enzyme family genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) under diverse environments[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 406(1/2): 273-284.
- [25] BAGUMA Y, SUN C, AHLANDSBERG S, MUTISYA J, PALMQVIST S, RUBAIHAYO P R, MAGAMBO M J, EGWANG T G, LARSSON H, JANSSON C. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Plant Science*, 2003, 164(5): 833-839.
- [26] GRAF A, SMITH A M. Starch and the clock: the dark side of plant productivity[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(3): 169-175.
- [27] HAMADA T, KIM S H, SHIMADA T. Starch-branching enzyme I gene (*IbSBEI*) from sweet potato (*Ipomoea batatas*); molecular cloning and expression analysis[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(16): 1255-1261.
- [28] BHATTACHARYYA M K, SMITH A M, ELLIS T H, HEDLEY C, MARTIN C. The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme[J]. *Cell*, 1990, 60(1): 115-122.
- [29] HAN Y, GASIC K, SUN F, XU M, KORBAN S S. A gene

- encoding starch branching enzyme I (*SBET*) in apple (*Malus × domestica*, Rosaceae) and its phylogenetic relationship to *Sbe* genes from other angiosperms[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 43(3): 852-863.
- [30] ZHAO Y, LI N, LI B, LI Z, XIE G, ZHANG J. Reduced expression of starch branching enzyme IIa and IIb in maize endosperm by RNAi constructs greatly increases the amylose content in kernel with nearly normal morphology[J]. *Planta*, 2015, 241(2): 449-461.
- [31] LI J, JIAO G, SUN Y, CHEN J, ZHONG Y, YAN L, JIANG D, MA Y, XIA L. Modification of starch composition, structure and properties through editing of TaSBEIIa in both winter and spring wheat varieties by CRISPR/Cas9[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(5): 937-951.