

少根紫萍淀粉合成关键基因对寡营养胁迫的响应*

王明秀^{1,2} 栾威² 马欣荣² 陶向^{2**} 赵云^{1**}

¹四川大学生命科学学院 成都 610041

²中国科学院成都生物研究所 成都 610041

摘要 浮萍是一种形态高度退化的开花植物, 环境适应性广, 生长条件适宜时可以接近指数增长的速度在16-48 h内实现生物量的翻倍。以寡营养处理, 少根紫萍 (*Landoltia punctata*) 淀粉含量可在7 d内提高到45%以上(干重)。通过深入分析转录组数据, 分别挖掘到ADP葡萄糖焦磷酸化酶编码基因 (*LpAGP*) 5个、颗粒结合型淀粉合酶基因 (*LpGBSS*) 2个、可溶性淀粉合酶基因 (*LpSSS*) 2个、淀粉分支酶基因 (*LpSBE*) 5个、异淀粉酶基因7个 (*LpISA*)、普鲁兰酶基因 (*LpPUL*) 1个。转录组定量结果表明 *LpAGPS1*、*LpAGPL2*、*LpAGPL3*、*LpGBSS1*、*LpGBSSII*、*LpSBE1-1*、*LpISA3* 和 *LpPUL1* 的表达量均因寡营养处理而上调。通过qRT-PCR检测 *LpAGPs* 等16个淀粉合成关键基因的表达量, 发现绝大部分淀粉合成相关基因表达量上调, 而参与淀粉降解途径相关基因 (如 α -淀粉酶和 β -淀粉酶编码基因) 的表达量因寡营养处理而下调。这种不同的调节方式促使少根紫萍淀粉合成“开源节流”, 淀粉得以快速积累。本研究结果可为进一步研究少根紫萍淀粉合成关键基因功能及淀粉积累机制奠定基础。(图3 表2 参33)

关键词 少根紫萍; 寡营养; 淀粉合成基因; 转录组; 荧光定量PCR

CLC Q949.717.03

Responses of starch biosynthesis-related genes to nutrition starvation in

*Landoltia punctata**

WANG Mingxiu^{1,2}, LUAN Wei², MA Xinrong², TAO Xiang^{2**} & ZHAO Yun^{1**}

¹ College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China

² Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract *Landoltia punctata* can accumulate high starch content, up to > 45% (dry weight) in 7 days, upon nutrient starvation. This study aimed to identify the genes related to starch metabolism and their expression patterns in response to starvation in *L. punctata*. The starvation-stress response transcriptome of *L. punctata* was carefully analyzed and used for the identification and quantification of starch metabolism-related genes. A quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to verify the quantification results. The results showed the presence of five *LpAGP*, two *LpGBSS*, two *LpSSS*, five *LpSBE*, seven *LpISA*, and one *LpPUL* genes. The RNA-Seq quantification results showed that *LpAGPS1*, *LpAGPL2*, *LpAGPL3*, *LpGBSS1*, *LpGBSSII*, *LpSBE1-1*, *LpISA3*, and *LpPUL1* were all up-regulated by nutrient starvation. The qRT-PCR results of 16 starch metabolism key genes verified that most of them were up-regulated by starvation, while the expression of α -amylase and β -amylase were down-regulated. The opposite expression change patterns of starch biosynthesis- and degradation-related key genes resulted in the accumulation of starch. This study paves the way for further studies on elucidating the function and mechanism starch metabolism-related genes in *L. punctata*.

Keywords *Landoltia punctata*; nutrient starvation; starch biosynthesis gene; transcriptome; qRT-PCR

淀粉作为植物的主要贮藏态多糖, 存在于根、茎、叶、花、果实、种子等几乎所有植物器官中。高等植物淀粉的生物合成以ADP-葡萄糖为底物, 合成过程包括起始、延长、分支和淀粉粒形成4个步骤, 最关键的3个酶为ADP葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase; EC:

2.7.7.27)、淀粉合酶 (Starch synthase, SS; EC: 2.4.1.21)、淀粉分支酶 (Starch branching enzyme, SBE; EC: 2.4.1.18)^[1-2]。AGPase是淀粉代谢途径的第一个也是最重要的限速酶, 它催化葡萄糖-1-磷酸与ATP反应形成ADP-葡萄糖并释放无机焦磷酸盐^[1-2]。SS进一步催化ADP-葡萄糖与新合成多糖链的非还原末端形成 α -1,4-糖苷键以延长多糖链。与SS不同, SBE催化 α -1,6糖苷键的形成, 使多糖链产生分支, 形成支链淀粉^[1-3]。ADP-葡萄糖的合成是淀粉合成途径中最重要的代谢调控点, 调节AGPase的酶活性可改变植物的碳代谢流从而改变淀粉含量^[4-5]。

收稿日期 Received: 2018-04-18 接受日期 Accepted: 2018-05-02

*国家自然科学基金项目 (31400218) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400218)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhaoyun@scu.edu.cn; taoxiang@cib.ac.cn)

浮萍是浮萍科植物的统称 (Lemnaceae), 包括5个属 (*Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella*, *Wolffia*) 40余个种。浮萍形态高度退化, 仅有一片叶状体和数条根 (甚至无根), 是最小的开花植物。浮萍环境适应性广, 在全球大部分地区均有分布, 常见于静止或缓慢流动的水体中, 尤以污染水体中多见。在温度较高的地区, 浮萍可全年生长。营养丰富时, 浮萍以接近指数增长的方式在16-48 h内实现生物量的翻倍, 年产生生物量达13-38 t/hm² (干重)^[6-7]。以寡营养胁迫处理, 少根紫萍淀粉含量在7 d之内提高到45%以上 (干重)^[8], 以含800 mg/L的烯效唑的Hoagland培养液培养少根紫萍, 10 d后淀粉含量超过48% (干重)^[9], 在缺氮且加入葡萄糖的培养基中, 淀粉含量可高达75% (干重)^[10]。另外, 浮萍的木质素含量较低^[11], 这有利于浮萍生物物质的高效利用, 使浮萍在生物能源开发领域有较大应用前景。因浮萍可在富营养的污水中快速繁殖, 固定高达85%氮和78%磷等液态废弃物, 以及大量的CO₂^[12], 其在美国已应用于污水处理领域近20年。综上所述, 浮萍是一种可集污水处理于一体的新型能源植物, 其种植既不与人类争粮, 亦不与粮争地。

本研究基于少根紫萍转录组数据深入挖掘淀粉合成关键基因, 并对其在寡营养处理后淀粉快速积累过程中的表达模式进行分析, 为浮萍淀粉积累机制解析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用植物材料为少根紫萍 (*Landoltia punctata* 0202), 由本实验室保存。

1.1.2 DNA序列数据 本研究所用DNA序列来源于少根紫萍转录组数据库, 转录组测序的clean reads和denovo组装结果自SRA (Sequence read archive database) 和TSA (Transcriptome shotgun assembly) 数据库下载, 登录号为PRJNA185389。

1.2 方法

1.2.1 浮萍培养及RNA提取 取少根紫萍0202单克隆转接到1/6 × Hoagland液体培养基中培养14 d后, 转接于9个盛装400 mL蒸馏水的500 mL烧杯中进行寡营养处理。每个烧杯转接0.5 g少根紫萍叶状体, 置于光周期16 h/8 h、光照强度130 μmol m⁻² s⁻¹、昼夜温度25 °C/15 °C光照培养箱中培养。接种后不同时间点取样, 取样时从3个烧杯中取相同量的叶状体共计0.5 g混合为1个样品, 每个时间点取3个样品作为生物学重复, 置于液氮速冻备用。以OMEGA公司Plant DNA/RNA Kit (R6733-01) 提取总RNA, 并电泳检测总RNA质量。

1.2.2 基因序列挖掘与分析 在转录组注释结果中, 以淀粉合成关键酶ADP-glucose pyrophosphorylase、Starch synthase、Starch branching enzyme等为关键词搜索, 匹配的转录本即为潜在的淀粉合成关键酶编码序列。将对应的转录本序列逐一提交NCBI进行BlastX比对, 确认注释信息的准确性。每种淀粉合成关键酶的多条编码序列经DNAMAN5.0翻译为蛋白序列, 进行序列的两两比对分析。转录本序列翻译为蛋白质序列后提交TargetP 1.1 ([http://www.cbs.dtu.dk/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)

[services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/))^[13-14]、ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)^[14-15]和TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)^[14], 对蛋白的亚细胞定位和跨膜结构进行预测。

1.2.3 蛋白序列的聚类分析 转录本翻译为多肽序列后, 以Clustalw进行序列比对, 并用MEGA6.0以邻接法 (Neighbor-joining) 建立系统发生树^[16], iTOL (<http://itol.embl.de/>) 进行修饰与标记^[17]。

1.2.4 基因的表达量分析 将转录组测序获得的clean reads与de novo组装结果进行映射比对, 并统计比对到每条转录本的clean reads数量, 基于RESM算法以Trinity package (v2012-06-08) 软件包中的perl脚本^[18]进行标准化处理, 获得各转录本在不同样本中的表达量信息 (单位FPKM)。

1.2.5 荧光定量PCR检测 基于转录本序列, 以Primer Premier 5设计引物: 引物长度20-25 bp, 扩增产物长度100-250 bp。引物交由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。总RNA经北京金式金生物技术有限公司的TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal) (货号AT341-01) 去除gDNA并反转录获得第一链cDNA模板。以Bio-Rad公司的SsoAdvanced SYBR Green Supermix (货号1725262) 试剂盒于Bio-Rad公司的CFX96™ Touch荧光定量PCR仪上进行定量PCR: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环40次。定量PCR结果以CFX Manager分析。

2 结果

2.1 少根紫萍淀粉合成基因序列挖掘

前期研究中, 我们以Illumina HiSeq 2000测序平台对寡营养 (蒸馏水)、烯效唑 (1/6 × Hoagland + 800 mg/L烯效唑) 和全营养 (1/6 × Hoagland) 条件下生长的12个少根紫萍样品进行转录组测序, 共测得543 912 936条90 bp的reads^[8-9, 19]。将12个转录组数据合并以Trinity软件 (v2012-06-08)^[18]进行De novo组装, 获得155 903条长度 ≥ 200 bp的Contigs。以NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的本地BlastX程序将155 903条序列与NCBI的NR数据库进行BlastX比对, 比对结果导入Blast2GO软件进行GO、KEGG注释, 155 903条序列中98 106 (62.9%) 条序列成功获得注释信息。

2.1.1 ADP葡萄糖焦磷酸化酶 对上述转录组数据进行深入分析、挖掘及DNAMAN 5.0反复比对, 共计从98 106条注释的转录本中挖掘到12条ADP葡萄糖焦磷酸化酶全长编码序列 (图1, 表1), 编码7个不同长度的蛋白序列。其中3条小亚基编码序列编码2种不同的小亚基蛋白, 长度分别为525 AA和417 AA; 9条大亚基编码序列编码5种不同的大亚基蛋白, 长度分别为517 AA、536 AA、515 AA、517 AA和515 AA。以转录组测序Read片段 (40-50 bp) 为“钓饵”与挖掘到的AGPase转录本进行步移比对, 发现comp43482_c0_seq10、comp43482_c0_seq15、comp43482_c0_seq1、comp43482_c0_seq28 4条序列实为de novo组装错误的产物: comp43482_c0_seq10实为LpAGPL1的5'端序列与LpAGPL3的3'端序列错误拼接的产物,

2.1.2 淀粉合酶 植物细胞内通常包含两种类型的淀粉合酶: 可溶性淀粉合酶 (Soluble starch synthase, SSS) 和颗粒结合型淀粉合酶 (Granule bound starch synthase, GBSS). 分析发现少根紫萍转录组中共有3条GBSS编码序列和3条SSS编码序列 (图1和表1). 其中comp13332_c0_seq1序列较短, 仅有258 bp; comp36381_c0_seq1长2 856 bp, 编码长度为609 AA的LpGBSSI; comp45414_c0_seq1长2 501 bp, 编码长度为804 AA的LpGBSSII. 3条SSS编码序列长度分别为4 528 bp、4 435 bp和2 326 bp, 其中comp35973_c0_seq1和comp35973_c0_seq2编码LpSSSIII, 且所编码蛋白序列完全相同, 而comp27963_c0_seq1编码LpSSSI, 但未检索到SSS2编码序列. 亚细胞定位预

2.1.4 淀粉去分支酶 淀粉去分支酶 (Starch debranching enzyme, DBE) 在支链淀粉合成过程中发挥重要作用. 根据作用底物的不同, 又可分为异淀粉酶 (Isoamylase, ISA; EC: 3.2.1.68) 和普鲁兰酶 (Pullulanase, PUL; EC: 3.2.1.41). 分析

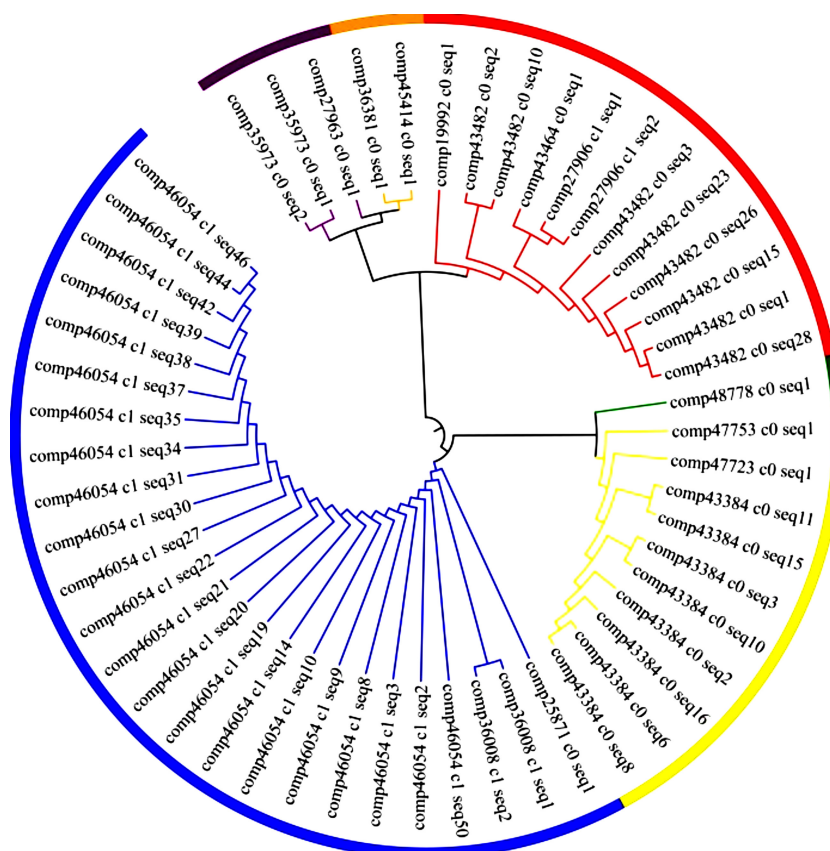


Fig. 1 Cluster analysis of starch biosynthesis enzymes. Different colors mean different enzymes sequences. Red: AGPase; Orange: GBSS; Purple: SSS; Blue: SBE; Yellow: ISA; Green: PUL.

表1 淀粉合成关键酶编码序列分析
Table 1 Analysis of key enzymes encoding sequences involved in starch biosynthesis

基因 Gene	序列编号 Seq ID	转录本长度 Transcript length	蛋白长度 Protein length	叶绿体转运肽得分 cTP	线粒体转运肽得分 mTP	定位 Location
<i>LpAGPS1</i>	comp27906_c1_seq1	2366	525	0.982	0.049	C
<i>LpAGPS1</i>	comp27906_c1_seq2	1626	525	0.982	0.049	C
<i>LpAGPS2</i>	comp19992_c0_seq1	1751	417	0.335	0.076	—
<i>LpAGPL1</i>	comp43482_c0_seq3	1799	517	0.175	0.462	M
<i>LpAGPL1</i>	comp43482_c0_seq23	3995	517	0.175	0.462	M
<i>LpAGPL1</i>	comp43482_c0_seq26	2095	517	0.175	0.462	M
<i>LpAGPL2</i>	comp43464_c0_seq1	1648	536	0.726	0.445	C
<i>LpAGPL3</i>	comp43482_c0_seq2	2029	515	0.621	0.166	C
<i>LpGBSSI</i>	comp36381_c0_seq1	2856	619	0.897	0.033	C
<i>LpGBSSII</i>	comp45414_c0_seq1	2501	804	0.593	0.059	C
<i>LpSSSIII</i>	comp35973_c0_seq2	4528	1143	0.688	0.202	C
<i>LpSSSIII</i>	comp35973_c0_seq1	4435	1143	0.688	0.202	C
<i>LpSSSI</i>	comp27963_c0_seq1	2326	622	0.848	0.507	C
<i>LpSBEIII</i>	comp25871_c0_seq1	3242	909	0.889	0.112	C
<i>LpSBEI-1</i>	comp36008_c1_seq1	2954	815	0.945	0.343	C
<i>LpSBEI-2</i>	comp36008_c1_seq2	3014	835	0.921	0.383	C
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq2	4758	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq3	4982	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq9	3541	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq14	7739	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq21	4910	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq30	7807	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq31	3752	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq35	6258	572	0.265	0.108	—
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq38	7667	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq46	7735	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-3</i>	comp46054_c1_seq50	4686	742	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq42	6180	624	0.265	0.108	—
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq44	7729	839	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq8	3674	794	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq10	7087	839	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq19	6863	839	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq20	4904	794	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq22	7589	839	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq27	6935	839	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq34	7661	839	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq37	7657	839	0.138	0.502	M
<i>LpSBEI-4</i>	comp46054_c1_seq39	3463	794	0.138	0.502	M
<i>LpISA1-1</i>	comp43384_c0_seq2	3478	648	0.316	0.097	—
<i>LpISA1-1</i>	comp43384_c0_seq16	3415	648	0.316	0.097	—
<i>LpISA1-1</i>	comp43384_c0_seq6	3401	648	0.316	0.097	—
<i>LpISA1-1</i>	comp43384_c0_seq8	3338	648	0.316	0.097	—
<i>LpISA1-2</i>	comp43384_c0_seq11	3392	761	0.316	0.097	—
<i>LpISA1-3</i>	comp43384_c0_seq15	3329	921	0.316	0.097	—
<i>LpISA1-4</i>	comp43384_c0_seq3	3315	734	0.316	0.097	—
<i>LpISA1-5</i>	comp43384_c0_seq10	3252	809	0.316	0.097	—
<i>LpISA2</i>	comp47753_c0_seq1	3029	858	0.850	0.030	C
<i>LpISA3</i>	comp47723_c0_seq1	2749	796	0.138	0.353	M
<i>LpPUL1</i>	comp48778_c0_seq1	3605	983	0.877	0.400	C

转运肽由TargetP 1.1预测分析。C：叶绿体转运肽；M：线粒体转运肽；—：无转运肽。
Transit peptides were predicted by TargetP 1.1. C: Chloroplast transit peptide; M: Mitochondrial targeting peptide; —: No targeting peptide was predicted.

少根紫萍转录组，共挖掘到18条ISA编码序列，其中10条序列编码长度大于600 AA的多肽链（表1）。序列分析发现其中8条序列编码ISA1，且编码的多肽链序列前627 AA完全相同。8条ISA1多肽链中comp43384_c0_seq2、6、8、16编码的序列完全相同，长度为648 AA；comp43384_c0_seq11与comp43384_c0_seq15编码多肽链长度分别为761 AA 和921 AA，前747 AA相同；comp43384_c0_seq3与comp43384_c0_seq10编码多肽链

长度分别为734 AA 和809 AA，前627 AA相同。此外两条序列comp47753_c0_seq1和comp47723_c0_seq1分别编码ISA2和ISA3。亚细胞定位预测结果显示多个LpISA1均无转运肽，而LpISA2和LpISA3则分别定位于叶绿体和线粒体中。与LpISA不同，LpPUL编码序列仅有一条，编码多肽链长度为983 AA，且含有叶绿体转运肽。综上，少根紫萍转录组数据中共存在5个不同的ISA1编码基因，1个ISA2和1个ISA3编码基因。

2.2 淀粉合成关键基因的RNA-Seq表达分析

将转录组测序clean reads与denovo组装结果进行映射比对,并统计比对到每条序列的clean reads数量,基于RESM算法,以Trinity package (v2012-06-08) 软件包中的perl脚本^[18]对对比结果进行标准化处理,获得每条序列的表达量信息(单位FPKM)。分析结果(图2)显示,5个AGPase编码基因的表达量差别较大,其中*LpAGPSI* (comp27906_c1_seq1) 表达量 > 200 FPKM,且因寡营养处理后上调明显,2 h后表达量达到252.65 FPKM,24 h后表达量为452.95 FPKM。*LpAGPS2* (comp19992_c0_seq1) 的表达量较*LpAGPSI*低,0 h表达量仅为45.75,且寡营养处理后表达量仅有轻微的下调。3条*LpAGPL1*转录本中表达量最高的comp43482_c0_seq26在处理前表达量为93.21 FPKM,经寡营养处理后无明显变化。*LpAGPL2* (comp43464_c0_seq1) 在处理前的表达量较低,仅有18.44 FPKM,但随着寡营养处理时间延长,表达量显著上调,至24 h时达137.32 FPKM。*LpAGPL3*对寡营养胁迫的响应与*LpAGPL2*类似,其在寡营养处理的0、2、24 h的表达量分别为67.32、75.11和560.89 FPKM。*LpGBSSI*与*LpGBSSII*的表达水平平均因寡营养处理而上调,其中*LpGBSSI* (comp36381_c0_seq1) 的表达量24 h内从78.61 FPKM上调为483.37 FPKM,而*LpGBSSII* (comp45414_c0_seq1) 变化较小。*LpSSSI*经寡营养处理后未见显著变化,而表达量最高的*LpSBEI-1* (comp36008_c1_seq2) 表达量因经寡营养处理从64.24 FPKM上调为101.36 FPKM。5个*LpISA1*基因中,*LpISA1/2/3/4*表达量极低,表达量最高的*LpISA1-5* (comp43384_c0_seq10) 经寡营养处理后呈现下调趋势,其0 h、2 h、24 h的表达量分别为57.26 FPKM、35.25 FPKM和15.87 FPKM。comp47753_c0_seq1编码的*LpISA2*在3个样品中表达量分别为44.27 FPKM、56.18 FPKM、40.83 FPKM,呈现轻微上调后下调的趋势,而*LpISA3* (comp47723_c0_seq1) 的表达量分别为21.66 FPKM、14.56 FPKM和39.48 FPKM。*LpPUL1* (comp48778_c0_seq1) 的表达量变化趋势与comp47723_c0_seq1相似。

2.3 淀粉合成关键基因的荧光定量PCR验证

为验证转录组定量结果的可靠性,根据转录组组装序列设计引物(表2),以30S核糖体蛋白编码基因(comp46738_c0_seq1)为内参,设定0 h的表达量为1.0,对*LpAGPSI*等10个淀粉合成关键基因进行荧光定量PCR分析。结果(图3)显示,寡营养处理2 h后,*LpAGPSI* (comp27906_c1_seq1) 的表达量无明显变化,但24 h时表达量是0 h的1.81倍;*LpAGPS2* (comp19992_c0_seq1) 与*LpAGPL1* (comp43482_c0_seq26) 经寡营养处理后,表达量变化很小;*LpAGPL2* (comp43464_c0_seq1) 和*LpAGPL3* (comp43482_c0_seq2) 在寡营养处理24 h后,表达量分别为0 h的5.69倍和5.26倍,上调明显。*LpSSSI* (comp27963_c0_seq1) 编码序列在处理2 h和24 h后的表达量分别为起始表达量的0.052倍和0.44倍,因寡营养处理而下调;*LpSSSIII* (comp35973_c0_seq1) 受到寡营养处理的影响与*LpSSSI*相反,2 h和24 h分别达到起始表达量的1.37倍和1.69倍;两个GBSS编码基因均因寡营养处理而上调,其中*LpGBSSI* (comp36381_c0_seq1) 在24 h的表达量上调至0 h表达量的3.95倍;*LpSBEI-1* (comp36008_c1_seq2) 表达量仅有轻微上调。*LpISA1-5* (comp43384_c0_seq10) 在2 h和24 h的表达量分别为0 h的0.86和0.22倍,下调明显。*LpISA2* (comp47753_c0_seq1) 的表达量几乎不变,而*LpISA3* (comp47723_c0_seq1) 的表达量则呈现持续上升的趋势,至24 h时表达量上升为0 h的1.99倍。comp48778_c0_seq1编码的*LpPUL1*在寡营养处理2 h时无表达变化,24 h时为0 h的1.21倍。comp45644_c0_seq11和comp27199_c0_seq1分别编码 α -淀粉酶(α -amylase)和 β -淀粉酶(β -amylase),二者的表达量均在寡营养处理后有较明显的下调,24 h时的表达量仅为0 h表达量的0.21倍和0.71倍。

3 讨论与结论

淀粉可根据分子结构分为直链淀粉和支链淀粉。直链淀

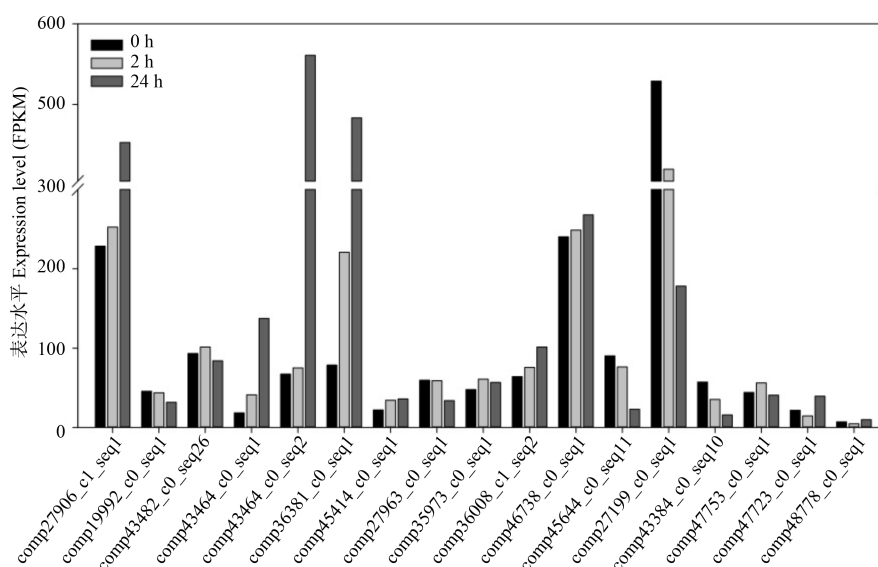


图2 淀粉合成关键基因的转录组定量。

Fig. 2 RNA-Seq quantification of starch biosynthesis-related genes.

表2 荧光定量PCR引物

Table 2 Primers for qRT-PCR verification

基因 Gene	序列编号 Seq ID	正向引物 Primer F	反向引物 Primer R
<i>LpAGPS1</i>	comp27906_c1_seq1	ATGGGAGCCGATTACTATGAGAC	GCCCAATCCGAGCATTCTTAT
<i>LpAGPS2</i>	comp19992_c0_seq1	GCTCCGAATACCCGTCCGTTAC	CATCCCGCCATACTTCTTGTC
<i>LpAGPL1</i>	comp43482_c0_seq26	GAGGACGCAAGAGCTAAAGACA	GGGAAGGCAGGAAATAGTGATG
<i>LpAGPL2</i>	comp43464_c0_seq1	GGGAGGACATAGGGACGATAAA	CAGAAAGCGAGGAGAGGTGAAG
<i>LpAGPL3</i>	comp43482_c0_seq2	ACGAGTTGGAGGCAATGAAAGT	TGTCCAGTCGGAAGGCGTAG
<i>LpSSSI</i>	comp27963_c0_seq1	GTGCTGTGTCGTCCTCTACTG	TCTTTTGCCATCCCTCGCTT
<i>LpSSSIH1</i>	comp35973_c0_seq1	TGACATTTTACATTGCCACGA	ATTGTGAAGACTACACGAGCA
<i>LpGBSSI</i>	comp36381_c0_seq1	ACGGACTCTACAAGAACGCAAA	CGGCTCACAGTCAGAACCTT
<i>LpGBSSI2</i>	comp45414_c0_seq1	CCCTTCGTAAATGGCACTCT	TACAAGGTGGACGGACAGGA
<i>LpSBE1-1</i>	comp36008_c1_seq2	CGAGTTTGGTGTATGGGAGGTTT	GTCTCTTCGGTTGTGGGTGTTC
<i>LpISA1-5</i>	comp43384_c0_seq10	ATCCGATTCAAGGTGACAGTA	CCCGCACAGACATTTAGC
<i>LpISA2</i>	comp47753_c0_seq1	TATGAGTGGTTCCGTTTGGT	CACGCATAAGGCTTTAGTTC
<i>LpISA3</i>	comp47723_c0_seq1	AGTTCGCCACCACTTGTTAGG	AAACTCCCAACGAGATAAAGAC
<i>LpPUL1</i>	comp48778_c0_seq1	ATCTTATTTCTTGGGCTGTTA	CATTCTTTGCCTTGACCATAGTG
<i>LpAMY</i>	comp45644_c0_seq11	TGGACTTCAATCAAGATGCTCAC	CTCCAATACTCACACTTATCCAG
<i>LpBMY</i>	comp27199_c0_seq1	AACAAGCACGGCGTTTGGTCT	GCGAGAAGAAATACGCCCCCAT
<i>Lp30S</i>	comp46738_c0_seq1	TTTCTCCCCGATGCTGTCTC	GAATACTCCACCCTTTTGTGTTTG

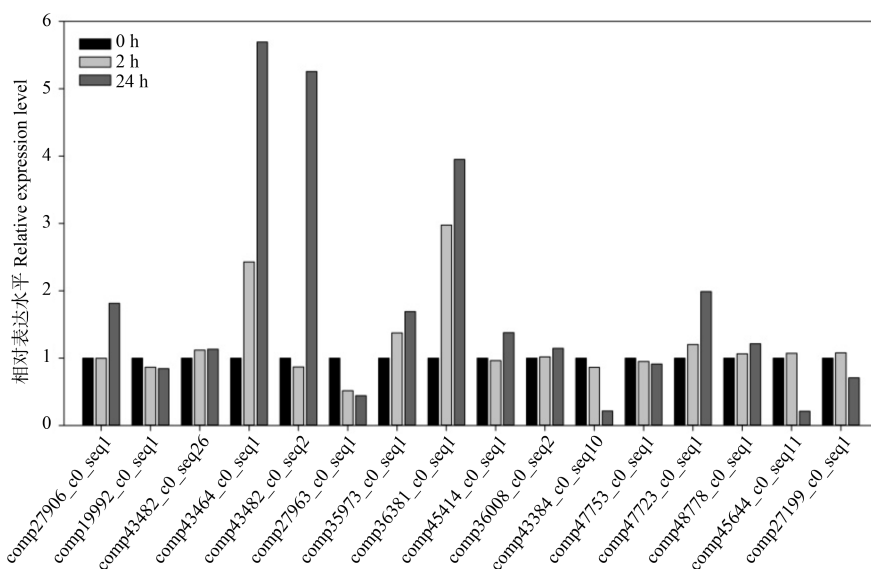


图3 淀粉合成关键基因的qRT-PCR定量。

Fig. 3 qRT-PCR quantification of starch biosynthesis key genes.

粉由颗粒结合型淀粉合酶GBSS催化合成, 支链淀粉的合成过程比直链淀粉复杂: 葡萄糖-1-磷酸与ATP在AGPase催化下合成ADP-葡萄糖, 随后在可溶性淀粉合酶SSS催化作用下延伸葡聚糖链, 淀粉分支酶SBE进一步通过 α -1,6-糖苷键形成支链并延长, 再由淀粉去分支酶DBE修饰支链形成成熟的淀粉大分子。2014年, Wang等人报道了浮萍科的第一个基因组多根紫萍*Spirodela polyrhiza*基因组^[20]。Wang等人的研究结果表明多根紫萍基因组大小为158 Mb, 编码19 623蛋白质, 其中包括4个AGPase, 1个GBSS, 4个SSS, 3个SBE, 3个ISA, 1个PUL编码基因。与多根紫萍相比较, 少根紫萍有5个AGPase, 2个GBSS, 2个SSS, 5个SBE, 7个ISA, 1个PUL。多根紫萍的3个AGPase大亚基编码基因已克隆^[21], 但小亚基编码基因尚未见报道。将少根紫萍的3个AGPase与多根紫萍的AGPase进行比对, *LpAGPL1*与*SpAGPL1* (GenBank号AEV40471) 相似度达94.39%, *LpAGPL2*与*SpAGPL2* (GenBank号AEV40472) 相似

度为95.52%, *LpAGPL3*与*SpAGPL3* (GenBank号AEV40474) 相似度为83.30%。据此可推测少根紫萍3个AGPase大亚基编码基因发挥与多根紫萍已克隆的3个AGPase大亚基基因类似的功能。此外, 经序列比对, 少根紫萍的GBSS, SSS、SBE、DBE均可在多根紫萍基因组编码蛋白中比对到对应的蛋白序列, 且相似度均在79%以上。

据Wang等人研究报道, ABA处理可促进多根紫萍形成休眠体turion, 快速积累淀粉^[21]。3个多根紫萍AGPase大亚基编码基因在turion形成过程中表达模式存在较大差别: *SpAGPL1*在叶状体中表达量较高, 但在turion形成过程中表达量下调; *SpAGPL2*在ABA处理初期(1 d)表达量下调, 随后在2 d时达到起始表达量(0 d)的2倍以上; *SpAGPL3*在ABA处理3 d后表达量上调为起始表达量(0 d)的10倍, 表明*SpAGPL2*和*SpAGPL3*在ABA处理后淀粉快速积累过程中发挥重要作用。随着时间推移, *SpAGPL2*和*SpAGPL3*表达量均

呈明显下降趋势,这可能与处理后期(3 d以后)RNA合成代谢减弱相关^[22]。少根紫萍无法像多根紫萍一样形成富含淀粉的休眠体turion,但前期研究中我们发现少根紫萍经寡营养或烯效唑处理可快速积累淀粉^[8-9, 19, 23]。将少根紫萍转接到蒸馏水中进行寡营养处理,因蒸馏水中缺乏少根紫萍生长所需的几乎所有必需元素(H、O除外),体内的总体代谢水平受到抑制而启动胁迫逃逸机制,以淀粉形式储存碳营养和能源,使少根紫萍在寡营养处理7 d后淀粉含量达到45% (干重)以上^[8]。以含800 mg/L的烯效唑的Hoagland培养液培养10 d淀粉含量超过48% (干重)^[9]。代谢通路水平分析结果显示在寡营养或烯效唑处理后,淀粉合成代谢增强,而降解代谢减弱,通过调控碳代谢流而“开源节流”,以实现淀粉的快速积累^[8]。然而,前期胁迫响应分析过程中均未深入分析每个淀粉合成关键编码基因的应答与淀粉积累的关系。

本研究基于比较转录组数据对多个少根紫萍AGPase编码基因的寡营养响应进行深入分析,发现寡营养处理的前24 h, *LpAGPS1*表达量显著上调, *LpAGPS2*和*LpAGPL1*变化较小,而*LpAGPL2*和*LpAGPL3*则显著上调(图2)。荧光定量PCR分析证实寡营养处理后*LpAGPL2*、*LpAGPL3*表达变化明显(图3)。因此推测在*LpAGPS1*和*LpAGPL2*、*LpAGPL3*在寡营养处理导致的少根紫萍淀粉快速积累过程中发挥主要作用。赵昭等人曾就少根紫萍AGPase编码基因对氮、磷饥饿的响应进行比较分析^[24],其结果表明*LpAGPL2*在氮饥饿处理的前72 h持续上调,与本研究寡营养处理后*LpAGPL2*的应答模式相同;但氮饥饿处理后2 h, *LpAGPL1*和*LpAGPL3*即出现表达量高峰值,随后在24 h时表达量已有所下降,其中*LpAGPL3*下调至低于0 h的表达量,并在随后维持于较低表达水平; *LpAGPS1*在N饥饿处理2 h和24 h后,表达量均高于起始表达量,与本研究寡营养处理寡营养应答模式类似。寡营养处理后少根紫萍的2个*LpGBSS*均呈上调表达趋势,表明直链淀粉的合成增强;而*LpSBE*的上调表达则说明支链淀粉合成同样增强(图2、3)。淀粉去分支酶曾被认为只在淀粉彻底水解中起作用,直到上世纪90年代,研究人员通过研究DBE基因突变株发现DBE在支链淀粉的合成中起着关键作用^[25-26]。根据底物的不同,DBE可分为异淀粉酶和普鲁兰酶,异淀粉酶以直链淀粉和糖原为底物,普鲁兰酶则以极限糊精为底物。经分析少根紫萍转录组中有多个淀粉去分支酶DBE编码基因,且多个DBE基因表达量极低,其中相对高表达的DBE基因呈现不同变化趋势: *LpISA1-5*在处理的前24 h呈持续下调趋势,而*LpISA2*和*LpISA3*则分别呈先升后降和先降后升的变化趋势; *LpPUL1*与*LpISA3*变化趋势相同,说明不同的DBE在寡营养处理的不同时间发挥不同的作用。为分析淀粉降解代谢对寡营养胁迫的响应,以qRT-PCR对 α -淀粉酶和 β -淀粉酶基因进行定量分析,结果显示二者均因寡营养处理而表达下调。合成代谢的增强和降解代谢的减弱,最终实现淀粉代谢的“开源节流”。

类黄酮是高等植物中的一类具有多种重要功能的代谢产物^[27-30]。研究显示在大多数植物中类黄酮的含量范围从0.5%到1.5% (干重)^[24],而少根紫萍类黄酮含量可以高达2%,甚至更高^[25]。前期研究中,结合转录组、蛋白质组及代谢组学分析寡营养处理后少根紫萍类黄酮含量及合成代谢流

变化,发现寡营养处理后,少根紫萍的类黄酮与木质素合成上游途径的3个关键酶均高表达,但分支点之后更多的代谢中间产物流向类黄酮代谢分支,这解释了为何少根紫萍中类黄酮含量较高而木质素含量非常低;烯效唑处理后,多个类黄酮代谢相关基因被抑制;而全营养培养条件下,类黄酮代谢相关转录本同样存在表达量变化,但总体而言上调表达的转录本较下调表达转录本更多^[31]。类黄酮含量测定结果显示寡营养处理7 d后类黄酮含量高达5.56%,烯效唑处理7 d类黄酮含量则降低至0.94%,而全营养处理后含量为3.37%。这表明相比于烯效唑和全营养培养,寡营养处理能促使少根紫萍大量合成类黄酮。考虑到不同培养条件下少根紫萍生物量积累量不一样,不同条件下类黄酮总量的变化应有较大差别。类黄酮有抵御逆境的作用,在少根紫萍感知到寡营养逆境后,类黄酮代谢增强,更多类黄酮被合成。而因为营养缺失,寡营养条件下少根紫萍生物量积累较少,处理7 d后生物量仅为起始量的2.8倍,但淀粉和类黄酮均快速积累,淀粉总量在7 d内上升至起始淀粉量的42倍。烯效唑处理条件下生物量积累量与全营养培养条件相当,且淀粉含量快速积累,7 d内上升至起始淀粉量的46倍,但类黄酮含量降低。全营养培养下虽然生物量快速积累,但淀粉含量一直处于较低水平(3%-5%)之间,且类黄酮含量变化小。因此,寡营养可作为少根紫萍同时快速积累淀粉和类黄酮的最优培养方式:先在富营养条件下培养快速积累生物量,继而转移到寡营养条件下培养以积累淀粉和类黄酮。此外,李琪等研究发现少根紫萍在快速吸附污染水体中氨氮(NH_4^+-N)和总磷(TP)的同时亦可快速积累淀粉,污染地表水培养的同时添加 CO_2 可加速少根紫萍的淀粉积累^[32]。刘洋、陈晓仪等发现24 h全光照利于少根紫萍的淀粉积累,全光照结合寡营养处理21 d后其淀粉含量(干重)可达到60.03%^[23, 33]。因此在生产应用中可根据实际情况和需求在生物量积累或淀粉积累过程中辅以高浓度 CO_2 或全光照。

参考文献 [References]

- 1 Preiss J, Ball K, Smith-White B, Iglesias A, Kakefuda G, Li L. Starch biosynthesis and its regulation [J]. *Biochem Soc Trans*, 1991, **19** (3): 539-547
- 2 Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, **61** (1): 209-234
- 3 Nakamura Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, **43** (7): 718-725
- 4 Smidansky ED, Clancy M, Meyer FD, Lanning SP, Blake NK, Talbert LE, Giroux MJ. Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (3): 1724-1729
- 5 Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y. Starch biosynthesis in cereal endosperm [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, **48** (6): 383-392
- 6 Datko AH, Mudd SH, Giovanelli J. *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746: development of standardized growth conditions suitable for biochemical

- experimentation [J]. *Plant Physiol*, 1980, **65** (5): 906-912
- 7 Skillicorn P, Spira W, Journey W. Duckweed aquaculture: a new aquatic farming system for developing countries [M]. Washington: World Bank, 1993: 81-124
 - 8 Tao X, Fang Y, Xiao Y, Jin YL, Ma XR, Zhao Y, He KZ, Zhao H, Wang HY. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation [J]. *Biotechnol Biofuel*, 2013, **6**: 72
 - 9 Liu Y, Fang Y, Huang M, Jin Y, Sun J, Tao X, Zhang G, He K, Zhao Y, Zhao H. Uniconazole-induced starch accumulation in the bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*) II: transcriptome alterations of pathways involved in carbohydrate metabolism and endogenous hormone crosstalk [J]. *Biotechnol Biofuel*, 2015, **8**: 64
 - 10 Landolt E, Kandler R. Biosystematics Investigation in the Family of Duckweeds (Lemnaceae) (Vol. 4). The Family of the Lemnaceae: A Monographic Study [M]. Zurich: Veroff Geobot Inst ETH, 1987
 - 11 Blazey EB, McClure JW. The distribution and taxonomic significance of lignin in the Lemnaceae [J]. *Am J Bot*, 1968, **55**: 1240-1245
 - 12 El-Shafai SA, El-Gohary FA, Nasr FA, van der Steen NP, Gijzen HJ. Nutrient recovery from domestic wastewater using a UASB-duckweed ponds system [J]. *Bioresource Technol*, 2007, **98** (4): 798-807
 - 13 Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. *J Mol Biol*, 2000, **300** (4): 1005-1016
 - 14 Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. *Nat Protoc*, 2007, **2** (4): 953-971
 - 15 Emanuelsson O, Nielsen H, Von Heijne G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites [J]. *Protein Sci*, 1999, **8** (5): 978-984
 - 16 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, **30** (12): 2725-2729
 - 17 Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. *Bioinformatics*, 2007, **23** (1): 127-128
 - 18 Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29** (7): 644-652
 - 19 Liu Y, Fang Y, Huang M, Jin Y, Sun J, Tao X, Zhang G, He K, Zhao Y, Zhao H. Uniconazole-induced starch accumulation in the bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*) I: transcriptome analysis of the effects of uniconazole on chlorophyll and endogenous hormone biosynthesis [J]. *Biotechnol Biofuel*, 2015, **8**: 57
 - 20 Wang W, Haberer G, Gundlach H, Glasser C, Nussbaumer T, Luo MC, Lomsadze A, Borodovsky M, Kerstetter RA, Shanklin J, Byrant DW, Mockler TC, Appenroth KJ, Grimwood J, Jenkins J, Chow J, Choi C, Adam C, Cao XH, Fuchs J, Schubert I, Rokhsar D, Schmutz J, Michael TP, Mayer KF, Messing J. The *Spirodela polyrrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3311
 - 21 Wang W, Messing J. Analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase expression during turion formation induced by abscisic acid in *Spirodela polyrrhiza* (greater duckweed) [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, **12**: 5
 - 22 Smart CC, Trewavas AJ. Absciscic-acid-induced turion formation in *Spirodela polyrrhiza* L III. Specific changes in protein synthesis and translatable RNA during turion development [J]. *Plant Cell Environ*, 1984, **7** (2): 121-132
 - 23 Liu Y, Wang XH, Fang Y, Huang MJ, Chen XY, Zhang Y, Zhao H. The effects of photoperiod and nutrition on duckweed (*Landoltia punctata*) growth and starch accumulation [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, **115**: 243-249
 - 24 Zhao Z, Shi HJ, Wang ML, Cui L, Zhao H, Zhao Y. Effect of nitrogen and phosphorus deficiency on transcriptional regulation of genes encoding key enzymes of starch metabolism in duckweed (*Landoltia punctata*) [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2015, **86**: 72-81
 - 25 James MG, Robertson DS, Myers AM. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels [J]. *Plant Cell*, 1995, **7** (4): 417-429
 - 26 Zeeman SC, Umemoto T, Lue W-L, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J. A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen [J]. *Plant Cell*, 1998, **10** (10): 1699-1711
 - 27 Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2001, **126** (2): 524-535
 - 28 Buer CS, Djordjevic MA. Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2009, **60** (3): 751-763
 - 29 Martin C, Gerats T. Control of pigment biosynthesis genes during petal development [J]. *Plant Cell*, 1993, **5** (10): 1253-1264
 - 30 Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, **14** (2): 3540-3555
 - 31 Tao X, Fang Y, Huang MJ, Xiao Y, Liu Y, Ma XR, Zhao H. High flavonoid accompanied with high starch accumulation triggered by nutrient starvation in bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*) [J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**: 166
 - 32 李琪, 方扬, 许亚良, 赖烦, 苏羽华, 靳艳玲, 赵海. 少根紫萍对微污染地表水的净化及淀粉积累[J]. 应用与环境生物学报, 2018, **24** (6): 1324-1329 [Li Q, Fang Y, Xu YL, Lai F, Su YH, Jin YL, Zhao H. Duckweed *Landoltia punctata* purifying micro-polluted surface water and producing starch [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, **24** (6): 1324-1329]
 - 33 陈晓仪, 杨千叶, 赵琦. 不同光周期对浮萍生长及淀粉积累的影响[J]. 北方园艺, 2017, **22**: 50-54 [Chen XY, Yang QY, Zhao. Effective of different photoperiod on the growth and starch accumulation of duckweed [J]. *North Horticult*, 2017, **22**: 50-54]