

李智博, 董世满, 曾长英, 等. 低温贮藏条件下木薯种茎可溶性糖与干旱胁迫耐受性的相关性研究 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(4): 58-66.
LI Zhibo, DONG Shiman, ZENG Changying, et al. Correlation between soluble sugar and tolerance to drought stress of cassava stem under low temperature storage[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(4): 58-66.

低温贮藏条件下木薯种茎可溶性糖与干旱胁迫耐受性的相关性研究

李智博^{1,2}, 董世满^{1,2}, 曾长英², 赵平娟¹, 李淑霞¹, 彭 明¹

(1 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101; 2 海南大学 热带作物学院, 海南 海口 570228)

摘要:【目的】研究木薯种茎在不同温度贮藏不同时间后的失水状况、可溶性糖含量以及相关糖代谢信号通路中有关酶基因表达量的变化, 分析不同温度下海藻糖含量与种茎失水率的相关性。【方法】以‘木薯 60444’种茎为试验材料, 采后分别贮藏于低温 (20±2)℃、常温 (36±2)℃ 0~30 d, 测定种茎失水率、相关可溶性糖含量, 运用实时荧光定量 PCR 分析种茎糖代谢相关基因的表达, 木薯种茎海藻糖含量和失水率的相关性分析采用 Pearson 法。【结果】低温贮藏组种茎失水率在 10、20、30 d 显著低于常温贮藏组 ($P<0.01$)。低温与常温贮藏种茎海藻糖含量随贮藏时间的延长整体呈不同程度地提升, 且低温贮藏组在 10、20、30 d 显著低于常温贮藏组 ($P<0.05$); 蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖含量均随贮藏时间的延长整体呈下降趋势。相关性分析表明, 低温贮藏组与常温贮藏组种茎海藻糖含量与种茎失水率呈强线性相关, 且 2 个贮藏组回归方程存在显著差异, 低温贮藏组相关系数低于常温贮藏组。实时荧光定量 PCR 分析表明, 低温贮藏不同程度地降低了糖酵解相关基因表达, 低温贮藏组海藻糖-6-磷酸合成酶基因 (*MeTPS-1*) 的表达量在贮藏 10、20、30 d 显著低于常温贮藏组 ($P<0.05$)。【结论】低温贮藏有助于木薯种茎保水, 减缓糖酵解速度, 延长贮藏时间。海藻糖与木薯种茎失水胁迫呈强相关性, 海藻糖含量上升有助于提升木薯种茎的保水能力。

关键词: 木薯种茎; 低温贮藏; 海藻糖; 可溶性糖; 海藻糖-6-磷酸合成酶

中图分类号: S330.29

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)04-0058-09

Correlation between soluble sugar and tolerance to drought stress of cassava stem under low temperature storage

LI Zhibo^{1,2}, DONG Shiman^{1,2}, ZENG Changying², ZHAO Pingjuan¹, LI Shuxia¹, PENG Ming¹
(1 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2 College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: 【Objective】The changes of water loss status, soluble sugar content and relative enzyme gene expression in related glyco metabolism signal pathway of cassava stem under different storage temperature and time were studied, and the correlation between trehalose content and water loss rate of cassava stem was

收稿日期: 2021-09-24 网络首发时间: 2022-01-17 10:17:03
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220114.1650.002.html> 2022-01-17 10:17:03

作者简介: 李智博, 硕士研究生, 主要从事木薯耐低温的分子机理研究, E-mail: 1421452858@qq.com; 通信作者: 赵平娟, 副研究员, 博士, 主要从事热带植物抗逆种质培育研究, E-mail: zhaopingjuan@itbb.org.cn; 李淑霞, 副研究员, 博士, 主要从事植物应答逆境胁迫的分子机制、植物基因工程、利用现代生物技术进行木薯抗逆品质改良以及种质创新利用等研究, E-mail: lishuxia@itbb.org.cn; 彭 明, 研究员, 博士, 主要从事木薯抗旱、耐贫瘠的分子机理, 低温敏感分子基础及耐低温育种, 转基因种质创新等研究, E-mail: pengming@itbb.org.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD1000500); 海南省自然科学基金 (320MS097); 中国热带农业科学院热带生物技术研究所基本科研业务费 (1630052021026)

analyzed. 【Method】 The stem of ‘cassava 60444’ was used as the experimental material. The stem was stored under low temperature of (20±2)℃ and normal temperature of (36±2)℃ for 0–30 d after harvest. The water loss status and soluble sugar content were determined, the change of related enzyme gene expression in the signal pathway of sugar metabolism was analyzed by real-time fluorescence quantification PCR, and the correlation between trehalose content and water loss rate of cassava stem was analyzed by Pearson method. 【Result】 The water loss rates of cassava stem in low temperature storage group at 10, 20, 30 d were significantly lower than those in normal temperature storage group ($P<0.01$). The trehalose contents of cassava stems under low and normal temperature storage overall increased to different degrees with the extension of storage time, and the content of low temperature storage group was significantly lower than that of normal temperature storage group at 10, 20, 30 d ($P<0.05$). The contents of sucrose, glucose, fructose and maltose in low and normal temperature storage groups all showed a decreasing trend with storage time. Correlation analysis showed that there was a strong linear correlation between trehalose content and water loss rate in low and normal temperature storage groups, and there was significant difference in the regression equations between the two storage groups with the smaller correlation coefficient under low temperature storage. Real-time quantitative PCR analysis showed that the expression of glycolysis related genes increased under low and normal temperature for 10–30 d, most related genes in low temperature storage group had lower expression level, and the expression of trehalose-6-phosphate synthase gene (*METPS-1*) at 10, 20, 30 d was significantly low than that in normal temperature storage group ($P<0.05$). 【Conclusion】 Low temperature storage of cassava stem contributes to retaining water, slowing down glycolysis rate and prolonging storage time. There is a strong correlation between trehalose and water loss stress of cassava stem, and the increase of trehalose content is helpful to improve the water retention capacity of cassava stem.

Key words: Cassava stem; Low temperature storage; Trehalose; Soluble sugar; Trehalose-6-phosphate synthase

木薯 *Manihot esculenta* Crantz 是大戟科木薯属植物, 世界三大薯类作物之一, 原产自南美洲巴西等地, 现在是我国热带以及亚热带地区重要的经济作物。木薯是无性繁殖作物, 在生产中以种茎繁殖为主, 种茎的好坏不仅影响全苗质量, 而且影响植株的生长、块根分化, 因此, 种茎的贮藏质量直接影响木薯产业的发展^[1-2]。近些年来, 我国木薯的产地向北迁移, 导致木薯种茎的贮藏期变长。木薯种茎在一般情况下需要贮藏 2~3 个月, 有些地方甚至需要 4~5 个月才能种植^[3], 在贮藏的过程中, 如果环境温度过高或者贮藏时间过久, 木薯种茎离体后极易干旱失水, 从而影响木薯种茎的成活率, 最终影响到木薯的生长发育以及最终产量。所以, 开展低温贮藏对木薯种茎生理特性影响的研究以及了解采后贮藏木薯种茎内相关可溶性糖的转化, 有助于改良木薯种茎贮藏方式和提高木薯产量。

在植物的生命周期中, 种子萌发和早期幼苗生长依赖于贮藏物质, 主要是碳水化合物, 它们以可溶性糖(蔗糖、葡萄糖和果糖)的形式从种子贮藏组织转移到茎和胚根等各种器官, 是细胞生长和维持渗透稳态所必需物质^[4-5]。蔗糖是可溶性糖的

主要成分之一, 在光合作用中产生再通过韧皮部运输到库组织进行利用和储存^[6]; 葡萄糖是植物体中的营养物质和信号分子, 不仅参与糖酵解过程, 而且可被己糖激酶感知^[7-8]; 果糖是由蔗糖通过与细胞壁结合的转化酶结合分解而成, 具有一种特定的感知与信号通路, 该通路共享下游信号成分, 如脱落酸和葡萄糖信号中的成分^[9]。可溶性糖对环境胁迫高度敏感, 环境胁迫作用于从源器官到库器官的碳水化合物供应^[10]。可溶性糖的关键作用是通过糖代谢产生更多的保护性物质, 为正常的代谢过程提供能源, 同时也可提高细胞的渗透势, 增强保水性能, 维持膨压并且能够有效地清除 ROS, 维持正常的生理代谢功能, 避免原生质体在逆境条件下脱水受到伤害, 从而对原生质膜起到保护作用^[11-12]。植物在逆境时可以通过增加可溶性糖含量来提高对环境的适应性。单忠英等^[13]发现, 木薯苗在受到干旱胁迫后, 叶片内的可溶性糖含量随着供水量的增加而逐渐下降, 在干旱胁迫下木薯苗能积累更多的可溶性糖, 增强渗透调节能力, 提高抗旱能力。Shi 等^[14]发现, 失水胁迫处理组狗牙根的可溶性糖含量显著高于对照组。

海藻糖是一种非还原性双糖,广泛存在于真菌、细菌及植物和无脊椎动物体内,但在大多数高等植物中,海藻糖仅以痕量存在,而且检测到的痕量是不可重复的,并且一度被怀疑是微生物污染^[15]。海藻糖具有多种生物学功能,既可作为能量来源又作为非生物胁迫的保护性糖或信号糖^[16-18]。海藻糖是木薯在干旱环境中产生的重要物质。赵超等^[19]发现在干旱胁迫下,木薯种茎皮层和中柱均产生较高浓度的海藻糖,而对照并未产生海藻糖。张丹^[20]通过定量 PCR 检测出干旱胁迫下木薯根部海藻糖合成酶基因 *TPS1-3* 表达量最高,推测其在木薯抗旱调控中起重要作用。Han 等^[21]在耐旱作物木薯、麻疯树和蓖麻中发现了大量海藻糖。

海藻糖-6-磷酸合成酶 (Trehalose-6-phosphate synthase, *TPS*) 基因是海藻糖合成酶的关键基因。研究发现,拟南芥 *TPS* 基因家族有 11 个基因,其中 *AtTPS* 基因家族可进一步划分为 *AtTPS1~4* 和 *AtTPS5~11* 这 2 个亚族。目前仅 *AtTPS1* 基因被证实可以明显影响 *TPS* 酶活性,且对植物生长代谢过程有影响,而 *TPS2~4* 基因被推测仅对十字花科植物的 *TPS* 蛋白酶有作用,此外, *TPS5~TPS11* 基因的生物学功能仍不明确^[22-23]。木薯 *TPS* 基因家族通过转录组数据鉴定有 12 个基因,与拟南芥 *TPS* 基因家族数据类似,同样分为 *MeTPS1~4* 和 *MeTPS5~12* 这 2 个亚族。推测 *MeTPS1~4* 为有活性的海藻糖合成酶基因,而 *MeTPS5~12* 都具有完整的 *TPS* 结构域以及 *TPS* 活性所需的基序,但是这 8 个基因可能是没有活性的^[21]。

前期研究普遍比较重视木薯的根系和叶片,而对木薯种茎的关注较少,且大部分对种茎的研究是与生长期种茎有关,对于采后贮藏种茎的生理及信号途径的研究较少见。为此,我们通过将‘木薯 60444’种茎置于不同温度贮藏 0~30 d,了解木薯种茎在不同温度长时间贮藏后可溶性糖含量变化趋势,解析低温贮藏木薯种茎生理变化及其分子机制,同时也为木薯栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料获取与处理

试验地点为海南省海口市,地理坐标为 N20.03°、E110.33°,地处热带地区,夏季处于 3—10 月,夏季室外最高温度为 38℃ 左右,室温为 22℃ 左右。试验材料为‘木薯 60444’,由中国热带农业科学院热带生物技术研究功能基因组研究室提供。选取长度、长势大致相同的茎段,平

均分成 2 份,分别进行低温 (20±2)℃ 与常温 (36±2)℃ 贮藏处理,每个处理组分别在贮藏 0、10、20、30 d 后称质量,并取材分别用于 RNA 抽提和可溶性糖含量测定。

1.2 可溶性糖含量测定

茎段于 105℃ 烘箱中杀青 20 min,并于 80℃ 烘干至恒质量后送至江苏三泰生物科技有限公司做靶向代谢物检测。

1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

称取木薯种茎样品 2.0 g,用液氮研磨成粉末,按照 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 说明书,提取木薯总 RNA,使用超微量分光光度计 NanoDrop 2000 检测总 RNA 的浓度和纯度。参照 FastKing Gdna Dispelling RT SuperMix 反转录试剂盒 (TaKaRa) 的说明进行反转录,存放于 -80℃ 冰箱。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

利用 NCBI 网站设计定量引物 (表 1),引物由北京擎科生物科技有限公司海口合成部合成。以木薯内参基因 *MeActin* 为参照使用实时荧光定量 PCR 技术分析基因的相对表达量。试剂盒为 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus),购于 TaKaRa 公司。使用的仪器为 Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。

1.5 数据处理

各数据取 3 次重复的平均值,试验数据采用 Excel 软件 (Microsoft 2016) 进行处理分析,采用 OriginPro 2021、Photoshop 软件作图。

2 结果与分析

2.1 低温贮藏组与常温贮藏组木薯种茎的失水率

木薯种茎在不同温度贮藏 10 d,低温贮藏组失水率低于常温贮藏组而且两者差异显著 ($P<0.01$);种茎贮藏 20 d 后,两者失水率差距进一步加大,二者差异极显著 ($P<0.001$);种茎在不同温度贮藏 30 d,两者失水率差异达到最大值,达极显著水平 ($P<0.001$)。因此,木薯种茎在低温贮藏下有助于保持水分 (图 1)。

2.2 低温贮藏组与常温贮藏组木薯种茎的可溶性糖含量

2.2.1 可溶性糖各组分含量差异 在不同温度贮藏 0~30 d,低温贮藏组与常温贮藏组离体种茎的海藻糖含量均得到了提升,贮藏第 20 天,2 种温度贮藏组种茎的海藻糖含量均达到最大值,低温贮藏组比常温贮藏组低 86.14%。随着贮藏时间的继续延长,

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

名称 Name	基因ID Gene ID	正向引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>MeActin</i>	Manes.12G150600	TGATGAGTCTGGTCCATCCA	CCTCCTACGACCCAATCTCA
<i>MeTPS-1</i>	Manes.05G087900	TATTGTCAGTGGGAGGGGGA	GCCATACCAGAGCACTCTCC
<i>MeTPS-2</i>	Manes.01G198900	AGGAGAGTGCATTGGTGTGG	CAACAATATGTTGGCCCCGC
<i>MeTPS-3</i>	Manes.16G042700	CGCTGCTGAACATGGCTATT	TCAGCATCCCTATGATGCCA
6-磷酸果糖激酶 6-Phosphofructokinase	Manes.05G021200	ACCTAAACACCACCGACCTC	TGAACTGTGGGCTTGAGAG
麦芽糖化酶 Maltase-glucoamylase	Manes.08G060600	AGGAAGCATCCCAGAAAGGC	CCCGACCAGACATGTTTCCA
葡糖磷酸变位酶 Phosphoglucomutase	Manes.06G141300	GCATCCTCTTCCACTGCCAT	CCTTCCTTGCCAACCAGGAT
碱性/中性转化酶 Alkaline/neutral invertase	Manes.03G208400	GAACTGCACCCCTTGATGGA	ACCACAACCCGGAATCAACA

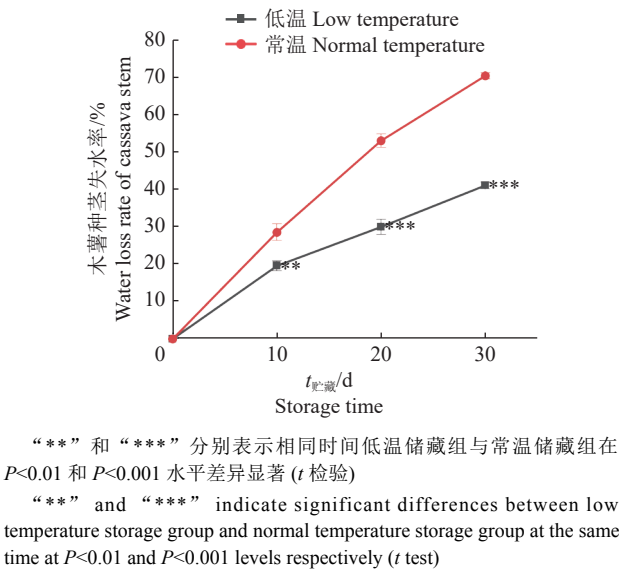


图 1 低温贮藏组与常温贮藏组木薯种茎的失水率
Fig. 1 Water loss rate of cassava stem repositied under low temperature and normal temperature

2 组海藻糖的含量均下降。在贮藏期间, 低温贮藏组海藻糖含量均低于常温贮藏组 (图 2A)。

在不同温度贮藏 0~30 d, 木薯种茎蔗糖含量整体下降, 其中常温贮藏组在 0~10 d 下降幅度最大, 在 20 d 时达到最低点, 基本为 0。不同的是, 在低温贮藏组中, 木薯种茎在 10~20 d 下降幅度最大, 20~30 d 蔗糖含量略有上升。总而言之, 木薯种茎蔗糖含量在常温贮藏 30 d 后基本为 0, 低温贮藏 30 d 后的蔗糖含量高于常温贮藏组 (图 2B)。

在不同温度贮藏 0~30 d, 木薯种茎葡萄糖含量整体减少, 低温贮藏组种茎中葡萄糖含量在前期下降较快, 中期最明显, 后期放缓。常温贮藏组葡萄

糖含量在前期下降较快, 有趣的是在中期缓慢增长, 后期与低温处理含量变化趋势相似, 呈缓慢下降趋势。在贮藏 30 d 时, 不同温度贮藏的葡萄糖含量都达到最低点, 低温贮藏组下降幅度较大 (图 2C)。

从图 2D 可以看出, 果糖含量整体减少。在低温贮藏组, 木薯种茎果糖含量在 0~10 d 缓慢下降, 在 10~20 d 快速下降, 在 30 d 略有上升。常温储藏组果糖含量在 0~10 d 降幅最快, 随后不断减慢, 在 30 d 达到最低点。低温贮藏组与常温贮藏组在贮藏 10 d 时果糖含量相差最大。

低温贮藏组与常温贮藏组木薯种茎麦芽糖含量都极低, 并且整体都呈下降趋势, 均在贮藏 20 d 时降至最低点, 在 20~30 d 略上升 (图 2E)。

2.2.2 可溶性糖各组分比例变化 由图 3 可以看出, 在低温与常温贮藏 0 d 时, 木薯种茎各可溶性糖组分所占比例大致相同, 其中蔗糖、葡萄糖和果糖为主要成分, 海藻糖、麦芽糖比例极低。而在贮藏 30 d 后, 常温贮藏组海藻糖与葡萄糖为主要成分, 蔗糖、果糖和麦芽糖比例较低; 低温贮藏组葡萄糖为主要成分, 海藻糖、蔗糖、果糖和麦芽糖比例较低。

贮藏 10 d, 常温贮藏组海藻糖、蔗糖、葡萄糖比例变化明显, 低温贮藏组蔗糖和葡萄糖比例变化明显。常温贮藏组海藻糖比例相比常温贮藏 0 d 高 37.24%, 而低温贮藏组海藻糖比例仅比低温贮藏 0 d 高 0.16%。低温与常温贮藏组葡萄糖含量都呈下降趋势, 低温贮藏 10 d 比初始低 5.36%, 常温贮藏 10 d 比初始低 7.34%。蔗糖常温贮藏 10 d 后比初始降低 28.79%, 而低温贮藏 10 d 比初始增长 4.16%。果糖含量变化不明显, 常温贮藏 10 d

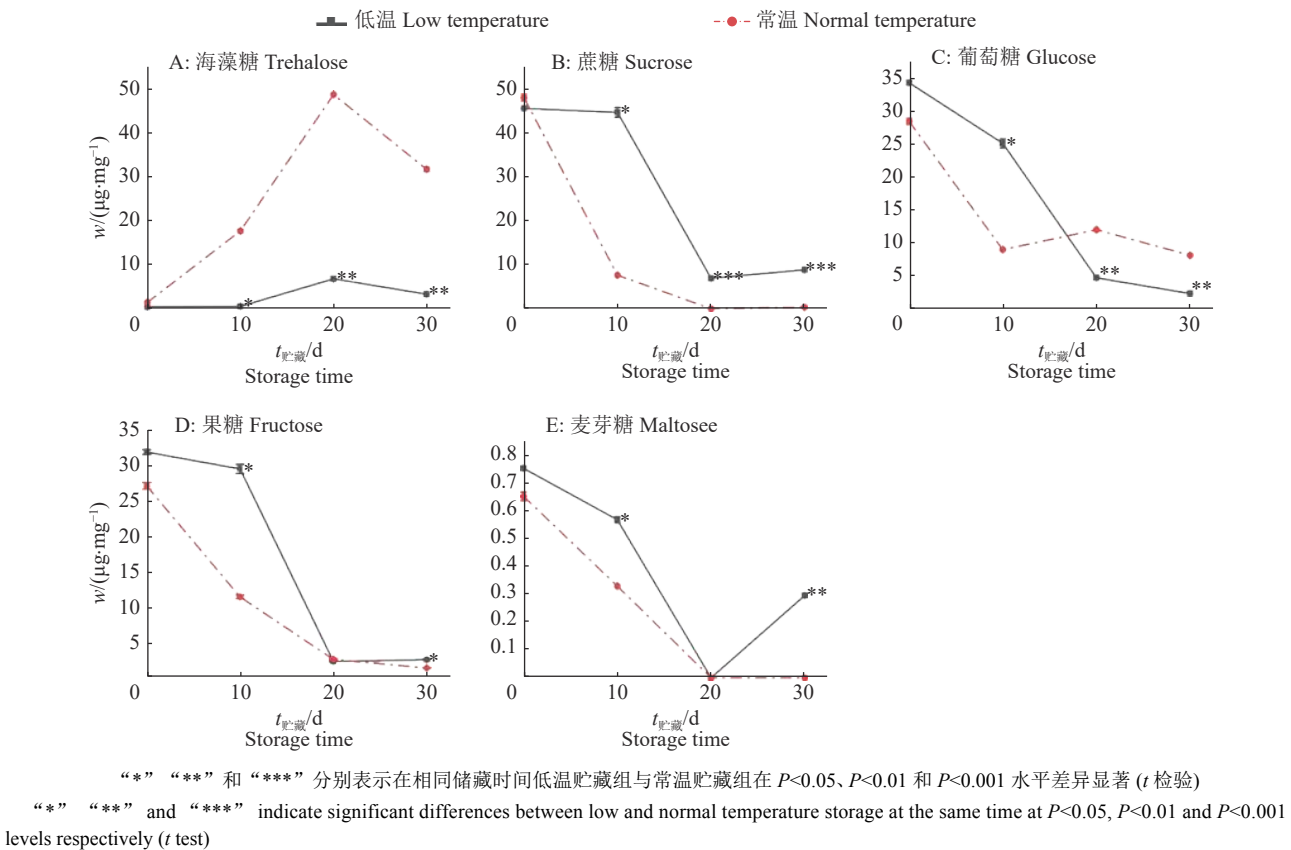


图 2 木薯种茎低温贮藏和常温贮藏 0~30 d 可溶性糖含量变化

Fig. 2 Changes of soluble sugar contents in cassava stems stored under low and normal temperature for 0~30 d

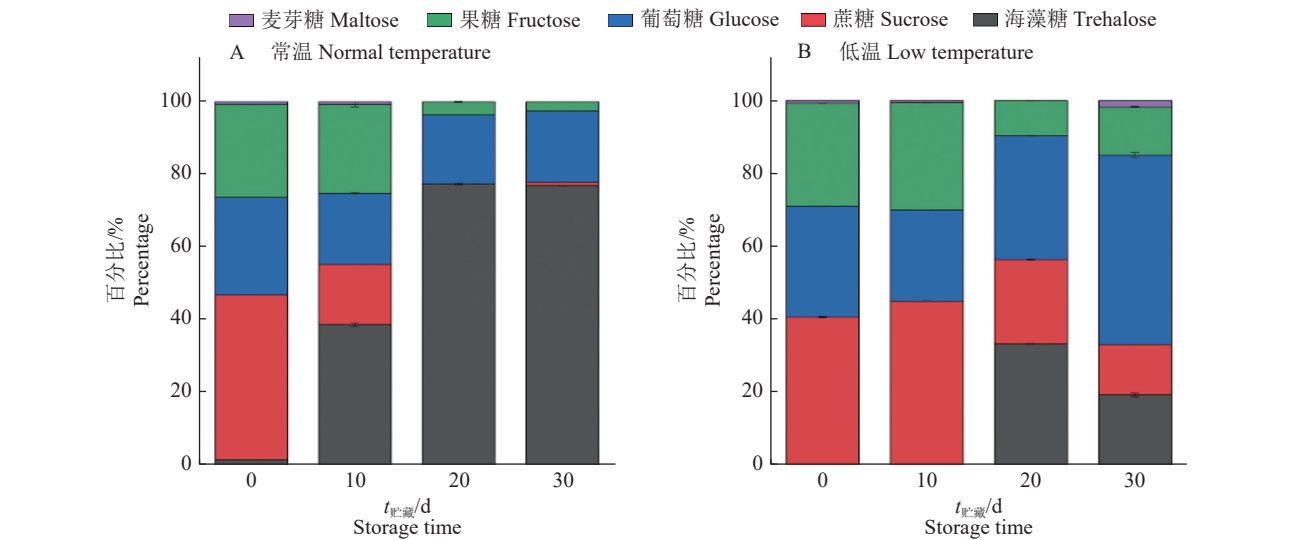


图 3 木薯种茎低温与常温储藏 0~30 d 可溶性糖各组分比例

Fig. 3 Proportion of each soluble sugar component in cassava stem stored under low and normal temperature for 0~30 d

比初始下降 1.22%，低温贮藏 10 d 比初始增长 1.44%。麦芽糖整体处于极低水平，未有明显变化，常温贮藏 10 d 后比初始增长 0.10%，而低温贮藏 10 d 后比初始降低 0.09%。

当木薯种茎贮藏 10~20 d 时，海藻糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖组分都发生了改变，其中在低温贮藏组海藻糖、蔗糖、葡萄糖和果糖比例变化较大，

常温贮藏组中海藻糖、蔗糖、葡萄糖、果糖比例变化较大。常温贮藏 20 d 海藻糖占比 77.35%，比常温贮藏 10 d 提高了 38.78%；低温贮藏 20 d 海藻糖占比 33.22%，比低温贮藏 10 d 提高 32.72%。无论是常温贮藏还是低温贮藏 20 d 葡萄糖占比都比 10 d 下降，其中低温贮藏 20 d 葡萄糖含量占比 33.97%，比贮藏 10 d 提高 8.94%；

常温贮藏 20 d 葡萄糖占比 19.05%，相较常温贮藏 10 d 降低 0.56%。木薯种茎离体贮藏 20 d 后，蔗糖占比也明显下降，低温贮藏 20 d 相较 10 d 下降 10.45%。果糖占比明显下降，种茎常温贮藏 20 d 果糖占比贮藏较贮藏 10 d 下降 20.90%，低温贮藏 20 d 相较贮藏 10 d 下降 19.82%。木薯种茎贮藏 20 d 时麦芽糖含量极低，低温贮藏与常温贮藏麦芽糖比例均降至 0。

当木薯种茎在不同温度贮藏 30 d 时，常温贮藏组海藻糖、葡萄糖含量未出现较大的变化，而低温贮藏组海藻糖、葡萄糖、蔗糖以及果糖等都出现了较大的变化。低温贮藏 30 d 后海藻糖含量相比贮藏 20 d 降低了 13.98%，常温贮藏 30 d 后海藻糖含量相较贮藏 20 d 没有较大的变化，仅仅下降了 0.44%。低温贮藏 30 d 后葡萄糖含量变化较大，比贮藏 20 d 提高了 18.08%，而常温贮藏 30 d 的葡萄糖含量仅仅增加 0.65%。低温贮藏组蔗糖含量变化较大，低温贮藏 30 d 后比贮藏 20 d 降低了 9.38%，常温贮藏 30 d 蔗糖占比 0.87%。低温贮藏 30 d 后果糖占比 13.18%，比贮藏 20 d 占比高 3.53%，常温贮藏 30 d 果糖占比 2.51%，比贮藏 20 d 降低 1.09%。低温贮藏 30 d 麦芽糖含量占比 1.74%。

2.2.3 海藻糖含量与失水率的相关性分析 本研究分别对低温贮藏组与常温贮藏组海藻糖含量与木薯种茎的失水率进行相关性分析，结果发现低温贮藏组与常温贮藏组海藻糖含量与木薯种茎的失水率均显著相关，低温贮藏组 $R_1=0.636$ 、常温贮藏组 $R_2=0.835$, $R_1<R_2$ ，这表明受到失水胁迫的程度越高，海藻糖浓度越高；并且，对低温贮藏组中海藻糖含量与木薯种茎失水率的线性回归方程与常温贮藏组中海藻糖含量与木薯种茎失水率的线性回归方程进行 t 检验，得 $t=0.014$ ，两者差异显著 ($P<0.05$)。分析表明，低温贮藏更容易保水，并且种茎中海藻糖含量更不易受失水影响 (图 4)。

2.3 低温贮藏组与常温贮藏组糖代谢相关基因的表达

2.3.1 葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖等糖代谢相关基因的表达 6-磷酸果糖激酶 (基因号: Manes.05G021200)，为糖酵解的限速酶。由图 5A 所示，木薯种茎在低温贮藏 10 d 时基因相对表达量迅速升高，在 20 d 时达到最高点，在 30 d 时下降到 1 左右；而常温贮藏 0 d 后迅速增长，在 20 d 左右达到最高点，在 20 d 后相对表达量下降，但仍然较贮藏 10 d 高。低温贮藏组 6-磷酸果糖激酶基因相对表

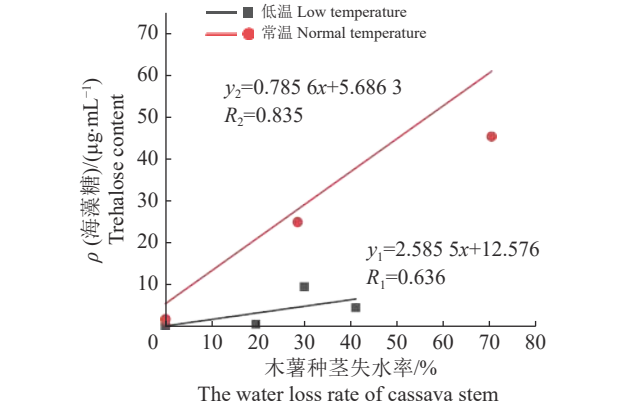


图 4 低温贮藏与常温贮藏木薯种茎海藻糖含量与失水率的相关性分析

Fig. 4 Correlation analyses between trehalose content and water loss rate of cassava stem stored under low and normal temperature

达量整体低于常温贮藏组，表明低温贮藏有效降低木薯种茎的糖酵解速率。

葡糖磷酸变位酶 (基因号: Manes.06G141300)，参与糖酵解糖异生，可以催化葡萄糖-1-磷酸盐和葡萄糖-6-磷酸盐相互转化，在糖代谢中起重要作用。如图 5B 所示，木薯种茎在低温贮藏组 0~30 d 其相对表达量呈现先增长后降低，20 d 时达到最高点；而常温贮藏组基因相对表达量在 0~20 d 增长趋势与低温贮藏组近似，20 d 后继续增长，30 d 达到最高点，30 d 时低温与常温贮藏组差异显著 ($P<0.01$)。

碱性/中性转化酶 (基因号: Manes.03G208400)，可以将蔗糖不可逆地水解为果糖和葡萄糖，是植物体内分解代谢的关键酶。碱性/中性转化酶基因由低温贮藏 0 d 开始增长在 10 d 达到最高点，随后呈下降趋势；常温贮藏组基因相对表达量在 10 d 时并未有明显变化，20 d 时迅速提高，是同期低温贮藏的 6 倍，20~30 d 开始下降至 10 附近，但仍然高于同期低温贮藏的相对表达量 (图 5C)。

麦芽糖化酶 (基因号: Manes.08G060600) 可将麦芽糖转化为葡萄糖。由图 5D 可知，低温贮藏组相对表达量整体呈先上升后下降的趋势，10 d 时达到最大值，20 d 时降至最低点，30 d 时比 20 d 略有上升，相对表达量为 1 左右；常温贮藏组与低温贮藏组趋势大致相似，10 d 时麦芽糖化酶相对表达量达到最大值，大致是低温贮藏组的 2 倍；低温贮藏组麦芽糖化酶在 30 d 时上调表达。

2.3.2 海藻糖-6-磷酸合成酶基因家族部分基因的相对表达 海藻糖-6-磷酸合成酶是木薯海藻糖合成途径中的关键酶。通过实时荧光定量 PCR 研究发现木薯种茎在失水逆境中响应信号为 *MeTPS-1*

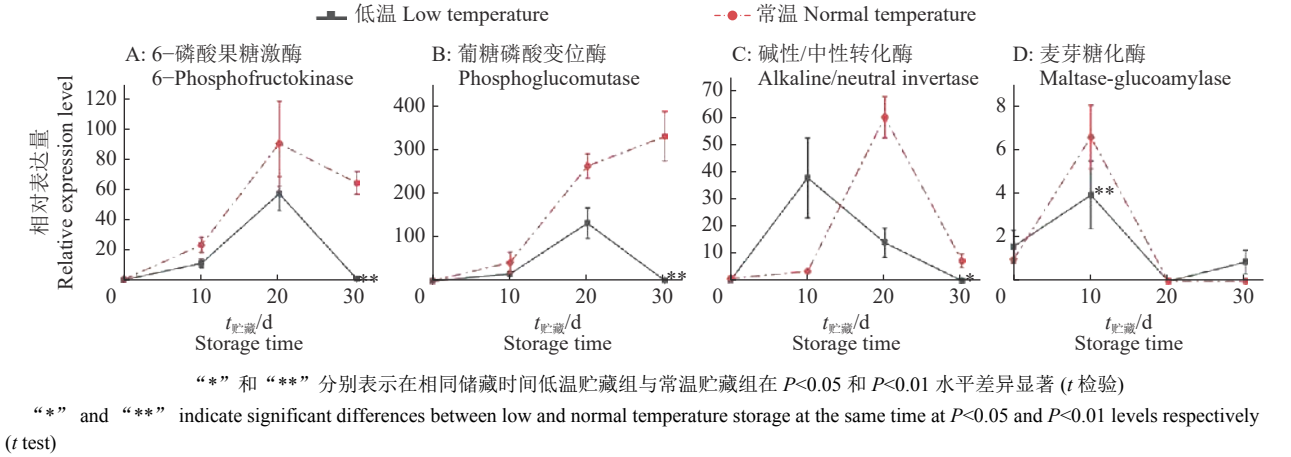


图 5 木薯种茎低温贮藏和常温贮藏 0–30 d 可溶性糖代谢相关基因表达

Fig. 5 Expression of genes related to soluble sugar metabolism in cassava stems stored under low and normal temperature for 0–30 d

(基因号: Manes.05G087900)、*MeTPS-2*(基因号: Manes.01G198900)、*MeTPS-3*(基因号: Manes.16G042700), 种茎中其他海藻糖–6–磷酸合成酶基

因 (基因号: Manes.17G085400、Manes.14G067800、Manes.15G098800、Manes.06G103000) 仅在 0 d 响应或者不响应 (图 6)。

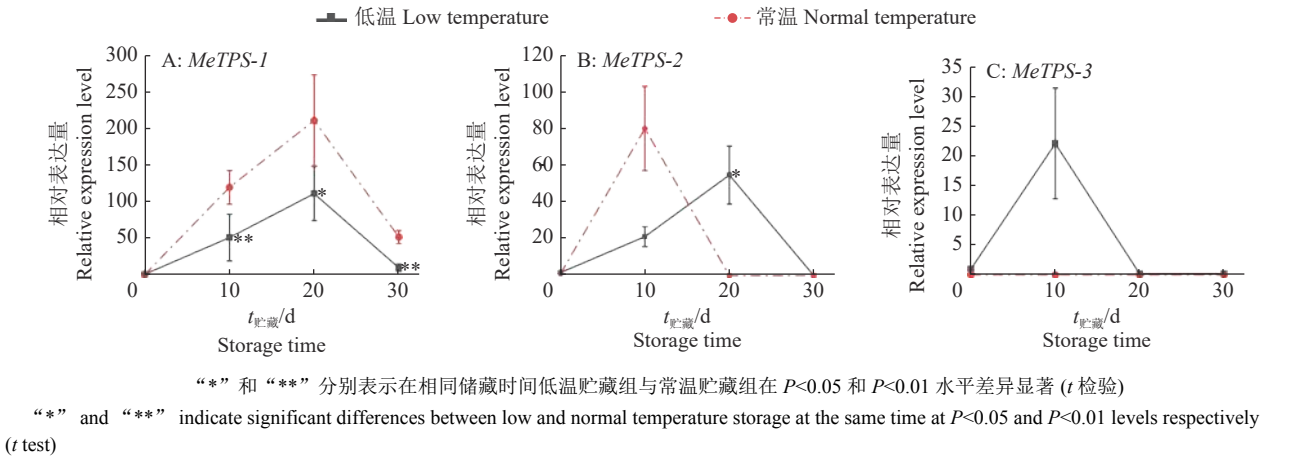


图 6 木薯种茎低温贮藏和常温贮藏 0–30 d 海藻糖–6–磷酸合成酶 (*TPS*) 基因家族部分基因相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of some genes in *TPS* gene family in cassava stems stored under low and normal temperature for 0–30 d

图 6A 为木薯种茎中 *MeTPS-1* 在低温以及常温贮藏后的表达模式, 低温以及常温贮藏 10 d 后均明显提高, 并在 20 d 时达到最高点, 整体变化趋势与图 2A 海藻糖含量变化趋势相似。其中低温贮藏组 *MeTPS-1* 相对表达量在 10 d 后上升较快, 20 d 时仅为同期常温贮藏组的 50% ($P<0.05$), 20 d 后迅速下降。常温贮藏组同期相对表达量均高于低温贮藏。

低温贮藏组 *MeTPS-2* 相对表达量在前 20 d 呈上升趋势, 20 d 时达到最大值, 常温贮藏组在 10 d 时达最大值, 在 20 d 时归于 0 (图 6B)。

MeTPS-3 仅在低温贮藏组中有表达, 10 d 时相对表达量高于 0 d, 随后则迅速下降, 于 20 d 时归

于 0 附近 (图 6C)。

由此可以看出, 在木薯种茎离体贮藏试验中, 海藻糖–6–磷酸合成酶主要由 *MeTPS-1* 响应, *MeTPS-2*、*MeTPS-3* 均表现为在失水胁迫后上调表达, 但是部分信号并未响应该试验。

3 讨论与结论

海藻糖存在于多种生物体内, 可以作为能源物质, 也可以作为逆境胁迫下的信号和保护性物质 [19, 24–25]。Han 等 [21] 在木薯中发现海藻糖、果糖、葡萄糖和蔗糖等渗透物质的浓度与保水能力呈正相关, 且海藻糖对木薯的渗透胁迫耐受性比果糖、葡萄糖和蔗糖更重要。Miranda 等 [26] 在拟南芥中发现

过量表达酵母 *TPS1* 和 *TPS2* 可以增加转基因品系对非生物胁迫的抗性, 包括冷冻、干旱、盐和热胁迫。在木薯种茎中海藻糖含量与失水胁迫高度相关, 表明海藻糖确实是响应木薯种茎失水胁迫的关键物质, 低温贮藏组海藻糖含量与木薯种茎失水率相关系数弱于常温贮藏组, 表明低温贮藏有效降低失水胁迫对木薯种茎的影响。赵超等^[19]发现‘South China 124’和‘Argentina 7’干旱处理海藻糖含量分别在 6 和 12 d 降低, 但并未给出具体分析。Rosa 等^[10]研究表明糖感应途径调节代谢状态, 高浓度糖表明良好的调节代谢状态, 而低糖水平表明可能糖代谢失调。本试验中低温贮藏组与常温贮藏组种茎贮藏后期海藻糖含量呈下降趋势, 推测在失水胁迫后期, 由于木薯种茎中其他可溶性糖含量均处于较低水平, 海藻糖转化为其他物质维持木薯种茎的正常代谢过程。

植物在逆境胁迫中, 海藻糖-6-磷酸合成酶相关响应基因可能较为单一, 在拟南芥和水稻中, *AtTPS1* 和 *OsTPS1* 分别被证明是唯一有活性的 *TPS* 基因, 而剩余的 *TPS* 蛋白缺乏 *TPS* 活性^[27-28]。Han 等^[21]在烟草中证实 *MeTPS1*(基因号: Manes.15G098800) 有活性。本试验通过实时荧光定量 PCR 检测糖-6-磷酸合成酶相关基因表达, 发现在木薯种茎中仅有 3 个基因响应不同贮藏温度下的失水胁迫, 且只有 *MeTPS-1*(基因号: Manes.05G087900) 具有完整的信号表达, 推测在 *TPS* 基因家族中, *MeTPS-1* 为响应木薯种茎失水胁迫的主要基因。

木薯种茎在前期受到失水胁迫, 种茎中的蔗糖在碱性/中性水解酶的作用下水解成分子量更小的葡萄糖与果糖, 参与木薯种茎的糖酵解过程, 提高木薯种茎的渗透调节能力; 在蔗糖合酶的作用下水解成 UDP-葡萄糖和 1-磷酸葡萄糖参与海藻糖合成途径, 提升木薯种茎在短时间内的抗旱能力, 保护生物细胞以及生物活性物质在不良环境下免遭破坏。果糖与麦芽糖在相应酶的作用下转化为 6-磷酸葡萄糖, 而 6-磷酸葡萄糖既可以参与糖酵解生成能量维持木薯种茎的代谢过程, 又可以在海藻糖-6-磷酸合成酶的作用下参与海藻糖的形成。在常温贮藏组中葡萄糖含量中期出现上涨的趋势, 可能是中期种茎脱水胁迫促使蔗糖大量水解成葡萄糖和果糖, 而果糖和麦芽糖也转化为葡萄糖。在低温贮藏组后期蔗糖、果糖、麦芽糖含量呈上升趋势, 推测由于低温贮藏组后期糖酵解速度较低, 部分葡萄糖与海藻糖在后期转化为蔗糖、果糖、麦芽糖。

对木薯种茎海藻糖的研究发现, 海藻糖含量上

调表明本研究的低温贮藏温度可能并不是最佳温度, 因此, 在后续试验中可以通过设置温度梯度寻找木薯种茎最适合的贮藏温度, 提高木薯种茎在长时间贮藏后的成活率。海藻糖-6-磷酸合成酶是优秀的抗逆基因, 它合成的 6-磷酸海藻糖作为木薯海藻糖合成途径的中间代谢物质, 具有不可替代的作用。目前海藻糖-6-磷酸合成酶基因在木薯中的研究还相对较少, 但在其他模式作物中研究较为成熟, Shim 等^[29]发现细菌海藻糖生物合成基因的异源表达响应高盐胁迫, 增强马铃薯植物中海藻糖的积累而且没有影响马铃薯的生长, 因此可以考虑将木薯 6-磷酸海藻糖合成酶基因导入其他作物中, 增强作物的抗逆性。

总而言之, 本试验探究低温贮藏与常温贮藏对离体木薯种茎影响的研究表明, 低温贮藏有助于减少种茎失水, 降低糖酵解相关酶基因的表达, 提高海藻糖含量, 维持木薯种茎活力, 延长贮藏时间, 同时种茎海藻糖含量与种茎的失水胁迫呈强相关性, 且低温贮藏组相关系数小于常温贮藏组, 表明低温贮藏组种茎中海藻糖含量更不易受失水影响。因此低温贮藏方式有效, 可以通过控制贮藏温度的方式大批量贮藏木薯种茎, 提高木薯种茎的成活率, 最终有效提高木薯产量。

参考文献:

[1] 谢向誉, 陆柳英, 曾文丹, 等. 木薯嫩枝茎不同贮藏方式生理特性研究[J]. *中国热带农业*, 2016(1): 48-51.

[2] 沈光. 良种化和加工增值带动种植实现木薯产业化[J]. *热带农业科学*, 2002(5): 57-60.

[3] 刘海刚, 孟富宣, 段元杰, 等. 蜡封对木薯种茎贮藏活力的影响[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2020, 35(3): 386-391.

[4] YU S M. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(3): 687-693.

[5] JOURNET E P, BLIGNY R, DOUCE R. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(7): 3193-3199.

[6] YUAN H, WU Y, LIU W, et al. Mass spectrometry-based method to investigate the natural selectivity of sucrose as the sugar transport form for plants[J]. *Carbohydrate Research*, 2015, 407: 5-9.

[7] JIANG X, NIE Y, KABACK H R. Site-directed alkylation studies with LacY provide evidence for the alternating access model of transport[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(10): 1634-1640.

[8] GEIGER D. Plant glucose transporter structure and function[J]. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 2020, 472(9): 1111-1128.

[9] ZHONG Y, XIE J, WEN S, et al. TPST is involved in

- fructose regulation of primary root growth in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 103(4/5): 511-525.
- [10] ROSA M, PRADO C, PODAZZA G, et al. Soluble sugars—Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(5): 388-393.
- [11] KEREPESI I, GALIBA G. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings[J]. *Crop Science*, 2000, 40(2): 482-487.
- [12] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, 24(1): 23-58.
- [13] 单忠英, 罗兴录, 樊吴静, 等. 干旱胁迫对木薯苗生理特性影响研究[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(2): 339-343.
- [14] SHI H, WANG Y, CHENG Z, et al. Analysis of natural variation in Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) reveals physiological responses underlying drought tolerance[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e53422. doi: [10.1371/journal.pone.0053422](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053422).
- [15] GUSSIN A E S. Does trehalose occur in angiospermae?[J]. *Phytochemistry*, 1972, 11(5): 1827-1828.
- [16] ASTRID W. The function of trehalose biosynthesis in plants[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(5): 437-440.
- [17] NUNES C, SCHLUEPMANN H, DELATTE T L, et al. Regulation of growth by the trehalose pathway: Relationship to temperature and sucrose[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(12): e26626.
- [18] ELEUTHERIO E C, ARAUJO P S, PANEK A D. Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Cryobiology*, 1993, 30(6): 591-596.
- [19] 赵超, 王海燕, 刘美珍, 等. 干旱胁迫下木薯茎秆可溶性糖、淀粉及相关酶的代谢规律[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(5): 795-806.
- [20] 张丹. 木薯海藻糖合成酶基因 *MeTPS1-3* 的克隆与功能分析[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [21] HAN B, FU L, ZHANG D, et al. Interspecies and intraspecies analysis of trehalose contents and the biosynthesis pathway gene family reveals crucial roles of trehalose in osmotic-stress tolerance in cassava[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1077. doi: [10.3390/ijms17071077](https://doi.org/10.3390/ijms17071077).
- [22] LUNN J E, FEIL R, HENDRIKS J H, et al. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochemical Journal*, 2006, 397(1): 139-148.
- [23] 张雯. 钾对苹果果实品质的影响及其与 6-磷酸海藻糖代谢途径的关系[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [24] PEGO J V, KORTSTEE A J, HUIJSER C, et al. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 407-416.
- [25] JANG J C, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(11): 1665-1679.
- [26] MIRANDA J A, AVONCE N, SUÁREZ R, et al. A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2007, 226(6): 1411-1421.
- [27] ZANG B, LI H, LI W, et al. Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76(6): 507-522.
- [28] VANDESTEENE L, RAMON M, LE ROY K, et al. A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in *Arabidopsis*[J]. *Molecular plant*, 2010, 3(2): 406-419.
- [29] SHIM J S, SEO J S, SEO J S, et al. Heterologous expression of bacterial trehalose biosynthetic genes enhances trehalose accumulation in potato plants without adverse growth effects[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2019, 13(4): 409-418.

【责任编辑 李庆玲】