

基于转录组测序初步揭示天麻生长代谢的分子机制

刘云霞¹, 狄永国², 仇全雷³, 肖舒卉¹, 谭或文¹, 陈丽梅¹, 徐慧妮¹, 李昆志^{1*}

1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

2. 昭通市昭阳区农业局 种植业科, 云南 昭通 657000

3. 西藏波密高原藏天麻产业开发有限公司, 西藏 林芝 860300

摘要: 目的 以箭麻(天麻 *Gastrodia elata* 的一个生长阶段)和共生天麻(白麻与蜜环菌共生的天麻)为实验材料,通过转录组测序分析初步揭示箭麻和共生天麻生长代谢特征。方法 采用 Trizol Reagent (Invitrogen) 提取天麻样品中的 RNA, 建立测序文库并利用 Illumina HiseqTM2000 进行测序, 通过与基因数据库比对分析注释和发现差异表达基因。结果 箭麻与共生天麻间共获得 72 244 条序列, 其中有 26 312 条得到注释。在 False Discovery Rate (FDR) <0.05 和 |log₂FC|>1 筛选条件下, 共有 12 498 条基因发生显著差异表达, 其中 9000 条基因表达上调, 3498 条表达下调。京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 功能富集分析表明, 差异基因显著富集在 20 个代谢途径中, 其中包含氮代谢, 碳代谢和能量代谢等途径。差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 注释到蛋白相邻类的聚簇 (cluster of Orthologous Groups of proteins, KOG) 的 25 个分类中, 其中差异表达基因与生长代谢过程相关过程能量的产生和转化 (energy production and conversion, C)、碳水化合物转运与代谢 (carbohydrate transport and metabolism, G)、次生代谢产物的合成、转运和代谢 (secondary metabolites biosynthesis, transport and metabolism, Q) 类别获得 2218 个注释结果。基于转录组数据, 分析了生长代谢过程中相关基因差异表达水平, 发现有利于碳、氮、能量等物质积累的谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS)、天冬酰胺合成酶 (asparagine synthetase, ASNS)、蔗糖合成酶 (sucrose synthase, SuSy)、可溶性淀粉合成酶 (soluble starch synthase, SSS)、ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、己糖激酶 (hexokinase, HK)、丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH)、异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 基因呈上调表达, 除分解 ATP 的 ATP 酶 (adenosine-triphosphatase, ATPase) 上调外, 分解氮、碳物质的谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH)、精氨酸酶 (arginase, Argase) 和淀粉酶 (amylase, AMS) 基因呈下调表达。qRT-PCR 分析结果表明这些基因表达水平与转录组表达情况基本一致。相比较于箭麻, 共生天麻生长代谢中物质积累比较旺盛。结论 共生天麻通过消解侵入的蜜环菌合成有机营养物质和能量, 有利于其从蜜环菌和周围环境吸收营养物质供箭麻生长需要, 为进一步研究天麻不同发育阶段代谢特征奠定基础, 并为天麻栽培提供理论指导。

关键词: 转录组分析; 共生天麻; 箭麻; 蜜环菌; 基因表达; 代谢

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)03-0827-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.026

Preliminary revealing molecular mechanism of growth and metabolism of *Gastrodia elata* based on transcriptome sequencing

LIU Yun-xia¹, DI Yong-guo², CHOU Quan-lei³, XIAO Shu-hui¹, TAN Yu-wen¹, CHEN Li-mei¹, XU Hui-ni¹, LI Kun-zhi¹

1. College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

2. Farming Family, Agricultural Bureau of Zhaoyang District of Zhaotong, Zhaotong 657000, China

3. Tibet Bomi Plateau Tibetan *Gastrodia elata* Industry Development Co., LTD., Linzhi 860300, China

Abstract: Objective Using mature tuber of *Gastrodia elata* (A growth stage of *G. elata*) and symbiotic *G. elata* (immature tuber of *G. elata* symbiosis with *Armillaria mella*) as experimental materials, their characteristics of growth and metabolism were preliminarily revealed by transcriptome sequencing analysis. **Methods** The RNA of *G. elata* sample was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen). The sequencing library was constructed and sequenced using Illumina HiseqTM2000 and the differentially expressed genes were analyzed by comparison with the gene database. **Results** A total of 72244 sequences were obtained from the symbiotic *G. elata* and the mature tuber of *G. elata*, in which 26 312 were annotated. Under the screening conditions of FDR<0.05 and |log₂FC|>1, a total of 12498 genes were significantly

收稿日期: 2020-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31760349); 国家自然科学基金资助项目 (31560351)

作者简介: 刘云霞 (1993—), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 研究方向为植物逆境分子生物学。Tel: 15687373973 E-mail: 1127550531@qq.com

*通信作者: 李昆志, 博士生导师, 教授, 研究方向为植物生理分子生物学。E-mail: likzkm@163.com

differentially expressed, in which 9000 genes were up-regulated and 3498 genes were down-regulated. KEGG functional enrichment analysis indicated that differential genes were involved in nitrogen metabolism, carbon metabolism and energy metabolism. DEGs were annotated in 25 categories of KOG, among which 2218 annotation results were obtained in categories C,G and Q related to differentially expressed genes in growth and metabolism. Based on transcriptome data, the differential expression levels of related genes in the process of growth and metabolism were analyzed. We found *GS*, *ASNS*, *SuSy*, *SSS*, *AGPase*, *PK*, *HK*, *PDH*, *MDH*, *IDH*, which are beneficial to the accumulation of carbon, nitrogen, energy and other substance were up-regulated. In addition to the up-regulation of *ATPase* in the decomposition of ATP, *Argase*, *GDH*, *AMS* in the decomposition of nitrogen and carbon were down-regulated. qRT-PCR analysis showed that the expression levels of these genes were basically consistent with the transcriptome expression. Compared with the mature tuber of *G. elata*, the material accumulation in the symbiotic *G. elata* was more vigorous. **Conclusion** These results indicated that the symbiotic *G. elata* synthesizes organic nutrients and energy through the digestion of the invaded *A. mellea*, which is conducive to the absorption of nutrients from *A. mellea* and the surrounding environment for the growth of mature tuber. It lays a foundation for further study of the metabolic characteristics of different developmental stages of *G. elata* and provides theoretical guidance for *G. elata* cultivation.

Key words: transcriptome analysis; symbiotic *Gastrodia elata*; mature tuber of *Gastrodia elata*; *Armillaria mellea*; gene expression; metabolization

天麻是名贵传统中药材, 具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络之功效, 主治小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风、头痛眩晕、风湿痹痛等症^[1-3]。天麻为药食两用的兰科植物, 具有极高的药用和食用价值, 拥有巨大的潜在市场, 天麻需求量大。野生天麻活性成分含量高、药效好, 但产量低, 不能满足实际需求, 且由于人工过度采集濒临灭绝, 天麻供给主要靠人工种植。因此, 天麻栽培成为天麻领域的研究热点。

天麻生长经历种子、原球茎、米麻、白麻和箭麻5个生长发育阶段^[4]。Kusano^[5]首次报道了天麻与木材腐烂病原菌蜜环菌存在真菌菌根关系。随后的研究表明, 天麻种子萌发需要萌发菌如小菇属 *Mycena dendrobii* L. Fan et S. X. Guo 侵入种胚细胞, 为天麻种子萌发提供营养物质, 促进天麻种子萌发出幼小的原球茎^[6]。随着原球茎进一步生长, 其前端分生组织处可直接分化出营养繁殖茎米麻。天麻可消化萌发菌和蜜环菌入侵的菌丝作为其营养来源^[7-9], 米麻从侵入的萌发菌和蜜环菌获得营养发育成营养繁殖茎白麻^[10]。在接下来的生长中白麻的直接营养物质是蜜环菌, 蜜环菌侵入白麻后, 白麻消化侵入的蜜环菌菌丝获得营养后进一步长出商品麻箭麻^[11]。最近, 研究者通过天麻转录组学分析, 阐明了天麻种子萌发的机制^[12-14]。谭彧文等^[15]通过转录组学的方法发现侵入到天麻体内的蜜环菌其胞外酶和抗氧化酶的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 98.31%表达下调, 说明侵入天麻体内的蜜环菌活性减弱, 不能进一步入侵天麻, 且不受天麻胁迫作用, 使蜜环菌和天麻处于共生状态, 初步揭示了天麻与蜜环菌的共生机制。袁媛等^[16]测出天麻的全基因组序列发现, 大部分与光合作用和抗病菌相关的基因如核酸结合部位

(nucleotide-binding site, NBS) 类基因发生了大量丢失, 同时发现天麻的线粒体基因组扩大且单子叶甘薯糖结合凝集素抗真菌蛋白 (gastrodia antifungal protein, GFP) 基因的数量增加, 且发现天麻与蜜环菌共生关系建立的重要信号是独角金内酯, 这些结果展现了完全异养植物天麻是如何通过实现广泛的基因收缩甚至丢失、扩张以及基因的新功能化来完成其独特的生长特征, 更进一步地阐述了天麻与蜜环菌的共生关系。文欢等^[17]也通过转录组学的方法发现了天麻内存在较完整的天麻苯丙烷类产物合成代谢通路。到目前为此, 天麻各生长发育阶段的生理形态特征比较清楚, 蜜环菌能入侵营养繁殖茎白麻与其共生, 但共生后进一步生长为箭麻的生长代谢特征仍不清楚。

本实验通过转录组分析, 在转录组水平的基础上研究箭麻和共生天麻生长代谢过程中相关差异基因表达水平变化, 揭示两者间的基因表达水平的差异, 以期阐释箭麻和共生天麻间的生长代谢特征, 为进一步研究天麻不同生长发育阶段的生理生化代谢特征奠定基础, 同时为天麻栽培提供理论指导。

1 材料与仪器

1.1 材料

选取昭通产乌天麻作为研究材料, 经笔者鉴定为乌天麻 *Gastrodia. elata* Bl. (*F. glauca*) S. Chow. 将蜜环菌 *Armillaria. mellea* (Vahl) P. Kumm. 接种于苹果树枝一段时间待长出蜜环菌菌丝后接种于营养繁殖茎白麻, 成为共生天麻, 接种3个月长出箭麻后分别取2种样品, 立即放入液氮中冷冻后储存入-80℃冰箱中用于总RNA提取。

1.2 仪器

Bio-rad CFX96 型荧光定量PCR仪 (美国伯乐

公司); DHP-9502 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); heraeus mutifuge X1R 型实验室用离心机(赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法

2.1 RNA 提取及质量检测

采用 Trizol Reagent (Invitrogen) 提取箭麻和共生天麻的 RNA。将约 0.1 g 样品放入用液氮预冷的研钵中, 磨碎后加入 1 mL 的 Trizol 提取液于研钵中继续研磨至研磨液呈红色透明状, 于室温静置 5 min 后移入 1.5 mL 离心管并加入 0.2 mL 氯仿振荡混匀; 随后在 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min 后吸取上清液至新的离心管中; 在加入 0.25 mL 异丙醇和 0.25 mL 氯化钠与柠檬酸钠混合高盐液, 混匀-20 °C 放置 30 min 后在 12 000 r/min、4 °C 条件下离心 30 min, 弃上清, 沉淀用 1 mL (-20 °C 预冷) 的 75% 乙醇清洗, 随后在 7500 r/min、4 °C 条件下离心 5 min, 弃乙醇, 重复清洗 2 次; 然后将沉淀在室温条件下自然晾干, 最后用 20 μ L 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC) 处理水溶解 RNA。用分光光度计测量样品 RNA 的纯度和浓度, 检测 RNA 样品的完整性。

2.2 转录组测序样品制备及文库建立

提取样品总 RNA 后, 将破碎缓冲液加入到带有 Oligo (dT) 磁珠富集的真核生物 mRNA 中将其打断成短片段。以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物合成第 1 条 cDNA 链, 随后加入缓冲液、RNase H、DNA 聚合酶 I 和 dNTPs 以合成第 2 条 cDNA 链。在经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复、加 poly (A) 并连接测序接头。最后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择, 并进行 PCR 扩增, 建好的测序文库用 Illumina HiSeqTM2000 进行高通量测序分析。

2.3 测序数据处理及分析

经过统计箭麻和共生天麻分别获得平均 28.97 Mb 和 67.73 Mb 条原始测序序列 (raw reads)。对 raw reads 过滤低质量数据和测序引物、接头等人工序列, 得到 clean reads。对过滤处理得到的 clean reads 进行 Trinity 组装生成转录本 (transcript) 和单基因簇 (unigene)。再将 Unigene 与 Swiss-Prot (瑞士-波特蛋白质序列数据库)、非冗余蛋白库 (non-redundant protein sequence database, NR)、京都基因和基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 和蛋白相邻类的聚簇 (cluster of orthologous groups of proteins, KOG) 数

据库比对, 获得 Unigene 功能注释信息。

2.4 表达差异分析

使用 RPKM 值表示 Unigene 的表达丰度。满足 false discovery rate (FDR) < 0.05 且 $\log_2|FC| \geq 2$ 条件的基因为差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。随后对差异表达基因做基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析、KOG 注释和 KEGG 注释与分类。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

为了验证转录组数据中基因差异表达的正确性, 选取转录组基因文库内与生长代谢过程中氮代谢相关的谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS)、天冬酰胺合成酶 (asparagine synthetase, ASNS)、谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH)、精氨酸酶 (arginase, Argase); 碳代谢相关的蔗糖合成酶 (sucrose synthase, SuSy)、可溶性淀粉合成酶 (soluble starch synthase, SSS)、ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)、淀粉酶 (amylase, AMS) 和与能量代谢相关的丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、己糖激酶 (hexokinase, HK)、丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH)、异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH)、ATP 酶 (adenosine triphosphatase, ATPase) 14 个具有代表性的基因, 用 Primer 6 设计引物, 以 β -actin 作为内参基因进行 qRT-PCR 相对表达分析^[6], 根据其 cDNA 片段设计特异性引物(表 1)。提取 RNA 后, 用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录。将反转录产物稀释 10 倍, 用 ChamQTM Universal SYBR® qPCR Master Mix 做荧光定量。荧光定量在 20 μ L 体系含有 10 μ L 2 \times ChamQTM Universal SYBR qPCR Master Mix, 2 μ L cDNA 模板和 0.4 μ L 每种基因特异性引物的反应混合物中进行。最后使用 CFX96TM Real-Time System 及其相对定量软件进行 2 次生物重复 3 次技术重复。反应参数为 95 °C、30 s, 并以 95 °C、10 s, 58 °C、30 s 循环 40 次。将 cDNA 文库分别标准化为参考基因 β -actin。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量。

3 结果与分析

3.1 测序数据组装结果

3.1.1 数据过滤统计表 测序后在 G 样本中平均获得 28.36 Mb 的高质量 clean reads, 占 raw reads 的 97.92%, 在 GA-G 样本平均获得 66.27 Mb 的高质量

的 clean reads, 占 raw reads 的 97.84%。4 个样本 clean reads Q₃₀ 均大于 92%, 平均 GC 含量为 47.28% (表 2)。对片段进行拼接得 72 244 个 Unigene 转录物。

3.1.2 组装质量统计 对片段进行拼接得到 72 244 个 Unigene 转录物。组装结果质量评估可从 N₅₀ 数值来评估。将所有 Unigene 从长到短排序, 并依次累加长度。当累加片段长度达到总片段长度 (所有

Unigene 的长度) 的 50% 时, 对应那个片段的长度和数量, 即为 Unigene N₅₀ 长度和数量。Unigene N₅₀ 越长, 数量越少, 说明组装质量越好。在本实验中, 由组装结果得 N₅₀ 长度为 1733 bp, 其中 Unigene 序列最长为 15 844 bp, 最短为 201 bp, 平均长度为 916 bp, 长度在 1000 bp 以上的 Unigene 有 18 698 个, 占总数的 25.88% (表 3)。

表 1 qRT-PCR 扩增特异引物

Table 1 Specific primers of qRT-PCR amplification

基因编号	基因名称	引物序列 (5'-3')	退火温度/°C
Unigene0037776	GS	正向: GGTCCTTACTACTGCTCTGTTG	58
		反向: ACCTCTCCATTGATGCCACTA	58
Unigene0048461	ASNS	正向: GCTGTTCTTGGTTGTTCTGATG	58
		反向: GCCGCTGGTGTGATAGATAG	58
Unigene0042264	GDH	正向: ACCTGGAAGTCTGCTGTAGC	58
		反向: GCCATTGTCTGTGAGTTTGTTC	58
Unigene0031451	Argase	正向: CTTGGCGGACAGATTGACATT	58
		反向: TCTTCCTTGCTCACGACCTT	58
Unigene0052542	SuSy	正向: TTGGCTGAGTATGAATCTGTGA	58
		反向: GCTCCTCCTTGAAGTGAAGT	58
Unigene0040686	SSS	正向: CGACTGAGGAATGGAA	58
		反向: CGATGAAGGCAATGATGG	58
Unigene0034050	AGPase	正向: ATGTCGGTAGCAGCAGTTG	58
		反向: TGGAAGATGAAGAAGTGGTGAT	58
Unigene0020821	AMS	正向: CCTTGAAGAAGGAAGACGAAGA	58
		反向: CAAGTCATCAGCAGCCTCAG	58
Unigene0010004	PK	正向: GTCGTCATTCTCGGCTCAA	58
		反向: TTGGTAGCACCTGTGGAGTC	58
Unigene0041256	HK	正向: TGAAGTTGGCTGAGGAGGTT	58
		反向: TTGAAGGAGGTGCCTGTGAT	58
Unigene0068805	PDH	正向: TGCGAAGAGTCTCTGCCTATT	58
		反向: GCGAGTGCATAAGTGCTT	58
Unigene0032967	MDH	正向: CGCAGCAATCGCCAAGTA	58
		反向: GCCGACCACAGGAACATTC	58
Unigene0064474	IDH	正向: ACAATCCAATGCTTCTCCTCTC	58
		反向: CAATGCCATCGCCAGGAAT	58
Unigene0000150	ATPase	正向: CCGTCTCCATCACCATTTCGTA	58
		反向: CAGCATACATACCGTTCGTTTCAG	58
	<i>β-actin</i>	正向: GGGGATGAAGCACAGTCCAA	58
		反向: GCCGTGGTTGTGAAGGAGTA	58

表 2 数据过滤统计表

Table 2 Data filter statistics table

样品	原始序列/Mb	有效序列/Mb (占比)	有效碱基数/Gb	Q30 值/%	GC/%
箭麻-1	30.27	29.55 (97.61%)	4.40	92.19	48.30
箭麻-2	27.67	27.17 (98.22%)	4.06	92.78	47.13
共生天麻-1	75.41	74.05 (98.19%)	11.06	92.93	47.44
共生天麻-2	60.05	58.49 (97.41%)	8.74	92.20	46.24

表 3 Unigene 长度分布统计

Table 3 Length statistics of Unigene distribution

Unigene 长度/bp	数量	占总数比例/%
200~500	38 888	53.83
500~1000	14 658	20.29
1000~3000	14 663	20.30
>3000	4035	5.58
总数	72 244	100.00
总长度	66 180 806	
平均长度	916	
N50 长度	1733	

3.1.3 转录物功能注释及分类 为了解转录物 Unigene 序列信息, 将组装好的 72 244 个 Unigene 序列比对到 Swissprot、Nr、KEGG 和 KOG 4 个数据库中, 有 26 312 个 Unigenes 获得注释信息, 所占比例为 36.42%。其中 Unigenes 注释成功最多的为 Nr 和 Swissprot 数据库, 分别为 26 217 和 17 886 个。注释在 KOG 和 KEGG 数据库中的 Unigenes 个数分别为 16 625 和 9 712 (表 4)。

表4 Unigene 功能注释结果统计

Table 4 Unigene functional annotation statistical results

数据库	NR	Swissport	KOG	KEGG	总计
数目	26 217	17 886	16 625	9 712	26 312
所占比/%	36.29	24.76	23.01	13.44	36.42

3.2 基因差异表达分析

3.2.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 在RNA组学研究中利用PCA, 将样本所包含的上万个维度的信息(上万个基因的表达量), 降维为数个维度的综合指标(主成分), 以便于进行样本间的比较, 同时保证原始

数据中包含信息尽可能多地被保留^[18]。使用R语言包 (<http://www.r-project.org/>) 对共生天麻和箭麻所有样品进行PCA, 如图1所示。根据共生天麻和箭麻在第1主成分(PC1)和第2主成分(PC2) 2个综合指标中的数值大小, 做二维坐标图。从图1可以看出共生天麻-1和共生天麻-2分布在右侧, 箭麻-1和箭麻-2分布在左侧, 说明2种样品具有一定的差异性。PCA分析中PC1(95.1%)和PC2(4.2%)对样品中所有基因表达量总体方差贡献率为99.3%, 表明通过PCA分析可以很好地区分箭麻和共生天麻。

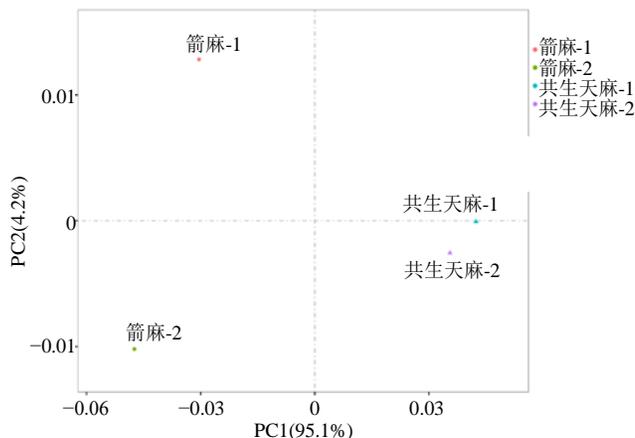
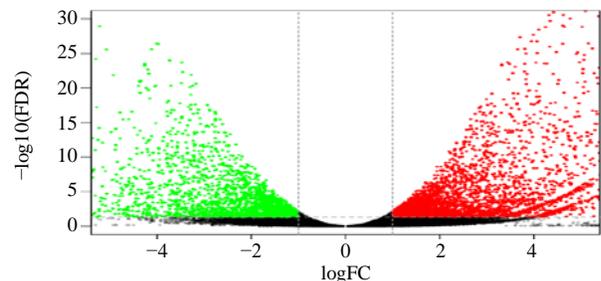


图1 共生天麻和箭麻样品的PCA

Fig. 1 Principal component analysis of symbiotic *G. elata* and mature tuber

3.2.2 分组间差异基因火山图 比较箭麻与共生天麻的测序结果, 以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ 为判断标准, 检测到共有 12 498 条基因发生显著差异表达, 其中上调表达基因数为 9 000, 占差异表达基因个数的 72.01%; 下调表达基因数为 3 498 占差异表达基因个数的 27.99%。差异表达直观展示火山图见图 2。

3.2.3 差异表达基因的GO分类 如表5所示, 有 10 473 条差异表达基因成功进行了GO分类。在GO分类的3个大类中有 4723 条差异表达基因与生物学过程有关, 占比为 45.10%, 其中富集最多的是代谢过程亚类, 占比对到该功能类别总数的 23.65%; 有 2508 条差异表达基因与分子功能相关, 占比 23.95%, 其中富集最多的是催化活性亚类, 共比对到该功能类别总数 46.93%; 与细胞成分有关的差异表达基因有 3242 条, 占比 30.96%, 富集最多的是细胞和细胞成分亚类, 共比对到该功能类别总数的 46.33%。



红色(实验组共生天麻相对于对照组箭麻表达量上调)和绿色(表达量下调)的点表示基因的表达量有显著差异, 黑色的点为没有差异 The red (the up-regulation of symbiotic *G. elata* relative to the mature tuber) and the green (the down-regulation of the expression) indicate significant differences in gene expression levels, with no differences in black spots

图2 差异表达基因火山图

Fig. 2 Differential expressed gene volcanic map

3.2.4 差异表达基因的KEGG功能分析 箭麻与共生天麻样本间的差异基因进行通路富集分析发现, 有 803 个差异基因比对到 20 个KEGG通路中。有较多基因归类为苯丙素生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)、淀粉与蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism)、植物激素信号传导 (plant hormone signal transduction)、碳代谢 (carbon metabolism)、糖酵解/葡萄糖酵素 (glycolysis/gluconeogenesis) 和

表5 箭麻和共生天麻差异表达基因 GO 注释

Table 5 GO annotation of differentially expressed genes in mature tuber and symbiotic *G. elata*.

本体	登录号	类目	基因数目
生物学过程	GO: 0044699	单一生物过程 (single-organism process)	863
	GO: 0065007	生物调节 (biological regulation)	362
	GO: 0050896	刺激应答 (response to stimulus)	313
	GO: 0051179	定位 (localization)	306
	GO: 0023052	信号传导 (signaling)	78
	GO: 0048511	有节奏过程 (rhythmic process)	5
	GO: 0051704	多生物过程 (multi-organism process)	41
	GO: 0040007	生长 (growth)	20
	GO: 0032501	多细胞生物过程 (multicellular organismal process)	108
	GO: 0040011	运动 (locomotion)	1
	GO: 0098754	解毒作用 (detoxification)	1
	GO: 0000003	繁殖 (reproduction)	69
	GO: 0022414	繁殖过程 (reproductive process)	68
	GO: 0022610	生物附着量 (biological adhesion)	3
	GO: 0032502	发育过程 (developmental process)	137
	GO: 0002376	免疫系统过程 (immune system process)	8
	GO: 0071840	细胞组分组织或合成 (cellular component organization or biogenesis)	184
	GO: 0008152	代谢过程 (metabolic process)	1117
	GO: 0009987	细胞过程 (cellular process)	1039
	分子功能	GO: 0001071	核酸结合转录因子活性 (nucleic acid binding transcription factor activity)
GO: 0003824		催化活性 (catalytic activity)	1186
GO: 0005215		运输活性 (transporter activity)	125
GO: 0016209		抗氧化活性 (antioxidant activity)	25
GO: 0009055		电子载体活性 (electron carrier activity)	6
GO: 0060089		分子转导活性 (molecular transducer activity)	10
GO: 0004871		信号传感器活性 (signal transducer activity)	8
GO: 0000988		转录因子活性, 蛋白质结合 (transcription factor activity, protein binding)	2
GO: 0098772		分子功能管理机构 (molecular function regulator)	7
GO: 0005488		结合 (binding)	1050
细胞组分	GO: 0005198	结构分子活性 (structural molecule activity)	17
	GO: 0016020	膜 (membrane)	502
	GO: 0044425	膜成分 (membrane part)	283
	GO: 0005576	胞外区 (extracellular region)	36
	GO: 0019012	病毒 (virion)	6
	GO: 0044423	病毒成分 (virion part)	6
	GO: 0030054	细胞调节 (cell junction)	27
	GO: 0031974	膜封闭腔 (membrane-enclosed lumen)	9
	GO: 0044422	细胞器成分 (organelle part)	161
	GO: 0043226	细胞器 (organelle)	623
	GO: 0032991	大分子复合物 (macromolecular complex)	87
	GO: 0005623	细胞 (cell)	751
	GO: 0044464	细胞成分 (cell part)	751

氮代谢 (nitrogen metabolism) 这几类相关的通路之中, 包含了生长过程中氮代谢、碳代谢和能量代谢 (如糖酵解) 等途径, 说明蜜环菌侵入天麻与天

麻共生长出箭麻过程中, 箭麻与共生天麻生长代谢过程中相关酶基因差异表达, 两者的代谢强弱有很大差别 (表 6)。

表 6 箭麻和共生天麻差异基因的显著富集的代谢途径

Table 6 Significant enrichment pathway of differentially expressed genes in mature tuber and symbiotic *G. elata*.

通路编号	类目	基因数目 (占比/%)	P 值
ko00940	苯丙素生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis)	67 (8.34)	0.00
ko04075	植物激素信号传导 (plant hormone signal transduction)	56 (6.97)	0.00
ko00500	淀粉与蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism)	61 (7.6)	0.00
ko00941	类黄酮类生物合成 (flavonoid biosynthesis)	18 (2.24)	0.00
ko00460	氰基氨基酸代谢 (cyanoamino acid metabolism)	17 (2.12)	0.00
ko00062	脂肪酸代谢 (fatty acid elongation)	14 (1.74)	0.00
ko01200	碳代谢(carbon metabolism)	36 (4.48)	0.00
ko00904	二萜生物合成 (diterpenoid biosynthesis)	9 (1.12)	0.00
ko00908	玉米素生物合成 (zeatin biosynthesis)	9 (1.12)	0.00
ko00360	苯丙氨酸代谢 (phenylalanine metabolis)	16 (1.99)	0.00
ko04145	吞噬体 (phagosome)	22 (2.74)	0.00
ko00270	半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (cysteine and methionine metabolism)	24 (2.99)	0.01
ko00910	氮代谢 (nitrogen metabolism)	7 (0.87)	0.01
ko04070	磷脂酰肌醇信号系统 (phosphatidylinositol signaling system)	17 (2.12)	0.02
ko01220	芳香族化合物的降解 (degradation of aromatic compounds)	5 (0.62)	0.02
ko00010	糖酵解/葡萄糖酵解(glycolysis/gluconeogenesis)	26 (3.24)	0.03
ko00052	半乳糖代谢 (galactose metabolism)	14 (1.74)	0.03
ko00905	油菜素类固醇生物合成 (brassinosteroid biosynthesis)	7 (0.87)	0.04
ko04712	昼夜节律植物 (circadian rhythm-plant)	12 (1.49)	0.04
ko00350	酪氨酸代谢 (tyrosine metabolism)	10 (1.25)	0.04

3.2.5 差异表达基因的 KOG 功能注释 在实验中共有 26 980 个 DEGs 注释到 KOG 的 25 个分类中, 其中 7796 个 Unigenes 注释为一般功能预测 (general functional prediction only, R), 占比 28.90%; 2782 个 Unigenes 注释为翻译后修饰、蛋白质分解及伴侣分子 (posttranslational modification, protein turnover, chaperones, O), 占比 10.31%; 2295 个 Unigenes 注释为信号转导 (signal transduction mechanism, T), 占比 8.51%; 1519 个 Unigenes 注释为 RNA 的加工和修饰 (RNA processing and modification, A), 占比 5.63%; 774 个 Unigenes 注释为能量的产生和转化 (energy production and conversion, C), 占比 2.87%; 816 个 Unigenes 注释为碳水化合物转运与代谢 (carbohydrate transport and metabolism, G), 占比 3.02%, 628 个 Unigenes 注释为次生代谢产物的合成、转运和代谢 (secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, Q), 占比 2.32% (表 7)。

3.2.6 箭麻和共生天麻中生长代谢关键差异基因表达分析 根据差异基因 GO 分类、KEGG 功能分析和 KOG 功能注释, 对箭麻和共生天麻生长代谢

表 7 差异表达基因的 KOG 功能注释

Table 7 DEGs KOG annotation

KOG	功能分类	KOG 单基因序列数量
A	RNA 的加工和修饰	1519
B	染色体结构和动态变化	449
C	能量的产生和转化	774
D	细胞周期调控, 细胞分裂, 染色体分配	609
E	氨基酸转运和代谢	702
F	核苷酸转运和代谢	205
G	碳水化合物转运与代谢	816
H	辅酶转运与代谢	212
I	脂质转运与代谢	796
J	翻译、核糖体结构和生物合成	1106
K	转录	1457
L	复制, 重组和修复	806
M	细胞壁/细胞膜的生物发生	263
N	细胞运动	3
O	翻译后修饰, 蛋白质周转, 伴侣	2782
P	无机离子转运与代谢	503
Q	次生代谢产物的合成、转运和代谢	628
R	一般功能预测	7796
S	未知功能	1221
T	信号转导机制	2295
U	胞质运输、分泌和包裹运输	1172
V	防御机制	141
W	胞外结构	76
Y	核结构	90
Z	细胞骨架	559

过程的相关基因进行筛选。在箭麻和共生天麻转录组测序数据注释的结果中筛选到与氮代谢、碳代谢和能量代谢相关酶的基因序列。在氮代谢途径中，选取了差异表达的基因 *GS*、*ASNS*、*GDH*、*Argase*；在碳代谢中选取了差异表达的基因 *SuSy*、*SSS*、*AGPase*、*AMS*；在能量代谢中选取了差异表达的基因 *PK*、*HK*、*PDH*、*MDH*、*IDH*、*ATPase*（表 8）。从这些基因的表达趋势来看，与合成氮，碳和能量的酶基因大部分呈上调，除分解能量的酶基因上调外，分解氮，碳的酶基因呈下调。说明蜜环菌侵染天麻与天麻共生时共生天麻各种代谢旺盛，合成各种有机物和能量物质。

3.2.7 箭麻和共生天麻中与各种代谢相关基因相

对表达水平 qRT-PCR 分析 选取的 14 个与生长代谢过程相关关键差异酶基因的相对定量 qRT-PCR 分析结果见图 3。由 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值计算箭麻和共生天麻中的相对表达量，统计分析结果显示箭麻和共生天麻的这些基因表达水平与转录组分析结果一致。即与箭麻相比，共生天麻中合生碳、氮，能量物质的显著差异酶基因呈上调表达，除分解 ATP 的 *ATPase* 基因呈上调表达外，分解氮、碳的 *GDH*、*Argase* 和 *AMS* 基因呈下调表达。因此，本课题组认为在转录组分析中用 RPKM（Reads Per Kilobase per Million mapped reads，每百万 reads 中来自于某基因每千碱基长度的 reads 数）法推断的基因表达水平是可靠的。

表 8 箭麻和共生天麻中与生长代谢相关关键差异基因的表达情况

Table 8 Expression of key differentially expressed genes in growth and metabolism of mature tuber and symbiotic *G. elata*.

代谢途径	酶基因名称	酶编号	RPKM		log ₂ Fold change(共生天麻/箭麻)	FDR
			箭麻	共生天麻		
氮代谢	<i>GS</i>	EC 2.7.7.42	413.24	924.37	1.16	0.001
	<i>ASNS</i>	EC 6.3.5.4	39.27	114.90	1.55	0.027
	<i>GDH</i>	EC 1.4.1.2	28.00	9.63	-1.54	0.031
	<i>Argase</i>	EC 3.5.3.1	10.48	4.62	-1.18	0.025
碳代谢	<i>SuSy</i>	EC 2.4.1.13	467.40	189.00	-1.31	0.005
	<i>SSS</i>	EC 2.4.1.21	0.69	5.77	3.06	0.009
	<i>AGPase</i>	EC 2.7.7.27	314.03	99.49	-1.66	0.002
	<i>AMS</i>	EC 3.2.1.1/3.2.1.2	357.83	40.44	-3.15	0.043
能量代谢	<i>PK</i>	EC 2.7.1.40	81.10	162.32	1.00	0.021
	<i>HK</i>	EC 2.7.1.1	57.54	115.91	1.01	0.007
	<i>PDH</i>	EC 1.2.1.51	37.65	77.71	1.05	0.014
	<i>MDH</i>	EC 1.1.1.299	36.00	83.51	1.21	0.003
	<i>IDH</i>	EC 1.1.1.41	16.19	34.40	1.09	0.048
	<i>ATPase</i>	EC 3.6.1.3	43.02	398.24	3.21	0.023

显著差异表达判断标准为 FDR<0.05 且|log₂FC|>1。Fold change (FC) 的意思是样本间表达量的差异倍数，log₂ fold change 的意思是取 log₂，这样可以以让差异特别大的和差异比较小的数值缩小之间的差距。|log₂FC|>1 表示样本间差异表达倍数 2 倍以上

The standard of significant differential expression was FDR < 0.05 and |log₂FC|>1. Fold change (FC) refers to the multiple of the expression amount difference between samples, and log₂. Fold change refers to taking log₂, which can narrow the gap between extremely large and relatively small differences. |log₂FC|>1 means that the differential expression ratio between samples is more than 2 times

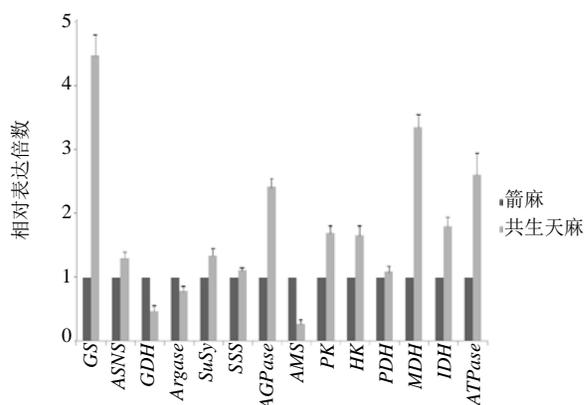


图 3 箭麻和共生天麻中生长代谢相关基因相对表达水平分析
Fig. 3 Analysis of relative expression level of related genes in growth and metabolism in symbiotic *G. elata* and mature tuber

4 讨论

4.1 共生天麻和箭麻的转录组测序分析

本研究利用 Illumina HiseqTM2000 测序技术箭麻和共生天麻进行测序，箭麻和共生天麻分别获得 4.23 Gb 和 9.90 Gb 有效数。通过数据组装获得 72 244 条 Unigenes，N₅₀ 长度为 1773 bp，平均长度为 916 bp 的非冗余 Unigene，且 Q₃₀ 值均大于 92%，说明组装数据良好可信。同时将组装好的 72 244 个 Unigene 序列比对到 Swissprot、Nr、KEGG 和 KOG 4 个数据库中有 26 312 个 Unigene 获得注释信息，所占比例为 36.42%。将箭麻和共生天麻进行 PCA，发现箭麻和共生天麻在一定程度上有

所差异,通过 PCA 可以很好地区分箭麻和共生天麻。在 $FDR < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1$ 的条件下,比较两组测序数据的结果,发现 12 498 条 DEGs,上调表达 9000 条,下调表达 3498 条。GO 数据库将 10 473 条差异表达基因分为生物学过程、分子功能和细胞组成 3 大类,其中代谢过程、细胞过程催化活性等功能小类富集较多。箭麻与共生天麻样本中有 803 个 DEGs 比对到 20 个 KEGG 通路中,与箭麻和共生天麻的生长代谢过程相关的淀粉与蔗糖代谢、碳代谢、糖酵解/葡萄糖酵解等表现出显著差异。将 DEGs 注释到 KOG 的 25 个分类中,含有能量的产生和转化,碳水化合物转运与代谢和次生代谢产物的合成、转运和代谢功能分类。根据 DEGs 的 GO 分类,KEGG 功能分析和 KOG 功能注释筛选出箭麻和共生天麻生长代谢(氮代谢、碳代谢和能量代谢)过程中的关键差异酶基因。qRT-PCR 分析结果与转录组数据结果基本一致。在差异表达的基因中,筛选到与天麻氮、碳和能量代谢相关基因,合成氮和碳营养物质的差异基因表达上调,分解氮碳营养物质的差异基因表达下调,能量相关的差异基因大多数表达上调。与箭麻相比较,共生天麻有利于氮、碳营养物质和能量物质合成。

4.2 共生天麻和箭麻中生长代谢过程相关关键差异基因分析

氮、碳和能量的积累在植物生长过程中至关重要,因此选取了氮代谢,碳代谢和能量代谢过程中的关键酶基因。氮素同化在植物生长和发育过程中是一个十分重要的生理过程。植物从外界吸收的无机铵态氮和硝态氮必须先同化为谷氨酰胺和谷氨酸等有机物才能被植物利用。氮同化过程中谷氨酰胺合成酶是一个关键酶,它在 ATP 供能条件下催化 NH_4^+ 同化为谷氨酰胺,然后在谷氨酸合酶作用下将其转化生成谷氨酸。许多研究表明正常条件下高等植物氮同化的主要途径是谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶构成的循环反应途径^[19]。谷氨酸脱氢酶参与催化谷氨酸分解为 α -酮戊二酸和铵离子及其逆反应合成谷氨酸的可逆反应。天冬酰胺和精氨酸是植物体内 N/C 比值较高的氨基酸,是植物氮代谢过程中有机氮运输和储存的主要形式。近年来进一步研究表明,苹果树在越冬期间其体内可溶性和蛋白态氨基酸中,精氨酸含量均很高,这说明苹果树中的氮素在越冬期间主要以精氨酸形式贮

藏^[20-22]。qRT-PCR 分析表明共生天麻 *GDH* 和 *ASNS* 基因都明显上调,分解谷氨酸的 *GDH* 基因和分解精氨酸的 *Argase* 基因都呈下调,这些基因不同表达水平有利于共生天麻积累便于在植物体内储存运输的谷氨酰胺,谷氨酸、天冬酰胺和精氨酸,为共生天麻和箭麻的基础代谢和生长代谢提供氮素营养。

淀粉是高等植物在生长、发育和繁殖过程中重要碳水化合物营养物质的贮藏形式,并且以往研究表明蔗糖主要参与淀粉等的合成。植物蔗糖代谢过程的关键酶是蔗糖合酶,它催化蔗糖的合成和分解,但研究表明它主要催化蔗糖分解为淀粉合成所需的葡萄糖和果糖^[23]。并有研究表明蔗糖合酶作为关键代谢酶在马铃薯块茎淀粉合成中为其提供前体物质二磷酸尿核苷葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)^[24],马铃薯中过量表达该酶可引起二磷酸腺苷葡萄糖(adenosine diphosphate glucose, ADPG)和 UDPG 的含量增加,淀粉产量增加了近 1 倍,同时马铃薯干质量较野生型也有所增加^[25]。植物合成淀粉的另一个限速酶是 AGPase,研究表明 AGPase 是淀粉生物合成过程中的关键酶,也是淀粉合成的限速酶,抑制 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶活性将会部分或全部终止淀粉的合成^[26-27]。可溶性淀粉合成酶也是淀粉合成过程中的关键酶。它以腺苷二磷酸葡萄糖为葡萄糖的供体,催化形成淀粉颗粒。淀粉酶是能将淀粉分子中的糖苷键水解获得葡萄糖和寡糖等产物的一类酶。转录组分析和 qRT-PCR 结果都显示相较于箭麻,共生天麻中 *SuSy*、*AGPase* 和 *SSS* 基因均上调,*AMS* 基因下调,这些基因的差异表达有利于共生天麻淀粉的合成和累积,供共生天麻和箭麻的生长发育需要。

糖酵解和柠檬酸循环是产生能量的主要途径。丙酮酸激酶和己糖激酶是糖酵解途径的限速酶^[28]。一分子葡萄糖通过糖酵解途径分解为 2 分子丙酮酸可以产生 2 分子 ATP。苹果酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶是柠檬酸循环中主要限速酶^[28]。一分子丙酮酸通过柠檬酸循环可以产生 12.5 分子 ATP。通过糖酵解和柠檬酸循环分解一分子葡萄糖可产生 32 分子 ATP。ATP 酶能催化 ATP 水解为 ADP 和磷酸根离子,并释放能量的反应。基于转录组数据和 qRT-PCR 分析,共生区天麻 *HK*、*PDH*、*IDH*、*MDH* 基因都表达上调,说明

共生区天麻糖酵解和柠檬酸循环都处于快速代谢产生较多的ATP储存能量。同时ATP基因也呈上调表达,它催化ATP基因分解释放较多的能量以满足共生天麻与蜜环菌共生所需要的能量和箭麻生长代谢所需要的能量。

5 结论

近年来从分子水平上对天麻及天麻与蜜环菌共生的研究颇多,最新研究已从生物学角度揭示天麻与蜜环菌共生关系及其形成机制^[16]。但是天麻(白麻)与蜜环菌共生后进一步生长出新天麻(箭麻)的生长代谢特征还不清楚。本研究通过转录组比较分析初步阐述共生天麻和箭麻生长代谢特征。转录组分析表明,共生天麻中与氮、碳和能量代谢相关差异基因与箭麻相比较大多数合成氮、碳和能量物质表达上调,分解谷氨酸和精氨酸的谷氨酸脱氢酶和精氨酸酶以及分解淀粉的淀粉酶表达下调,有利于共生区天麻产生较多的氮和碳营养储存物质和较多的能量物质供其进一步生长为箭麻。可以看出白麻与蜜环菌共生状况是否良好对白麻能否进一步生长出箭麻有很大影响。在生产中科学地掌握白麻与蜜环菌共生时适宜的生长环境是白麻可以进一步生长为箭麻的关键,这是天麻栽培过程中需要注意的事项。然而,天麻蜜环菌共生时的最适宜环境仍需要进行下一步的探究。与此同时,箭麻和共生天麻与碳代谢、氮代谢及能量代谢相关的基因中,同一基因家族成员基因时空表达不一致,今后应研究清楚基因家族成员在箭麻和共生天麻中的亚细胞定位和时空表达特性,阐明其功能与作用,为人工栽培天麻提供进一步理论指导。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 罗国刚,樊文静,袁兴运,等.天麻皂苷对三叉神经节离体培养后降钙素基因相关肽表达影响的机制研究[J].药学学报,2011,46(12):1451-1456.
- [2] Liu W, Su B L, Wang Z S, et al. Gastrodin improved baroreflex sensitivity and increased gamma-amino butyric acid content in brains without decreasing blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *CNS Neurosci Therap*, 2012, 18(10): 873-875.
- [3] Wang Y, Wu Z, Liu X, et al. Gastrodin ameliorates Parkinson's disease by downregulating connexin 43 [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(2): 585-590.
- [4] 陈顺芳,黄先敏,王锐,等.天麻的一代生活史[J].昭通师范高等专科学校学报,2009,31(5):36-39.
- [5] Kusano S. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea* [J]. *J Agric Coll Tokyo Imp Univ*, 1911, 4: 1-65.
- [6] 徐锦堂,郭顺星,范黎,等.天麻种子与小菇属真菌共生萌发的研究[J].菌物学报,2001,20(1):137-141.
- [7] 张维经,李碧峰.天麻与蜜环的关系[J].植物学报,1980,22(1):57-62.
- [8] 徐锦堂,范黎.天麻种子/原球茎和营养繁殖茎被菌根真菌定殖后的细胞分化[J].植物学报,2001,43(10):1003-1010.
- [9] 徐锦堂.天麻营养繁殖茎被蜜环菌侵染过程中细胞结构的变化[J].中国医学科学院学报,2001,23(2):150-153.
- [10] Zou N, Bai X, Lv J, et al. Study on symbiotic mechanism between *Gastrodia elata* Blume and *Armillaria mellea* in tissue culture system [J]. *Med Plant*, 2010, 1(10): 91-92.
- [11] 王绍柏,余昌俊,许启新,等.天麻箭麻形成新探[J].时珍国医国药,2010,21(12):3293-3294.
- [12] Zeng X, Li Y Y, Ling H, et al. Transcriptomic analyses reveal clathrin-mediated endocytosis involved in symbiotic seed germination of *Gastrodia elata* [J]. *Bot Stud*, 2017, 58(1): 31.
- [13] 曾旭,杨建文,凌鸿,等.石斛小菇促进天麻种子萌发的转录组研究[J].菌物学报,2018,37(1):52-63.
- [14] Zeng X, Li Y Y, Ling H, et al. Revealing proteins associated with symbiotic germination of *Gastrodia elata* by proteomic analysis [J]. *Bot Stud*, 2018, 59(1): 8.
- [15] 谭彧文,包焱,操璟璟,等.蜜环菌与天麻共生分子机制的转录组分析[J].中草药,2018,49(17):4125-4130.
- [16] Yuan Y, Jin X H, Liu J, et al. The *Gastrodia elata* genome provides insights into plant adaptation to heterotrophy [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 8.
- [17] 文欢,张大燕,彭成,等.天麻苯丙烷代谢途径的转录组学分析[J].中药材,2017,40(4):789-796.
- [18] Saavedra J, Córdova A, Gálvez L, et al. Principal component analysis as an exploration tool for kinetic modeling of food quality: A case study of a dried apple cluster snack [J]. *J Food Eng*, 2013, 119(2): 229-235.
- [19] 陈胜勇,李观康,汪云,等.谷氨酰胺合成酶的研究进展[J].中国农学通报,2010,26(22):45-49.
- [20] Gaufichon L, Rothstein S J, Suzuki A. Asparagine metabolic pathways in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(4): 675-689.
- [21] Canton F R, Suarez M F, Canovas F M. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees [J]. *Photos Res*, 2005, 83(2): 265-278.
- [22] Cheng L L, Ma F W, Ranwala D. Nitrogen storage and its

- interaction with carbohydrates of young apple trees in response to nitrogen supply [J]. *Tree Physiol*, 2004, 24(1): 91-98.
- [23] Elling L. Effect of metal ions on sucrose synthase from rice grains--a study on enzyme inhibition and enzyme topography [J]. *Glycobiology*, 1995, 5(2): 201-206.
- [24] Geigenberger P, Stitt M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues [J]. *Planta*, 1993, 189(3): 329-339.
- [25] Baroia-fernandez E, Munoz F J, Montero M, *et al.* Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(9): 1651-1662.
- [26] Sweetlove L J, Muller-rober B, Willmitzer L, *et al.* The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers [J]. *Planta*, 1999, 209(3): 330-337.
- [27] Kawagoe Y, Kubo A, Satoh H, *et al.* Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm [J]. *Plant J*, 2005, 42(2): 164-174.
- [28] 王镜岩. 生物化学 (下册) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 108-109.

[责任编辑 时圣明]