核 农 学 报 2021,35(3):0737~0744
Journal of Nuclear Agricultural Sciences

文章编号:1000-8551(2021)03-0737-08

垄沟集雨覆盖对旱作马铃薯块茎淀粉合成关键酶活性、基因表达及淀粉累积的影响

苏 旺[1] 胡禄华[2] 王 舰[1,*]

([1]青海大学农林科学院/青海省农林科学院/青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室/青海大学青藏高原生物技术教育部重点实验室/青海省马铃薯育种重点实验室,青海 西宁 810016;
[2] 青海大学生态环境工程学院,青海 西宁 810016)

摘 要:为探讨垄沟集雨覆盖栽培对旱作马铃薯块茎形成过程中淀粉合成关键酶活性、基因表达及淀粉累积的影响,以马铃薯栽培品种青薯9号为材料,设置全膜双垄和地膜垄作覆盖栽培模式,以露地平播为对照,测定马铃薯块茎形成过程中淀粉合成关键酶活性、基因表达及淀粉累积指标。结果表明,从块茎发育全过程来看,全膜双垄和地膜垄作覆盖栽培马铃薯可溶性淀粉合成酶(SSS)活性分别较露地平播显著提高77.70%、22.63%,可溶性淀粉合成酶 *SSIII* 基因表达量分别较露地平播显著提高32.26%、119.35%,同时,ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPP)、颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)活性和ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 *AGPase*、可溶性淀粉合成酶 *SSII*、颗粒结合型淀粉合成酶 *GBSSI*、淀粉分支酶 *SBEI*、淀粉分支酶 *SBEII* 基因表达量均明显降低,而淀粉分支酶(SBE)活性无显著变化;全膜双垄覆盖栽培马铃薯总淀粉含量、直链淀粉含量及直/支链淀粉比较露地平播分别提高5.04%、17.57%和27.81%,达到显著水平,而地膜垄作明显降低了马铃薯总淀粉含量、直链淀粉含量及直/支链淀粉比;SSS活性与 *GBSSI* 基因表达量呈显著负相关,与直链淀粉含量及直/支链淀粉比呈显著正相关,其他淀粉合成关键酶活性均与基因表达量、淀粉累积指标无明显相关性。本研究结果对筛选青海东部旱区马铃薯适宜的淀粉优质生产措施具有重要意义。

关键词:垄沟集雨覆盖;旱作马铃薯;淀粉合成关键酶活性;淀粉合成关键酶基因表达;淀粉累积
DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2021.03.0737

作为青海东部旱区的特色优势作物[1],马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)以块大、整齐、淀粉含量高、退化轻等特性享誉国内外[2]。近二十年,垄沟集雨覆盖栽培可使无效、微效降水形成径流[3],叠加到沟内,且覆盖后可抑制土壤水分蒸发,促进水分下渗[4],逐渐成为青海东部旱区马铃薯生产中的主要栽培技术。

马铃薯垄沟集雨覆盖栽培的研究主要集中在土壤水分[5-6]、温度[7]、酶活性[8]、微生物种类和数量[8]、产量及水分利用效率[9-13]等方面,有关淀粉合成关键酶活性及其基因表达的研究尚鲜见。前人多从品种、氮肥的角度分析马铃薯淀粉合成关键酶活性及其变化规律,从淀粉合成相关基因功能来探讨马铃薯淀粉生物合成的分子基础,如吕文河等[14]研究表明,马铃薯高淀粉品种克新22号的可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase,SSS)、颗粒结合型淀粉合成酶(granule bound starch synthase,GBSS)及淀粉分支酶(starch branching enzyme,SBE)活性均显著高于低淀粉品种克新19号;而杨华等[15]研究认为,低淀粉品种CY-117的ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase,AGPP)、SSS活性显著高于高淀粉品种QS-2,且氮素主要是通过影响SSS活性来实现对马铃薯块茎淀粉含量的调控。研究表明,抑制表达异淀粉酶 *ISA1/2/3* 基因[16]以及过表达超氧化物歧化酶 *SOD*、抗坏血酸过氧化物酶 *APX* 基因[17]均显著调控了马铃薯块茎淀粉生物合成过程;杨涛等[18]对可溶性淀粉合成酶 *SSIII* 基因进行了克隆及生物学分析;Yoo

收稿日期:2019-09-27 **接受日期**:2020-02-12
基金项目:青海省自然科学基金(2017-ZJ-960Q),青海省重大科技专项(2017-NK-A7、2019-NK-A1),青海省科技合作专项(2018-HZ-802)
作者简介:苏旺,男,助理研究员,主要从事马铃薯栽培、遗传育种研究。E-mail:suwangtt@126.com
* **通讯作者**:王舰,男,研究员,主要从事马铃薯种质资源、遗传育种研究。E-mail:jianwang2197@163.com

等[19]鉴定了 *SSIII* 基因的功能。

鉴于此,本研究以旱作马铃薯生产上大规模应用的垄沟集雨覆盖栽培模式为对象,探讨其对马铃薯块茎形成过程中淀粉合成关键酶活性、基因表达和淀粉累积的影响,分析淀粉合成关键酶活性、基因表达及淀粉累积间的相关性,旨在为青海东部旱区筛选马铃薯优质淀粉生产措施奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验地概况

供试马铃薯品种为青薯 9 号,由青海大学农林科学院提供。试验于 2018 年 4 月至 9 月在青海省西宁市城北区青海大学农林科学院试验基地(36.73°N,101.75°E)进行。该基地位于青藏高原东北部,海拔 2 339 m,属大陆性高原半干旱气候,6—9 月降水集中,占全年降水量的 70%,年均降水量 380 mm,年均日照时数 1 939.7 h,年均气温 7.6℃,年均蒸发量 1 363.6 mm,无霜期 180 d。试验地耕层土壤含有机质 17.2 mg·kg^{-1},碱解氮 147.1 mg·kg^{-1},速效磷 21.0 mg·kg^{-1},速效钾 158.9 mg·kg^{-1},pH 值 8.1。土壤质地为栗钙土,地力水平中上等。

1.2 试验设计

采用大田小区种植,单因素随机区组排列,重复 3 次。设置 2 种垄沟集雨覆盖栽培模式,分别为地膜垄作(M03)和全膜双垄(M02),以露地平播(M01)为对照。其中,M03 为宽窄行种植,垄宽 60 cm,沟宽 30 cm,垄高 15 cm,窄行 30 cm,宽行 60 cm,选用幅宽 90 cm 地膜,小区面积 5.4 m×5 m=27 m^2,12 行区;M02 为宽窄行种植,大垄垄宽 70 cm,垄高 15 cm,小垄垄宽 50 cm,垄高 10 cm,窄行 50 cm,宽行 70 cm,选用幅宽 120 cm 地膜,小区面积 6 m×5 m=30 m^2,10 行区;M01 为等行距种植,小区面积 7 m×5 m=35 m^2,行距 70 cm,10 行区。各小区种植密度一致,均为 4.28×10^4 株·hm^{-2}。采用 0.013 mm 厚地膜。旱作,无灌溉。播前施磷酸二胺 300 kg·hm^{-2}、尿素 225 kg·hm^{-2}、硫酸钾 150 kg·hm^{-2},其他田间管理按照国家马铃薯品种区域试验进行。2018 年 4 月 25 日整地,4 月 26 日播种,9 月 27 日统一收获。

在马铃薯匍匐茎顶端开始膨大至成熟收获期间,按照时间顺序依次取样,具体取样时期如下:块茎形成期后期(第一花序开始开花,S1)、块茎增长期前期(盛花期,S2)、块茎增长期后期(茎叶开始衰老,S3)、淀粉积累期中期(植株基部 1/3 左右茎叶枯黄,S4)、淀粉积累期后期(植株基部 2/3 左右茎叶枯黄,S5)、成熟期(植物地上部茎叶全部枯黄,S6)。各处理各重复小区内选择长势均匀的 2 株进行取样,取样部位为每株马铃薯全部块茎。

实验室内,去除块茎泥土,选取大小一致的薯块,分别在顶、中、底部各取 1 片 0.5 cm 厚的薯片,切成 0.1~0.2 cm^2 大小一致的颗粒,混匀,称量 4.00 g,置于-80℃超低温冰箱中保存,其中,2.00 g 用于测定 AGPP、SSS、GBSS、SBE 活性,2.00 g 用于测定 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 *AGPase*、可溶性淀粉合成酶 *SSII*、*SSIII*、颗粒结合型淀粉合成酶 *GBSSI*、淀粉分支酶 *SBEI*、*SBEII* 基因表达量。剩余部分用于测定马铃薯块茎总淀粉含量及直链淀粉含量。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 *淀粉合成关键酶活性* AGPP、SSS 和 GBSS 粗酶液制备:取 1.00 g 马铃薯块茎,碾磨成粉样,加入 800 μL 提取液[终浓度为:50 mmol·L^{-1}4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid,Hepes)(pH 值 7.2~7.4)、5 mmol·L^{-1} 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)、1 mmol·L^{-1} 二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)、2 mmol·L^{-1} KCl、1% 聚乙烯吡咯烷酮 40(polyvinyl pyrrolidone 40,PVP-40)],研磨成匀浆后置于离心管中,于 4℃条件下 10 000 r·min^{-1}离心 30 min,收集上清液作为 AGPP 与 SSS 活性测定的粗酶液。将离心所得沉淀用 800 μL 提取液洗涤后,悬浮于提取介质中,作为 GBSS 活性测定的粗酶液。

SBE 粗酶液制备:取 1.00 g 马铃薯块茎,加入 800 μL提取液[含 50 mmol·L^{-1} Hepes-NaOH(pH 值 7.5)、5 mmol·L^{-1} EDTA、1 mmol·L^{-1} DTT、2 mmol·L^{-1} KCl、1% PVP-40],研磨成匀浆后置于离心管中,于 4℃条件下 15 000 r·min^{-1}离心 15 min,收集上清液作为 SBE 活性测定的粗酶液。

参照 Nakamura 等[20]的方法测定 AGPP、SSS、GBSS 活性;参照李太贵等[21]和程方民等[22]的方法测定 SBE 活性。

1.3.2 *淀粉合成关键酶基因表达量* 取-80℃超低温冰箱保存的块茎颗粒,采用 Trizol 法提取 RNA[23],同时,去除基因组 DNA。反转录合成 cDNA 第一链,20 μL反应体系及程序:RNA+水 10.5 μL,OligodT(18) 2 μL,65℃加热 5 min,迅速冰浴 2 min,后加入 5×RT buffer 4 μL,RT enzyme 1 μL,RNase-free 水 0.5 μL,dNTP 2 μL,42℃孵育 80 min,70℃加热 15 min。根据 NCBI 公布的基因 RNA 序列,使用

Premier 5.0 软件设计实时荧光定量 PCR(quantitative ral-time PCR, qRT-PCR)引物(表 1),并在扩增反应完成后,绘制溶解曲线,以保证引物特异性。以 cDNA 为模板,*Tublin*1 为内参基因。使用 10 μL PCR 反应体系:2×RealStar Green Power Mixture (with ROX Ⅱ) 5 μL,引物各 0.4 μL,cDNA 1 μL,水 3.2 μL。PCR 反应程序:95℃预变性 10 min,95℃变性 15 s,60℃退火 60 s,72℃延伸 1.5 min,40 个循环。各样品重复 3 次,参照 Δ*Ct* 法计算目的基因相对表达量[24]。

表 1　qRT-PCR 目的基因引物

Table 1　Target gene and sequence of qRT-PCR primers

基因名称 Gene name	上游引物(5′→3′) Forward primer(5′→3′)	下游引物(5′→3′) Reverse primer(5′→3′)
*Tublin*1	GTCAGTCTGGTGCTGGTAATAA	TCTCAGCCTCCTTCCTTACA
AGPase	TTCCTTCCACCAACCAAGATAG	CACTATGGAGTGTTCCACAGAA
SSII	CAACAGGACCTACTTCAACAGA	CTACCACTCCCACCATCATAAG
SSIII	GTCACCTGTTCGTGTATCATCT	CCACTCTCTTCCGATCTCTTTG
GBSSI	CTTGCGTTTGCTGAGATGATAAA	CAGAAGCTCCTAAGCCCAATAG
SBEI	GCGAACATGTGTGGCTTATTAC	TCTCGTCACTCTCCTCGATATT
SBEII	CTCTGGATAGACCGTCAACATC	AGGTACCCTTCTCCTCCTAATC

1.3.3　淀粉累积

1.3.3.1　总淀粉含量测定　取部分马铃薯块茎切碎、烘干及粉碎,采用碘量法[25]测定马铃薯总淀粉含量,每份样品测定 3 次,取平均值。根据公式计算淀粉含量:

$$淀粉含量=R/(0.1\times0.01\times0.05\times10^{6})\times100\% \quad (1)$$

式中,*R* 值为从标准曲线上求出的浓度。

1.3.3.2　直链淀粉含量测定　取剩余马铃薯块茎采用自然沉降法[26]提取淀粉,称 2 mg 淀粉样品于烧杯中,加入 0.5 mL 35%高氯酸溶液,稍加震荡,待样品完全溶解后加入 8 mL 蒸馏水,混合均匀后得到混合样;另取一烧杯加入 0.5 mL 35%高氯酸和 8 mL 蒸馏水做空白对照。分别取样品混合样和空白对照各600 μL于 2 个比色皿中,然后在比色皿中依次加入 300 μL 碘液、1 800 μL 蒸馏水。混合均匀,分别于550 nm和 618 nm 波长处测定其吸光度值,重复 3 次。根据公式计算直链淀粉含量[27]:

$$直链淀粉含量=(3.5-5.1\times R)/(10.4\times R-19.9)\times100\% \quad (2)$$

式中,*R*=618 nm 波长处吸光度值/550 nm 吸光度值。

1.3.3.3　直/支链淀粉比　支链淀粉含量=1−直链淀粉含量;直/支链淀粉比=直链淀粉含量/支链淀粉含量。

1.4　统计方法

采用 Microsoft Excel 2007 和 SAS V8.0 统计软件进行数据处理和统计分析,采用 Duncan 法进行样本之间的多重比较($a=0.05$),采用 Pearson 法进行相关性分析($a=0.05$)。

2　结果与分析

2.1　淀粉合成关键酶活性

ADP 葡萄糖焦磷酸化酶(AGPP)、淀粉合成酶(SSS、GBSS)、淀粉分支酶(SBE)、淀粉去分支酶等淀粉合成关键酶相互协调、共同作用完成作物淀粉生物合成。由表 2 可知,在马铃薯块茎形成过程中,各淀粉合成关键酶活性波动较大;从块茎发育全程来看,马铃薯块茎的 AGPP、GBSS 活性平均表现为露地平播(M01)>地膜垄作(M03)>全膜双垄(M02),M02、M03 马铃薯块茎的 SSS 活性分别较 M01 平均提高 77.70%和 22.63%($P<0.05$),而 M01、M02 和 M03 马铃薯块茎的 SBE 活性无显著差异。可见,在块茎形成过程中,垄沟集雨覆盖栽培显著降低了旱作马铃薯 AGPP、GBSS 活性,显著提高了可溶性 SSS 活性,其中,以全膜双垄最为明显。

2.2　淀粉合成关键酶基因相对表达量

各淀粉合成关键酶间存在种间功能异化的亚型,在作物淀粉生物合成中扮演各自独特的作用。由表 3 可知,在马铃薯块茎形成过程中,淀粉合成关键酶基因相对表达量总体均呈升高趋势;从块茎发育全程来看,马铃薯块茎中 *AGPase*、*SSII*、*GBSSI*、*SBEI*、*SBEII* 基因

表 2 垄沟集雨覆盖栽培模式对旱作马铃薯块茎形成各时期淀粉合成关键酶活性的影响

Table 2 Effects of mulching on ridge-furrow for harvesting rainwater on activity of starch synthesis key enzyme at each period of tuber formation in rainfed potato /($U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)

酶 Enzyme	处理 Treatment	酶活性 Enzyme activity						
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	平均 Average
AGPP	M01	8. 41±0. 23a	9. 58±0. 30a	1. 82±0. 46c	7. 30±0. 46a	3. 09±0. 08b	8. 21±0. 46a	6. 40±2. 98a
	M02	6. 18±0. 08b	1. 67±0. 15c	5. 52±0. 09b	4. 21±0. 08b	0. 15±0. 02c	2. 38±0. 09b	3. 35±1. 99b
	M03	1. 57±0. 08c	5. 47±0. 05b	8. 26±0. 08a	2. 89±0. 15c	4. 00±0. 08a	1. 06±0. 02c	3. 87±2. 52b
SSS	M01	11. 73±0. 15b	8. 43±0. 15c	5. 33±0. 13c	10. 33±0. 19b	7. 50±0. 52c	11. 07±0. 67b	9. 06±3. 33c
	M02	12. 88±0. 24a	12. 60±0. 14b	17. 08±0. 22a	27. 58±0. 42a	10. 87±0. 21b	15. 63±0. 16a	16. 10±5. 68a
	M03	7. 93±0. 16c	19. 23±0. 21a	9. 33±0. 87b	0. 33±0. 08c	18. 11±0. 21a	11. 71±0. 16b	11. 11±6. 98b
GBSS	M01	9. 89±0. 08a	11. 34±0. 14a	13. 16±0. 37a	15. 62±0. 22a	10. 57±0. 29b	8. 82±0. 28a	11. 54±2. 27a
	M02	0. 33±0. 08c	6. 63±0. 21b	0. 56±0. 02c	8. 17±0. 08b	5. 55±0. 08c	1. 17±0. 07c	3. 73±3. 24c
	M03	3. 69±0. 07b	4. 95±0. 06c	3. 73±0. 07b	5. 69±0. 08c	15. 49±0. 16a	2. 99±0. 11b	6. 09±4. 42b
SBE	M01	11. 38±0. 10b	11. 83±0. 03b	11. 42±0. 06a	12. 08±0. 05b	12. 25±0. 02a	11. 33±0. 05b	11. 71±0. 37a
	M02	11. 98±0. 03b	11. 06±0. 01b	10. 54±0. 01b	10. 35±0. 02c	11. 53±0. 03a	13. 15±0. 02a	11. 43±0. 97a
	M03	14. 79±0. 01a	14. 13±0. 02a	11. 55±0. 01a	13. 47±0. 01a	10. 67±0. 02b	10. 82±0. 03b	12. 57±1. 67a

注:不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference among treatments at 0. 05 level. The same as following.

表 3 垄沟集雨覆盖栽培模式对旱作马铃薯块茎形成各时期淀粉合成关键酶基因相对表达量的影响

Table 3 Effects of mulching on ridge-furrow for harvesting rainwater onrelative gene expression of starch synthesis key enzyme at each period of tuber formation in rainfed potato

基因 Gene	处理 Treatment	基因相对表达量 Relative gene expression						
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	平均 Average
AGPase	M01	0. 46±0. 01b	18. 77±3. 16a	18. 11±1. 37b	37. 29±6. 92a	7. 94±3. 29c	4. 84±0. 26b	14. 56±12. 81a
	M02	1. 35±0. 09a	2. 52±0. 18b	4. 75±0. 23c	2. 36±0. 31c	10. 98±0. 99b	7. 60±0. 62a	4. 92±3. 51b
	M03	0. 27±0. 02c	0. 99±0. 06c	39. 06±5. 14a	25. 33±2. 24b	12. 29±1. 76a	1. 63±0. 20c	13. 26±15. 08a
SSII	M01	0. 01±0. 001b	0. 54±0. 15a	0. 70±0. 45a	1. 21±0. 07a	0. 30±0. 07b	0. 89±0. 03a	0. 61±0. 43a
	M02	0. 26±0. 02a	0. 05±0. 01c	0. 13±0. 04b	0. 19±0. 01c	0. 71±0. 07a	0. 65±0. 04b	0. 33±0. 26c
	M03	0. 03±0. 01b	0. 19±0. 03b	0. 62±0. 13a	0. 98±0. 10b	0. 32±0. 05b	0. 56±0. 05c	0. 45±0. 33b
SSIII	M01	0. 01±0. 002b	0. 15±0. 06b	0. 15±0. 06b	0. 49±0. 03a	0. 15±0. 01b	0. 91±0. 26b	0. 31±0. 33c
	M02	0. 47±0. 03a	0. 06±0. 01c	0. 05±0. 01c	0. 21±0. 03b	0. 38±0. 12a	1. 32±0. 16a	0. 41±0. 45b
	M03	0. 04±0. 02b	2. 06±1. 40a	0. 58±0. 08a	0. 49±0. 08a	0. 11±0. 02b	0. 82±0. 06b	0. 68±0. 84a
GBSSI	M01	16. 79±0. 48a	174. 94±29. 94a	217. 55±14. 55a	136. 08±6. 03b	94. 29±1. 99b	73. 73±0. 88c	118. 89±69. 03a
	M02	16. 60±1. 17a	84. 91±3. 02b	74. 50±7. 62c	29. 05±2. 61c	192. 73±20. 27a	123. 13±13. 04b	86. 82±61. 44c
	M03	13. 70±0. 52b	19. 98±5. 88c	193. 01±13. 59b	190. 07±10. 57a	69. 06±9. 83c	159. 02±21. 39a	107. 47±78. 94b
SBEI	M01	1. 18±0. 05c	41. 31±6. 92a	14. 57±0. 85b	40. 68±5. 51a	6. 60±0. 24b	1. 48±0. 23c	17. 63±17. 86a
	M02	3. 32±0. 59a	3. 06±0. 21b	6. 78±0. 37c	2. 82±0. 12c	10. 76±1. 46a	11. 00±0. 81a	6. 28±3. 66c
	M03	1. 74±0. 32b	3. 27±1. 45b	19. 54±1. 72a	15. 49±0. 38b	6. 20±0. 91b	2. 30±0. 48b	8. 09±7. 16b
SBEII	M01	0. 03±0. 01b	0. 37±0. 08b	0. 26±0. 01b	1. 69±0. 18a	0. 13±0. 02b	0. 76±0. 07a	0. 54±0. 58a
	M02	0. 19±0. 02a	0. 11±0. 05c	0. 15±0. 02c	0. 49±0. 02b	0. 29±0. 08a	0. 47±0. 09b	0. 28±0. 16c
	M03	0. 05±0. 01b	0. 62±0. 06a	0. 91±0. 08a	0. 56±0. 05b	0. 21±0. 02a	0. 18±0. 06c	0. 42±0. 32b

平均相对表达量均表现为 M01>M03>M02，M03、M02 马铃薯块茎中 *SSIII* 基因相对表达量分别较 M01 提高 119.35%、32.26%（$P<0.05$）。可见，在块茎形成过程中，垄沟集雨覆盖栽培显著降低了旱作马铃薯 *AGPase*、*SSII*、*GBSSI*、*SBEI*、*SBEII* 基因表达量，以全膜双垄最为明显；显著提高了 *SSIII* 基因表达量，以地膜垄作最为明显。

2.3　淀粉累积

淀粉累积决定着作物淀粉品质的优劣。由表 4 可知，在马铃薯块茎形成过程中，块茎总淀粉含量、直链淀粉含量和直/支链淀粉比波动较大；从块茎发育全程来看，M02 马铃薯块茎总淀粉含量、直链淀粉含量和直/支链淀粉比分别较 M01 提高 5.04%、17.57%、27.81%，而 M03 分别较 M01 降低 5.71%、42.43%、47.68%。可见，在块茎形成过程中，与地膜垄作相比，全膜双垄覆盖栽培显著提高了旱作马铃薯总淀粉含量、直链淀粉含量及直/直链淀粉比。

表 4　垄沟集雨覆盖栽培模式对旱作马铃薯块茎形成各时期淀粉累积的影响

Table 4　Effects of mulching on ridge-furrow for harvesting rainwater on starch accumulation at each period of tuber formation in rainfed potato

指标 Index	处理 Treatment	块茎形成时期 Tuberformation period						
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	平均 Average
总淀粉含量 Total starch content/%	M01	9.74±2.32b	10.90±0.68a	14.24±2.18b	18.66±2.15a	18.85±1.67a	8.48±0.07b	13.48±4.49ab
	M02	14.96±1.57a	8.63±1.57b	16.94±0.14a	18.95±0.10a	16.65±1.23b	8.85±1.95b	14.16±4.29a
	M03	7.93±0.44c	6.28±0.31c	10.01±0.24c	16.82±0.78b	11.48±0.14c	23.73±1.47a	12.71±6.22b
直链淀粉含量 Amylose content/%	M01	20.36±0.02a	6.18±1.74b	4.50±4.34b	10.38±1.58b	18.62±3.78b	15.77±6.07a	12.63±6.82b
	M02	5.23±0.07c	6.66±3.59b	15.45±1.96a	32.35±1.62a	21.61±8.20a	7.85±1.48b	14.85±10.49a
	M03	8.41±0.60b	9.06±1.62a	4.26±2.85b	6.23±2.93c	8.43±3.57c	7.21±2.44b	7.27±2.53c
直/支链淀粉比 Amylose/amylopectin ratio	M01	0.256±0.0003a	0.066±0.019b	0.048±0.047b	0.116±0.019b	0.230±0.057a	0.190±0.086a	0.151±0.090b
	M02	0.055±0.001c	0.072±0.041b	0.183±0.027a	0.479±0.035a	0.283±0.134a	0.085±0.017b	0.193±0.163a
	M03	0.092±0.007b	0.100±0.020a	0.045±0.031b	0.067±0.033c	0.093±0.042b	0.078±0.028b	0.079±0.029c

2.4　相关性分析

由表 5 可知，SSS 活性与 *GBSSI* 基因表达量呈显著负相关，与直链淀粉含量及直/支链淀粉比呈显著正相关；*AGPase* 基因表达量与 *SSII*、*GBSSI*、*SBEI* 及 *SBEII* 基因表达量呈显著正相关；*SSII* 基因表达量与 *GBSSI*、*SBEI* 及 *SBEII* 基因表达量呈显著正相关；*GBSSI* 基因表达量与 *SBEI* 基因表达量呈显著正相关；*SBEI* 基因表达量与 *SBEII* 基因表达量呈显著正相关；直链淀粉含量与直/支链淀粉比呈显著正相关。

3　讨论

通过多年发展，垄沟集雨覆盖栽培已广泛应用于小麦[28]、玉米[29]、马铃薯[30]、谷子[31]、糜子[32]、燕麦[33]、苜蓿[34]等作物上，因其结合地膜、秸秆、砂石等材料具有活化土壤养分[35]、提高土壤温度[36]、改良作物光合能力[37]等作用，已成为青海东部旱区关注的焦点。本研究表明，在块茎形成过程中，与地膜垄作相比，全膜双垄覆盖栽培模式可显著改良旱作马铃薯淀粉的质量。

马铃薯可溶性淀粉合成酶主要为 SSII 和 SSIII 两种同工型。本研究显示，在块茎形成过程中，与露地平播相比，垄沟集雨覆盖栽培同时提高了旱作马铃薯 SSS 活性及 *SSIII* 基因表达量，表明 SSIII 是可溶性淀粉合成酶的主要活性成分，这与 Lloyd 等[38] 和 Edwards 等[39] 的研究结果类似。

在作物淀粉生物合成研究中，淀粉合成关键酶活性与基因表达量的关系一直备受关注。本研究表明，除 SSS 活性与 *GBSSI* 基因表达量呈显著负相关外，AGPP、GBSS、SBE 活性与各关键酶基因表达量均无显著相关性，这可能是马铃薯淀粉合成关键酶活性除受到转录调控外，还受到转录后调控[40]，与陈江等[41] 在玉米上、谭彩霞等[42] 在小麦上取得的结论相似。

本研究显示，旱作马铃薯 SSS 活性与直链淀粉含量、直/支链淀粉比呈显著正相关，*AGPase* 基因表达量与 *SSII*、*GBSSI*、*SBEI* 及 *SBEII* 基因表达量呈显著正相关，说明 AGPP 和 SSS 是马铃薯块茎淀粉生物合成的重要限制及功能酶。甘晓燕等[43] 及 Sweetlove 等[44] 也证实了这一点。除 SSS 活性外，其他淀粉合成关键酶

表 5 旱作马铃薯块茎淀粉合成关键酶活性、基因表达与淀粉累积的相关性

Table 5 Correlation analysis between amylase activity, key enzyme gene expression and starch accumulation in rainfed potato

指标 Index	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13
R1	1.000												
R2	0.067	1.000											
R3	0.214	−0.110	1.000										
R4	−0.137	−0.351	−0.238	1.000									
R5	0.298	−0.439	0.362	0.002	1.000								
R6	0.085	−0.449	0.284	0.036	0.708*	1.000							
R7	0.043	0.212	−0.316	0.429	−0.067	0.233	1.000						
R8	−0.175	−0.569*	0.163	−0.133	0.685*	0.700*	−0.050	1.000					
R9	0.403	−0.343	0.426	0.040	0.787*	0.605*	−0.089	0.580*	1.000				
R10	0.416	−0.032	0.296	0.090	0.716*	0.727*	0.359	0.268	0.617*	1.000			
R11	−0.287	−0.033	0.044	−0.409	0.129	0.281	−0.261	0.312	0.115	0.062	1.000		
R12	−0.005	0.515*	0.111	−0.344	−0.341	−0.220	−0.197	−0.344	−0.295	−0.081	0.285	1.000	
R13	−0.017	0.539*	0.106	−0.359	−0.323	−0.220	−0.201	−0.326	−0.286	−0.074	0.297	0.995*	1.000

注：* 表示显著相关（$P<0.05$）；R1～R13 分别表示 AGPP、SSS、GBSS、SBE 活性，*AGPase*、*SSII*、*SSIII*、*GBSSI*、*SBEI*、*SBEII* 基因相对表达量，总淀粉含量，直链淀粉含量及直/支链淀粉比。

Note: * indicate significant correlation at 0.05 level. R1-R13 represent AGPP, SSS, GBSS, SBE activity, *AGPase*, *SSII*, *SSIII*, *GBSSI*, *SBEI*, *SBEII* relative gene expression, total starch content, amylose content and ratio of amylose to amylopectin, respectively.

活性及其相关基因表达量均与淀粉累积无显著相关，说明马铃薯淀粉合成关键酶活性的改变并不会直接造成淀粉累积的变化，应有其他因素控制，其具体机制还需进一步深入研究。

4 结论

本研究初步表明，在块茎形成过程中，与地膜垄作相比，全膜双垄覆盖栽培模式可显著提高旱作马铃薯总淀粉及直链淀粉含量，有利于改良淀粉加工品质，但需要多年多点试验的进一步验证。本研究结果对筛选青海东部旱区马铃薯适宜的淀粉优质生产措施具有十分重要的意义。今后，应结合土壤理化及植株生理，如水分、温度、容重、叶片光合及衰老等，研究全膜双垄覆盖栽培下其与旱作马铃薯淀粉生物合成的关联。

参考文献：

[1] 杨永智，王舰.青海马铃薯发展[J].青海科技，2018(1)：32-34

[2] 纳添仓.青海高原马铃薯特色产业现状及发展措施[J].长江蔬菜(学术版)，2011(14)：57-60

[3] 尹鑫卫，王琦，李晓玲，吴雪.半干旱区垄沟集雨系统点尺度土壤水分动态随机模拟[J].生态学报，2019，39(1)：320-332

[4] Li C J, Wang C J, Wen X X, Qin X L, Liu Y, Han J, Li Y J, Liao Y C, Wu W. Ridge-furrow with plastic film mulching practice improves maize productivity and resource use efficiency under the wheat-maize double-cropping system in dry semi-humid areas[J]. Field Crops Research, 2017, 203: 201-211

[5] 于显枫，张绪成，王红丽，马一凡，侯慧芝，方彦杰. 施肥对旱地全膜覆盖垄沟种植马铃薯耗水特征及产量的影响[J]. 应用生态学报，2016，27(3)：883-890

[6] 张绪成，于显枫，王红丽，侯慧芝，方彦杰，马一凡. 半干旱区减氮增钾、有机肥替代对全膜覆盖垄沟种植马铃薯水肥利用和生物量积累的调控[J]. 中国农业科学，2016，49(5)：852-864

[7] 胡广荣，王琦，宋兴阳，李富春，张登奎，张恩和，刘春林，王鹤龄. 沟覆盖材料对垄沟集雨种植土壤温度、作物产量和水分利用效率的影响[J]. 中国生态农业学报，2016，24(5)：590-599

[8] 曹莉，秦舒浩，张俊莲，王蒂，王春林，李德明. 垄沟覆膜栽培方式对马铃薯土壤酶活性及土壤微生物数量的影响[J]. 甘肃农业大学学报，2012，47(3)：42-46

[9] Kołodziejczyk M. The effect of living mulches and conventional methods of weed control on weed infestation and potato yield[J]. Scientia Horticulturae, 2015, 191: 127-133

[10] 孙智广，苏建举，海江波. 不同免耕覆草栽培模式对马铃薯农艺性状和产量的影响[J]. 西北农业学报，2015，24(5)：69-74

[11] Li Q, Li H B, Zhang L, Zhang S Q, Chen Y L. Mulching improves yield and water-use efficiency of potato cropping in China: A meta-analysis[J]. Field Crops Research, 2018, 221: 50-60

[12] Qin S, Yeboah S, Wang D, Zhang J. Effects of ridge-furrow and plastic mulching planting patterns on microflora and potato tuber yieldin continuous cropping soil[J]. Soil Use and Management, 2016, 32: 465-473

[13] 秦舒浩，张俊莲，王蒂，蒲育林，杜全中. 覆膜与沟垄种植模式对旱作马铃薯产量形成及水分运移的影响[J].应用生态学报，

2011, 22(2): 389-394

[14] 吕文河, 霍丹丹, 李勇, 吕典秋, 白雅梅, 宿飞飞. 马铃薯块茎不同部位淀粉含量及淀粉合成关键酶活性差异比较[J].东北农业大学学报, 2017, 48(6): 1-8

[15] 杨华, 郑顺林, 李佩华, 程红, 刘帆, 袁继超.氮营养水平对秋马铃薯块茎发育中淀粉合成关键酶的影响[J].四川农业大学学报, 2013, 31(1): 9-14

[16] Ferreira S J, Senning M, Fischer-Stettler M, Streb S, Ast M, Neuhaus H E, Zeeman S C, Sonnewald S, Sonnewald U. Simultaneous silencing of isoamylases ISA1, ISA2 and ISA3 by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181444

[17] Shafi A, Pal A K, Sharma V, Kalia S, Kumar S, Ahuja P S, Singh A K. Transgenic potato plants overexpressing SOD and APX exhibit enhanced lignification and starch biosynthesis with improved salt stress tolerance[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2017, 35(5): 504-518

[18] 杨涛, 张宁, 栗亮, 刘海英, 司怀军, 王蒂. 马铃薯可溶性淀粉合成酶 *SSIII* 基因克隆及生物信息学分析[J].分子植物育种, 2009, 7(3): 545-549

[19] Yoo S H, Lee B H, Li L, Perris S D, Spalding M H, Han S Y, Jane J L. Biocatalytic role of potato starch synthaseIII for α-glucan biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 mutants[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 710-717

[20] Nakamura Y, Yuki K, Park S, Ohya T. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains[J]. Plant and Cell Physiology, 1989, 30(6): 833-839

[21] 李太贵, 沈波, 陈能, 罗玉坤. Q 酶在水稻籽粒垩白形成中作用的研究[J]. 作物学报, 1997, 23(3): 338-344

[22] 程方民, 蒋德安, 吴平, 石春海. 早籼稻籽粒灌浆过程中淀粉合成酶的变化及温度效应特征[J]. 作物学报, 2001, 27(2): 201-206

[23] Huang X F, Nazarian-Firouzabadi F, Vincken J P, Ji Q, Visser R G F, Trindade L M. Expression of an amylosucrase gene in potato results in larger starch granules with novel properties[J]. Planta, 2014, 240(2): 409-421

[24] Pfaffl M W. A new mathematicalmodel for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45

[25] 张永成, 田丰. 马铃薯试验研究方法[M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2007, 168

[26] 唐宏亮, 石瑛, 田洵, 王金明.马铃薯淀粉合成关键酶与块茎淀粉积累的关系[J].中国农学通报, 2015, 31(27): 88-93

[27] Hovenkamp-Hermelink J H M, De Vries J N, Adamse P, Jacobsen E, Witholt B, Feenstra W J. Rapid estimation ofthe amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato[J].Potato Research, 1988, 31(2): 241-246

[28] 王彩绒, 田霄鸿, 李生秀.沟垄覆膜集雨栽培对冬小麦水分利用效率及产量的影响[J].中国农业科学, 2004, 37(2): 208-214

[29] Zhang S L, Li P R, Yang X Y, Wang Z H, Chen X P. Effects of tillage and plastic mulch on soil water, growth and yield of spring-sown maize[J]. Soil Tillage Research, 2011, 112: 92-97

[30] Wang X L, Li F M, Jia Y, Shi W Q. Increasing potato yields with additional water and increased soil temperature[J]. Agricultural Water Management, 2005, 78: 181-194

[31] 丁瑞霞, 贾志宽, 韩清芳, 任广鑫, 王俊鹏.宁南旱区微集水种植条件下谷子边际效应和生理特性的响应[J]. 中国农业科学, 2006, 39(3): 494-501

[32] 苏旺, 屈洋, 冯佰利, 柴岩.沟垄覆膜集水模式提高糜子光合作用和产量[J]. 农业工程学报, 2014, 30(13): 137-145

[33] 强生才, 张恒嘉, 莫非, 赵鸿, 周宏, 熊友才.微集雨模式与降雨变律对燕麦大田水生态过程的影响[J].生态学报, 2011,31(9): 2365-2373

[34] 霍海丽, 王琦, 张恩和, 师尚礼, 任祥, 王鹤龄, 王田涛, 刘青林. 不同集雨种植方式对干旱区紫花苜蓿种植的影响[J].应用生态学报, 2013, 24(10): 2770-2778

[35] Ren X, Chen X, Jia Z. Ridge and furrow method of rainfall concentration for fertilizer use efficiency in farmland under semiarid conditions[J].Applied Engineering in Agriculture, 2009, 25(6): 905-913

[36] 李玉玲, 张鹏, 张艳, 贾倩民, 刘东华, 董昭芸, 贾志宽, 韩清芳, 任小龙. 旱区集雨种植方式对土壤水分、温度的时空变化及春玉米产量的影响[J].中国农业科学, 2016, 49(6): 1084-1096

[37] 张玉, 韩清芳, 成雪峰, 杨姗姗, 贾志宽, 丁瑞霞, 任小龙, 聂俊峰.关中灌区沟垄集雨种植补灌对冬小麦光合特征、产量及水分利用效率的影响[J].应用生态学报, 2015, 26(5): 1382-1390

[38] Lloyd J R, Landschutze V, Kossmann J. Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin[J]. Biochemical Joural, 1999, 338(2): 515-521

[39] Edwards A, Fulton D C, Hylton C M, Jobling S A, Gidley M, Rossner U, Martin C, Smith A M. A combined reduction in activity of starch synthaseII and Ⅲ of potato has novel effects on the starch of tubers[J]. The Plant Journal, 1999, 17(3): 251-261

[40] Smith S M, Fulton D C, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman S C, Smith A M. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in Arabidopsis leaves[J]. Plant Physiology, 2004, 136(1): 2687-2699

[41] 陈江, 王燕, 黄斌全, 胡玉峰, 刘应红, 顾勇, 李炀平, 张军杰, 刘汉梅, 黄玉碧.不同类型玉米籽粒淀粉积累、相关酶活及基因表达差异分析[J]. 核农学报, 2012, 26(2): 217-230

[42] 谭彩霞, 郭静, 陈静, 封超年, 郭文善, 朱新开, 李春燕, 彭永欣. 小麦籽粒淀粉合成酶基因表达与酶活性特征的研究[J].麦类作物学报, 2009, 29(1): 24-30

[43] 甘晓燕, 巩檑, 张丽, 石磊, 陈虞超, 聂峰杰, 宋玉霞. 马铃薯块茎淀粉积累及相关酶活性的研究[J].分子植物育种, 2017, 15(11): 4625-4628

[44] Sweetlove L J, Muller-Rober B, Willmitzer L, Hill S A. The contribution of adenosine 5′-diphosphoglucose pyrophosphorylase to thecontrol of starch synthesis in potato tubers[J]. Planta, 1999, 209(3): 330-337

Journal of Nuclear Agricultural Sciences
2021,35(3):0737~0744

Effects of Mulching on Ridge-Furrow for Harvesting Rainwater on Activity and Gene Expression of Starch Synthesis Key Enzyme and Starch Accumulation of Rain-Fed Potato Tuber

SU Wang[1] HU Luhua[2] WANG Jian[1,*]

([1] *Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University/Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences/State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University/Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Biotechnology of Ministry of Education, Qinghai University/Key Laboratory of Potato Breeding of Qinghai, Xining, Qinghai* 810016; [2] *College of Ecological and Environmental Engineering, Qinghai University, Xining, Qinghai* 810016)

Abstract: To investigate effect of mulching on ridge-furrow for harvesting rainwater on the activity and gene expression of starch synthesis key enzyme and starch accumulation of rain-fed potato tuber during tuber formation, using Qingshu 9 as experimental material, the cultivated patterns included whole plastic mulching on double ridges and single ridge mulching with plastic film, the bare land flat sowing was set as control. The activity and gene expression of key enzymes in starch synthesis and starch accumulation indexes were determined by Ultraviolet-Visible Spectrophotometer and Fluorescence Quantitative PCR. The results showed that, compared with the control, under the whole plastic mulching on double ridges and single ridge mulching with plastic film, the soluble starch synthase (SSS) activity was increased significantly by 77.70% and 22.63%, respectively, and *SSIII* gene expression was increased significantly by 32.26% and 119.35%, respectively. Meantime, the activity of ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPP), granule-bound starch synthase (GBSS) and ADP-glucose pyrophosphorylase *AGPase*, soluble starch synthase *SSII*, granule-bound starch synthase *GBSSI*, starch branching enzyme *SBEI*, and starch branching enzyme *SBEII* gene expression levels showed significant decrease, but the activity of starch branching enzyme (SBE) was not affected during the whole process of potato tuber formation. Compared with the control, the total starch content, amylase content and ratio of amylose to amylopectin were increased significantly by 5.04%, 17.57% and 27.81% under the whole plastic mulching on double ridges, respectively, while the starch accumulation index was decreased significantly by single ridge mulching with plastic film. SSS enzyme activity showed a significant negative correlation with *GBSSI* gene expression, and a significant positive correlation with amylase content and amylose to amylopectin ratio. The other key enzyme activity showed no significant correlation with the key enzyme gene expression and the starch accumulation index. The results are of great significance for selecting production measures of potato with high quality starch in the eastern arid area of Qinghai province.

Keywords: mulching on ridge-furrow for harvesting rainwater, rain-fed potato, starch synthesis key enzyme activity, starch synthesis key enzyme gene expression, starch accumulation