

## 木薯淀粉分支酶基因 *MeSBE2.2* 的克隆和表达分析

裴金利<sup>1</sup> 陈新<sup>2</sup> 夏志强<sup>2</sup> 刘陈<sup>2</sup> 马平安<sup>2</sup> 张圣奎<sup>2</sup> 王文泉<sup>2\*</sup>

(1. 海南大学 农学院,海口 570228;

2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所,海口 571101)

**摘要** 为了明确淀粉分支酶(SBE)在木薯淀粉合成中的功能,利用 RT-PCR 方法克隆得到了 *MeSBE2.2* 序列,并通过实时定量 PCR(Q-PCR)分析其转录特点。结果表明,*MeSBE2.2* 全长 2 053 bp,编码 616 个氨基酸,其编码蛋白质序列与蓖麻 SBEII 氨基酸序列的同源性最高,为 91%。研究其转录特点发现:*MeSBE2.2* 在块根和叶片中的表达模式有品种间差异性;器官特异性表达分析结果表明,*MeSBE2.2* 主要在木薯块根中柱中表达;于 3 个不同生长时期的表达分析发现,*MeSBE2.2* 在块根中表达平稳,在叶片中其表达量随植株生长呈显著下降趋势。本研究结果为进一步研究 SBE 家族在木薯块根淀粉合成中的功能提供了重要依据。

**关键词** 木薯(*Manihot esculenta* Crantz);淀粉分支酶;克隆;表达分析

中图分类号 S 533

文章编号 1007-4333(2015)04-0036-06

文献标志码 A

## Cloning and expression analysis of starch branching enzyme gene (*MeSBE2.2*) in cassava

PEI Jin-li<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, XIA Zhi-qiang<sup>2</sup>, LIU Chen<sup>2</sup>, MA Pin-an<sup>2</sup>,

ZHANG Sheng-kui<sup>2</sup>, WANG Wen-quan<sup>2\*</sup>

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract** To investigate the function of starch branching enzyme (SBE) in starch biosynthesis in cassava, one gene encoding starch branching enzyme, named *MeSBE2.2* was cloned by RT-PCR and its expression patterns were studied by real-time quantitative PCR (Q-PCR). The results showed that the 2 053 bp full-length sequence encoded 616 amino acids and the deduced protein sequence shared the highest similarity of 91% with *Ricinus communis* SBEII protein sequence. Expression analysis results showed that *MeSBE2.2* was differentially expressed in roots and leaves in various cultivars. Organ-specific expression analysis revealed that *MeSBE2.2* was mainly expressed in stele. The expression level of *MeSBE2.2* in roots at three different growth stages remained stable while it was significantly decreased in leaves as the plant aged. This study paves a way for further understanding the function of SBE gene family in starch metabolism in cassava.

**Key words** cassava (*Manihot esculenta* Crantz); starch branching enzyme; gene cloning; expression analysis

木薯广泛种植于热带以及非洲和亚洲的亚热带地区,具有重要的食用和工业价值<sup>[1]</sup>。木薯作为一种高光效、高淀粉含量和高水分利用率的热带作物,其淀粉合成机制目前尚不明确。在高等植物

中,淀粉是储藏碳水化合物主要形式,由直链淀粉(20%~30%)和支链淀粉(70%~80%)2种葡萄糖多聚体组成<sup>[2]</sup>。直链淀粉主要由颗粒结合的淀粉合成酶(GBSS)催化合成<sup>[3]</sup>,而支链淀粉的合成在可

收稿日期:2015-03-14

基金项目:国家“973计划”项目(2010CB126601);国家木薯产业技术体系项目(CARS-12);国家国际科技合作计划项目(2011DFB31690)

第一作者:裴金利,硕士研究生,E-mail:peijinli609@163.com

通讯作者:王文泉,研究员,主要从事木薯作物遗传育种研究,E-mail:wangwenquan@itbb.org.cn

溶性淀粉合成酶(SS)、SBE和淀粉去分支酶(DBE)协同作用下完成<sup>[4]</sup>。SBE首次发现于马铃薯中<sup>[5]</sup>,其多种同工酶已经从拟南芥<sup>[6]</sup>、马铃薯<sup>[7]</sup>、大麦<sup>[8]</sup>、小麦<sup>[9]</sup>以及豌豆<sup>[10]</sup>等物种中得到克隆鉴定。高等植物中的SBE根据系统进化关系可以分为SBEI和SBEII两种类型,而谷类作物中SBEII又可以进一步分为SBEIIa和SBEIIb。SBEI和SBEII两种类型不仅结构上有差异,其作用于催化底物时也具有特异性。其中SBEI倾向于以直链淀粉作为底物,主要催化转移相对较长的多糖链;而SBEII倾向于以支链淀粉为底物,催化转移较短的多糖链<sup>[11]</sup>。

SBEI和SBEII在马铃薯<sup>[7]</sup>、小麦<sup>[9]</sup>、玉米<sup>[12]</sup>、高粱和大麦<sup>[13]</sup>以及甘薯<sup>[14]</sup>中的表达有组织特异性和时空特异性,揭示不同的SBE同工酶在其表达器官的淀粉合成中发挥不同的作用。SBE的缺失导致显著的表型改变,如豌豆<sup>[15]</sup>、玉米<sup>[16-17]</sup>、小麦<sup>[18]</sup>和马铃薯<sup>[19]</sup>的SBEII缺失突变体植株表现为极高直链淀粉含量且淀粉颗粒的形态和组成均有改变。玉米中SBEI的缺失对于淀粉的合成以及组成没有显著影响<sup>[20]</sup>。

为进一步明确SBE在木薯淀粉合成中的作用,本研究拟对木薯*MeSBE*家族进行系统进化关系分析,克隆*MeSBE2.2*基因全长cDNA序列,并对其进行组织表达分析和时空表达分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

本研究内容分为2个部分:1)不同木薯品种相关淀粉酶基因的表达差异分析;使用品种为KU50、R3、FB-4、FB-1和SC8,其平均淀粉含量分别为30.2%,27.3%,27.9%,23.1%和24.2%(平均淀粉率为本实验室在海南省儋州和澄迈,广西省武鸣和合浦4个基地的未发表数据),于种植后150 d取块根和功能叶片进行分析。其中R3、FB-4、FB-1为国外引进品种,而KU50和SC8为改良栽培种。2)相关淀粉酶基因的时空表达模式分析:以高产、高淀粉的木薯品种KU50为材料,分别取种植后90、150和240 d的块根和功能叶片进行不同种植时间的差异表达分析;于种植后240 d,取木薯幼叶、功能叶片、叶柄、茎外皮、花、须根、块根皮层和块根中柱进行组织差异表达分析。取样时选取3株长势相近的木薯并在相同部位混合取样后放入液氮罐中速冻,放入-80℃保存待用或者马上在液氮中研磨并

进行总RNA提取。

### 1.2 植物总RNA提取及单链cDNA的合成

使用RNAlant Plus植物总RNA提取试剂(Tiagen,北京)进行总RNA的提取。RNA的质量通过凝胶电泳和紫外分光光度检测分析。使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒(TakaRa,大连)进行单链cDNA的合成。反转录产物保存于-20℃待用。

### 1.3 木薯SBE基因家族成员的确定及系统进化关系分析

根据已经发表的拟南芥SBE序列搜索木薯基因组数据库(<http://www.phytozome.net/cassava>),并通过HMM模型进行序列比对,得到了6个SBE基因亚型。其他物种的SBE氨基酸序列信息通过NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)下载,经CLUSTAL W进行序列比对后,使用MEGA5.0构建SBE系统进化树。各个物种的SBE命名以及登陆序列号详见附表1。进化树的构建使用NJ(Neighbor-Joining)法,并经由1 000次Bootstrap统计检测。

### 1.4 *MeSBE2.2*表达模式分析以及引物设计

通过实时定量PCR(Q-PCR)对*MeSBE2.2*的表达模式进行分析。定量引物由PRIMER BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计并提前检测排除非特异性扩增。引物序列信息为*MeSBE2.2*上游引物(5'GATTTGCTGCTCAGGACACAG 3')和*MeSBE2.2*下游引物(5'TCCATAATAACGTGACTTGCCAAAG 3')。使用木薯β-actin基因作为内参基因,其定量引物序列为actin上游引物(5'CAAGGGCAA-CATATGCAAGC 3')和actin下游引物(5'CCTTCGTCTGGACCTTGCTG 3')。使用Rotor-gene 6000(Rcorbett, Australia)进行Q-PCR,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行数据分析<sup>[21]</sup>。Q-PCR程序如下:95℃预变性90 s,95℃变性10 s,59.5℃退火15 s,延伸20 s,循环40次。

### 1.5 *MeSBE2.2*基因的分子克隆

根据木薯基因组数据库提供的序列信息由PRIMER BLAST设计特异性扩增引物。扩增引物为*MeSBE2.2* F(5'GCTACGTGGGCTGCACTTAT 3')和*MeSBE2.2* R(5'TGGCGTGTA-TCTCTGCCTTG 3');使用PrimerSTAR HS DNA

Polymerase,以 KU50 块根 cDNA 为模板进行基因扩增。扩增程序如下:98 °C 预变性 2 min,98 °C 变性 10 s,59.5 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min 30s,34 个循环后 72 °C 延伸 5 min。使用 DNAMAN 软件进行序列同源度比对,使用 [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/) 对蛋白质分子量和等电点在线预测,通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd> 进行蛋白质保守功能结构域分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 木薯 SBE 基因家族成员的确定

分别以 3 个拟南芥 SBE 的核苷酸序列为模板 BLAST 比对搜索木薯基因组数据库 ([http://](http://www.phytozome.net/cassava)

[www.phytozome.net/cassava](http://www.phytozome.net/cassava)), 获得了 6 个 SBE 基因家族成员。分别命名为 *MeSBE1*, *MeSBE2.1*, *MeSBE2.2*, *MeSBE3*, *MeSBE4*, *MeSBE5*。木薯 SBE 命名及其基本信息如表 1 所示。木薯 6 个 SBE 基因长度介于 3 128 至 19 327 bp 之间;开放阅读框(ORF)的长度分布在 1 488 到 2 652bp 之间;氨基酸长度最短为 495 个氨基酸,最长为 883 个氨基酸;蛋白质相对分子质量在 57.2 到 99.1 ku 之间,等电点则处于 5.34 到 6.43 之间([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))。木薯 SBE 之间的序列同源性结果显示 *MeSBE2.1*, *MeSBE2.2* 基因的氨基酸序列同源度高达 91%,而 *MeSBE4*, *MeSBE5* 基因与其他亚型的同源性较低。

表 1 木薯 SBE 基因家族成员信息

Table 1 Information of SBE gene family in cassava

基因名称 Gene	基因组数据库名 Phytozome locus name	基因 长度 (L)	ORF 长度 (L)	氨基酸 长度 (AA)	蛋白相 对分子 质量/ku	等电点 (PI)	氨基酸序列同源度/% Homology				
							Me- SBE2.1	Me- SBE2.2	Me- SBE3	Me- SBE4	Me- SBE5
<i>MeSBE1</i>	cassava4.1_006240m.g	3 128	1 488	495	57.2	6.43	43	44	31	10	9
<i>MeSBE2.1</i>	cassava4.1_001686m.g	19 327	2 514	837	96.0	5.57	—	91	58	12	11
<i>MeSBE2.2</i>	cassava4.1_003773m.g	18 129	1 851	616	71.2	5.67	—	—	61	14	9
<i>MeSBE3</i>	cassava4.1_001595m.g	7 454	2 559	852	96.7	5.34	—	—	—	16	9
<i>MeSBE4</i>	cassava4.1_001932m.g	14 687	2 385	794	90.3	5.70	—	—	—	—	29
<i>MeSBE5</i>	cassava4.1_001414m.g	3 328	2 652	883	99.1	5.73	—	—	—	—	—

### 2.2 木薯 SBE 基因家族系统进化关系分析

以木薯 SBE 核酸序列以及水稻、玉米和拟南芥等物种的 SBE 核酸序列构建同源进化树。SBE 可以分为两大类, SBEI 和 SBEII; SBEI 可以进一步分为双子叶 SBEI 亚家族, 单子叶 SBEI 亚家族和 NG 亚家族; SBEII 则进一步划分为双子叶 SBEII 亚家族和单子叶 SBEII 亚家族。 *MeSBE1* 与蓖麻葡萄糖分支酶 GBE、甜橙 GBE 以及葡萄 GBE 同源性高, 和 *MeSBE4*、 *MeSBE5* 同属于 NG 亚家族; *MeSBE2.1* 和 *MeSBE2.2* 与蓖麻 SBEII、毛果杨 SBEII 以及胡杨 GBE 2-2 同源关系较近属于双子叶 SBEII 亚家族; *MeSBE3* 与毛果杨 SBEI、胡杨 GBE 等同源性高, 同属于双子叶 SBEI 亚家族(图 1)。

### 2.3 *MeSBE2.2* 编码序列的分子克隆

根据木薯基因组数据库提供的序列信息 (cassava4.1\_003773m.g), 设计特异引物进行 RT-

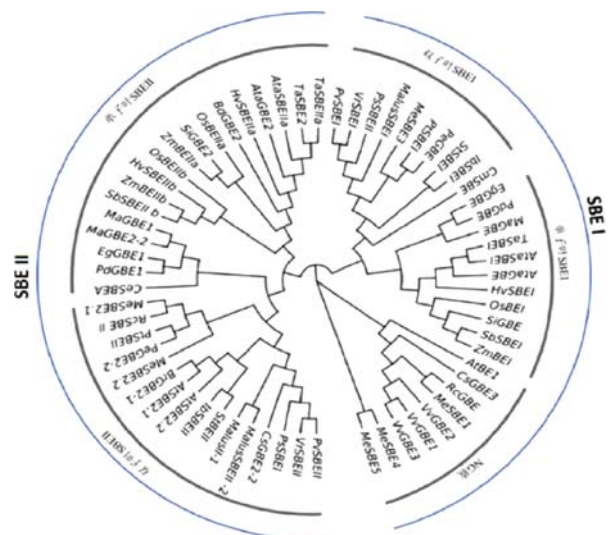


图 1 淀粉分支酶家族进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of starch branching enzyme

PCR 扩增。扩增条带测序后得到了一个长为 2 053 bp 的 *MeSBE2.2* 序列,其中包括 57 bp 的 5'UTR, 1 851 bp 的开放阅读框和 145 bp 的 3'UTR。该序列编码 616 个氨基酸,与已经发布的木薯 AM560 中 *SBE2.2* 的序列大小相一致。

### 2.4 *MeSBE2.2* 蛋白质序列分析

*MeSBE2.2* 蛋白质分子质量为 71.25 ku, 预测等电点为 5.58([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))。DNAMAN 序列比对结果显示 *MeSBE2.2* 与拟南芥 *SBE2.2*、马铃薯 *BEII* 和豌豆 *SBEI* 的氨基

酸序列同源性分别为 81.25%、79.52%、82.40%；与蓖麻 *SBEII*、可可 *SBE2.2* (XM\_007027587.1)、葡萄 *GBE2* 以及甘薯 *SBEII* 和玉米 *SBEIIb* 的同源性分别为 91%、86%、86%、81% 和 79% (图 2)。利用 STRUCTURE 在线软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 对 *MeSBE2.2* 进行蛋白质功能结构域分析表明, *MeSBE2.2* 含有 *SBE* 结构特征, 包含 *AmyAc\_bac\_euk\_BE*、*E\_set\_GBE\_euk\_N*、*Alpha-amylase* 等保守结构域 (图 3)。

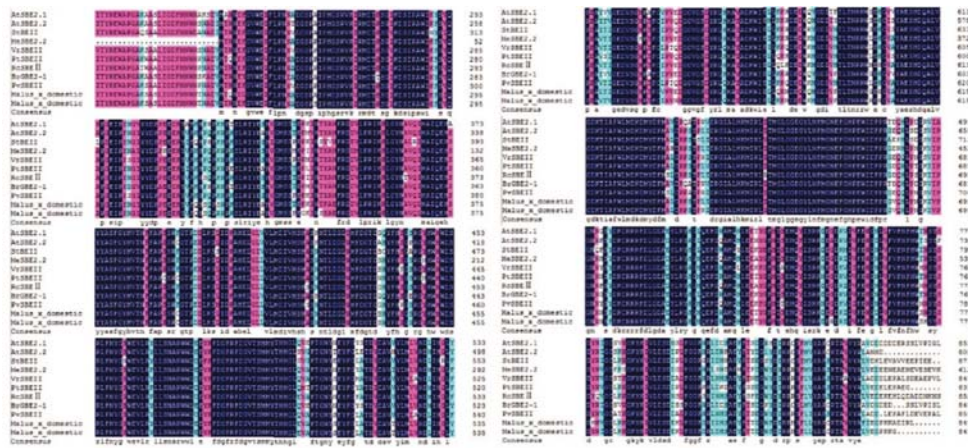


图 2 淀粉分支酶氨基酸序列多重比对 (DNAMAN)

Fig. 2 Multi-alignment of starch branching enzyme using DNAMAN

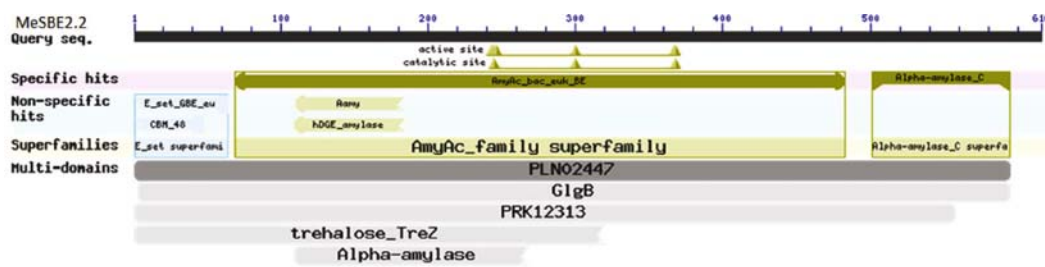


图 3 *MeSBE2.2* 蛋白保守结构域分析

Fig. 3 Conserved motifs analysis of *MeSBE2.2* protein

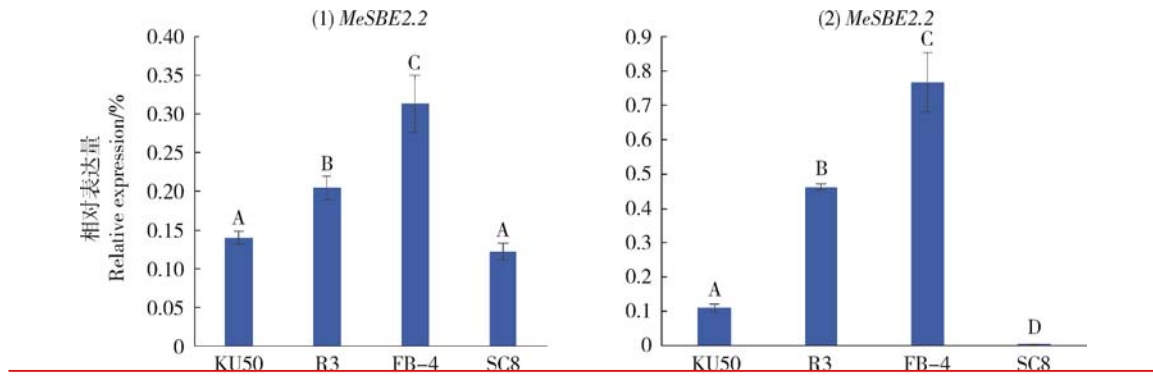
### 2.5 *MeSBE2.2* 在不同木薯品种中的表达分析

为了了解 *MeSBE2.2* 与淀粉累积的关系,利用 Q-PCR 技术对 *MeSBE2.2* 在 5 个木薯品种块根和叶片中的表达水平进行分析。结果显示 *MeSBE2.2* 在块根中, R3 和 FB-4 的表达水平显著高于其在 FB-1 中的表达 (图 4(1)); 在叶片中, KU50、R3 和 FB-4 中的表达水平都显著高于其在 FB-1 和 SC8 中的表达 (图 4(2))。

### 2.6 *MeSBE2.2* 组织特异性表达分析

为了研究 *MeSBE2.2* 在木薯不同组织器官中的作用,利用实时定量 PCR (Q-PCR) 技术分析其在幼叶、功能叶、叶柄、茎、块根皮层、块根中柱和须根中的表达模式。Q-PCR 结果显示 *MeSBE2.2* 表达量介于内参基因表达量 5%~30%, 并在各组织中均有表达; 其中 *MeSBE2.2* 在叶柄、茎和块根中柱的表达量较高, 在幼叶中的表达量最低 (图 5)。





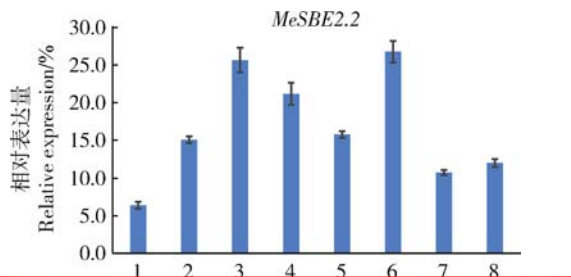
(1) *MeSBE2.2* 在不同品种块根中的表达分析; (2) *MeSBE2.2* 在不同品种叶片中的表达分析。

(1) Expression analysis of *MeSBE2.2* in the storage roots of high/low starch cultivars;

(2) Expression analysis of *MeSBE2.2* in leaves of high/low starch cultivars.

图4 *MeSBE2.2* 在木薯中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *MeSBE2.2* in cassava



1. 幼叶; 2. 成熟叶; 3. 叶柄; 4. 茎; 5. 块根皮层; 6. 块根中柱; 7. 须根; 8. 花。

1. Immature leaves; 2. Maturing leaves; 3. Petiole;

4. Stem; 5. Root stele; 6. Root cortex; 7. Fibres; 8. Flowers.

图5 *MeSBE2.2* 组织特异性表达分析

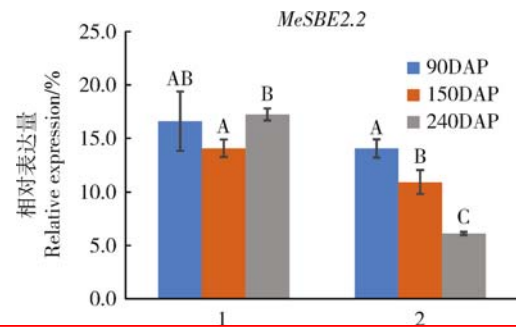
Fig. 5 Tissue-special expression analysis of *MeSBE2.2*

## 2.7 *MeSBE2.2* 在块根和叶片生长过程中的表达模式分析

为了揭示 *MeSBE2.2* 在木薯生长过程中的作用,利用实时定量 PCR(Q-PCR)方法分析其在不同生长时期的块根和叶片中的表达模式。Q-PCR 分析 *MeSBE2.2* 在植后(DAP) 90、150 及 240 d 3 个生长时期的块根和叶片中的表达情况,结果显示 *MeSBE2.2* 在不同生长时期的块根中表达较为平稳,在 3 个生长时期中以成熟期块根中表达量较高; *MeSBE2.2* 在不同生长时期的叶片中有明显的波动,其中块根形成期时表达量最高,成熟期最低(图 6);说明 *MeSBE2.2* 参与了木薯源器官(叶片)和库器官(块根)的生长代谢过程。

## 3 讨论

木薯 SBE 基因家族系统进化关系分析可将



1. 块根; 2. 叶片。1. Roots; 2. Leaves.

图6 *MeSBE2.2* 时空表达模式分析

Fig. 6 Spatial expression analysis of *MeSBE2.2*

SBE 家族分为两类,即 SBEI 和 SBEII。 *MeSBE2.1* 和 *MeSBE2.2* 与蓖麻 SBEII 等有很高的序列同源性,属于双子叶 SBEII 族; *MeSBE3* 与毛果杨 SBEI 等亲缘关系较近属于双子叶 SBEI 族。 *MeSBE4* 和 *MeSBE5* 与其他物种亲缘关系较远,属于 NG(new group)族。且木薯 SBE 家族成员内部序列比对结果显示 *MeSBE4* 和 *MeSBE5* 与其他亚型的氨基酸序列同源度很低(9%~29%)。但是蛋白质保守功能结构域分析显示 *MeSBE4* 和 *MeSBE5* 含有 SBE 特征结构。推测 *MeSBE4* 和 *MeSBE5* 可能是木薯特有的 SBE 亚型。

*MeSBE2.2* 在不同品种的块根和叶片中表达模式具有明显的品种差异性; *MeSBE2.2* 在 KU50 中的表达有一定的组织特异性,其中在块根中柱的表达量最高,而在幼叶中表达量最低; *MeSBE2.2* 在块根开始膨大期、快速膨大期和成熟期有较平稳的表达,且在成熟期的表达量略高,这些结果与此前

研究报告 SBE 在木薯块根生长时期的表达模式一致<sup>[22]</sup>。MeSBE2.2 在不同生长时期的叶片中则出现显著的波动,以块根开始膨大期的表达量最高,随植物的生长其表达量显著下降,并在成熟期达到最低;这一结果说明,MeSBE2.2 的表达具有时空特异性,在木薯块根和成熟叶片中发挥功能。

高等植物中 SBE 突变可以改变直链淀粉和支链淀粉的结构<sup>[23-25]</sup>。如在玉米、马铃薯等作物中 SBE 的缺失会导致支链淀粉合成受阻,直链淀粉含量显著增高<sup>[16-17]</sup>。因此明确淀粉分支酶在木薯淀粉合成中的功能,为从分子水平改良木薯淀粉性质提供可能途径,对于生产变性淀粉具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Jansson C, Westerbergh A, Zhang J, et al. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China[J]. Applied Energy, 2009, 86: S95-S99
- [2] French D: Chapter VII-Organization of Starch Granules. In: Starch: Chemistry and Technology [M]. 2 ed, Edited by Paschall RLWNB. San Diego: Academic Press, 1984: 183-247
- [3] Ball S, Guan H-P, James M, et al. From glycogen to amylopectin a model for the biogenesis of plant starch granule[J]. Cell, 1996, 86(3): 349-352
- [4] Smith A M, Denyer K, Martin C. The synthesis of the starch granule[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1997, 48(1): 67-87
- [5] Haworth W N, Peat S, Bourne E J. Synthesis of amylopectin [J]. Nature, 1944, 154: 236-238
- [6] Fisher D K, Gao M, Kim K N, et al. Two closely related cDNAs encoding starch branching enzyme from Arabidopsis thaliana[J]. Plant Molecular Biology, 1996, 30(1): 97-108
- [7] Larsson C T, Khoshnoodi J, Ek B, et al. Molecular cloning and characterization of starch-branching enzyme II from potato[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(3): 505-511
- [8] Sun C, Sathish P, Ek B, et al. Demonstration of in vitro starch branching enzyme activity for a 51/50-kD polypeptide isolated from developing barley (*Hordeum vulgare*) caryopses [J]. Physiol Plant, 1996, 96: 473-483
- [9] Morell M K, Blennow A, Kosar-Hashemi B, et al. Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm[J]. Plant Physiology, 1997, 113(1): 201-208
- [10] Burton R A, Bewley J D, Smith A M, et al. Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development [J]. The Plant Journal for Cell and Molecular Biology, 1995, 7(1): 3-15
- [11] Guan H, Li P, Imparl-Radosevich J, et al. Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997, 342(1): 92-98
- [12] Gao M, Fisher D K, Kim K N, et al. Evolutionary conservation and expression patterns of maize starch branching enzyme I and IIb genes suggests isoform specialization [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 30(6): 1223-1232
- [13] Mutisya J, Sathish P, Sun C, et al. Starch branching enzymes in sorghum (*Sorghum bicolor*) and barley (*Hordeum vulgare*): comparative analyses of enzyme structure and gene expression [J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160(8): 921-930
- [14] Qin H, Zhou S, Zhang Y-z: Characterization and expression analysis of starch branching enzymes in sweet potato [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(9): 1530-1539
- [15] Bhattacharyya M K, Smith A M, Ellis T H, et al. The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme[J]. Cell, 1990, 60(1): 115-122
- [16] Boyer C D, Daniels R R, Shannon J C. Abnormal starch granule formation in *Zea mays* L. endosperms possessing the amylose-extender mutant[J]. Crop Sci, 1976, 16: 298-301
- [17] Yao Y, Thompson D B, Guiltinan M J. Maize starch-branching enzyme isoforms and amylopectin structure. In the absence of starch-branching enzyme IIb, the further absence of starch-branching enzyme Ia leads to increased branching [J]. Plant Physiology, 2004, 136(3): 3515-3523
- [18] Regina A, Bird A, Topping D, et al. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(10): 3546-3551
- [19] Schwall G P, Safford R, Westcott R J, et al. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(5): 551-554
- [20] Blauth S L, Kim K N, Klucinec J, et al. Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme I (sbe1) in *Zea mays* L. [J]. Plant Mol Biol, 2002, 48: 287-297
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. Methods (San Diego, Calif), 2001, 25(4): 402-408
- [22] 许娟, 罗兴录, 赵德征. 木薯淀粉合成相关酶基因的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报, 2012(11): 101-109
- [23] Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, et al. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm [J]. Plant Physiology, 2001, 127(2): 459-472
- [24] Satoh H, Nishi A, Yamashita K, et al. Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm [J]. Plant Physiology, 2003, 133(3): 1111-1121
- [25] Guan H, Kuriki T, Sivak M, et al. Maize branching enzyme catalyzes synthesis of glycogen-like polysaccharide in glgB-deficient *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(4): 964-967

责任编辑: 袁文业