

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202006030



姚绍嫦, 黄鼎, 谭勇, 等. 牛大力块根糖积累及其相关酶活性变化研究 [J]. 广西植物, 2021, 41(11): 1939–1948.

YAO SC, HUANG D, TAN Y, et al. Sugar accumulation and sucrose-metabolizing enzyme activities in tuberous roots of *Callerya speciosa* [J]. *Guihaia*, 2021, 41(11): 1939–1948.

牛大力块根糖积累及其相关酶活性变化研究

姚绍嫦^{1,2}, 黄 鼎^{1,2}, 谭 勇^{1,2}, 顾晋源¹, 李良波¹, 黄荣韶^{1*}

(1. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学 壮瑶药重点实验室, 南宁 530200)

摘 要: 为提高牛大力块根的产量与品质, 该研究以不同发育时期(移栽 6、12、18、24、30、36 个月)的牛大力块根为材料, 采用紫外分光光度法对糖类含量及其相关酶活性进行测定, 研究它们在牛大力块根发育过程中的动态变化规律。结果表明: (1) 牛大力块根的生长发育进程可初步划分为形成期(移栽 6~12 个月)、迅速膨大期(移栽 12~24 个月)与稳定膨大期(移栽 24~36 个月)三个阶段。淀粉与蔗糖分别是牛大力块根中主要的多糖与可溶性糖。在牛大力块根发育过程中, 多糖类物质的含量逐渐增加, 而可溶性糖含量逐渐减少, 两者之间呈显著负相关, 推测可溶性糖的分解代谢有利于促进多糖类物质的积累。(2) 蔗糖的分解代谢是蔗糖合酶(SUS)、蔗糖磷酸合酶(PS)、酸性转化酶(AI)与中性转化酶(NI)等多种相关酶协同作用的结果。SUS 在牛大力块根发育过程中发挥着既催化蔗糖合成, 又催化蔗糖分解的双重调节作用, SUS(合成)的活性不断上升, 至移栽 36 个月达到峰值, 极显著高于其他时期; SUS(分解)的活性从移栽 6 个月至 24 个月逐渐上升, 但在块根稳定膨大期稍有下降; 其净活性为催化蔗糖分解, 在移栽 12 个月达到最高。转化酶 AI 和 NI 的活性均在块根发育过程中逐渐上升, 且 AI 活性高于 NI 活性, 提示 AI 可能在蔗糖代谢分解过程中发挥更重要的作用。该研究结果可为今后深入研究牛大力多糖类成分积累和调控机制提供理论依据, 并为提高牛大力药材的产量与品质提供技术指导。

关键词: 牛大力, 块根发育, 糖积累, 蔗糖代谢, 酶活性**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2021)11-1939-10

Sugar accumulation and sucrose-metabolizing enzyme activities in tuberous roots of *Callerya speciosa*

YAO Shaochang^{1,2}, HUANG Ding^{1,2}, TAN Yong^{1,2}, GU Jinyuan¹,
LI Liangbo¹, HUANG Rongshao^{1*}

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Key Laboratory of Zhuang Yao Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract: In order to improve the yield and quality of *Callerya speciosa*, the dynamic variation rules of sugar accumulation and sucrose-metabolizing enzyme activities in tuberous roots at six different developmental stages (6, 12,

收稿日期: 2020-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(81760689, 82060685); 广西自然科学基金(2018GXNSFAA281287); 广西科技重大项目(桂科 AA17204056-3); 广西壮瑶药重点实验室项目(20-065-14); 2020 年广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (81760689, 82060685); Natural Science Foundation of Guangxi (2018GXNSFAA281287); Fund of Guangxi Innovation-Driven Development (AA17204056-3); Program of Key Laboratory of Zhuang Yao Medicine (20-065-14); Training Program for 1 000 Young and Middle-Aged Backbone Teachers of Guangxi Higher Education Institution in 2020].

作者简介: 姚绍嫦(1980-), 博士, 高级工程师, 主要从事药用植物繁育与栽培技术研究, (E-mail) yaoshaochang@163.com.

***通信作者:** 黄荣韶, 博士, 教授, 研究方向为药用植物繁育与栽培技术研究, (E-mail) hrshao802@163.com.

18, 24, 30, 36 months after transplanting) of *C. speciosa* were discussed using UV spectrophotometry methods. The results were as follows: (1) The root development can be preliminarily divided into three stages: the initial stage (from 6 to 12 months after transplanting), the rapid thickening stage (from 12 to 24 months after transplanting), and the stable thickening stage (from 24 to 36 months after transplanting). Starch and sugar were the main form of polysaccharides and soluble sugars in tuberous roots, respectively. The content of polysaccharides increased, whereas that of soluble sugars decreased during the tuberous root development. There was significantly negative correlation between polysaccharides and soluble sugars, suggesting that the decomposing of soluble sugars might facilitate to the accumulation of polysaccharides. (2) Several sucrose-metabolizing enzymes, such as sucrose synthase (SUS), sucrose phosphate synthase (SPS), acid invertase (AI) and neutral invertase (NI), played synergistic effects on metabolizing sucrose. SUS played a dual role in both synthesizing and decomposing of sucrose during the tuberous root development of *C. speciosa*. The activity of SUS (synthesizing) significantly increased along with root growth, peaked at 36 months after transplanting, whereas that of SUS (decomposing) increased from 6 months to 24 months after transplanting but decreased slightly at the stable thickening stage; the total activity of SUS played a role in the decomposing of sucrose and peaked at 12 months after transplanting. The activities of AI and NI increased consistently during the tuberous root development of *C. speciosa*. Moreover, the activity of AI was much higher than that of NI, indicating that AI might be more important in the decomposing of sucrose. These results provide a theoretical basis for the further study of regulation mechanism of polysaccharides accumulation, and provide technical guidance for the improvement of yield and quality in *C. speciosa* tuberous roots.

Key words: *Callerya speciosa*, tuberous root development, sugar accumulation, sucrose-metabolizing, enzyme activities

糖类物质的积累是药材产量与品质形成的关键因素,蔗糖代谢是各种蛋白质代谢、脂类代谢、初生与次生代谢等代谢活动的桥梁,在整个生物体的代谢过程中具有举足轻重的作用(郝建军等, 2013)。在植物体内,与蔗糖合成代谢相关的酶主要有蔗糖合酶(sucrose synthase, SUS)、蔗糖磷酸合酶(sucrose phosphate synthase, SPS)与蔗糖转化酶(invertase, INV),其中 SUS(合成)方向与 SPS 主要负责蔗糖的合成,而 SUS(分解)方向与 INV 则是蔗糖代谢的关键酶。蔗糖合酶能参加将蔗糖分解生成二磷酸尿苷(uridine diphosphate glucose, UDPG)-葡萄糖与果糖的可逆反应,可为多糖、细胞壁与淀粉合成提供前体与底物,从而调控蔗糖进入各种代谢途径(Stein & Granot, 2019)。蔗糖转化酶也能将蔗糖分解为果糖和葡萄糖,根据转化酶反应所需的 pH 不同可分为酸性转化酶(acid invertase, AI)与中性转化酶(neutral invertase, NI)两种类型(于安民等, 2014)。

牛大力来源于豆科鸡血藤属美丽鸡血藤(*Callerya speciosa*),又名美丽崖豆藤、山莲藕(中国科学院中国植物志编辑委员会, 2010),是《广西中药材标准》(1990 年版)、《广西壮药质量标准》(第一卷)收录的广西道地药材与标志性壮药材,也是岭南地区著名的药食两用植物(姚绍嫦等,

2020)。牛大力根气味甘香、性温和,药性甘、平,归肺、肾经,具有补虚润肺、强筋活络之功效,可治疗腰肌劳损、风湿性关节炎、肺虚咳嗽等病症(韦玉燕等, 2010; 伍月榕等, 2020)。牛大力的主要成分是多糖及黄酮类化合物,其中多糖属于水溶性多糖,主要由鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖等组成,以葡萄糖与半乳糖为主(冯梦莹, 2015)。牛大力多糖是药材甘甜味的重要来源,被认为是牛大力药材品质的一个评价指标,具有降糖、抗炎、免疫调节、抗疲劳等作用,并且具有一定的抗氧化能力和清除自由基能力(郑元升等, 2008; 罗轩等, 2014; Huang et al., 2020)。

目前,在牛大力人工栽培中出现膨大根(块根)和不膨大根(纤维根)两种不同类型的根,研究发现膨大根的多糖含量约为不膨大根的 3 倍(朱德华等, 2018)。在牛大力块根膨大的过程中,牛大力多糖的含量会随着其生长年限的增加而升高(钟益宁等, 2020)。多糖的生物合成已被证明与蔗糖代谢酶活性存在密切的相关性。杨骏等(2020)通过对 F 型及 H 型铁皮石斛不同时期多糖含量与蔗糖代谢酶活性的测定,发现多糖的含量伴随着蔗糖转化酶活性的升高而积累,而蔗糖合酶与蔗糖转化酶的活性呈显著正相关。霍山石

斛多糖含量也被证明与蔗糖转化酶及蔗糖合酶活性相关(Wei et al., 2007; 王博等, 2009)。然而, 目前对于牛大力块根糖类物质积累与蔗糖代谢酶活性之间的相关性未见研究报道。因此, 本研究以道地产区的牛大力为材料, 分析牛大力块根发育过程中的淀粉、多糖、可溶性糖与蔗糖等含量的动态变化, 研究催化蔗糖合成、代谢的相关酶在块根糖类物质积累中发挥的作用, 并探讨它们的相关性, 研究结果可为今后深入研究牛大力多糖类成分积累调控机制提供理论依据, 并为提高牛大力药材的产量与品质提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

牛大力来源于广西药用植物园科研基地, 经广西中医药研究院方鼎研究员鉴定为豆科鸡血藤属美丽鸡血藤(*Callerya speciosa*)。将牛大力种子置于光照培养箱内于(26±2)℃条件下进行催芽, 待种子露白后将种子播种至温室大棚的沙床中育苗。待幼苗长至三片真叶时, 将幼苗移栽至种植盆中, 栽培管理条件一致。移栽后, 每隔半年取样1次, 从2017年6月15日至2019年12月15日, 共取样6次, 每次随机选取10株进行取样。取样时先将植株整株挖起, 清洗干净根系, 从中选择有代表性的根, 切取中部同一部位长度为10 cm作为样品, 从样品中切取长度为2 cm的根, 切成约0.5 cm×0.5 cm的小块, 将10株植株的样品充分混合后立即放入液氮中, 带回实验室, 放入-80℃超低温冰箱保存备用; 剩下的样品(8 cm)用于块根生长指标测定。

1.2 方法

1.2.1 牛大力的块根生长指标测定 利用排水法测量牛大力块根的体积。利用电子天平称量块根的鲜重, 之后将块根置于80℃恒温烘箱烘干至恒重后称量其干重, 计算折干率, 计算公式如下。

折干率(%) = 干重/鲜重×100。

1.2.2 可溶性糖含量测定方法 参考《植物生理学实验手册》的方法(上海植物生理学会, 1985), 稍有修改。采用蒽酮比色法测定, 称取烘干样品0.2 g, 加入80%乙醇7.0 mL匀浆, 转移至10.0 mL离心管中, 80℃水浴30 min, 4 000 r·min⁻¹离心10 min, 收集上清液。重复提取两次(每次10 min),

合并3次上清液至50.0 mL容量瓶, 用80%乙醇定容。取上清液1.0 mL于10.0 mL试管中, 依次加入蒸馏水1.5 mL与6.5 mL蒽酮试剂, 混匀后放置15 min, 在620 nm处测定吸光度。同时, 取20~100 μg葡萄糖用相同方法测定吸光度, 做成标准曲线。据此计算样品中的可溶性糖含量。计算公式如下。

可溶性糖含量(%) = $C \times (V/a) / (W \times 10^6) \times 100$ 。

式中: C 为根据标准曲线查到的葡萄糖量(μg); V 为样品提取液体积(mL); a 为显色时取样品体积(mL); W 为样品重量(g)。

1.2.3 淀粉含量测定方法 参考《植物生理学实验指导》的方法(高俊凤, 2006), 稍有修改。用蒸馏水将上述的可溶性糖含量测定提取的残渣转移至50.0 mL容量瓶中, 沸水浴15 min, 冷却后加入9.2 mol·L⁻¹高氯酸2.0 mL, 沸水浴15 min, 加蒸馏水4.0 mL, 4 000 r·min⁻¹离心10 min, 收集上清液。重复提取残渣两次(每次10 min), 合并3次上清液于50.0 mL容量瓶, 用蒸馏水定容。取上清液0.2 mL稀释10倍后, 加入蒽酮试剂5.0 mL, 沸水浴10 min, 冷却后在620 nm处测定吸光度, 计算淀粉含量。计算公式如下。

淀粉含量(%) = $C \times (V/a) \times 0.9 / (W \times 10^6) \times 100$ 。

式中: 0.9 为由葡萄糖换算为淀粉的系数; C 为根据标准曲线查到的葡萄糖量(μg); V 为样品提取液体积(mL); a 为显色时取样品体积(mL); W 为样品重量(g)。

1.2.4 蔗糖含量测定方法 参考《植物生理学实验手册》的方法(上海植物生理学会, 1985), 稍有修改。采用蒽酮比色法进行测定。称取0.2 g烘干样品, 研碎, 加入80%乙醇溶液6.0 mL, 转移到离心管中, 置于80℃水浴中30 min, 振荡3~5次, 冷却后, 4 000 r·min⁻¹离心10 min, 收集上清液。重复提取残渣两次(每次10 min), 合并3次上清液于50 mL容量瓶, 用80%乙醇定容。吸取1.0 mL提取液于试管中, 加入30% KOH溶液0.1 mL, 沸水浴10 min, 冷却至室温。加入蒽酮试剂5.0 mL, 混匀后40℃保温12 min, 于620 nm波长测定吸光度。同时, 取20~100 μg蔗糖于一系列试管中, 加入0.1 mL 30% KOH以相同方法显色, 做成标准曲线。据此计算样品中的蔗糖含量。

蔗糖含量(%) = $C \times (V/a) / (W \times 10^6) \times 100$ 。

式中: C 为根据标准曲线查到的蔗糖量(μg);

V 为样品提取液体积 (mL); a 为显色时取样品体积 (mL); W 为样品重量 (g)。

1.2.5 多糖含量测定方法 多糖提取与测定的方法参考朱德华等 (2018) 的方法, 使用苯酚-硫酸法检测牛大力多糖的含量。绘制葡萄糖标准曲线, 线性标准曲线的方程为 $y = 12.62x - 0.007$, $r^2 = 0.998$ ($n = 5$)。于 490 nm 测定样品的吸光度值, 利用标准曲线计算出牛大力多糖含量。

1.2.6 酶活性的测定方法 参照谢小波等 (2013) 的方法并进行改进, 将牛大力新鲜样品在液氮中研磨至粉末, 准确称取 0.3 g, 加提取缓冲液 1.5 mL, 涡旋混匀, 冰上放置 5 min, 于 4 ℃ 5 000 r · min⁻¹ 条件下离心 15 min, 取上清液, 即为粗酶液, 用于下一步的酶活性测定。参照于安民等 (2014) 的方法 (紫外分光光度法) 测定与计算 SUS、SPS、AI 和 NI 的酶活性。利用测定组和对照组吸光度的差值, 并结合不同浓度下葡萄糖吸光度标准曲线来计算分解方向的酶活性 (包括 AI、NI 和 SUS 分解方向) 的葡萄糖合成量。利用测定组和对照组吸光度的差值, 并结合不同浓度下蔗糖吸光度标准曲线来计算合成方向的酶活性 (包括 SPS 与 SUS 合成方向) 的蔗糖合成量。根据各自的葡萄糖合成量或蔗糖合成量来计算相应的酶活性, 酶活性单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ FW。

1.3 数据处理

采用 Excel 与 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 实验数据均进行正态检验和方差齐性检验, 并以平均值±标准差的方式表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), Duncan 法进行多重比较。分析结果用 GraphPad Prism 5 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 牛大力的块根生长发育进程

从图 1 可以看出, 移栽 6 个月的牛大力根部尚未出现明显的膨大现象, 而移栽 12 个月的牛大力已明显观察到根部的膨大。移栽 12 个月至 24 个月, 牛大力块根的膨大速率较快, 体积从 3.12 cm³ 增加到 33.52 cm³, 显著高于其他样品。移栽 24 个月至 36 个月, 牛大力块根膨大速率开始下降, 移栽 30 个月的块根体积与 36 个月的块根体积差异不显著。类似于体积, 块根的鲜重与干重在移栽 12 个月至 24 个月也呈显著增加的变化趋势。从

移栽 24 个月开始, 各样品的块根鲜重无显著差异, 但移栽 36 个月的块根干重显著高于其他样品, 且该时期块根的折干率较高 (40.70%) (表 1), 说明从移栽 24 个月开始, 块根的膨大速率减缓, 但积累的干物质增加。因此, 根据牛大力块根的生长发育进程, 我们可初步划分为形成期 (移栽 6~12 个月)、迅速膨大期 (移栽 12~24 个月) 与稳定膨大期 (移栽 24~36 个月) 三个阶段。

2.2 牛大力块根不同发育时期的多糖物质含量变化

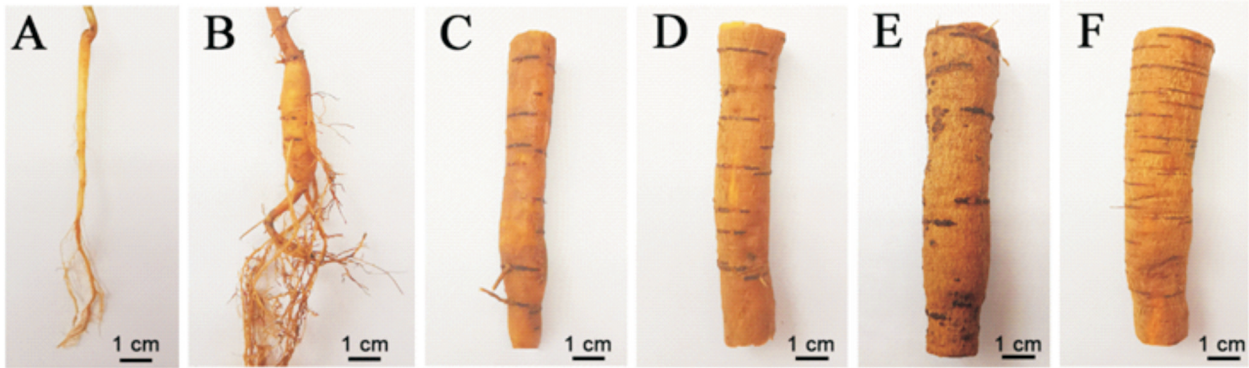
由图 2 可知, 牛大力多糖含量在块根生长发育过程中呈现出逐渐上升的变化趋势, 但在块根稳定膨大期的上升速率减缓, 直至移栽 36 个月其含量达到最大值 (36.57%)。淀粉作为一种主要的多糖物质, 其含量的变化规律类似于多糖, 随着块根的生长发育而不断增加。移栽 6~18 个月, 块根的淀粉含量较低且变化不大。移栽 18 个月后, 块根的淀粉含量迅速增加, 极显著高于形成期 (移栽 6~12 个月)。移栽 36 个月, 块根的淀粉含量达到最大值 (13.99%), 极显著高于移栽 30 个月的含量 (12.69%)。

2.3 牛大力块根不同发育时期的可溶性糖含量变化

可溶性糖主要包括蔗糖、葡萄糖与果糖等, 在牛大力块根发育的过程中可溶性糖含量呈下降的变化趋势 (图 3:A)。移栽 6 个月, 牛大力处于块根形成期, 此时的可溶性糖含量最高, 达到 23.45%, 极显著高于其他样品。随着块根膨大进程, 根中合成积累的可溶性糖出现迅速下降, 特别是从移栽 6 个月至 12 个月。移栽 36 个月, 块根的可溶性糖含量最低, 仅为 2.66%。由图 3:B 可知, 蔗糖含量在移栽 6 个月最高, 达到 7.06%。随着块根的发育进程, 其变化规律总体上呈下降的趋势, 直至移栽 36 个月, 含量降至 1.19%。通过比较可溶性糖含量与蔗糖的含量, 我们发现在牛大力块根发育过程中蔗糖在可溶性糖中占据的比例为 30.05%~54.26%。因此, 我们认为蔗糖可能是牛大力块根最主要的可溶性糖。

2.4 牛大力块根不同发育时期的相关酶活性变化

2.4.1 SPS 和 SUS (合成) 酶的活性变化 通过对牛大力块根发育过程中的 SPS 和 SUS (合成) 方向的活性进行测定 (图 4), 我们发现从移栽 6 个月至 24 个月, 牛大力块根的 SPS 酶活性呈上升的变化趋势, 在移栽 30 个月出现稍微下降, 之后又开始升高, 直至移栽 36 个月达到最大值 (58.99 $\mu\text{mol} \cdot$



A, B, C, D, E, F 分别表示移栽 6、12、18、24、30、36 个月。
A, B, C, D, E, F represent 6, 12, 18, 24, 30 and 36 months after transplanting, respectively.

图 1 牛大力不同发育时期块根形态特征

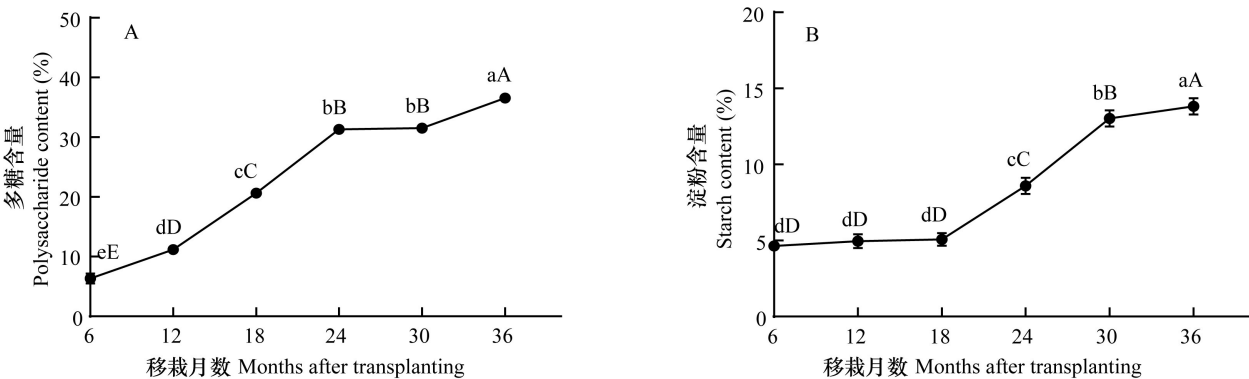
Fig. 1 Morphological characteristics of *Callerya speciosa* tuberous roots at different developmental stages

表 1 不同发育时期的牛大力根体积、鲜重与干重

Table 1 Root volume, fresh weight and dry weight of *Callerya speciosa* tuberous roots at different developmental stages

移栽月数 Months after transplanting	体积 Root volume (cm ³)	鲜重 Fresh weight (g)	干重 Dry weight (g)	折干率 Drying rate (%)
6	1.57±0.05 d	3.01±0.52 c	1.13±0.27 d	37.54±0.13 b
12	3.12±0.24 d	6.35±1.19 c	2.32±0.24 d	36.54±0.21 b
18	15.65±1.54 c	18.18±2.56 b	7.49±0.38 c	41.20±1.16 a
24	33.52±2.57 b	36.79±0.93 a	10.64±0.58 b	28.92±0.25 d
30	34.87±2.09 ab	36.87±1.47 a	11.50±0.47 b	31.19±0.32 c
36	37.32±1.88 a	37.49±1.18 a	15.26±2.05 a	40.70±0.36 a

注：小写字母表示差异性显著 ($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters mean significant differences ($P<0.05$).



不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著,不同大写字母表示在 $P<0.01$ 水平上差异极显著。下同。
Different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$ level, different capital letters indicate extremely significant differences at $P<0.01$ level.The same below.

图 2 牛大力块根不同生长发育时期的多糖与淀粉含量

Fig. 2 Contents of polysaccharide and starch in *Callerya speciosa* tuberous roots at different developmental stages

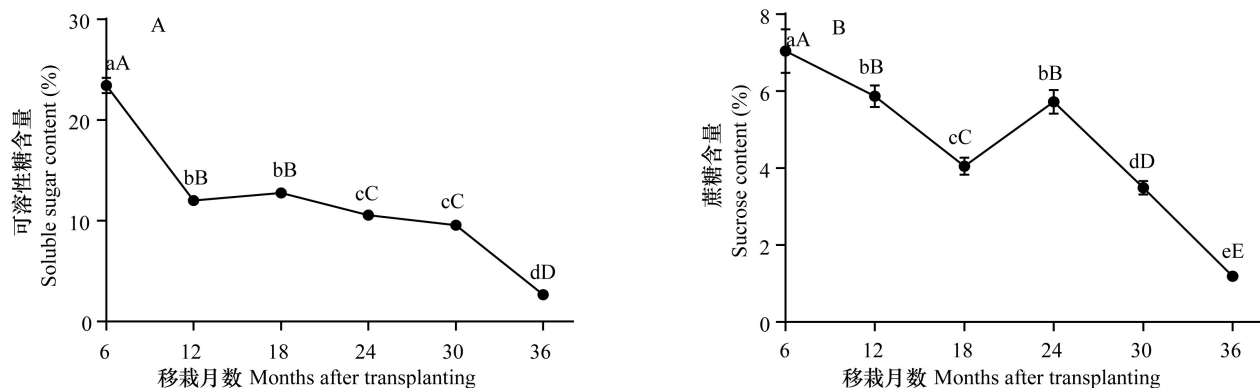


图3 牛大力块根不同生长发育时期的可溶性糖与蔗糖含量

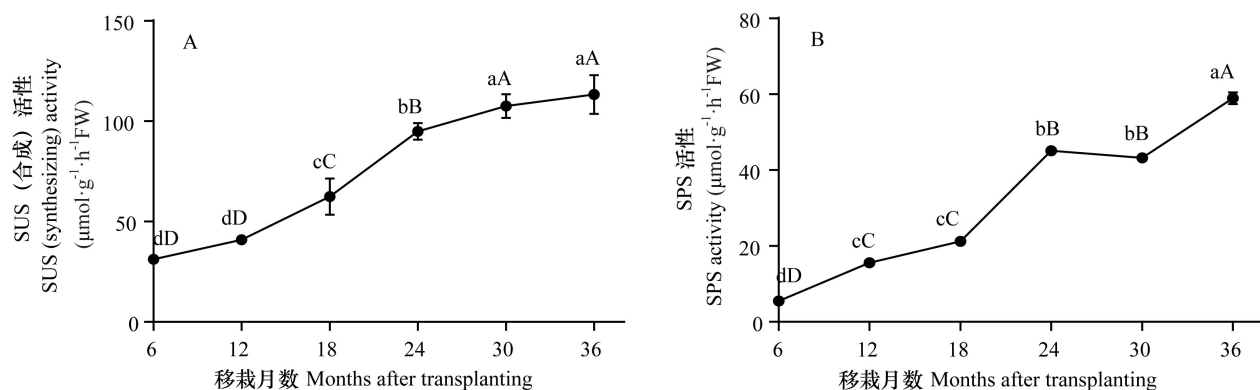
Fig. 3 Contents of soluble sugar and sucrose in *Callerya speciosa* tuberous roots at different developmental stages

图4 牛大力块根不同发育时期的合成方向酶活性

Fig. 4 Enzyme activities of synthesizing direction in *Callerya speciosa* tuberous roots at different developmental stages

$\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{FW}$), 极显著高于其他样品。而 SUS(合成)方向的活性则不断增加, 在移栽 36 个月达到最大值 ($113.26 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{FW}$), 极显著高于除移栽 30 个月之外的所有样品。SUS 与 SPS 均为参与蔗糖合成的关键酶, 而 SUS(合成)方向的酶活性远远高于 SPS 的酶活性, 提示 SUS 可能在牛大力块根发育过程中发挥更重要的催化蔗糖合成作用。

2.4.2 蔗糖分解代谢酶活性的变化 参与蔗糖分解代谢相关的酶主要包括 SUS、AI 与 NI 三种, 从图 5 可以看出, 在牛大力块根发育过程中, 转化酶 AI 和 NI 的活性均逐渐上升, 且均在移栽 36 个月达到最高, 分别为 $154.66 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{FW}$ 与 $90.82 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{FW}$, 极显著高于移栽 30 个月之前的所有样品。通过比较 NI 与 AI 酶活性的含量及变化规律, 我们发现 AI 的活性高于 NI, 推测

AI 可能在蔗糖代谢分解过程中发挥更重要的作用, 是一种主要的转化酶。类似于转化酶的活性, SUS(分解)方向的酶活性从移栽 6 个月至 24 个月也逐渐上升, 但在块根稳定膨大期稍有下降, 峰值出现在移栽 24 个月 ($150.89 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{FW}$)。在牛大力块根发育过程中, SUS 发挥着双重的调控作用, 一方面 SUS(合成)方向参与催化蔗糖合成, 另一方面 SUS(分解)方向参与蔗糖分解代谢。因此, 我们通过 SUS 净活性来综合评价 SUS 的调控作用, $\text{SUS 净活性} = \text{SUS(分解)方向} - \text{SUS(合成)方向}$ 。由图 5:D 可知, SUS 的净活性为正值, 说明其综合调控作用为催化蔗糖分解。随着块根发育进程, SUS 净活性总体上呈上升后下降的变化趋势, 在移栽 12 个月达到最大值 ($67.97 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{FW}$), 在块根形成期、迅速膨大期与稳定膨大期这三个发育阶段之间存在极显著差异。

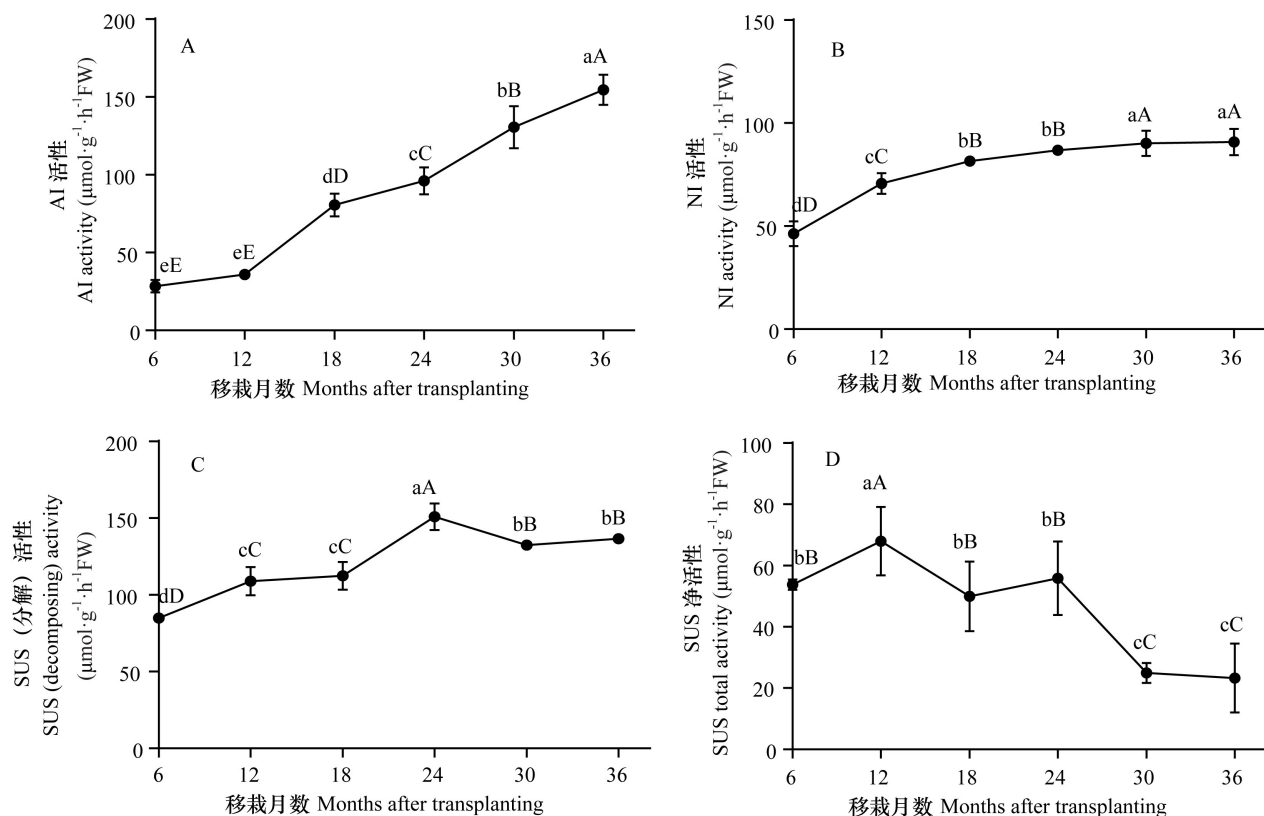


图 5 牛大力块根不同发育时期的分解方向酶活性及 SUS 净活性

Fig. 5 Enzyme activities of decomposing direction and total SUS in *Callerya speciosa* tuberous roots at different developmental stages

2.5 牛大力块根不同发育时期糖类物质含量与相关酶活性的相关性

从表 2 可以看出,牛大力不同发育时期的多糖含量与蔗糖含量、可溶性糖含量呈负相关,说明了多糖的积累可能是在可溶性糖分解代谢的基础上完成的。多糖含量与蔗糖合成及代谢相关的酶活性呈显著或极显著正相关,说明多糖类物质的积累受蔗糖合成及代谢相关的酶影响,酶活性越大,多糖的积累量越多。作为一种主要的多糖物质,淀粉含量与蔗糖合成及代谢相关酶活性的相关性类似于多糖含量,进一步验证了它们之间的相关性关系。可溶性糖含量与 SPS、SUS(合成方向)、AI 和 NI 活性等蔗糖合成及代谢相关酶活性呈显著的负相关关系,提示在牛大力块根发育过程中蔗糖代谢相关酶主要用于分解代谢蔗糖等可溶性糖,通过这些糖类物质的分解代谢从而促进多糖类物质的合成积累。

3 讨论与结论

块根是一个重要的“库”器官,在生长发育和形态建成过程中需要积累大量的光合产物,光合产物从“源”到“库”的主要运输物质是蔗糖,蔗糖既是光合作用早期形成的光合产物,又是叶片光合产物向各器官运输的主要形式,在植物糖代谢中具有举足轻重的作用(Abid et al., 2009)。光合产物的形成、运输与分配直接影响到药用植物块根药材产量的高低与品质的优劣。本研究阐明块根糖运输、代谢与积累机制,并通过人工调控增加“源”端的装载能力和“库”端的卸载能力,将有利于更多的光合产物合成并积累到“库”器官中,对提高中药材的产量与品质具有重要的意义。

块根中主要的可溶性糖是蔗糖。在发育前期,蔗糖能较快地从叶片被输送至块根而参与同

表 2 牛大力不同发育时期糖类含量以及相关酶活性的相关性

Table 2 Correlation coefficients between sugar content, and sucrose-metabolizing enzyme activities in *Callerya speciosa* tuberous roots at different developmental stages

种类 Type	多糖含量 Polysaccharide content	淀粉含量 Starch content	可溶性 糖含量 Soluble sugar content	蔗糖含量 Sucrose content	SUS(合成) 活性 SUS (synthesizing) activity	SPS 活性 SPS activity	SUS(分解) 活性 SUS (decomposing) activity	AI 活性 AI activity
淀粉含量 Starch content	0.88 *							
可溶性糖含量 Soluble sugar content	-0.854 *	-0.764						
蔗糖含量 Sucrose content	-0.786	-0.800	0.856 *					
SUS(分解)活性 SUS (decomposing) activity	0.915 *	0.705	-0.800	-0.529				
SPS 活性 SPS activity	0.979 **	0.912 *	-0.882 *	-0.787	0.901 *			
SUS(合成)活性 SUS (synthesizing) activity	0.990 **	0.932 **	-0.827 *	-0.782	0.885 *	0.975 **		
AI 活性 AI activity	0.962 **	0.938 **	-0.842 *	-0.897 *	0.776	0.948 **	0.972 **	
NI 活性 NI activity	0.915 *	0.727	-0.908 *	-0.760	0.894 *	0.865 *	0.887 *	0.858 *

注: ** 和 * 分别表示在 $P<0.001$ 水平和 $P<0.05$ 水平上差异显著。
Note: ** and * indicate significant differences at $P < 0.01$ and $P < 0.05$ levels, respectively.

化物的积累。在甘薯块根发育前期,蔗糖含量较高,而在发育后期,蔗糖含量下降同时淀粉积累较快(沈淞海等,1994)。我们也发现蔗糖是牛大力块根发育过程中主要的可溶性糖,蔗糖含量与可溶性糖含量均在牛大力块根发育前期较高,随着块根的发育进程,它们的含量逐渐下降,而淀粉含量与多糖含量则不断上升。进一步的相关性分析结果表明,多糖类与可溶性糖含量之间呈显著负相关,说明可溶性糖的分解代谢有利于促进多糖类物质的积累。

已有研究表明,贮藏器官的物质积累是几种蔗糖代谢酶协同发挥作用的结果,蔗糖经过一系列酶的代谢过程后,最终被转化为其他糖形式而被植物利用与积累(Nguyen-quoc & Foyer, 2001; 于安民等,2014)。李丹等(2009)发现在甜菜块根蔗糖合成中 SUS 合成方向大于 SPS 活性;于安民等(2014)发现阳春砂仁果实发育过程中 SUS(合成)活性与 SUS(分解)活性均远远高于 SPS 活性,推测 SUS 是催化阳春砂仁果实中蔗糖合成与分解的关键酶;郑国琦等(2008)发现宁夏枸杞果实发育过程中 SUS 呈现出先增加后下降的趋势,而 SPS 的活性明显低于 SUS 活性。本研究结果表明,在牛大力块根发育过程中,SUS(合成)活性随着块根

发育进程而不断上升,SUS(分解)活性在块根形成期与迅速膨大期也不断升高,并且 SUS(合成)活性与 SUS(分解)活性均远远高于 SPS 活性,这与前人研究结果基本一致。因此,我们推测 SUS 是催化牛大力块根中蔗糖合成与分解的关键酶,在牛大力块根发育过程中发挥着既催化蔗糖合成,又催化蔗糖分解的双重调节作用。类似于李丹等(2009)的研究结果,SPS 与 SUS(分解)在牛大力块根形成期与迅速膨大期呈现出相似的活性变化规律,说明 SPS 活性受光合产物积累量的反馈调节,使得 SPS 的合成产物得到适时分解代谢,从而维持 SPS 的高活性。通过对牛大力块根糖类物质含量、蔗糖合成与代谢酶之间的相关性分析发现 SPS、SUS(分解)活性与多糖含量呈极显著正相关,但与可溶性糖含量呈显著负相关,进一步验证了 SPS 与 SUS(分解)协同促进蔗糖代谢与多糖类物质的积累。蔗糖转化酶可分为 AI 与 NI 两种不同类型,已被证明能将蔗糖分解为果糖和葡萄糖。在牛大力块根形成期 AI 与 NI 的活性均较低,在块根稳定膨大期它们的活性提高了 2~4 倍,可见此时 AI 与 NI 的活性均非常高,确保了蔗糖的分解代谢。通过比较 NI 与 AI 的活性,我们发现 AI 处于更高的水平,因此我们推测 AI 可能在蔗糖代谢

分解过程中发挥更重要的作用,是一种主要的转化酶。此外,本研究通过分析牛大力块根中的 SUS 净活性,认为牛大力块根发育过程中蔗糖分解方向酶活性高于蔗糖合成方向酶活性,其中对蔗糖分解起关键作用的是 SUS, SUS 净活性为催化蔗糖分解,其活性变化与蔗糖含量的变化趋势一致,均为不断下降,在移栽 36 个月的块根中活性达到最低。SUS 的活性决定了储存“库”器官的强度,通过调节“源”“库”关系,在块根发育过程中发挥着重要的作用。于安民等(2014)对阳春砂的研究表明,果皮和种子团中 SUS 的净活性为催化蔗糖合成,且逐渐上升,有利于蔗糖的迅速积累。不同于阳春砂果实成熟,牛大力块根发育 SUS 主要起分解蔗糖的作用,以达到为多糖类物质积累提供前体物质的目的。因此,我们可以利用分子生物学的方法,对牛大力中的 SUS 进行过表达基因调控,以达到增强“库”强,提高产量与品质的目的。然而,对于牛大力块根发育过程中 SUS 活性与可溶性糖、多糖类物质的积累之间的相关基因及其表达网络有待进一步深入研究。

高浓度的蔗糖可为糖向脂肪、蛋白、次生代谢物等的转化提供基础(姜志娜等,2012)。在药用植物丹参中,蔗糖代谢产生的同化物主要用于丹酚酸类物质的积累(王春丽等,2012)。本研究发现牛大力多糖含量在牛大力块根发育过程中逐渐升高,且多糖积累与可溶性糖含量呈显著负相关,与蔗糖代谢相关的酶活性呈显著或极显著正相关,因此我们认为牛大力块根发育过程的蔗糖分解代谢可为多糖的积累提供前体物质与底物,这与前人在枸杞(郑国琦等,2008)、铁皮石斛(杨骏等,2020)上的研究结果一致。淀粉属于一种多糖类物质,淀粉含量也是决定牛大力块根品质的一个重要指标。已有研究表明,蔗糖分解代谢酶能促进块根淀粉的合成,特别是 SUS,比如高淀粉含量的甘薯块根中具有更高的 SUS 活性(吕长文等,2011;占雷雷等,2019)。淀粉含量在牛大力块根发育过程中逐渐增加,表明 SUS 的高活性可促进其块根中淀粉的合成与积累。这些均可为进一步深入研究牛大力块根发育过程中 SUS 活性与蔗糖及次生代谢产物含量之间的关系提供思路。

综上所述,在牛大力块根发育过程中,多糖类物质含量逐渐增加,而可溶性糖含量则逐渐减少,多糖与可溶性糖含量之间呈显著负相关,说明可

溶性糖的分解代谢有利于促进多糖类物质的积累。蔗糖的分解代谢是蔗糖合酶(SUS)、蔗糖磷酸合酶(SPS)、酸性转化酶(AI)与中性转化酶(NI)等多种相关酶协同作用的结果, SUS 在牛大力块根发育过程中发挥着既催化蔗糖合成,又催化蔗糖分解的双重调节作用,其净活性为催化蔗糖分解,在块根形成期达到最高。转化酶 AI 和 NI 的活性均在块根发育过程中逐渐增强,且 AI 活性高于 NI 活性,推测 AI 可能在蔗糖代谢分解过程中发挥更重要的作用。本研究结果可为今后深入研究牛大力多糖类成分积累调控机制提供理论依据,并为提高牛大力药材的产量与品质提供技术指导。

参考文献:

- ABID G, SILUE S, MUHOVSKI Y, et al., 2009. Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development [J]. *Gene*, 439(1-2): 1-10.
- China Flora Editorial Board, Chinese Academy of Sciences, 2010. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M]. Beijing: Science Press, 10: 182-183. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 2010. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 10: 182-183.]
- FENG MY, 2015. Purification, structural characteristics and activities of bioactive compounds from *Millettia Speciosa* Champ [D]. Guangzhou: South China University of Technology: 41-51. [冯梦莹, 2015. 牛大力功能成分的分离纯化、结构鉴定及活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学: 41-51.]
- GAO JF, 2006. Experimental instruction in plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press: 105-108. [高俊凤, 2006. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社: 105-108.]
- HAO JJ, YU Y, ZHANG T, 2013. *Phytophysiology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press: 234-240. [郝建军, 于洋, 张婷, 2013. 植物生理学 [M]. 北京: 化学工业出版社: 234-240.]
- HUANG Z, ZENG YJ, CHEN X, et al., 2020. A novel polysaccharide from the roots of *Millettia Speciosa* Champ: preparation, structural characterization and immunomodulatory activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 145: 547-557.
- JIANG ZN, TAN XF, YUAN J, et al., 2012. Content variation of main nutrients in leaves and fruits of *Camellia oleifera* [J]. *J Centr S Univ For Technol*, 32(5): 42-45. [姜志娜, 谭晓风, 袁军, 等, 2012. 油茶果实和叶片中主要营养物质含量的变化规律 [J]. 中南林业科技大学学报, 32(5): 42-45.]
- LI D, WANG Y, HE L, et al., 2009. Relationship between sucrose metabolism related enzymes and sucrose accumulation in sugar beet [J]. *Crops*, (3): 27-32. [李丹, 王晔, 赫磊, 等, 2009. 甜菜蔗糖代谢相关酶活性与糖积累关系的研究 [J]. 作物杂志, 3: 27-32.]

- LUO X, LIN CW, CHEN JJ, et al., 2014. *In vivo* anti-fatigue effect of polysaccharides from *Milletia speciosa* Champ [J]. Nat Prod Res Devel, 26(3): 324–328. [罗轩, 林翠梧, 陈洁晶, 等, 2014. 牛大力多糖对小鼠抗疲劳作用的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 26(3): 324–328.]
- LÜ CW, WANG JC, TANG DB, et al., 2011. Dynamic characteristics of carbohydrate synthesis and accumulation in tuberous roots of sweet potato [J]. J Chin Cereals Oils Ass, 26(2): 23–27. [吕长文, 王季春, 唐道彬, 等, 2011. 甘薯块根碳水化合物合成与积累动态特性研究 [J]. 中国粮油学报, 26(2): 23–27.]
- NGUYEN-QUOC B, FOYER CH, 2001. A role for ‘futile cycles’ involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit [J]. J Exp Bot, 52(358): 881–889.
- Shanghai Association of Plant Physiology, 1985. The handbook of plant physiology experiments [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press; 137–138. [上海植物生理学会, 1985. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 137–138.]
- SHEN SH, SHEN HM, WU JH, 1994. Relation of starch accumulation with free sugars in the sweet potato (*Lpomea batatas*) [J]. J Zhejiang Agric Univ, 20(4): 400–404. [沈淞海, 沈海铭, 吴建华, 1994. 甘薯生长发育过程中可溶性糖含量与淀粉积累的关系 [J]. 浙江农业大学学报, 20(4): 400–404.]
- STEIN O, GRANOT D, 2019. An overview of sucrose synthases in plants [J]. Front Plant Sci, 10: 95–109.
- WANG B, PAN LH, LUO JP, et al., 2009. Effect of salicylic acid on cell growth and polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* [J]. Chin J Biotechnol, 25(7): 1062–1068. [王博, 潘利华, 罗建平, 等, 2009. 水杨酸对霍山石斛类原球茎细胞生长及多糖合成的影响 [J]. 生物工程学报, 25(7): 1062–1068.]
- WANG CL, LIANG ZS, LI DR, et al., 2012. Effects of growth-regulating substances and soluble sugar contents on accumulation of salvianolic acids in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Plant Physiol J, 48(2): 181–188. [王春丽, 梁宗锁, 李殿荣, 等, 2012. 生长调节物质和可溶性糖含量对丹参中丹酚酸类物质积累的影响 [J]. 植物生理学报, 48(2): 181–188.]
- WEI M, JIANG ST, LUO JP, 2007. Enhancement of growth and polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *D. huoshanense* by the addition of putrescine [J]. Biotechnol Lett, 29: 495–499.
- WEI YY, WU FJ, ZENG HS, et al., 2010. Overview research of *Milletia speciosa* Champ [J]. J Guangxi Acad Sci, 26(3): 380–382. [韦玉燕, 巫繁菁, 曾海生, 等, 2010. 牛大力研究概况 [J]. 广西科学院学报, 26(3): 380–382.]
- WU YR, PENG LS, XIAO J, 2020. Research progress on the main constituents of *Milletia speciosa* Champ and its pharmacological effects [J]. J Hunan Univ Chin Med, 40(4): 503–506. [伍月榕, 彭丽珊, 肖健, 2020. 牛大力主要化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 湖南中医药大学学报, 40(4): 503–506.]
- XIE XB, QI XJ, JIN W, et al., 2013. Accumulation of fruit sugar components and activities analyzing of sucrose metabolizing enzymes during fruit development of red bayberry [J]. Acta Agric Zhejiang, 25(1): 48–52. [谢小波, 戚行江, 金伟, 等, 2013. 杨梅果实糖分积累及其代谢酶活性变化规律 [J]. 浙江农业学报, 25(1): 48–52.]
- YANG J, MENG HL, YANG SC, et al., 2020. Correlation between soluble polysaccharide and sucrose metabolic enzymes in *Dendrobium officinale* [J]. J West Chin For Sci, 41(2): 62–67. [杨骏, 孟衡玲, 杨生超, 等, 2020. 铁皮石斛可溶性糖含量与蔗糖代谢酶活性的相关性研究 [J]. 西部林业科学, 41(2): 62–67.]
- YAO SC, GU JY, HUANG RS, et al., 2020. Cloning and expression analysis of *CsSuSy* genes from *Callerya Speciosa* [J]. Mol Plant Breed, 19(6): 1876–1885. [姚绍嫦, 顾晋源, 黄荣韶, 等, 2020. 牛大力蔗糖合酶基因 *CsSuSy* 克隆与表达特征分析 [J]. 分子植物育种, 19(6): 1876–1885.]
- YU AM, ZHANG M, YANG JF, et al., 2014. Dynamic study on soluble sugar accumulation and sucrose metabolizing enzyme activities during fruit development of *Amomum villosum* Lour [J]. World Sci Technol/Mod Trad Chin Med Mat Med, 16(7): 1497–1505. [于安民, 张敏, 杨锦芬, 等, 2014. 阳春砂果实发育过程中可溶性糖及蔗糖代谢酶活性变化规律的研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 16(7): 1497–1505.]
- ZHAN LL, ZHU GP, LIU YH, 2019. Differential roles of four sucrose-degrading enzymes in the formation of qualities of the storage roots of sweet potato [J]. Chin J Trop Crop, 40(9): 1723–1728. [占雷雷, 朱国鹏, 刘永华, 2019. 4种蔗糖分解酶在甘薯块根品质形成中的作用 [J]. 热带作物学报, 40(9): 1723–1728.]
- ZHENG GQ, LUO J, ZHENG ZY, et al., 2008. Research on the accumulation of sucrose metabolism related sugar, polysaccharides, and total sugar in fruit of *L. barbarum* [J]. Chin Trad Herb Drug, 39(7): 1092–1097. [郑国琦, 罗杰, 郑紫燕, 等, 2008. 枸杞果实内蔗糖代谢相关糖分与枸杞多糖和枸杞总糖量积累研究 [J]. 中草药, 39(7): 1092–1097.]
- ZHENG YS, PU HL, MA JJ, 2008. Bidirectional regulation of polysaccharide from *Milletia speciosa* Champ. on T lymphocyte proliferation in mice [J]. J Guangdong Pharm, 24(1): 58–61. [郑元升, 蒲含林, 麻建军, 2008. 牛大力多糖对小鼠T淋巴细胞增殖的双向调节作用 [J]. 广东药学院学报, 24(1): 58–61.]
- ZHONG YN, LIU H, WU SY, et al., 2020. Comparison and analysis on polysaccharides content of *Milletia speciosa* Champ in different planted growing stages by colorimetric method [J]. Guangzhou Chem Ind, 48(4): 78–80. [钟益宁, 柳欢, 吴诗云, 等, 2020. 比色法分析牛大力不同生长期的多糖含量 [J]. 广州化工, 48(4): 78–80.]
- ZHU DH, TAN XM, CHEN YB, et al., 2018. Morphological identification and detection of polysaccharides content between two *Milletia speciosa* Champ species [J]. J N Pharm, 15(2): 2–3. [朱德华, 谭旭明, 陈永斌, 等, 2018. 两种牛大力根性状鉴别及多糖的含量测定 [J]. 北方药学, 15(2): 2–3.]