

基因芯片分析水稻灌浆期籽粒淀粉合成 相关基因的表达

蔡珊兰, 廖炳创, 潘丽朴, 朱国辉

(华南农业大学 生命科学学院, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:水稻 *Oryza sativa* 灌浆过程是籽粒胚乳细胞蔗糖转变成淀粉的过程. 为了解这期间的基因表达变化, 研究利用 Affymetrix 水稻基因芯片分析了水稻籽粒灌浆 3 和 9 d 的基因表达差异, 并着重分析了淀粉合成代谢相关基因的表达模式. 结果表明, 在检测到信号的 59 个淀粉合成相关基因中, 灌浆后 9 d 相比 3 d 表达丰度上调 2 倍的基因有 20 个, 包括 *SUS2*、*AGPS2*、*AGPL2*、*GBSS I*、*SS II a*、*BE I* 等, 这类基因对水稻籽粒淀粉合成和灌浆起了至关重要的作用. 灌浆后 9 d 相比 3 d 表达丰度下调 2 倍的基因有 12 个, 包括 *CIN2*、*SPS3*、*AGPL1*、*GBSS II*、*SS III b* 等, 这类基因可能参与胚乳细胞基本结构的形成以及初始淀粉粒的产生.

关键词:水稻; 灌浆; 淀粉合成基因; 基因芯片

中图分类号: S51

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2013)02-0187-05

Comprehensive Expression Analysis of Starch Biosynthesis Related Genes in the Developing Rice Grains Using DNA Microarrays

CAI Shanlan, LIAO Bingchuang, PAN Lipu, ZHU Guohui

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms,
College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Rice grain filling is a process of starch accumulation. Biosynthesis of starch from sucrose in the developing endosperm primarily determines grain yield and quality of rice. DNA microarray analysis was performed in this study to investigate the differential expressed genes between 3 days and 9 days post anthesis in rice spikelets. 59 starch biosynthesis related genes were screened and among these, 20 genes were 2-folds up-regulated at 9 days post anthesis (DPA) compared with 3 DPA, including *SUS2*, *AGPS2*, *AGPL2*, *GBSS I*, *SS II a*, *BE I*, which could be the key genes responsible for the starch biosynthesis during grain filling. 12 genes were down-regulated at 9 DPA compared with 3 DPA, including *CIN2*, *SPS3*, *AGPL1*, *GBSS II*, *SS III b*, which were presumed to be involved in the construction of fundamental cell machinery and initiation of starch granules.

Key words: *Oryza sativa*; grain filling; starch biosynthesis related genes; DNA microarray

水稻 *Oryza sativa* 籽粒灌浆特性对其最终产量和品质的形成至关重要. 成熟籽粒中其干质量的 80% ~ 90% 是淀粉^[1], 因此籽粒灌浆充实的过程实际上是胚乳细胞中淀粉生物合成与累积的过程. 水稻灌浆过程的同化物主要来源于叶片光合作用产物以及茎鞘中储存的非结构性碳水化合物^[2]. 同化物

以蔗糖的形式经韧皮部运输到籽粒,之后在籽粒胚乳细胞中形成淀粉.参与此过程的酶有几十种,但其中的 5 种酶在淀粉合成中起关键作用^[3-5],包括蔗糖合成酶(Sucrose synthase, SuS)、腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADP glucose pyrophosphorylase, AG-Pase)、淀粉合成酶(Starch synthase, SS)、淀粉分支酶(Starch branching enzyme, SBE)和淀粉脱支酶(Starch debranching enzyme, DBE).此外,还有一些代谢酶比如转化酶(Invertase),以及转运蛋白比如蔗糖转运蛋白(Sucrose transporter, SUT)也参与胚乳细胞淀粉合成的过程^[6-7].目前,水稻中淀粉合成相关酶及转运蛋白的编码基因已经基本被克隆和鉴定,几乎所有酶或蛋白都是由多基因编码的^[8-9].

虽然已有文献报道了淀粉合成相关基因表达与水稻籽粒灌浆之间的关系^[10-11],但大多着重于描述单个基因或一类基因.本研究运用基因芯片的方法,综合分析这些淀粉合成相关基因在水稻灌浆过程中的表达变化,并构建基因在代谢途径上的转录图谱,对于了解籽粒灌浆的生物学过程有重要的科学意义.

1 材料与方法

1.1 植物材料

以籼稻品种 9311 为试验材料,种植在大田.在抽穗开花期,选取生长整齐一致、同日开花的主穗挂牌标记.自开花后每隔 3 d 取挂牌单穗 20 株,剥取顶部 3 个一次枝梗上的籽粒.取其中的一半在 70 ℃ 烘干后去壳,用于粒质量和糖的分析,另一半液氮速冻后在 -80 ℃ 条件下保存,其中开花后 3 d(3 Days post anthesis, 3 DPA)和 9 d 的籽粒用于基因芯片分析.

1.2 淀粉和可溶性糖的测定

50 ~60 颗去壳籽粒磨碎后称取 0.1 g 置于离心管,80 ℃ 下用 10 mL 体积分数为 80% 的乙醇提取 30 min,离心后残渣重复提取 1 次,合并上清,用硫酸-蒽酮比色法测定可溶性糖的含量^[12].残渣中的淀粉用体积分数为 3% 的 HCl 于沸水中水解 1 h,其后调节 pH 至中性,测定方法同可溶性糖,用不同浓度的葡萄糖标准溶液作标准曲线.

1.3 基因芯片杂交分析

籽粒总 RNA 用 TRIzol 试剂(Qiagen 公司)提取,并以 RNeasy spin columns 柱进行纯化,RNA 中微量的 DNA 用 Invitrogen 的 DNase I 于 37 ℃ 消化 30 min.将提取的 RNA 送上海伯豪生物技术有限公司进行基因芯片分析.芯片使用 Affymetrix 水稻基因组生物芯片

(Affymetrix genechip rice genome array),芯片覆盖约 57 258 个转录本.8 μg 的总 RNA 用于合成生物素标记的 cRNA 探针,随后与芯片杂交,用 Affymetrix genechip scanner 3 000 对芯片进行扫描,用 Genechip operating software(GCOS)分析探针检测信号(表达、不表达或边缘化表达)和进行数据均一化处理.以籽粒灌浆 3 d 的样品为参照,以 9 d 基因表达变化的信号 log₂ 比值(Signal log₂ ratio)确定基因的上下调关系,变化倍数大于 2 倍(log₂ 比值 ≥ 1 或 ≤ -1)认为是差异表达基因.

1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测

RNA 提取和纯化的方法同 1.3.将 2 μg 的总 RNA 用 Invitrogen 公司的 SuperScript first-strand synthesis system 反转录成 cDNA,获得的 cDNA 稀释 5 倍后用于实时荧光定量 PCR 分析.20 μL 的反应体系中含有 10 μL iQ SYBR green supermix (Bio-rad)、2 μL cDNA、0.5 μmol · L⁻¹ 基因特异的引物(表 1)和适量的水,PCR 反应在 Bio-rad 的 iCycler PCR 仪上进行.所有的处理均重复 3 次,以 18s rRNA 基因为内参处理数据.

2 结果与分析

2.1 水稻籽粒灌浆动态分析

Ohdan 等^[9]把水稻灌浆过程分为启动期(开花后 1 ~3 d)、前期(3 ~5 d)、中期(5 ~10 d)和后期(10 ~20 d).从图 1 看出,水稻籽粒在灌浆前、中期质量快速增加,灌浆速率在灌浆后第 9 天达到最大,而后下降,最终籽粒干质量为 24.5 mg(图 1A).籽粒灌浆过程也是淀粉累积过程,淀粉含量从开花后 3 d 的 19.9% 上升到 9 d 的 59.6%.与此相反,籽粒中可溶性糖含量快速下降,完成向淀粉的转化(图 1B).本研究以灌浆 3 d(灌浆初始期)和 9 d(最大灌浆率期)的水稻籽粒为材料,分析两者之间淀粉合成相关基因的表达变化.

2.2 芯片数据分析及部分基因 qRT-PCR 验证

在 Affymetrix 水稻基因组芯片 57 258 个微矩阵点中,籽粒灌浆 9 d 相比 3 d 上调表达(log₂ 比值 ≥ 1)的点有 4 778 个,占总数的 8.3%;下调表达(log₂ 比值 ≤ -1)的点有 5 136 个,占总数的 9.0%,由此可见,水稻从灌浆 3 d 到灌浆 9 d 是基因表达的剧烈变化期.这些基因包括糖代谢、蛋白代谢、光合作用、激素合成、信号转导等相关基因.为了验证芯片数据的可靠性,对同样的材料采用相同方法处理后,以基因 18s rRNA 作为内参,选取 6 个基因进行 qRT-PCR 验证.表 1 列出了这些基因的特有扩增引物以及在芯片检测中的

表 1 实时荧光定量 PCR 所用基因及其引物序列

Tab.1 Genes and primers for quantitative RT-PCR analysis

探针编号	基因	引物序列	相对表达倍数变化 ¹⁾	
			qRT-PCR	基因芯片
Os. 4166. 1. S1_at	<i>AGPL1</i>	F: 5' GGAATCGTGGTGATCCTGAAG 3' R: 5' CATCAGCGAGCTCTCCTATATGAC3'	-1.9	-2.0
Os. 50640. 1. S1_at	<i>CIN2</i>	F: 5' CGCGCCTTTACGTTTTCAAT3' R: 5' CATGACCGGCTTCTTCATCTC3'	-2.5	-2.9
Os. 9212. 1. S1_at	<i>GBSS II</i>	F: 5' TGTGCGAGTGCAGAACTGTTGA3' R: 5' CAGAGCCCGTTTGACAGTTGA3'	-3.0	-4.0
Os. 9127. 1. S1_a_at	<i>SUS2</i>	F: 5' AGCCATGACATGTGGTTTGC3' R: 5'GACACCCCATCAACAATAATCTCA3'	3.6	2.4
Os. 11244. 2. S1_x_at	<i>GBSS I</i>	F: 5' CGTGGACACGGTCATCGA3' R: 5' GGCCGCCACCTTCTTCA3'	3.6	3.2
Os. 12725. 1. S1_at	<i>SS I</i>	F: 5' GAGGATGCTTGAAGCGGTTT 3' R: 5' TGATTCCAAGACTCACATTTCGA3'	2.5	2.8

1) 正值表示上调,负值表示下调.

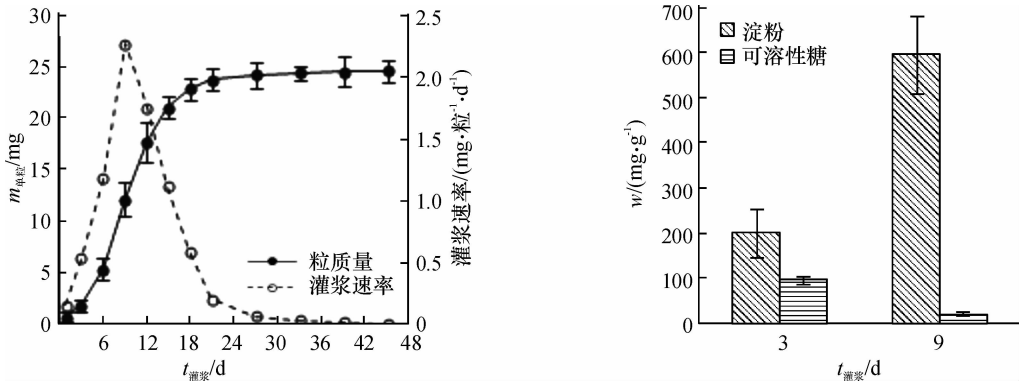


图 1 水稻灌浆过程中籽粒粒质量、灌浆速率以及淀粉和可溶性糖含量变化

Fig. 1 Grain mass, grain filling rate, starch accumulation, and soluble carbohydrate content in rice spikelets during grain filling

信号相对表达倍数变化. 这 6 个基因的相对表达量 (图 2) 及表达模式与芯片结果 (表 2) 基本一致,说明芯片数据具有生物学意义上的可重复性,结果是可信的.

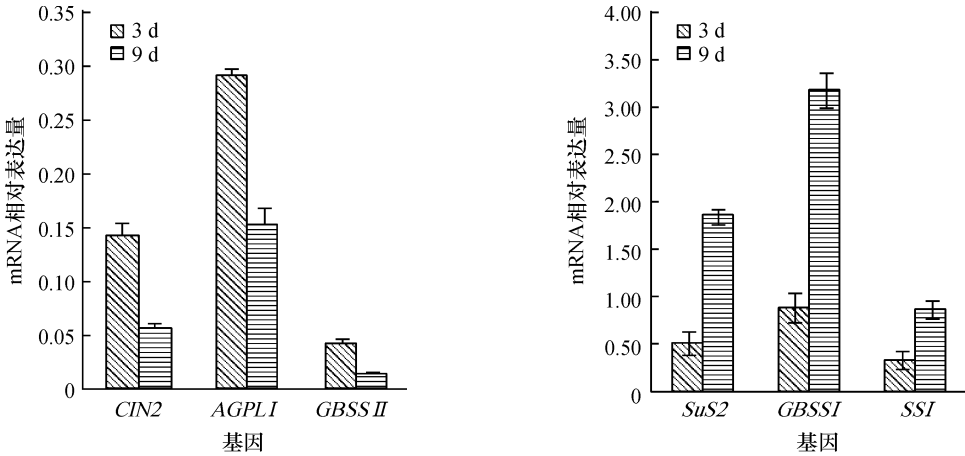


图 2 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

Fig. 2 Confirmation of several differential expressed genes using quantitative RT-PCR

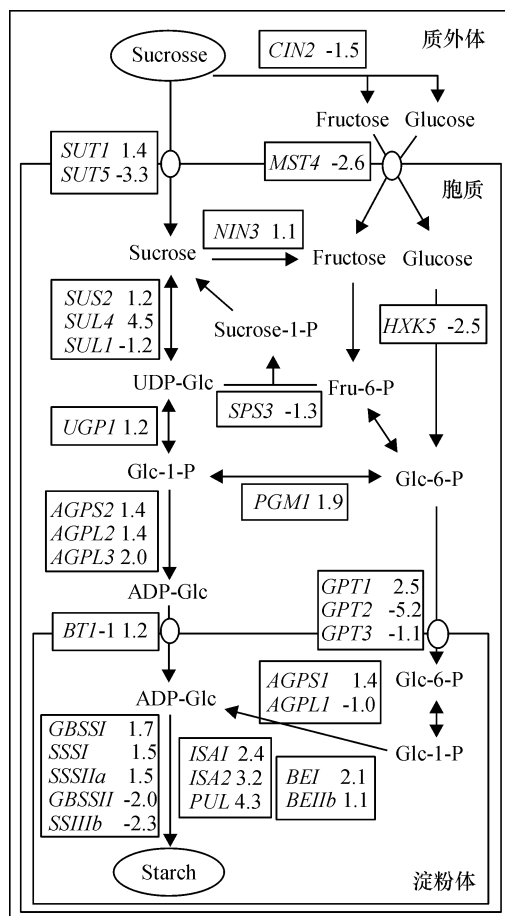
2.3 淀粉代谢相关基因分析

为了了解水稻灌浆过程中糖代谢相关基因的表达,重点分析了芯片中参与淀粉合成相关酶和转运蛋白的相关基因数据.其中未检测到信号或信号值偏低(或相对偏低)的基因有 31 个,检测到信号值的基因有 59 个.根据其在水稻籽粒中的表达丰度及模式,可以大致分为 3 类:第 1 类是灌浆 9 d 相比 3 d 上调表达($\log_2$ 比值 ≥ 1)的基因,共有 20 个(表 2),这些基因在淀粉合成代谢过程中的催化步骤见图 3.这类基因表达本底较高,且随着水稻灌浆进程其表达量急剧上升,对籽粒淀粉的形成可能

起决定性的作用.第 2 类是灌浆 9 d 相比 3 d 下调表达($\log_2$ 比值 ≤ -1)的基因,共有 12 个(表 2),这些基因在淀粉合成代谢过程中的催化步骤见图 3.这类基因在水稻灌浆早期表达量较高,而在灌浆过程中其表达水平下降,这类基因可能参与细胞基本结构的形成以及初始淀粉粒的产生.第 3 类基因表达水平在灌浆 3 d 与 9 d 中变化不大($-1 < \log_2$ 比值 < 1),共有 26 个.包括 *SUT4*、*NIN1*、*HXK6*、*FK1*、*PGIb*、*PGM2*、*SS III a*、*BE II a* 等基因,这类基因相对表达量较低或变化不大,可能不是水稻灌浆过程中淀粉形成的限速因子.

表 2 水稻灌浆 3 d 和 9 d 后籽粒淀粉合成相关基因的差异表达
Tab. 2 Differential expressed starch biosynthesis-related genes at 3 days post anthesis (DPA) and 9 DPA in spikelets

探针编号	LOC 登录号	基因	酶或蛋白名称	芯片信号		
				3 d	9 d	$\log_2$ 比值
Os. 4704. 1. S1_at	LOC_Os03g07480	<i>SUT1</i>	Sucrose transporter	1 868	4 945	1. 4
Os. 8133. 1. S1_at	LOC_Os02g32730	<i>NIN3</i>	Neutral invertase	1 277	2 684	1. 1
Os. 9127. 1. S1_a_at	LOC_Os06g09450	<i>SUS2</i>	Sucrose synthase	14 612	34 356	1. 2
Os. 17890. 1. S1_at	LOC_Os03g22120	<i>SUS4</i>		1 677	37 084	4. 5
Os. 5319. 1. S1_at	LOC_Os10g11140	<i>PGM1</i>	Phosphoglucumutase	6 742	25 235	1. 9
Os. 10118. 1. S1_at	LOC_Os09g38030	<i>UGP1</i>	UDP-glucose pyrophosphorylase	17 664	41 528	1. 2
Os. 3122. 1. S1_at	LOC_Os09g12660	<i>AGPS1</i>	ADP-glucose pyrophosphorylase	8 896	24 112	1. 4
Os. 178. 1. S1_a_at	LOC_Os08g25734	<i>AGPS2</i>		17 910	46 459	1. 4
Os. 6732. 1. S1_a_at	LOC_Os01g44220	<i>AGPL2</i>		20 106	51 738	1. 4
Os. 20397. 1. S1_a_at	LOC_Os03g52460	<i>AGPL3</i>		3 932	15 816	2. 0
Os. 4975. 1. S1_at	LOC_Os02g10800	<i>BT1 -1</i>	Brittle protein	19 903	44 867	1. 2
Os. 4078. 1. S1_at	LOC_Os08g08840	<i>GPT1</i>	Glc -6 -P/phosphate-tranlocator	6 144	33 595	2. 5
Os. 12725. 1. S1_at	LOC_Os06g06560	<i>SS I</i>	Starch synthase	6 027	17 127	1. 5
Os. 5738. 1. S1_at	LOC_Os06g12450	<i>SS II a</i>		11 022	30 335	1. 5
Os. 11244. 2. S1_x_at	LOC_Os06g04200	<i>GBSS I</i>	Granule-bound starch synthase	15 789	50 615	1. 7
Os. 22169. 1. S1_a_at	LOC_Os06g51084	<i>BE I</i>	Starch branching enzyme	10 669	46 251	2. 1
Os. 6796. 1. S1_a_at	LOC_Os02g32660	<i>BE II b</i>		24 294	51 660	1. 1
Os. 3414. 1. A1_at	LOC_Os08g40930	<i>ISA1</i>	Isoamylase	5 701	29 729	2. 4
Os. 25202. 1. S1_at	LOC_Os05g32710	<i>ISA2</i>		1 202	10 687	3. 2
Os. 361. 1. S1_at	LOC_Os04g08270	<i>PUL</i>	Pullulanase	2 679	54 282	4. 3
Os. 26352. 1. S1_at	LOC_Os02g36700	<i>SUT5</i>	Sucrose transporter	1 036	105	-3. 3
Os. 11851. 1. S1_at	LOC_Os03g11900	<i>MST4</i>	Monosaccharide transporter	373	63	-2. 6
Os. 50640. 1. S1_at	LOC_Os04g33740	<i>CIN2</i>	Cell-wall invertase	6 571	2 281	-1. 5
Os. 47344. 1. A1_at	LOC_Os11g07440	<i>NIN6</i>	Neutral invertase	217	23	-3. 2
Os. 25677. 1. S1_at	LOC_Os03g28330	<i>SUS1</i>	Sucrose synthase	6 431	2 763	-1. 2
Os. 27130. 1. S1_at	LOC_Os06g43630	<i>SPS3</i>	Sucrose phosphate synthase	2 206	867	-1. 3
Os. 20973. 1. S1_s_at	LOC_Os05g44760	<i>HXK5</i>	Hexokinase	8 789	1 503	-2. 5
Os. 4166. 1. S1_at	LOC_Os05g50380	<i>AGPL1</i>	ADP-glucose pyrophosphorylase	7 994	4 026	-1. 0
Os. 47946. 1. S1_s_at	LOC_Os07g33910	<i>GPT2</i>	Glc-6-P/phosphate -tranlocator	5 353	148	-5. 2
Os. 52206. 1. S1_at	LOC_Os05g07670	<i>GPT3</i>		3 815	1 747	-1. 1
Os. 23163. 1. S1_at	LOC_Os04g53310	<i>SS III b</i>	Starch synthase	5 139	1 041	-2. 3
Os. 9212. 1. S1_at	LOC_Os07g22930	<i>GBSSII</i>	Granule-bound starch synthase	2 353	581	-2. 0



图中数字表示基因表达量 9 d 对 3 d 的倍数,均为 $\log_2$ 比值,正值为上调,负值为下调.

图3 水稻灌浆3 d和9 d后籽粒淀粉合成差异表达基因的代谢图谱

Fig. 3 A pathway description of the differential expressed starch biosynthesis-related genes at 3 days post anthesis(DPA) and 9 DPA in spikelets

3 讨论与结论

水稻灌浆过程也是籽粒中淀粉累积的过程,本研究综合分析了水稻灌浆过程中淀粉合成相关基因的表达变化.从其表达模式和转录丰度可明显看出,第1类基因对籽粒淀粉合成和籽粒灌浆起了至关重要的作用.其中,*SUS2*、*SUS4* 基因编码蔗糖合成酶,催化蔗糖向 UDPG 的转化;*AGPS2*、*AGPL2*、*AGPL3* 基因编码 ADPG 焦磷酸化酶,催化 ADPG 的产生;*GBSS I*、*SS I*、*SS II a* 基因编码淀粉合成酶,*BE I*、*BE II b* 基因编码淀粉分支酶,*ISAI*、*ISA2*、*PUL* 基因编码淀粉脱支酶,共同催化直链淀粉和支链淀粉的合成.蔗糖合成酶、ADPG 焦磷酸化酶、淀粉合成酶协调作用是水稻灌浆过程中淀粉合成的主要途径.

在水稻灌浆的早期(3 d), 研究发现了较高的 *CIN2*、*SPS3* 等基因的转录丰度, 且随着灌浆的进行, 其表达下降. *CIN2* 基因编码细胞壁转化酶, 此酶在质外体水解蔗糖产生葡萄糖和果糖; *SPS3* 基因编码蔗

糖磷酸合成酶,此酶催化单糖合成蔗糖.葡萄糖和果糖对胚乳早期的发育非常重要,这些己糖分子可能具有双重功能:既可作为信号分子启动和维持胚乳细胞的分裂,又可被胚乳吸收后重新合成蔗糖,输向下游组织^[13-14],然后在一系列酶作用下用于初始淀粉粒的合成.

本研究分析了水稻灌浆不同时期籽粒中基因差异表达,检测到 20 个表达丰度上调和 12 个表达丰度下调的淀粉合成相关基因,对进一步了解籽粒灌浆生物学过程有重要的科学意义.

参考文献:

- [1] YOSHIDA S. Physiological aspects of grain yield [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1972, 23: 437-464.
- [2] YANG Jianchang, ZHANG Jianhua. Grain filling of cereals under soil drying [J]. New Phytol, 2006, 169(2): 223-236.
- [3] NAKAMURA Y, YUKI K, PARK S Y. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains [J]. Plant Cell Physiol, 1989, 30(6): 833-839.
- [4] NAKAMURA Y, YUKI K. Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during development of rice endosperm [J]. Plant Sci, 1992, 82(1): 15-20.
- [5] EMES M, BOWSHER C, HEDLEY C, et al. Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm [J]. J Exp Bot, 2003, 54(382): 569-575.
- [6] 夏斌, 郭涛, 王慧, 等. 水稻淀粉合成关键酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(22): 47-51.
- [7] TETLOW I, MORELL M, EMES M. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants [J]. J Exp Bot, 2004, 55(406): 2131-2145.
- [8] SAKAMOTO T, MATSUOKA M. Identifying and exploiting grain yield genes in rice [J]. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11(2): 209-214.
- [9] 韦克苏, 程方民, 董海涛, 等. 水稻胚乳贮藏物代谢相关基因响应花后高温胁迫的微阵列分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(1): 1-11.
- [10] KATO T, SHINMURA D, TANIGUCHI A. Activities of enzymes for sucrose-starch conversion in developing endosperm of rice and their association with grain filling in extra-heavy panicle types [J]. Plant Prod Sci, 2007, 10(4): 442-450.
- [11] HIROSE T, TERAOKA T. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Planta, 2004, 220(1): 9-16.
- [12] 黄卓烈. 生物化学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [13] WEBER H, BORISJUK L, WOBUS U. Sugar import and metabolism during seed development [J]. Trends Plant Sci, 1997, 2(5): 169-174.
- [14] STURM A, TANG Guoqing. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning [J]. Trends Plant Sci, 1999, 4(10): 401-407.

【责任编辑 李晓卉】