

2个籼稻低直链淀粉突变体淀粉合成关键酶分析

夏斌[†], 郭涛[†], 王慧, 刘永柱, 张建国, 陈志强
(华南农业大学, 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:对2个空间诱变低直链淀粉突变体 XLA-1 和 XLA-2 灌浆期籽粒4种淀粉合成关键酶 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)、可溶性淀粉合成酶(SSS)、颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)和淀粉分支酶(SBE)的活性进行了测定. 结果表明:原种籼小占与 XLA-1、XLA-2 的4种淀粉合成关键酶的变化趋势相似,但活性存在差别,除 SBE 外,原种籼小占的 AGPase、SSS 和 GBSS 的活性从整体趋势上都高于 XLA-1、XLA-2;在3个供试材料中,AGPase 和 SSS 的活性峰值均早于 GBSS、SBE;原种籼小占和 XLA-2 的直链淀粉积累与 GBSS 活性呈极显著正相关,而 XLA-1 的直链淀粉积累与 GBSS 的活性则呈显著相关;XLA-1 与 XLA-2 的 GBSS 活性及峰值日期存在明显差异,两者突变机理可能有所不同.

关键词:籼稻;空间诱变;低直链淀粉突变体;淀粉合成关键酶

中图分类号:S335

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2011)03-0010-04

Activity Assay of Grain Starch Synthesis Key Enzymes in Two Low Amylose Content Mutants from *Oryza indica*

XIA Bin[†], GUO Tao[†], WANG Hui, LIU Yong-zhu, ZHANG Jian-guo, CHEN Zhi-qiang

(National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The four key enzymes (ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), soluble starch synthase (SSS), granule bound starch synthase (GBSS) and starch branching enzyme (SBE) activity in the mutations XLA-1 and XLA-2 were assayed during the grain filling stages. The main results obtained as follows: There was a similar trend among the four key enzymes of starch synthesis in XLA-1, XLA-2 and control, but they had different activity. The activity of AGPase, SSS and GBSS in control were higher than that in XLA-1 and XLA-2, except SBE. In these tested materials, the peak activity of AGPase and SSS both expressed earlier than that of GBSS and SBE. There was a very significant positive relationship between the activity of GBSS and the accumulation of amylose in control and XLA-2, and a significant positive relationship between the activity of GBSS and the accumulation of amylose in XLA-1. There was an obvious difference in the activity of GBSS and the peak activity between XLA-1 and XLA-2.

Key words: *Oryza indica*; space mutation; low amylose content mutants; starch synthesis key enzymes

稻米淀粉是水稻 *Oryza sativa* 重要的营养成分, 其中直链淀粉是影响稻米品质的关键指标之一^[1]. 淀粉的生物合成过程是一个复杂的生化过程, 需要多个酶促反应才能完成. 研究表明, ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)、可溶性淀粉合成酶(SSS)、颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)和淀粉分支酶(SBE)是控

收稿日期:2010-12-01

作者简介:夏斌(1984—),男,硕士;郭涛(1978—),男,助理研究员,硕士;†对本文贡献相同;通信作者:陈志强(1956—),男,教授,E-mail:chenlin@scau.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金(10151064201000058);863计划项目(2007AA1F00101);国家科技支撑计划项目(2008BAD97B02);现代农业产业技术体系建设专项资金资助

制水稻淀粉合成代谢和影响淀粉品质的4个关键酶^[2]. 本研究对籼粘稻“籼小占”经空间诱变筛选出的2个低直链淀粉突变体 XLA-1 和 XLA-2 在籽粒灌浆过程中淀粉合成关键酶活性和淀粉合成积累动态差异进行了比较分析,旨在为深入了解其低直链淀粉突变特性提供一定理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

籼粘稻品系: 籼小占、XLA-1 和 XLA-2, 直链淀粉质量分数分别为: 28.01%、15.87% 和 14.88% (数据来源于 2010 年 8 月, 另文发表). XLA-1 和 XLA-2 是籼小占于 2003 年 10 月搭载返回式卫星, 2004 年在诱变二代 (SP₂) 中发现的 2 个低直链淀粉突变体. 上述品系均由国家植物航天育种工程技术研究中心提供.

1.2 方法

1.2.1 取材方法 在试验材料齐穗当日, 选择生长和开花基本一致的颖花挂牌标记, 开花后第 3 天开始第 1 次取样, 以后每 3 d 取样 1 次, 共取 10 次. 样品分为 2 组, 一组籽粒装入 50 mL 的离心管, 立即放入液氮速冻, 随后置于 -80 °C 冰箱保存, 用于酶活性测定; 另一组籽粒取回后首先经 108 °C 杀青 20 min, 然后置于 50 °C 烘箱中烘干, 用于淀粉分析.

1.2.2 粗酶液的提取 参照 Nakamura 等^[3]方法并适当改动, 步骤如下: 取样品籽粒 25 粒, 人工去壳, 剥出胚乳, 称质量. 置于预冷的研钵中, 加入 5 mL 预冷的提取液 (100 mmol/L Hepes-NaOH, pH7.5, 2 mmol/L EDTA, 8 mmol/L MgCl₂, 10 g/L PVP-40, 50 mmol/L 巯基乙醇, $\varphi = 12.5\%$ 的丙三醇), 冰浴研磨成均浆, 12 000 r/min 在 2 °C 下离心 30 min, 收集上清液即为粗酶液 1, 该粗酶液用于 AGPase 与 SSS 酶活性测定. 上述沉淀用 1 mL 提取介质洗涤 2 次, 然后将沉淀悬浮于 4 mL 提取介质中, 置于 4 °C 冰箱中 24 h, 离心, 重复 1 次, 加冰冻丙酮, 4 °C 下干燥, 干燥完毕后再加抽提液使沉淀悬浮, 该悬浮液为粗酶

液 2, 于 -20 °C 保存, 用于 GBSS 酶活性测定. 重复 3 次, 用 EXCEL 软件计算标准偏差值和平均值并作图, 用 SPSS16.0 软件进行相关性分析.

1.2.3 酶活性的测定 AGPase、SSS 和 GBSS 活性的测定按照 Nakamura 等^[2-3]方法进行测定; SBE 酶活性按照李太贵等^[4]的方法测定.

酶活性单位的定义: AGPase、SSS 和 GBSS 待测样品光密度每分钟增加 0.01 为 1 个酶活性单位 (U); SBE 酶活性以 0 时 $D_{660\text{ nm}}$ 为对照, t 时 $D_{660\text{ nm}}$ 下降百分率表示.

1.2.4 稻米直链淀粉、支链淀粉含量的测定 按照何照范^[5]的双波长法测定. 样品用乙醚脱脂后的米粉进行测定, 分别以纯的直链淀粉和纯的支链淀粉为标样. 直链淀粉测定波长为 660 nm, 参比波长为 436 nm; 支链淀粉测定波长为 540 nm, 参比波长为 748 nm.

2 结果与分析

2.1 直链淀粉与支链淀粉形成积累的动态变化

以供试材料籽粒发育各时期的直链淀粉、支链淀粉平均值做动态图, 从图 1 可知, 在籽粒发育成熟整个过程中, 籼小占直链淀粉的整体变化趋势都高于 XLA-1 和 XLA-2. 随着开花时间延长, 直链淀粉的积累呈线性增长, 12 ~ 18 d 之间达到峰值, 籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的直链淀粉质量分数分别为 25.34%、14.21% 和 13.67%, 随后逐渐稳定在峰值的水平; 支链淀粉积累比直链淀粉优先, 在开花后第 9 天, 籼小占的支链淀粉质量分数为 42.5%, 直链淀粉质量分数仅为 18.2%, XLA-1 与 XLA-2 的结果相似. 支链淀粉含量的峰值在开花后第 9 ~ 15 天之间出现, 籼小占的支链淀粉质量分数为 44.97%, XLA-1 和 XLA-2 分别为 58.92% 和 52.56%, 随后逐渐稳定, 总体来说 XLA-1 和 XLA-2 的支链淀粉质量分数都较籼小占高 10% ~ 20%. 由此可见, XLA-1、XLA-2 和籼小占的淀粉差异主要表现在直链淀粉和支链淀粉相对积累比率上.

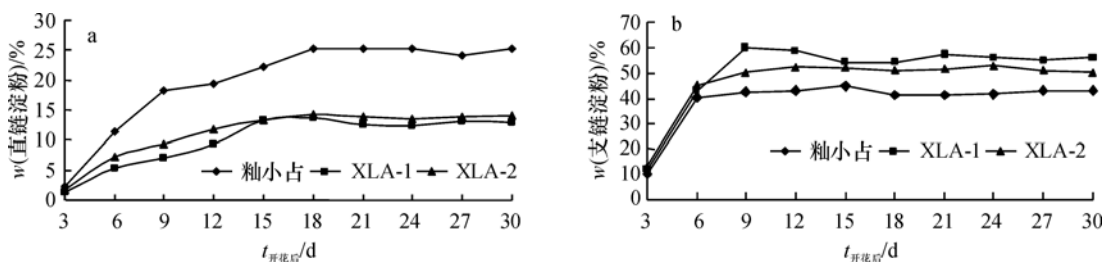


图 1 直链淀粉和支链淀粉形成积累动态

Fig. 1 The forming and accumulation of amylose and amylopectin

2.2 AGPase 活性变化

AGPase 活性在籼小占中的变化趋势与 XLA-1、XLA-2 基本相同,均呈单峰曲线变化(图 2),但籼小占 AGPase 活性峰值明显大于 XLA-1、XLA-2. 籼小占的 AGPase 活性最大值出现在开花后第 12 天,为 $2.2 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; XLA-1、XLA-2 则出现在开花后第 9 天,分别为 1.27 和 $1.17 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,之后随时间推移其活性逐步降低. 在水稻胚乳中,AGPase 的活性与淀粉积累速率一致,与籽粒灌浆速率显著相关^[6],说明籼小占灌浆速率和灌浆时间均高于 XLA-1、XLA-2,可为随后的淀粉合成提供较为充足的底物.

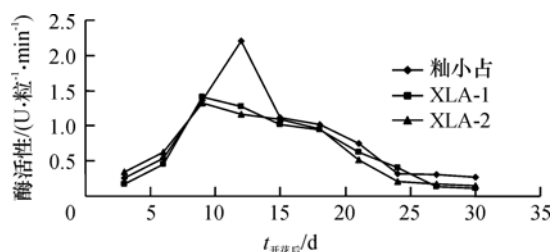


图 2 籽粒灌浆过程中 AGPase 活性的变化

Fig. 2 Change of AGPase activity in filling rice grain

2.3 SSS 与 GBSS 的活性变化

籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的 SSS 活性呈单峰曲线变化(图 3),但三者 SSS 活性表达有差异. 籼小占的 SSS 活性峰值出现在开花后第 6 天,活性为 $5.7 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; XLA-1 与 XLA-2 在开花后第 9 天达到峰值,活性分别为 3.6 和 $3.1 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. 比较籼小占与 XLA-1、XLA-2 的 SSS 活性变化可发现,籼小占的 SSS 比 XLA-1、XLA-2 表达早,且活性显著高于突变体. 前人研究表明,SSS 与支链淀粉合成相关^[7],本研究中籼小占 SSS 活性在灌浆前期较强,而其支链淀粉积累反而落后于 2 个突变体,可推测支链淀粉的合成还与其他酶的活性相关.

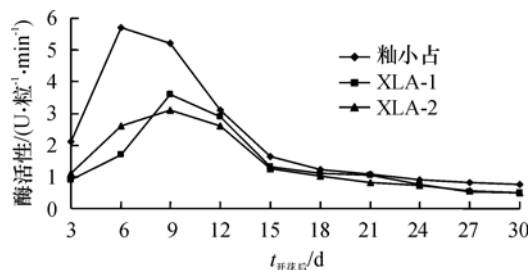


图 3 籽粒灌浆过程中 SSS 活性的变化

Fig. 3 Change of SSS activity in filling rice grain

由图 4 可知,籼小占的 GBSS 活性在开花后第 18 天达到峰值 $6.8 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,XLA-1 的 GBSS

活性峰值出现在开花后第 15 天,其活性为 $6.1 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,XLA-2 出现在第 18 天,活性为 $4.6 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. 前人研究表明,GBSS 活性与直链淀粉合成高度相关^[8],籼小占从灌浆前期到灌浆后期的 GBSS 活性表达始终高于 XLA-1 与 XLA-2,故其最终直链淀粉含量明显高于突变体. 在整个灌浆期,XLA-1 的 GBSS 活性仅次于籼小占(相差不超过 $0.7 \text{ U} \cdot \text{粒}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),基本上高于 XLA-2 的 GBSS 活性,但其最终直链淀粉含量与 XLA-2 接近,由此推测 2 个突变体低直链淀粉的形成机制有所不同.

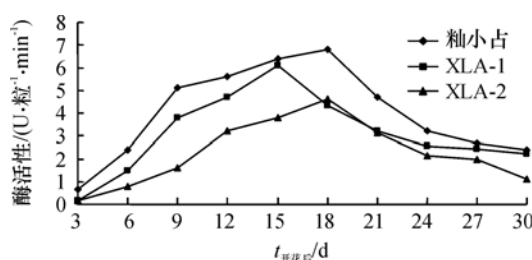


图 4 籽粒灌浆过程中 GBSS 活性的变化

Fig. 4 Change of GBSS activity in filling rice grain

2.4 SBE 的活性变化

由图 5 可知,在籽粒发育过程中,籼小占的 SBE 活性的变化趋势总体上低于突变体 XLA-1, XLA-1 一直维持在比较高的水平,且在开花后第 24 天有增高的现象;XLA-2 与原种的 SBE 活性表达相近,两者均低于 XLA-1. 籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的 SBE 活性都在开花后第 15 天达到峰值,其活性分别为 27.75% 、 35.79% 和 32.11% . SBE 催化 $\alpha-1,6$ 糖苷键的形成,与 SSS 共同作用,形成支链淀粉^[9],由 SBE 的活性变化可推测,在籽粒灌浆前期,突变体 XLA-1 和 XLA-2 支链淀粉积累速率高于原种籼小占.

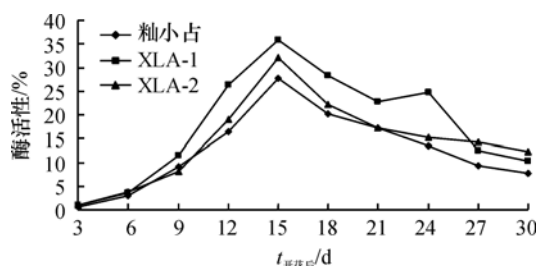


图 5 籽粒灌浆过程中 SBE 活性的变化

Fig. 5 Change of SBE activity in filling rice grain

2.5 4 种酶活性与直链淀粉形成的相关性

AGPase、SSS 和 SBE 的活性变化与供试材料间的直链淀粉合成的关系不明显,而 GBSS 与直链淀粉的形成有相关性. 籼小占和 XLA-2 的直链淀粉积累的含量与 GBSS 的活性呈极显著正相关,相关系数 (r) 分别为 0.989^{**} 和 0.943^{**} ;而 XLA-1 的直链淀

粉积累含量与 GBSS 的活性则呈显著相关, $r = 0.903^*$. 这证实了 GBSS 在直链淀粉合成中的重要作用.

3 讨论

关于水稻籽粒灌浆结实过程中淀粉合成关键酶活性与淀粉积累的关系, 前人的研究表明, AGPase、SSS、GBSS 和 SBE 对淀粉生物合成和积累作用较大^[2,10]. 本研究以籼小占和 2 个低直链淀粉突变体 XLA-1、XLA-2 为材料, 通过对其直链淀粉、支链淀粉含量在籽粒灌浆过程中的变化及淀粉合成关键酶之间关系的差异分析, 发现在灌浆期间原种籼小占与 XLA-1、XLA-2 的 4 种淀粉合成关键酶的变化趋势相似, 但活性存在差别. AGPase、SSS、GBSS、SBE 的活性变化都呈单峰曲线变化, 同一种材料中不同酶活性的峰值表达次序存在差异: 籼小占中, 上述酶的峰值表达顺序为 SSS→AGPase→SBE→GBSS; 而 XLA-1 为 SSS、AGPase→GBSS、SBE; XLA-2 为 SSS、AGPase→SBE→GBSS. 金正勋等^[11] 研究表明, 灌浆前期 AGPase 和 SBE 活性高, 不利于形成蒸煮食味品质优良的稻米; 灌浆中后期 AGPase 和 SBE 活性高, 有利于形成蒸煮食味品质优良的稻米. 本研究结果表明, 在 3 个供试材料中, AGPase 和 SSS 的活性表达早于 GBSS 和 SBE; 除 SBE 外, 籼小占的 AGPase、SSS、GBSS 的活性从整体趋势上都高于 XLA-1、XLA-2. AGPase 是淀粉生物合成途径中的限速酶, 负责底物供应, Smith 等^[12] 认为 AGPase 是控制贮藏器官中淀粉积累的关键酶, 籼小占的 AGPase 峰值活性较 XLA-1、XLA-2 高, 其灌浆速率和底物供应比较充足, 有较强的淀粉合成能力; 彭佶松等^[13] 研究指出 SSS 对籽粒淀粉中直链淀粉与支链淀粉的比率有一定的影响, 本研究供试材料 SSS 活性在籽粒发育早期较高, GBSS 和 SBE 活性在灌浆初期较低, 表明在水稻灌浆的起始阶段, SSS 在籽粒淀粉合成代谢起相对重要的作用.

Smith 等^[12] 的研究指出, GBSS 的活性与直链淀粉合成密切相关. Wang 等^[14] 报道指出, 水稻籽粒的直链淀粉含量随 GBSS 基因拷贝数增加而线性增加. 在本研究中, AGPase、SSS 和 SBE 的活性变化与供试材料间的直链淀粉合成的关系不明显, 而 GBSS 与直链淀粉的形成有显著相关. 这也证实了 GBSS 在直链淀粉合成中的重要作用.

已有报道表明水稻 SBE 基因突变将导致直链淀粉含量显著变化^[15]. 本研究中 XLA-1 的 GBSS 活性与原种相近, 但 SBE 活性始终高于原种籼小占, 说明在籽粒灌浆中 XLA-1 支链淀粉合成能力比籼小占

强, 因此可推测导致 XLA-1 直链淀粉下降的原因可能是 SBE 的活性较高导致其支链淀粉含量增加, 直链淀粉含量下降; XLA-2 GBSS 活性低于籼小占和 XLA-1, 故其最终直链淀粉含量低于两者.

前期遗传分析表明, XLA-1 存在非 W_x 基因控制其直链淀粉的含量^[16]. 此非 W_x 因子可能是 SBE 的活性调节因子, 通过影响 SBE 的活性而间接调节直链淀粉的合成; XLA-2 受 W_x 复等位基因控制, 该复等位基因可能编码活性较低的 GBSS 同工酶, 导致其直链淀粉合成下降.

水稻籽粒灌浆结实期间淀粉合成关键酶对稻米直链淀粉、支链淀粉的含量及比率有着显著的影响^[17]. 以往的研究多以常规品种或不同类型的品种以及转基因品种为主^[3,18-19], 通过诱变得到低直链淀粉含量差异极为显著的材料作为研究对象则较鲜见. 对低直链淀粉突变体在籽粒灌浆过程中淀粉合成关键酶活性差异进行分析, 有助于深入了解淀粉合成的调控机理, 为研究和利用低直链淀粉突变体提供理论依据.

参考文献:

- [1] TAN Y, CORKE H. Factor analysis of physicochemical properties of 63 rice varieties [J]. *Food Agric*, 2002, 82: 745-752.
- [2] NAKAMURA Y, YUKI K. Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm [J]. *Plant Sci*, 1992, 82: 15-20.
- [3] NAKAMURA Y, YUKI K, PARK S, et al. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains [J]. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30(6): 833-839.
- [4] 李太贵, 沈波, 陈能, 等. 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.
- [5] 何照范. 粮油籽粒品质及其分析技术 [M]. 北京: 农业出版社, 1985: 290-294.
- [6] GREENE T W. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, a ratelimiting step in starch biosynthesis [J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 103(4): 574-580.
- [7] CRAIG J, LLOYD J R, TOMLINSON K, et al. Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 413-426.
- [8] SANO Y. Gene regulation at the waxy locus in rice [J]. *Gamma Field Symp*, 1985, 24: 63-77.
- [9] KOUICHI M, KOJI K, YUJI A, et al. Starchbranching enzymes from immature rice seeds [J]. *Biochem*, 1992, 112: 643-651.
- [10] 潘晓华, 李木英, 曹黎明, 等. 水稻发育胚乳中淀粉的积累及淀粉合成的酶活性变化 [J]. *江西农业大学学报*, 1999, 21(4): 456-462.