植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (6): 741–752, www.chinbullbotany.com

·专题介绍·

稻米淀粉品质形成的关键酶及其分子生物学研究进展

王忠华[1, 2*], 俞挺捷[1]

[1] 浙江万里学院生物技术研究所, 宁波 315100

[2] 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029

摘要 稻米淀粉的形成是影响水稻产量和品质的决定性因素之一。因此, 开展稻米淀粉形成过程中所涉及关键酶的研究是非常必要的。随着分子生物学技术的快速发展, 有关稻米淀粉品质的研究也越来越深入, 并取得了较大进展。该文对水稻淀粉品质形成过程中的关键酶及其分子生物学研究进展进行了较为详尽的综述, 主要包括ADP葡萄糖焦磷酸化酶、淀粉合成酶、淀粉分支酶和淀粉去分支酶等, 并对该领域的发展趋势进行了展望。

关键词 基因克隆, 基因表达, 关键酶, 稻米淀粉品质

王忠华, 俞挺捷 (2008). **稻米淀粉品质形成的关键酶及其分子生物学研究进展**. **植物学通报 25**, 741–752.

水稻(*Oryza sativa*)是世界上最重要的粮食作物之一, 世界上大约有一半以上的人口以稻米为主食, 因此各国科学家纷纷开展对稻米品质形成机理方面的研究。由于稻米淀粉是精米的主要成分, 稻米品质性状的形成实质上可看作是籽粒中淀粉生物合成和积累的过程(蔡一霞等, 2004), 而这一过程发生在稻米淀粉体中, 并在一系列酶的催化作用下形成(图 1)。根据已有的研究来看, 籽粒淀粉形成过程中, 蔗糖合成酶(sucrose synthase, SS)、ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPP 或 AGPase)、淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE)、淀粉去分支酶(starch debranching enzyme, SDBE)、淀粉粒结合型淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)和可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase, SSS)等与稻米品质的关系十分密切, 其中淀粉分支酶是水稻胚乳淀粉生物合成的关键酶, 它可催化 α-1, 6 葡萄糖苷键的形成, 在直链上产生分支而形成支链淀粉(Nakamura and Yuki, 1992; Nakamura et al., 1992b; 包劲松和夏英武, 1999; 张峰等, 2001; 蔡一霞等, 2004; Tetlow et al., 2004; 刘奇华等, 2006; 张海艳等, 2006)。近年来的研究发现, 淀粉去分支酶在淀粉颗粒形成中具有重要的作用, 正常支链淀粉的分支模式是SBE和SDBE平衡作用的结果, 植物糖原是在SDBE缺失或活性降低的情况下, 只通过SBE催化作用而形成的(Nakamura et al., 1996a, 1996b; 钟海明等, 2007)。

本文对水稻淀粉生物合成和积累过程中的几个关键酶及其分子生物学研究的最新进展进行综述, 以期为稻米品质的进一步改良提供参考。

1 与淀粉合成相关的关键酶

1.1 ADP葡萄糖焦磷酸化酶

ADP葡萄糖焦磷酸化酶(AGPP)是淀粉合成途径中被最为广泛鉴定的酶, 又称为AGP合成酶(全称为Glu-1-P腺基转移酶, glucose-1-phosphate adenylytransferase)、ADP葡萄糖合成酶(ADP-glucose synthase)或ADP葡萄糖二磷酸化酶(ADP-glucose diphosphorylase)。它催化G-1-P(葡萄糖1-磷酸)和ATP形成焦磷酸和ADP葡萄糖(ADP-glucose, ADPG)。AGPP是一个异源四聚体, 由2个大亚基和2个小亚基组成, 它是一个变构调节酶, 受3-磷酸甘油的正向激活和无机磷酸的负向抑制(Preiss and Sivak, 1998)。Anderson等

收稿日期: 2007-12-12; **接受日期**: 2008-02-29

基金项目: 国家自然科学基金(No.30671284)和浙江省重大科技专项(No.2004C12020-3)

* **通讯作者**。E-mail: wang1972@zwu.edu.cn

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

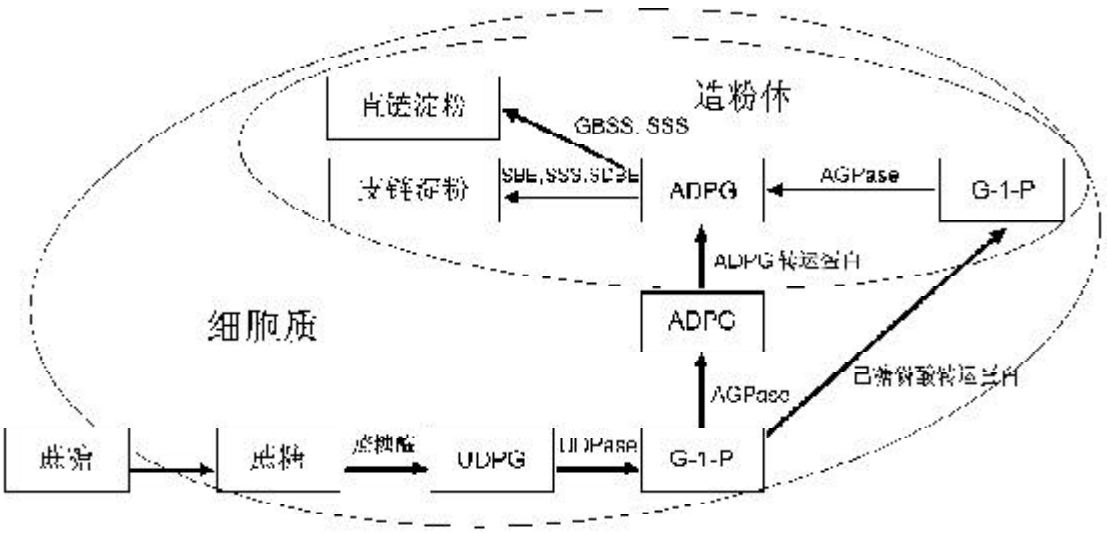

图 1 淀粉生物合成的主要途径

ADPG: 腺苷二磷酸葡萄糖; UDPG: 尿苷二磷酸葡萄糖; G-1-P: 葡萄糖-1-磷酸; AGPase: ADP-葡萄糖焦磷酸化酶; UDPase: UDP-葡萄糖焦磷酸化酶; GBSS: 淀粉粒结合型淀粉合成酶; SSS: 可溶性淀粉合成酶; SBE: 淀粉分支酶; SDBE: 淀粉去分支酶

Figure 1 Major ways to starch bio-synthesis

ADPG: Adenosine diphosphate glucose; UDPG: Uridine diphosphate glucose; G-1-P: Glucose-1-phosphate; AGPase: ADP-glucose pyrophosphorylase; UDPase: UDP-glucose pyrophosrylase; GBSS: Granule-bound starch synthase; SSS: Soluble starch synthase; SBE: Starch branching enzyme; SDBE: Starch debranching enzyme

(1989)研究发现, 在水稻胚乳中, 该酶的活性与淀粉积累量呈正相关。它还与籽粒灌浆速率具有相关性(潘晓华等, 1999; 杨建昌等, 2001), 是淀粉合成的限速酶, 并负责将其从细胞质转移到造粉体中(Greene and Hannah, 1998), 但不影响淀粉的结构(朱昌兰等, 2002)。Krishnan 等(1986)对水稻叶片中的 AGPP 进行了免疫学分析, 结果表明叶片中 AGPP 是由 2 个不同的亚基(43 kDa 和 46 kDa)组成, 而水稻胚中则只由 1 个亚基(50 kDa)组成, 表明水稻叶片和胚乳中 AGPP 亚基的数量和大小是不同的。

1.2 淀粉合成酶

淀粉合成酶是一个葡萄糖转移酶, 它以寡聚糖为前体, ADPG 为底物, 通过 α-1, 4 糖苷键不断增加寡聚糖的葡萄糖单位, 最终形成 α-1, 4 糖苷键连接的聚糖, 聚糖又作为淀粉分支酶的底物合成支链淀粉。依据它在淀粉体中存在的状态, 淀粉合成酶可分为颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)和可溶性淀粉合成酶(SSS)(Foster, 1996)。

GBSS 又称为 ADP-Glu-淀粉葡萄糖基转移酶(ADP-glucose-starch glucosyl-transferase), 催化 ADP-Glu$^+$\{(1,4)-α-D-glucose\}(N)为 ADP+\{(1,4)-α-D glucose\} (N+1), 是直链淀粉合成过程中起主要作用的酶, 由蜡质基因 *Wx* 位点控制, 该位点的基因表达产物(Wx 蛋白)的分子量为 60 kDa 左右, 其紧密结合在淀粉粒上。据 Takeda 和 Hizukuri (1987)报道, 与正常野生型水稻相比, 缺失 GBSS 的水稻胚乳中不含直链淀粉。此外, GBSS 不仅涉及直链淀粉的合成, 而且还与分离的淀粉颗粒中支链淀粉分支的延长有关(Denyer et al., 1996), 但GBSS在正常淀粉粒支链淀粉的延长中的确切作用尚不清楚。

可溶性淀粉合成酶是另一大类淀粉合成酶, 它包括除 GBSS 以外的所有淀粉合成酶, 其同工酶种类很多, 根据其氨基酸序列可分为 4 种: SSSI、SSSII、SSSIII

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

和 SSSIV(Dian et al., 2005; Fujita et al., 2007)。有关这些同工酶在淀粉合成中的作用研究都是来源于缺失某一同工型的突变体或转基因植物, 而这些不同表现型的植株似乎表明: 每种同工型SSS在支链淀粉合成中发挥着特定的作用。如 SSSII 形式的缺失导致支链淀粉中间长度的链减少, 短链增加, 表明 SSSII 在中间长度链的合成中有专一作用, 而其它同工型酶不能互补这种缺失作用(Craig et al., 1998)。目前每种同工型的可溶性淀粉合成酶在淀粉合成过程中的确切作用仍不清楚。Jiang 等(2004)研究发现水稻 SSSII 由 SSSII-1、SSSII-2 和 SSSII-3 三部分组成, 三者的序列同源性为 51%-64%, 与玉米(*Zea mays*)、豌豆(*Pisum sativum*)、小麦(*Triticum aestivum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*)相比, 具有 53%-73% 的同源性。另外, 他们还发现水稻 SSSII 蛋白包括 1 个淀粉合成酶的保守区域。

1.3 淀粉分支酶

淀粉分支酶(SBE)又称 Q 酶, 在支链淀粉结构形成中有重要的作用, 催化 α-1, 6 糖苷键的形成, 并与可溶性淀粉合成酶共同作用, 形成支链淀粉(Burton et al., 1995; Smith et al., 1995)。SBE 在植物器官中含有多个同工酶(Martin and Smith, 1995)。Mizuno 等(1992) 从未成熟水稻种子中分离到 4 种形式的淀粉分支酶, 分别称之为 RBE1、RBE2 (RBE2A 和 RBE2B 的混合物)、RBE3 和 RBE4。其中 RBE1、RBE2A 和 RBE2B 是主要类型, 但它们的分子量大小、N-末端氨基酸序列以及与抗玉米分支酶(BE2I)的抗体免疫反应等都是相同的, 只是 RBE2A 的分子量比 RBE1 和 RBE2B 略大, 表明它们是相同的淀粉分支酶类型, 因此统称为 BE2I。Nakamura 和 Yuki(1992)也从发育的水稻种子中纯化到 2 个淀粉分支酶同工酶: QE2I 和 QE2II, 分子量分别为 80 kDa 和 85 kDa。从蛋白酶解图谱和 Western 杂交结果可以看出, QE2I 和 QE2II 是由不同基因编码的产物。Mizuno 等(1993)和 Kim 等(1998)对直链淀粉扩展突变体(*amylose extender*, *ae*)进行了研究, 结果表明该突变体缺乏 87 kDa RBE3 同工酶活性, 而 GBSS 和 RBE1 同工型则没有改变。分离出 RBE3 cDNA, 其编码氨基酸序列分析表明该蛋白最初是一个825个氨基酸的前体, 其 N-末端包含一段 65 个残基的转运多肽。RBE3 和 RBE1 有许多序列是相同的, 特别是蛋白质分子中心区域。但 RBE3 N-末端拥有一段 70 个氨基酸残基的序列, 并在 C-末端与 RBE1 相比缺少一段约 50 个氨基酸的序列, 这种两末端结构上的差异也许可以解释 RBE1 和 RBE3 在淀粉合成中的功能差异, 即 RBE3 主要抑制支链淀粉长链 B 的增加。Nishi 等(2001)发现水稻 *ae* 突变体 RBE2B 的活性大大降低, 导致胚乳中支链淀粉的结构发生改变, 而 RBE1、RBE2A 等酶的活性未受影响。由此表明, RBE2B 的功能不能由 RBE1 和 RBE2A 来补偿, 并且 RBE2B 在短链转移中有特殊的功能。RBE2B 活性随显性位点数量的增加而呈直线增加, 这种基因的剂量效应可用来解释 RBE2B 蛋白水平对支链淀粉中短链比例的变化和淀粉含量及在尿素溶液中淀粉糊化性状的影响, 同时对粒重也存在剂量效应。RBE1的最适底物为直链淀粉和具有很少分支的多聚糖, 而RBE2对支链淀粉和高度分支的葡聚糖有较高的亲和力, 这表明 RBE1 和 RBE2 在支链淀粉分子的构建中可能发挥着不同的作用。

Martin和Smith(1995)以及Smith等(1995)认为, 同工型淀粉分支酶在结构和功能上的差异决定了支链淀粉簇状结构内部分支模式和链长的分配。根据淀粉分支酶作用的底物和形成的分支链长可将同工型分为 BEI (SBEB, B 型)和 BEII(SBEA, A 型)。A 型偏向于短的葡萄糖苷链, 而 B 型偏向于长的葡萄糖苷链(Guan and Preiss, 1993)。B 型淀粉分支酶优先催化直链淀粉形成分支, 在体内参与较长链和中等长度链的合成。对 B 型进行负调控或使其活性丧失, 对淀粉合成和组成的影响很小, 说明 B 型 SBE 在淀粉合成中的作用很小, 可能对 A 型起适当的补偿作用。

杨建昌等(2001)的研究结果表明, 水稻籽粒中3个酶(ADPG 焦磷酸化酶、淀粉合成酶和淀粉分支酶)的活性变化与籽粒灌浆动态相关联, 尤以 Q 酶的相关值最大, 对籽粒灌浆起着关键的调控作用。李太贵等(1997)认为高温下早籼形成以腹白为主的垩白, 主要是由于包括 Q

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

酶在内的酶的绝对或相对缺乏引起的, 而糖源不足可能不是主要原因。Nakamura 和 Yuki(1992)对 Q 酶进行了较为系统的研究, 认为各种淀粉分支酶活性平衡点的变化改变了多聚葡萄糖的结构和颗粒形状, 从而影响稻米的品质。

1.4 淀粉去分支酶

淀粉去分支酶(starch debranching enzyme, DBE)是水解 α-1, 6 糖苷键的酶。近年来, DBE 在支链淀粉结构形成中的作用越来越受到关注。Ball 等(1996)提出了“Glucan trimming” 模型, 并以此模型解释了 DBE 在淀粉合成中的作用。他们认为 SBE 催化生成的支链淀粉分支是松散的, 而 DBE 的作用是剪切掉分支松散的糖链, 抑制糖原的合成, 并留下紧密分布的分支。依据其作用底物的不同, 去分支酶可分为异淀粉酶(isoamylase, ISA)和支链淀粉酶(pullulanase) 2 种。其中支链淀粉酶又称为 R 酶、普鲁兰酶、α- 限制性糊精酶或限糊精酶, 它催化水解支链淀粉的 α-1, 6 分支; 而异淀粉酶催化水解糖原的 α-1, 6 分支, 但不能水解支链淀粉的 α-1, 6分支(Nakamura et al., 1996a; Kubo et al., 1999; David et al., 2000)。

到目前为止, 有关淀粉去分支酶在支链淀粉合成中的作用有 2 种假说。第 1 种是以 Erlander(1970)为代表, 认为植物糖原是支链淀粉合成的中间产物, 经过去分支酶的作用形成支链淀粉; 第 2 种是以 Nakamura 等(1992a)和 Nakamura(1996)为代表, 认为分支酶和去分支酶这 2 种酶的活性平衡对 α-1, 6 分支的频率或支链淀粉的 α-1, 4 侧链的链长分配具有重要的决定作用。这 2 种假说都各有欠缺, 还有待于进一步研究论证。因此, 支链淀粉的合成和淀粉颗粒的形成是一个复杂且可调节的过程, 它是 SS、SBE 以及淀粉其它代谢酶共同作用的结果。

2 与淀粉合成相关的关键酶基因

前面已经提到, 稻米中的淀粉分为直链淀粉和支链淀粉, 两者的含量比例直接影响淀粉粒的结构和稻米品质。稻米淀粉主要在淀粉体中合成, 并受到一系列关键性酶的调控。这些酶包括 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶、颗粒结合型淀粉合成酶、可溶性淀粉合成酶、淀粉分支酶和淀粉去分支酶。目前普遍认为编码后 4 种酶的基因与稻米淀粉品质关系密切(Smith et al., 1997)。下面分别阐述这 5 种关键酶相关基因的克隆、分子特性及其表达调控的研究进展。

2.1 ADP葡萄糖焦磷酸化酶基因

Krishnan 等(1986)用水稻 *AGPP* cDNA 作探针进行 Northern 杂交, 结果显示叶片的 *AGPP* mRNA (2.1 kb) 比胚乳组织的(1.9 kb)稍大一点, 由此表明水稻胚乳和叶片 *AGPP* 都是组织特异性表达的。对水稻基因组进行 Southern 分析, 结果表明水稻 *AGPP* 基因至少存在 3 个拷贝。因此, AGPP 是由一个小的基因家族编码的。从限制性酶切片段差异而言, 此家族至少可分为 2 类。Nakamura(1992)从水稻发育胚乳中鉴定出 6 个 AGPP 多肽, 分子量皆为 50 kDa 左右。研究结果还表明水稻胚乳AGPP是由具有相似氨基酸结构的亚基组成的四聚体, 它可能是一个多基因家族编码的产物, 这些不同形式的AGPP在水稻胚乳淀粉积累过程中可能起到不同的作用。Anderson 等(1991)也分离到水稻胚乳特异性表达的 AGPP, 并对其基因序列结构进行了分析, 结果发现在 6 kb 的序列中有 10 个外显子和 9 个内含子。他们还对水稻种子发育的基因表达模式进行了分析, 结果表明 *AGPP* 的mRNA转录物在开花后15天达到最高水平, 与此时淀粉积累速率最高的现象相吻合(Anderson et al., 1991)。这也证明基因表达限制了淀粉积累速率, 而且AGPP是同时通过种子发育过程中转录水平调控和酶水平的变构来调控淀粉合成的。

2.2 颗粒结合型淀粉合成酶基因

颗粒结合型淀粉合成酶(GBSS)催化合成直链淀粉, 而 *Wx* 基因通过编码 GBSS 来控制直链淀粉含量, 后者是决定稻米蒸煮食味品质的主要因素(Aryes et al., 1997; 包劲松等, 1999; 吕英海和李建粤, 2005; 孙业盈等, 2005)。水稻 *Wx* 基因首先由 Okagaki 和 Wessler(1988)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

克隆, 随后 Wang 等(1990)报道了 *Wx* 基因的核苷酸序列。Hirano 和 Sano(1991)利用玉米 Wx^+DNA 克隆了水稻 Wx^+基因, 并制备了水稻 Wx^+蛋白的抗血清, 研究发现 Wx^+ 基因由许多外显子和内含子组成。推测的氨基酸序列表明 Wx^+ 多肽由 1 个含 77 个氨基酸残基的转运多肽和 1 个含 532 个氨基酸残基的成熟蛋白组成。Wx^+ 基因的表达调控是组织和发育时期专一性的, Northern 杂交显示 Wx^+基因在授粉后 13-18 天表达量最高, 此后则几乎不再表达。

Wang等(1995)研究发现, 在直链淀粉含量高的水稻品种未成熟种子中, *Wx* 基因只有一种分子量为 2.3 kb 的成熟转录物; 而在直链淀粉含量中等或偏低的水稻品种的未成熟种子中, *Wx*基因除了成熟转录物外, 还有一个分子量为3.3 kb的含有第1内含子的前体mRNA。而在糯稻品种中由于无直链淀粉, 未观察到 *Wx* 基因的 mRNA 转录本。Cai 等(1998)通过 RT-PCR 和 DNA 测序分析发现, 不同水稻品种中 *Wx* 基因第 1 内含子存在多种剪接位点, 这些不正常的剪接现象说明在剪接过程中发生了故障, 因而影响剪接效率。对 *Wx* 基因第 1 内含子的 5′供体旁邻顺序进行分析, 结果表明第1类(直链淀粉含量高的水稻)品种中第1外显子和第1内含子连接处是G(CAAGgtat), 第2类(直链淀粉含量中等或偏低水稻)品种中则是A(CAAgttat)。第 1 内含子被剪接后, 在第 2 类水稻品种的第 1 外显子和第 2 外显子连接处产生了一个新的起始密码子AUG, 而它的开放阅读框与编码区中正常起始密码子的不一致。该单核苷酸多态性(SNP)可以解释 89 个非糯品种的 79.7% 的表观直链淀粉含量变异(Ayres et al., 1997)。上述研究表明, 不同水稻品种中胚乳直链淀粉含量受 *Wx* 基因转录后加工, 尤其是第 1 内含子从前体 mRNA 的切除效率的调控。Bligh 等(1995)在 Wang 等(1990)发表的 *Wx* 核苷酸序列中发现了位于前导内含子剪切点上游 55 bp 处的一段 CT 微卫星序列(microsatellite)。他们设计了 1 对引物 “484/485”, 对该 CT 重复序列进行 PCR 扩增, 在不同水稻品种中共发现 6 种(CT)n 多态性。Ayres 等(1997) 用该引物对近 80 年来育成的 92 个美国水稻品种 *Wx* 位点上(CT)n的多态性进行了分析, 以研究现代美国水稻品种中 *Wx* 基因的来源和谱系。在这 92 个品种中, 他们共检测到8种(CT)n多态性, 并发现(CT)n标记和直链淀粉含量存在显著相关性, 微卫星等位基因可以解释非糯品种中 82.9% 的表观直链淀粉含量变异。四川农业大学万映秀等(2006)利用微卫星标记 RM190 和 484/W2R2ACCI 标记分析了 50 个水稻非糯品种 *Wx* 基因的等位性变异, 结果发现这 2 个标记可将供试材料划分为 10 种等位基因变异类型。进一步分析结果表明, RM190 揭示的 *Wx* 基因多态性可以解释直链淀粉含量变异的59.3%; 484/W2R2ACCI揭示的 *Wx* 基因多态性可以分别解释直链淀粉含量及胶稠度变异的 56.1% 和 24.6%; 而 2 个标记共同可解释直链淀粉含量变异的 72.4%。

Shimada 等(1993)分离出水稻 *Wx* 基因外显子 4 和外显子 9 之间的一个 1.0 kb 片段, 使之与 PBI221 质粒的 CaMV 35S 启动子和 *GUS* 基因反向连接后再用电击法导入水稻原生质体中, 结果发现在愈伤组织中即可检测到 GUS 活性, 由此表明融合基因反义部分也获得表达。另外, 他们还发现再生的转基因水稻植株中也检测到GUS活性, 并产生了几个水稻种子直链淀粉含量明显减少的植株。即使是四倍体, 直链淀粉含量还有轻微下降, 这说明即使内含子序列包含在内, 反义基因也能使目标基因的表达水平下降。此外, 人们还发现水稻 *Wx* 基因在胚乳、花粉、胚囊和糊粉层中都能表达, 且低温对其表达有促进作用(Umemoto et al., 1995)。陈丽等(1997, 1999)依据反式作用原理初步探讨了 *Wx* 基因的特异性表达机理, 结果在其 5′ 非编码区发现许多顺式作用元件, 并分离了与之结合的核调控蛋白。他们在 5′端上游找到1个增强 *Wx* 基因表达的区段(-861 bp--640 bp), 它包含 5 段与核蛋白因子结合的序列, 即 Hinfla-2、Hinflc-1、Hinflc-2、Hinfld 和 Rsale, 其中后两者的重叠序列为 AACGT, 而 1 个含 AACGT 3 次重复的区段(-839 bp--809 bp)即为 *Wx* 基因的顺式作用元件, 随后他们还利用该顺式元件构建“鱼饵”质粒, 通过酵母单杂交的方法从水稻 cDNA 文库中筛选到 13 个核蛋白基因的阳性克隆。唐威华等(2000)又分离并纯化出 1 个与富含AT的DNA区段相结合的HMG(high mobility group

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

protein)型核蛋白。

已有研究证明，水稻 *Wx* 基因的转录能力与 Wx 蛋白含量及直链淀粉含量关系密切。Wang 等(1995)发现 *Wx* 基因有 2 种转录本，其片段大小分别为 2.3 kb 和 3.3 kb。据此将 *Wx* 基因转录本分为 3 种类型：① 高直链淀粉含量的籼稻品种产生成熟的 2.3 kb mRNA；② 中、低等直链淀粉含量的籼、粳稻品种除产生 2.3 kb mRNA 外，还产生第 1 内含子未被切除的 3.3 kb 的前体 mRNA；③ 糯稻只产生痕量 3.3 kb 的前体 mRNA。然而，葛鸿飞等(2000)研究发现，糯稻也具有从转录本中剪接第 1 内含子的正常能力，其缺乏直链淀粉是由于第 1 内含子中某些碱基发生突变的结果。这与 Isshiki 等(2000) 的报道一致，即 *Wx* 基因第 1 内含子 5'端保守序列中的 GT 突变成 TT 是造成中、低等直链淀粉含量品种的 *Wx* 基因第 1 内含子剪接效率低的原因。

为了深入探讨 *Wx* 基因的表达调控机理，人们对降低水稻直链淀粉含量的 *dull* 突变基因如何抑制基因的表达进行了研究。目前已发现 9 种不同的水稻 *du* 基因，已经定位的都不在第 6 染色体上(*Wx* 基因所在的染色体)，其中 *du-1* 和 *du-2* 基因使 Wx^b 转录剪接效率大大降低，而对 Wx^a 前体 mRNA 的剪接无太大影响，这说明 *du-1* 和 *du-2* 是控制 Wx^b 转录剪接效率相关基因的突变基因(Isshiki et al., 2000)。据此可以分离、克隆不同的基因及其核调控蛋白，再依据反式作用原理剖析 *Wx* 基因的时间和组织特异性表达机理，从而为在分子水平上改良稻米品质提供理论依据。

2.3 可溶性淀粉合成酶基因

可溶性淀粉合成酶(SSS)与 GBSS、淀粉分支酶(SBE)相互作用分别合成直链淀粉和支链淀粉，并影响淀粉的链长和分支频率。Baba 和 Tanaka(1993)用阴阳离子交换层析法从水稻未成熟种子的可溶性提取物中分离出 3 种分子量分别为 55 kDa、57 kDa 和 57 kDa 的 SSS，每一种又进一步用亲和层析法纯化。用由 GBSS 制备出来的抗血清与上述 3 种蛋白进行 Western 杂交，结果表明 3 种蛋白的氨基酸序列同源性很高(除 55 kDa 蛋白在 N 末端缺少 8 个氨基酸残基外)，由此推断这 3 个蛋白是同一基因的产物。用合成的寡核苷酸作为探针从未成熟种子中分离出 cDNA 克隆，序列分析初步推测其编码氨基酸序列中含有作为淀粉和糖原合成酶的ADPG结合位点的 lys-X-gly-gly 保守序列，由此可以认定这个蛋白就是水稻未成熟种子中的 SSS。该酶的前体含有 626 个氨基酸残基，包括 N 末端的由 113 个氨基酸残基组成的转运多肽。成熟 SSS 与 GBSS 和 *Escherichia coli* 糖原合成酶的序列相似性很低，但3个酶中的许多区域包括底物结合位点是高度保守的。斑点杂交分析表明编码SSS的基因为单拷贝，并在叶片和未成熟种子中表达。Northern 杂交结果显示在开花后 5-15 天，*SSS* mRNA 含量最丰富，其 mRNA 的积累方式与 *SBE* 相同。这些结果说明 SSS 和 GBSS 在淀粉合成中起不同的作用。随后，Tanaka 和 Baba(1995)以该 cDNA 片段为探针获得了 *SSSI* 基因组克隆。通过比较 *SSSI* cDNA 与其基因组克隆时发现，前者转录物(2.7 kb)比后者外显子总长(2.5 kb)大 200 bp，这可能是因为 *SSSI* 基因的 5'端非编码区还有 1 个外显子。两者在转运肽内都含有保守序列 lys-ser-gly-gly，该序列是淀粉合成酶结合 ADP-葡萄糖的位点。

有关可溶性淀粉合成酶基因在淀粉合成中的具体作用及其机理尚不清楚。但人们已经开始了有益的探索，如 Jiang 等(2004)研究发现，水稻可溶性淀粉合成酶Ⅱ由 3 种基因编码，其中 *SSSII-1* 在胚乳、叶片和根中都表达，*SSSII-2* 只在叶片中表达，*SSSII-3* 则主要在胚乳中表达。基因序列分析表明后两者同源性很高。他们还发现基因 *SSSII-3* 与 Umemoto 等(2002)报道的 *SSSIIa* 及高振宇等(2003)报道的糊化温度 *ALK* 基因是同一基因。该基因在不同水稻品种间有一定的序列差异，特别是基因编码区内存在碱基替换现象，导致了氨基酸序列的改变，其结果可能造成了 SSSII 酶活性的变化，进而影响支链淀粉的中等长度分支链的合成，使淀粉晶体层结构改变， 最终表现为糊化温度(gelatinization temperature, GT)的改变，这也是籼、粳亚种间支链淀粉结构不同的主要原因。Fujita 等(2006)利用逆转座子 *Tos17* 插入法获得了 4 种 *SSSI* 不同程度缺失的水稻突变体。他们发现，这些突变体胚乳中支链淀粉链长分布

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

的变化程度与SSSI活性的降低程度呈正相关，即活性丧失的越多，支链淀粉链长变化幅度越大。他们还发现，尽管SSSI活性完全丧失，但并不影响种子的形状和大小、淀粉颗粒及胚乳的晶体结构。由此他们推断支链淀粉链的形成可能是由SSSI、SSSIIa和SSSIIIa协同作用完成的。最近，该课题组采用逆转座子*Tos17*插入和化学诱变相结合的方法成功筛选出*SSSIIIa*完全缺失的水稻突变体(Fujita et al., 2007)。与*SSSI*缺失相比，该突变对淀粉含量与结构的影响很大，由此表明*SSSIIIa*对水稻胚乳的发育是非常重要的。

2.4 淀粉分支酶基因

水稻淀粉分支酶(RSBE，又称Q酶)能切开α-1，4糖苷键连接的葡聚糖并将短链通过α-1，6糖苷键连接到受体链上形成支链淀粉。因此，它在淀粉的生物合成中起着非常重要的作用。Mizuno等(1992)用玉米*BE2I* cDNA作为探针分离到水稻的*BE2I* cDNA克隆。研究结果表明水稻*BE2I*基因最初编码含820个氨基酸残基的前体蛋白，包括N末端的由64或66个残基组成的转运多肽；成熟BE2I含有756(或754)个氨基酸残基，分子量约为86.7 kDa(或86.5 kDa)。Northern杂交结果显示，*BE2I* mRNA在开花后7-15天大量积累，以后迅速下降，而BE2I蛋白的积累要明显延迟，但RBE3蛋白的积累比BE2I要早一些。这种表达方式与*Wx*基因一致，*BE2I*和*Wx*基因的表达均在种子发育中期达到最高。对*BE2I*基因的结构进行分析，发现*BE2I*基因有14个外显子和13个内含子，其侧翼区域都含有许多启动子的共有序列，它们可能是这个基因的启动子；许多重复序列和G-box基元也在启动子区出现，由此表明反式作用因子参与了*BE2I*基因表达的调控(Kawasaki et al., 1993)。Nakamura和Yamanouchi(1992)报道了*QE2I*的cDNA序列，全长为2 758 bp，包含1个长度为2 460 bp的开放阅读框架。他们还将*QE2I*基因定位于第6染色体上的标记R1167和G342之间，并证明其是单拷贝的(Nakamura et al., 1994)。Kawasaki等(1996)在研究水稻粉质(*fro-2*)突变体时发现，*fro-2*位点位于第4号染色体上，其导致开花后10天的未成熟发育种子编码SBE的基因表达大为下降。但*RBE1*作图结果表明该*RBE1*基因位于第6号染色体上，表明野生型*Floury-2*是通过反式作用调控*RBE1*基因表达的。但在*fro-2*突变体种子中同时也发现编码其它酶如RBE3和GBSS的基因表达也下降，虽然*fro-2*突变体未成熟种子的*RBE1*基因表达水平很低，但突变体和野生型叶片中的*RBE1*基因表达并无差异，表明*Fro-2*基因可能在种子发育的特异阶段调节一些参与淀粉合成的基因的表达。

为了研究*RBE1*和*RBE3*基因在功能和表达调控上的差异，研究人员分别筛选了其相应的突变体。Mizuno等(1993)研究发现，水稻*ae*突变体中的*ae*基因(位于第2染色体上)就是*RBE3*基因的突变基因(启动子区的碱基发生突变)。Harrington等(1997)利用RFLP分子标记图谱技术将*SBEIII*定位于第2染色体上，其两侧为CO718和RG157标记，并检测到多拷贝杂交模式，这表明该位点上可能存在着串联重复基因。Satoh等(2003)采用N甲基N亚硝脲(N-methyl-N-nitrosourea, MNU)处理可育的雌配子获得*BEI*缺失突变体。遗传分析表明该突变体受一对隐性基因控制，被命名为*sbe1*。有趣的是，该突变体表现出正常的胚乳表型，并且其淀粉含量与野生型相同，但支链淀粉的结构明显发生改变。当长链聚合度为37及短链聚合度介于12-21之间时，突变体中的支链淀粉含量显著下降；而当短链聚合度为10时，其含量显著增加。由此表明，BEI可以特异性地合成B_1和B_{2-3}链。

2.5 淀粉去分支酶基因

淀粉去分支酶除在种子发芽过程中水解支链淀粉的α-1，6分支外，还参与植物淀粉的合成。它在淀粉合成中的作用模型为：淀粉合成酶在淀粉粒表面以短糖链为底物进行延伸，当糖链延伸到一定长度后淀粉分支酶才起作用，即通过“剪”、“贴”过程形成分支链，随后淀粉去分支酶剪切各分支链到适合的长度，再次作为淀粉合成酶的底物。这样一轮循环后淀粉颗粒就向前延伸了1轮，且为下轮做好准备(Ball et al., 1996)。

水稻去分支酶(DBE)分为2类，即R酶(又称极限糊精酶)和异淀粉酶。Nakamura等(1996a)首先分离到水

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

稻R酶基因的cDNA克隆，随后以该cDNA为探针筛选到R酶的基因组克隆。与大麦(*Hordeum vulgare*)等的R酶基因进行比较发现，不同作物间R酶基因的大部分外显子都是高度保守的(Francisco et al., 1998)。1999年他们又获得了水稻异淀粉酶基因的cDNA克隆，该cDNA克隆与玉米*Sugary-1*异淀粉酶基因的序列同源性很高(Kubo et al., 1999)。水稻糖质(*sugary-1*)突变体的胚乳有2个不同区域：植物糖原域和淀粉域。糖原域内α-1, 4链的A链增加而B链降低，该域的淀粉分支结构消失。进一步分析发现，该突变体中异淀粉酶和R酶的活性都显著降低，不过前者在整个胚乳中几乎完全缺乏活性，而后者只在糖原域中活性降低。这说明它们都参与了淀粉合成，但异淀粉酶基因在决定支链淀粉分支结构时起主要作用，R酶基因则通过弥补异淀粉酶基因功能而影响淀粉的分支结构。同时还发现水稻*Sugary-1*基因即为编码水稻异淀粉酶的基因(Nakamura et al., 1996b, 1997; Kubo et al., 1999)。现已知*Sugary-1*基因位于第8号染色体上(Yano et al., 1984)，因此*sugary-1*突变体中的损伤基因不可能是位于第4号染色体上的R酶基因，但是R酶活性也降低，这就暗示*Sugary-1*基因产物可能通过某种反式作用调控着R酶基因的表达。这种反式调控机理还需进一步探明。

3 研究展望

随着分子生物学和各项检测技术的发展以及扫描电镜、高效液相色谱、淀粉粘滞谱速测仪和质地分析仪等仪器在稻米品质分析中的广泛应用，人们对稻米淀粉粒的形态结构、排列方式、淀粉粒发育过程中的各种生理变化及其与稻米品质表现之间的联系，尤其是其中一些关键酶在不同条件下的活性变化及其主要调控功能有了初步的了解，特别是对某些关键酶在水稻籽粒灌浆及稻米品质调控中的作用将会有更深入的了解，从而可望有效推动稻米品质的遗传和生理研究，提高优质稻米的选育效率，促进籽粒灌浆并改善稻米品质。这对于指导今后的稻米改良研究工作具有较大的现实意义。如东北农业大学沈鹏等(2006)选用稻米蒸煮食味品质有显著差异的4个粳稻品种，对水稻籽粒灌浆过程中淀粉合成关键酶的活性变化及其与蒸煮食味品质的关系进行了研究。结果发现，不同品质类型的水稻品种间籽粒直链淀粉和支链淀粉含量在灌浆前、中、后期有差异，这种差异主要表现在灌浆不同时期的淀粉积累速率上。他们还发现，在籽粒灌浆过程中，不同品质类型品种中的ADPG焦磷酸化酶和可溶性淀粉合成酶活性出现峰值的时间无差异，但劣质品种的淀粉分支酶活性峰值出现时间明显早于优质品种，而且优质品种在灌浆中、后期仍然保持较高水平的分支酶活性。ADPG焦磷酸化酶、可溶性淀粉合成酶和淀粉分支酶的活性与直链和支链淀粉含量、味度值、快速粘度分析(rapid visco analysis, RVA)谱特性间的相关性和程度因灌浆时期不同而发生变化。在整个灌浆过程中，可溶性淀粉合成酶活性与味度值间的相关性均不显著，但灌浆前期和中、后期的ADPG焦磷酸化酶和淀粉分支酶的活性与味度值间呈显著或极显著相关。由此表明，选择灌浆前期酶活性低或灌浆后期酶活性高的材料，将有利于提高稻米蒸煮食味品质。

在过去的10年里，淀粉生物合成方面的研究取得很大突破。同时，部分控制淀粉合成相关酶的主效基因已得到分离和鉴定。但由于参与淀粉合成的酶数目众多，包括GBSS、SSS、SBE和DBE等，其对应的基因有17个之多(Nakamura, 2002)。由此可见，淀粉的组成和结构性状十分复杂，要对其实现遗传调控确实相当困难。加之目前对各个基因位点上的复等位基因及其遗传效应的估计还不是十分清楚，从而阻碍了水稻优质育种工作的步伐。今后需进一步加强对稻米品质相关基因的克隆、分子特性及其表达调控的研究，更好地利用分子标记辅助选择及转基因技术来提高水稻优质品种选育效率。例如，目前稻米品质基因工程所利用的主要是*GBSS*和*RBE*基因，而很少利用其它淀粉合成相关基因，为加快优质稻米分子育种的步伐，有必要尽快实现转基因的多元化。对于稻米品质生理研究，许多报道都只是针对稻米最终品质指标性状的分析，而对于品质形成过程及其机理的研究则相对较少，尤其是对于籽粒灌浆过程与稻米品质形成之间的关系，目前还缺乏深入

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

的认识。这一问题的解决, 将使我们可以从同化物输入这一灌浆源头抓起, 调节和改善与灌浆过程有关的各个环节, 从而有效改良稻米品质。

参考文献

包劲松, 何平, 夏英武, 陈英, 朱立煌 (1999). 稻米淀粉RVA谱特征主要受*Wx*基因控制. 科学通报 **44**, 1973-1976.

包劲松, 夏英武 (1999). 水稻淀粉合成的分子生物学研究进展. 植物学通报 **16**, 352-358.

蔡一霞, 徐大勇, 朱庆森 (2004). 稻米品质形成的生理基础研究进展. 植物学通报 **21**, 419-428.

陈丽, 王宗阳, 张景六, 洪孟民 (1997). 一个能与水稻未成熟种子核蛋白特异结合的31 bp的DNA片段. 植物生理学报 **23**, 313-318.

陈丽, 邢彦彦, 张景六, 洪孟民 (1999). 应用酵母单杂交系统分离水稻蜡质基因5'调控区蛋白的基因. 植物生理学报**25**, 110-114.

高振宇, 曾大力, 崔霞, 周奕华, 颜美仙, 黄大年, 李家洋, 钱前 (2003). 水稻稻米糊化温度控制基因*ALK*的图位克隆及其序列分析. 中国科学(C辑) **33**, 481-487.

葛鸿飞, 王宗阳, 洪孟民 (2000). 糯性水稻中蜡质基因第一内含子的剪接活性. 植物生理学报 **26**, 237-240.

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

刘奇华, 蔡建, 李天 (2006). 水稻籽粒中的淀粉合成关键酶及其与籽粒灌浆和稻米品质的关系. 植物生理学通讯 **42**, 1211-1216.

吕英海, 李建粤 (2005). 水稻蜡质基因及其利用研究进展. 西北植物学报 **25**, 2335-2339.

潘晓华, 李木英, 曹黎明, 刘水英 (1999). 水稻发育胚乳中淀粉的积累及淀粉合成的酶活性变化. 江西农业大学学报**21**, 456-462.

沈鹏, 金正勋, 罗秋香, 金学泳, 孙艳丽 (2006). 水稻灌浆过程中籽粒淀粉合成关键酶活性与蒸煮食味品质的关系. 中国水稻科学 **20**, 58-64.

孙业盈, 吕彦, 董春林, 王平荣, 黄晓群, 邓晓建 (2005). 水稻*Wx*基因表达调控的研究进展. 遗传 **27**, 1013-1019.

唐威华, 王宗阳, 张景六, 洪孟民 (2000). 水稻蜡质基因第一内含子中g片段上核蛋白因子结合位点的确定. 植物生理学报 **26**, 323-330.

万映秀, 邓其明, 王世全, 刘明伟, 周华强, 李平 (2006). 水稻*Wx*基因的遗传多态性及其与主要米质指标的相关性分析. 中国水稻科学 **20**, 603-609.

杨建昌, 彭少兵, 顾世梁, Visperas RM, 朱庆森 (2001). 水稻灌浆期籽粒中3个与淀粉合成有关的酶活性变化. 作物学报 **27**, 157-164.

张峰, 蒋德安, 翁晓燕 (2001). 淀粉合酶的酶学与分子生物学研究进展. 植物学通报 **18**, 177-182.

张海艳, 董树亭, 高荣岐 (2006). 植物淀粉研究进展. 中国粮油学报 **21**(6), 41-46.

钟海明, 柳美南, 颜春龙, 黄蓉芬, 胡志萍 (2007). 稻米品质形成机理研究进展及水稻品质育种技术策略. 江西农业学报**19**(6), 5-11.

朱昌兰, 翟虎渠, 万建民 (2002). 稻米食味品质的遗传和分子生物学基础研究. 江西农业大学学报(自然科学版) **24**, 454-459.

Anderson JM, Hnilo J, Larson R, Okita TW, Morell M, Preiss J (1989). The encoded primary sequence of rice seed ADP-glucose pyrophosphorylase subunit and its homology to the bacterial enzyme. *J Biol Chem* **264**, 12238-12242.

Anderson JM, Larson R, Laudencia D, Kim WT, Morrow D, Okita TW (1991). Molecular characterization of the gene encoding a rice endosperm-specific ADPglucose pyrophosphorylase subunit and its developmental pattern of transcription. *Gene* **97**, 199-205.

Ayres NM, McClung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA, Park WD (1997). Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theor Appl Genet* **94**, 773-781.

Baba T, Tanaka KI (1993). Identification, cDNA cloning and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds. *Plant Physiol* **103**, 565-573.

Ball S, Guan HP, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buléon A, Colonna P, Preiss J (1996). From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**, 349-352.

Bligh HFJ, Hill RL, Jones CA (1995). A microsatellite sequence closely linked to the *waxy* gene of *Oryza sativa*. *Euphytica* **86**, 83-85.

Burton RA, Bewley JD, Smith AM, Bhattacharyya MK, Tatge H, Ring S, Bull V, Hamilton WDO, Martin C (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development.

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

Planta **7**, 3-15.

Cai XL, Wang ZY, Xing YY, Zhang JL, Hong MM (1998). Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5'UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant J* **14**, 459-465.

Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* **10**, 413-426.

Dauvillée D, Mestre V, Colleoni C, Slomianny MC, Mouille G, Delrue B, d'Hulst C, Bliard C, Nuzillard JM, Ball S (2000). The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity. *Plant Sci* **157**, 145-156.

Denyer K, Clarke B, Hylton C, Tatge H, Smith AM (1996). The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J* **10**, 1135-1143.

Dian W, Jiang H, Wu P (2005). Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *J Exp Bot* **56**, 623-632.

Erlander SR (1970). The mechanism for the synthesis of starch and its relationship to the newly proposed structural model for DNA. *Partl Die Staerke* **22**, 352-362.

Foster M (1996). Physical associated of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm. Granule-associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II. *Plant Physiol* **111**, 821-829.

Francisco PB, Zhang Y, Park SY, Ogata N, Yamanouchi H, Nakamura Y (1998). Genomic DNA sequence of a rice gene coding for a pullulanase-type of starch debranching enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1387**, 469-477.

Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y (2006). Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol* **140**, 1070-1084.

Fujita N, Yoshida M, Kondo T, Saito K, Utsumi Y, Tokunaga T, Nishi A, Satoh H, Park JH, Jane JL, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y (2007). Characterization of SSIIIa-deficient mutants of rice: the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol* **144**, 2009-2023.

Greene TW, Hannah TW (1998). Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, a rate-limiting step in starch biosynthesis. *Physiol Plant* **103**, 574-580.

Guan HP, Preiss J (1993). Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiol* **102**, 1269-1273.

Harrington SE, Bligh HFJ, Park WD, Jones CA, McCouch SR (1997). Linkage mapping of starch branching enzyme III in rice (*Oryza sativa* L.) and prediction of location of orthologous genes in other grasses. *Theor Appl Genet* **94**, 564-568.

Hirano HY, Sano Y (1991). Molecular characterization of the *waxy* locus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* **32**, 989-997.

Isshiki M, Nakajima M, Satoh H, Shimamoto K (2000). *Dull*: rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the *waxy* pre-mRNA. *Plant J* **23**, 451-460.

Jiang H, Dian W, Liu F, Wu P (2004). Molecular cloning and expression analysis of three genes encoding starch synthase II in rice. *Planta* **218**, 1062-1070.

Kawasaki T, Mizuno K, Shimada H, Satoh H, Kishimoto N, Okumura S, Ichikawa N, Baba T (1996). Coordinated regulation of the gene participating in starch biosynthesis by the rice *Floury-2* locus. *Plant Physiol* **110**, 89-96.

Kawasaki T, Mizuno K, Baba T, Shimada H (1993). Molecular analysis of the gene encoding a rice starch branching enzyme. *Mol Gen Genet* **237**, 10-16.

Kim KN, Fisher DK, Gao M, Guihinan MJ (1998). Molecular cloning and characterization of the *Amylose-Extender* gene encoding starch branching enzyme IIB in maize. *Plant Mol Biol* **38**, 945-956.

Krishnan HB, Reeves CD, Okita TW (1986). ADP glucose pyrophosphorylase is encoded by different mRNA transcripts in leaf and endosperm of cereals. *Plant Physiol* **81**, 642-645.

Kubo A, Fujita N, Harada K, Matsuda T, Satoh H, Nakamura Y (1999). The starch debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol* **121**, 399-410.

Martin C, Smith AM (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 971-985.

Mizuno K, Kawasaki T, Shimada H, Satoh H, Kobayashi E, Okumura S, Arai Y, Baba T (1993). Alteration of the struc-

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

tural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *J Biol Chem* **268**, 19084-19091.

Mizuno K, Kimura K, Arai Y, Kawasaki T, Shimada H, Baba T (1992). Starch branching enzyme from immature rice seeds. *J Biochem* **112**, 643-651.

Nakamura Y (1992). Multiple form of ADP-glucose pyrophosphorylase of rice endosperm. *Physiol Plant* **84**, 336-342.

Nakamura Y (1996). Some properties of starch debranching enzymes and their possible roles in amylopectin biosynthesis. *Plant Sci* **121**, 1-18.

Nakamura Y (2002). Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol* **43**, 718-725.

Nakamura Y, Kubo A, Shimamune T, Matsuda T, Harada K, Satoh H (1997). Correlation between activities of starch debranching enzyme and α-polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice. *Plant J* **12**, 143-153.

Nakamura Y, Nagamum Y, Kumta N, Ninobe Y (1994). Linkage localization of the starch branching enzyme I (Q-Enzyme I) gene in rice. *Theor Appl Genet* **489**, 859-860.

Nakamura Y, Takeichi T, Kawaguchi K, Yamanouchi H (1992a). Purification of two forms of starch branching enzyme (Q-enzyme) from developing rice endosperm. *Physiol Plant* **84**, 329-335.

Nakamura Y, Umemoto T, Ogata N, Kuboki Y, Yano M, Sasaki T (1996a). Starch debranching enzyme (R enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene. *Planta* **199**, 209-218.

Nakamura Y, Umemoto T, Takahata Y, Aaano E (1992b). Characteristics and roles of key enzymes associated with starch biosynthesis in rice endosperm. *Gamma Field Symp* **31**, 25-44.

Nakamura Y, Umemoto T, Takahata Y, Komae K, Amano E, Satoh H (1996b). Changes in structure of starch and enzyme activities affected by sugary mutations in developing rice endosperm: possible role of starch debranching enzymes (R enzymes) in amylopectin biosynthesis. *Physiol Plant* **97**, 491-498.

Nakamura Y, Yamanouchi H (1992). Nucleotide sequence of cDNA encoding starch branching enzyme or Q enzyme I from rice endosperm. *Plant Physiol* **99**, 1265-1266.

Nakamura Y, Yuki K (1992). Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm. *Plant Sci* **82**, 15-20.

Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H (2001). Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol* **127**, 459-472.

Okagaki RJ, Wessler SR (1988). Comparison of nonmutant and mutant *waxy* genes in rice and maize. *Genetics* **120**, 1137-1143.

Preiss J, Sivak MN (1998). Biochemistry molecular biology and regulation of starch synthesis. In: Setlow JK, ed. Genetic Engineering. New York: Plenum Press. pp.177-219.

Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A, Fujita N, Nakamura Y (2003). Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiol* **133**, 1111-1121.

Shimada H, Tada Y, Kawasaki T, Fujimura T (1993). Antisense regulation of the rice *waxy* gene expression using a PCR amplified fragment of the rice genome reduces the amylose content in grain starch. *Theor Appl Genet* **86**, 665-672.

Smith AM, Denyer K, Martin C (1995). What controls the amount and structure of starch in storage organs? *Plant Physiol* **107**, 673-677.

Smith AM, Denyer K, Martin C (1997). The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 67-87.

Takeda Y, Hizukuri S (1987). Structures of rice amylopectins with high and low affinities for iodine. *Carbohydr Res* **168**, 79-88.

Tanaka KI, Baba T (1995). Structure, organization and chromosomal location of the gene encoding a form of rice soluble starch synthase. *Plant Physiol* **108**, 677-683.

Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* **55**, 2131-2145.

Umemoto T, Nakamyra Y, Ishikura N (1995). Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm. *Phytochemistry* **6**, 1613-1616.

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741

Umemoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y (2002). Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor Appl Genet* **104**, 1-8.

Wang ZY, Zheng FQ, Shen GZ, Gao JP, Snustad DP, Li MG, Zhang JL, Hong MM (1995). The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *waxy* gene. *Plant J* **7**, 613-622.

Wang ZY, Zheng FQ, Shen GZ, Zheng FG, Guo XL, Zhang WG, Hong MM (1990). Nucleotide sequence of rice *waxy* gene. *Nucleic Acids Res* **18**, 5898-5898.

Yano M, Isono Y, Satoh H, Omura T (1984). Gene analysis of sugary and shrunken mutants of rice, *Oryza sativa* L. *Jpn J Breed* **34**, 43-49.

Research Advances in the Key Enzymes Involved in Rice Starch Quality Regulation

Zhonghua Wang[1, 2*], Tingjie Yu[1]

[1]*Institute of Biotechnology, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China*
[2]*Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*

Abstract The composition, structure and accumulation of rice starch are key factors affecting grain quality and yield. Therefore, the key enzymes involved in the formation of rice starch need to be studied. With the development of molecular biology techniques, research into rice starch quality has made extensive progress. This review summarizes the progress of these key enzymes, including ADP-glucose pyrophosphorylase, starch synthase, starch branching enzyme and de-branching enzyme, and their roles involved in rice starch biosynthesis. Prospects for future research are also discussed.

Key words gene cloning, gene expression, key enzymes, rice starch quality

Wang ZH, Yu TJ (2008). Research advances in the key enzymes involved in rice starch quality regulation. *Chin Bull Bot* **25**, 741–752.

***** Author for correspondence. E-mail: wang1972@zwu.edu.cn

(**责任编辑**: **刘慧君**)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-741