

水稻籽粒灌浆过程直链淀粉的积累及其相关酶的品种类型间差异*

钟连进 程方民

(浙江大学农学系, 浙江杭州 310029)

摘要 对籼、粳、糯3种类型水稻籽粒灌浆过程中直链淀粉含量的变化及其相关酶活性差异的比较分析表明, 不论是早籼品种浙733, 还是早粳品种浙农104, 其直链淀粉含量在籽粒灌浆过程中的变化趋势基本相似, 均表现为灌浆初期的直链淀粉含量较低, 随着灌浆时间的推移, 籽粒中直链淀粉含量明显升高, 灌浆后期则略有降低, 而对早糯品种早香糯而言, 由于品种本身的直链淀粉含量很低, 其在灌浆过程中的变化趋势不明显。品种类型间的直链淀粉含量差异在籽粒灌浆初期已较明显, 而不是在灌浆中后期才表现出来。不同直链淀粉含量类型水稻品种在灌浆过程中的酶活差异主要表现在颗粒结合型淀粉合成酶活性上, 籼稻品种籽粒灌浆过程中的颗粒结合型淀粉合成酶活性明显高于直链淀粉含量相对较低的粳稻品种, 糯稻品种的颗粒结合型淀粉合成酶活性则很低。而蔗糖合成酶、ADPG 焦磷酸化酶、可溶性淀粉合成酶、Q 酶、淀粉磷酸化酶和R 酶的活性变化与品种类型间直链淀粉含量高低的关系均不甚明显。

关键词 水稻; 籽粒灌浆; 直链淀粉含量; 淀粉合成酶

中图分类号: S511 文献标识码: A

Varietal Differences in Amylose Accumulation and Activities of Major Enzymes Associated with Starch Synthesis during Grain Filling in Rice

ZHONG Lian-Jin CHEN G Fang-Min

(Department of Agronomy, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract Based on comparison of amylose content (AC) at different stages of grain filling period among 3 types of rice including *indica*, *japonica* and *waxy*, the relationship between AC and the activities of 6 key enzymes associated with starch synthesis was analyzed in this paper. The results indicated that similar trends of AC could be seen for Zhe733 (*indica* rice) and Zhenong 104 (*japonica* rice), in which lower AC value was at the early stage of grain filling and higher AC value was at the later stage of grain filling, but it was not clear for Zaoxiannuo (*waxy* rice). Differences in AC among varieties could be found at the beginning stage of grain filling. Moreover, the activity of the granule-bound starch synthase (GBSS) was positively correlated to the ratio of AC to total starch content, but the relationship between AC and other enzymes associated with starch synthesis was not found, including sucrose synthase (SS), ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPP), soluble starch synthase (SSS), starch branching enzyme (SBE), starch phosphorylase and starch debranching enzyme (DBE).

Key words *Oryza sativa* L.; Grain filling; Amylose content; Starch synthase

直链淀粉含量不仅影响稻米蒸煮过程中的水分吸收和体积扩张, 而且与米饭的质地、色泽及老化特性等有着密切的联系^[1,2]。近年来, 国内外在稻米直链淀粉含量的遗传规律与环境生态效应等方面已有

大量的研究报道, 并对水稻等作物的淀粉合成途径有了较清晰的认识。现已明确, 蔗糖合成酶(EC2.4.1.13)、ADPG 焦磷酸化酶(EC2.7.7.27)、淀粉合成酶(EC2.4.1.21)和淀粉分支酶(EC2.4.1.18, 也称

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39830250); 国家自然科学基金项目(30070435)。

作者简介: 钟连进(1971-), 男, 浙江金华人, 现为浙江大学博士生, 研究方向为水稻生理生态。

Received (收稿日期): 2001-05-15, Accepted (接受日期): 2002-07-04

Q 酶)是淀粉合成代谢的几个关键酶,对水稻籽粒中的淀粉合成积累起着重要的调节作用^[3~8]。但是,对诸关键酶在不同类型品种间的相对活性表现差异及其与淀粉组成、结构间的相互关系,目前尚不清楚,而对参与淀粉结构形成有关酶的深入了解,对进一步通过有关酶的调控与遗传操作来改善提高稻米的蒸煮食味品质有十分重要的意义。为此,本研究选用直链淀粉含量差异极为明显的粳、籼、糯 3 种不同类型品种各 1 个,对不同直链淀粉含量品种类型间在籽粒灌浆过程中的有关关键酶活性差异进行了比较分析。

1 材料与方 法

1.1 试验样品的准备

试验于 2000 年在浙江大学华家池校区教学试验农场进行。以早粳品种浙 733、早籼品种浙农 104、早糯品种早香糯为材料,于 4 月 15 日播种,湿润育秧,5 月 12 日移栽,田间按常规管理。分别在各品种齐穗当日,选生长基本一致且开花 1/3 的主穗或大分蘖穗 60~80 个,并挂牌标记,之后以每 5 天为间隔,在水稻灌浆结实期进行分段取样,每次取样时间为当日上午 11:00~11:30,样品取回后立刻用液氮冷冻,并放入 -20℃ 冰柜保存,待所有样品采集完毕后,统一进行有关指标测定。

1.2 测定方法

1.2.1 粗酶液的提取 取稻穗中部灌浆进程基本一致的籽粒 25 颗,去壳后称重,加 5mL 提取液(含 100mmol/L Tricine-NaOH pH7.5, 8mmol/L MgCl₂, 2mmol/L EDTA, 50mmol/L β-Mer-thionin, 12.5% Glycerol 和 1% PVP-40),磨成匀浆,在 10000 × g 离心 25min,然后分别收集上清液和沉淀,其中上清液用于可溶性酶活性的测定,沉淀用于颗粒结合型酶活性的测定。

1.2.2 酶生理活性的测定 蔗糖合成酶、ADPG 焦磷酸化酶、可溶性淀粉合成酶、可溶性 Q 酶和淀粉磷酸化酶的生理活性测定参照 Nakamura 等人的方法进行^[3,4],其中除 Q 酶以每降低 1% 碘蓝值为一个单位(U)外,其余以单位籽粒每分钟产生的 NADPH 量为酶活性单位;在粗酶液的沉淀部分加入 5mL 上述提取液,悬浮后再进行颗粒结合型淀粉合成酶和颗粒结合型 Q 酶的测定,测定方法与可溶性淀粉合成酶、可溶性 Q 酶的测定方法相同;R 酶的测定参照 Akiho 的方法^[9],在 50μL 的上清粗酶液中,分别加入 0.4% Pullulan 和 0.1mmol/L 乙酸缓冲液(pH5.5),30℃ 下反应 20min 后,沸水中煮

30s 终止反应,然后用 DNS 法测定反应中产生的还原糖量,以单位籽粒每分钟产生的还原糖量为酶活性单位。以上酶活的测定均重复进行 3~4 次。

1.2.3 直链淀粉含量的测定 直链淀粉含量的测定依照钟连进等人的方法^[10],利用籽粒鲜样品为材料进行测定。重复 3 次。

2 结果和分 析

2.1 直链淀粉含量的品种类型间差异

从图 1 可见,在水稻籽粒灌浆不同时期,3 种类型品种直链淀粉含量均有明显差异,就同一灌浆时期而言,粳稻品种浙 733 最高,籼稻品种浙农 104 次之,糯稻品种早香糯最低,差异极为明显,不同灌浆时期均表现出相同规律。说明品种类型间直链淀粉含量差异在水稻籽粒灌浆的开始阶段已开始显现,而不是在灌浆中后期才表现出来。从籽粒中直链淀粉占总淀粉的比率看(图 2),随着水稻开花后天数的推移,直链淀粉占总淀粉的比率呈明显上升趋势,其中以粳稻品种浙 733 和籼稻品种浙农 104 较为明显,可见水稻灌浆中后期直链淀粉的增长速率大于总淀粉的增长速率。糯稻品种早香糯的这一变化规律不甚明显,这可能与其直链淀粉含量过低有关。

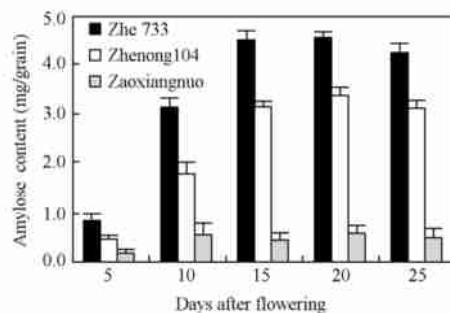


图 1 水稻籽粒灌浆过程中直链淀粉含量的变化

Fig. 1 Changes of amylose content in filling rice grain

2.2 蔗糖合成酶与 ADPG 焦磷酸化酶活性的品种类型间差异

已经明确,由源器官输送到籽粒的蔗糖,首先降解为葡萄糖,继而转化为葡萄糖供体 ADPG 后才能用于合成淀粉,而蔗糖合成酶和 ADPG 焦磷酸化酶是控制这一进程的两个关键酶^[3~5,11]。从图 3、图 4 中可见,蔗糖合成酶在水稻开花后 5~10 天左右的活性最高,ADPG 焦磷酸化酶在开花后 10 天左右时的活性最高,之后随着开花后天数的推移,其活性逐步降低,3 个供试验品种的变化趋势基本一致。就同一灌浆时期而言,3 个品种间虽然存在着一定差异,但与品种类型间在直链淀粉含量水平上表现出

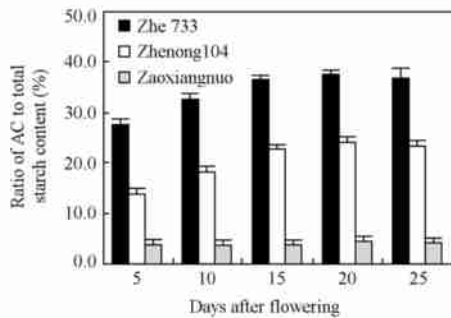


图2 水稻籽粒灌浆过程中直链淀粉占总淀粉比率的变化

Fig. 2 Changes of ratio of AC to starch content in filling rice grain

的差异并无规律性的联系。在水稻开花后 5~10 天, 浙 733 的蔗糖合成酶和 ADPG 焦磷酸化酶活性相对较高, 但开花 15 天后, 浙农 104 的蔗糖合成酶和 ADPG 焦磷酸化酶的相对活性则高于浙 733, 早香糯亦有相同趋势, 这可能与不同品种间的灌浆速率存在着一定联系。

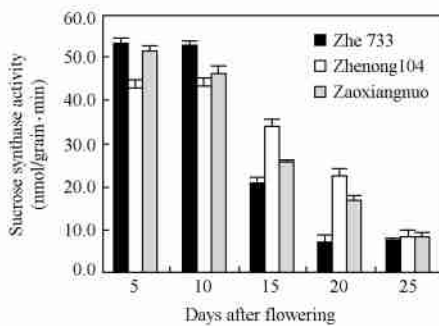


图3 水稻籽粒灌浆过程中蔗糖合成酶活性的变化

Fig. 3 Changes of sucrose synthase activity in filling rice grain

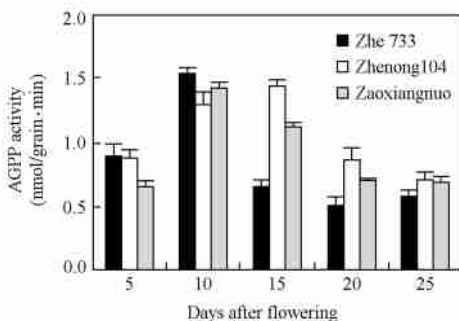


图4 水稻籽粒灌浆过程中ADPG 焦磷酸化酶活性的变化

Fig. 4 Changes of AGPP activity in filling rice grain

2.3 可溶性淀粉合成酶与颗粒结合型淀粉合成酶活性的品种类型间差异

比较 3 个不同类型品种籽粒灌浆过程中的两类淀粉酶的活性差异(图 5、图 6), 可以发现, 早糯品种早香糯的可溶性淀粉合成酶活性与早粳品种浙 733、早粳品种浙农 104 的差异一般不大, 其中在水

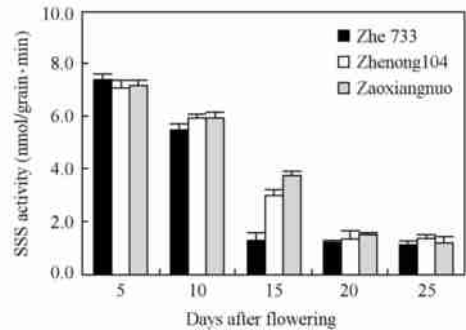


图5 水稻籽粒灌浆过程中可溶性淀粉合成酶活性的变化

Fig. 5 Changes of SSS activity in filling rice grain

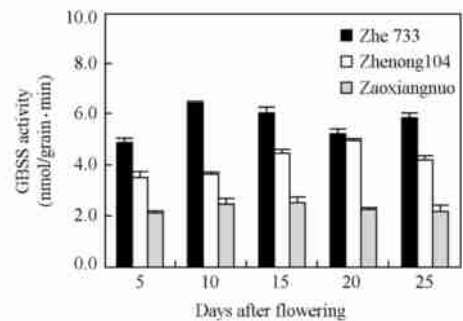


图6 水稻籽粒灌浆过程中颗粒结合型淀粉合成酶活性的变化

Fig. 6 Changes of GBSS activity in filling rice grain

稻开花后 10~20 天, 前者的可溶性淀粉合成酶活性还高于后两种类型品种。但就颗粒结合型淀粉合成酶而言, 同一灌浆时期, 早糯品种早香糯的活性明显低于浙 733 和浙农 104, 而后两者相比, 直链淀粉含量相对较高的浙 733 则要高于直链淀粉含量相对较低的浙农 104, 且规律性相当明显。这一现象说明, 不同类型品种间的直链淀粉含量差异与水稻籽粒灌浆过程中的颗粒结合型淀粉合成酶存在着密切的联系, 较高的颗粒结合型淀粉合成酶活性有利于籽粒中直链淀粉的形成与积累。而可溶性淀粉合成酶的活性变化似乎也与籽粒中直链淀粉含量水平有一定联系, 其作用可能与颗粒结合型淀粉合成酶相反。

2.4 Q 酶活性的品种类型间差异

Q 酶在水稻籽粒中以可溶性和淀粉颗粒结合型两种形态存在。从表 1 可见, 在水稻灌浆的初期, 可溶性 Q 酶的活性高于淀粉颗粒结合型 Q 酶的活性, 开花后 10~15 天左右直至成熟, 淀粉颗粒结合型 Q 酶的活性则相对高于可溶性 Q 酶的活性。比较 3 个不同类型品种在水稻灌浆结实期间的总 Q 酶活性(表 1), 可以发现, 同一灌浆时期, 3 个品种间的总 Q 酶活性差异并不大, 直链淀粉含量相对较高的浙 733 在水稻开花后大部分时期的总 Q 酶活性甚至还高于直链淀粉含量相对较低的品种浙农 104。糯稻

品种早香糯和上述两品种在总 Q 酶活性上的差异也不明显。这一研究结果说明, 虽然 Q 酶是水稻籽粒中唯一能催化淀粉分支形成的关键酶, 但不同类型水稻品种间的直链淀粉含量水平差异并不取决于其活性的高低。至于糯稻品种极低的直链淀粉含量水平是否与其相对较高的可溶性 Q 酶/颗粒结合型 Q 酶比率有关, 尚待进一步的探讨。

表 1 水稻籽粒灌浆过程中可溶性 Q 酶、颗粒结合型 Q 酶和总 Q 酶的活性变化

品种 Variety	酶活性 A activity of enzymes (U/grain·min)	开花后天数 Days after flowering				
		5	10	15	20	25
浙 733 Zhe 733	Soluble Q-enzyme	6.72	9.04	6.76	6.48	4.55
	Granule-bound Q-enzyme	4.39	9.10	10.97	10.69	9.34
	Total Q-enzyme	11.11	18.14	17.73	17.17	13.89
浙农 104 Zhenong104	Soluble Q-enzyme	5.40	7.74	7.78	6.11	4.99
	Granule-bound Q-enzyme	3.83	8.38	9.53	10.34	8.99
	Total Q-enzyme	9.23	16.12	17.31	16.45	13.98
早香糯 Zaoxiangnuo	Soluble Q-enzyme	6.02	7.01	7.86	6.84	5.82
	Granule-bound Q-enzyme	5.07	7.28	8.63	8.99	8.03
	Total Q-enzyme	11.09	14.29	16.49	15.83	13.85

2.5 淀粉磷酸化酶与 R 酶活性的品种类型间差异

淀粉磷酸化酶(EC2.4.1.1) 也是淀粉合成途径中的一个重要酶, 由于其催化反应的可逆性, 许多学者认为, 淀粉磷酸化酶的主要作用是催化淀粉的水解^[3, 11, 12]。从图 7 可见, 水稻籽粒中淀粉磷酸化酶的活性高峰期一般在开花后的 20 天左右, 明显地滞后于蔗糖合成酶与 ADPG 焦磷酸化酶的活性高峰期, 水稻灌浆后期籽粒中直链淀粉含量略有降低的现象, 可能与该酶的较高活性有关。但品种间的活性差异表现相对较为复杂, 难以判别其活性与品种直链淀粉含量高低间的直接关系。

R 酶属淀粉分解酶类, 能专一性地裂解支链淀粉的 α -1, 6 糖苷键, 从而对淀粉的结构产生影响^[9]。从图 8 中可见, 籼稻品种浙 733 和糯稻品种早香糯的 R 酶活性差异不大, 而粳稻品种浙农 104 的 R 酶活性则明显高于浙 733 和早香糯, 且在开花后各个时期均呈现出相同趋势。这一现象说明, 品种类型间的直链淀粉含量高低与其灌浆过程中 R 酶活性之间并无必然的关系, 粳稻品种浙农 104 比其他两个品种呈现出较高的酶活水平, 很可能与其直链淀粉

或支链淀粉的链长、结构有关。

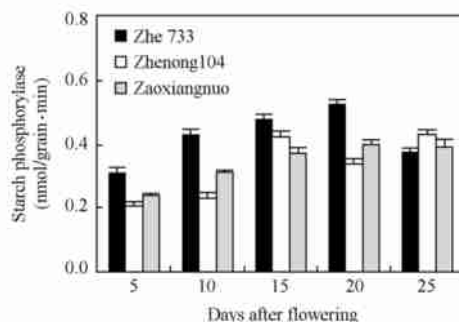


图 7 水稻籽粒灌浆过程中淀粉磷酸化酶活性的变化

Fig. 7 Changes of starch phosphorylase activity in filling rice grain

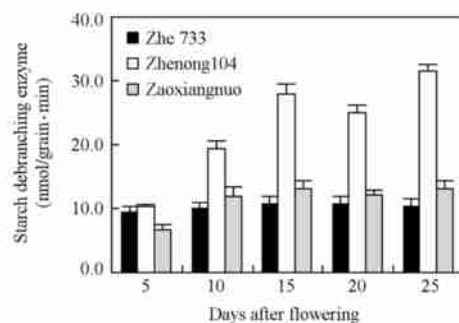


图 8 水稻籽粒灌浆过程中 R 酶活性的变化

Fig. 8 Changes of starch debranching enzyme activity in filling rice grain

3 讨论

关于水稻籽粒灌浆过程中有关酶活性与淀粉积累的关系, 前人研究结果表明, ADPG 焦磷酸化酶、淀粉合成酶、蔗糖合成酶和 Q 酶对控制淀粉合成与积累作用较大, 而 UDPG 焦磷酸化酶、蔗糖磷酸合成酶等与淀粉积累的关系不明显^[4, 11, 13]。但是关于上述有关酶活性的变化对水稻籽粒中淀粉组成的影响, 目前的研究报道不一。Kouchi 等^[14]认为, Q 酶在淀粉合成过程中的作用是通过形成 α -1, 6 糖苷键, 从而形成分支的糖链, 因而是影响水稻籽粒中淀粉的组成与结构的关键酶。而 Smith 等^[11]指出, 颗粒结合型淀粉合成酶的活性与直链淀粉的合成关系密切。Denyer 等^[15]认为, 非糯质水稻品种籽粒中的淀粉组成与结构可能是由 Q 酶与 R 酶之间活性的平衡关系所决定的。彭估松等^[6]报道, 可溶性淀粉合成酶对籽粒中直链淀粉与支链淀粉的比率也有一定的影响。本研究利用 3 个直链淀粉含量差异较大的品种类型为材料, 通过对其直链淀粉含量在籽粒灌浆过程中的变化及其与有关酶活性之间关系的比较

分析, 结果发现, 颗粒结合型淀粉合成酶的活性与品种类型间的直链淀粉含量差异之间的关系最为密切, 而蔗糖合成酶、ADPG 焦磷酸化酶、可溶性淀粉合成酶、Q 酶和 R 酶的活性变化与品种间的直链淀粉含量高低的关系均不明显。早籼品种浙 733 的直链淀粉含量相对较高, 与之相对应, 其颗粒结合型淀粉合成酶的活性也明显高于相同灌浆时期早粳品种浙农 104 和早糯品种早香糯的颗粒结合型淀粉合成酶的活性, 而后两者相比, 早香糯要低于浙农 104。Kuiper 等^[16]曾发现, 马铃薯突变体 amf 中缺少 GB-SS (颗粒结合型淀粉合成酶) 基因, 仅含支链淀粉, 若转入 GBSS 基因, 又能恢复直链淀粉的合成; Wang 等^[17]报道, 水稻籽粒中的表观直链淀粉含量随 GBSS 基因的拷贝数增加而线性增加。这些报道与本研究的结论相一致, 从不同的角度证实了颗粒结合型淀粉合成酶在直链淀粉合成中的重要作用。由此笔者推测, 颗粒结合型淀粉合成酶是控制水稻籽粒中直链淀粉占总淀粉比率的关键酶, Q 酶和 R 酶虽然能直接催化淀粉分子中分支链的形成和去除, 但可能主要是影响支链淀粉的精细结构, 而不是直链淀粉占总淀粉的相对比率, 对此尚需进一步探讨。

本研究结果发现, 水稻籽粒灌浆过程中直链淀粉占总淀粉的比率呈明显的上升趋势, 这与前人的有关研究报道基本一致^[18-20]。一些学者推测, 水稻灌浆初期的 Q 酶活性大于灌浆盛期的 Q 酶活性, 是水稻灌浆中后期直链淀粉积累相对大于支链淀粉的原因。但从本研究中有关酶在籽粒全灌浆过程中的活性高峰期看, Q 酶与颗粒结合型淀粉合成酶的活性高峰期基本接近, 两者均明显滞后于蔗糖合成酶、ADPG 焦磷酸化酶和可溶性淀粉合成酶的活性高峰期。据此, 笔者认为, 水稻籽粒灌浆过程中直链淀粉占总淀粉的比率呈上升趋势的原因, 可能主要是由于颗粒结合型淀粉合成酶是在淀粉粒形成一定的晶体结构后, 才在淀粉合成中起催化作用的缘故。

References

- [1] Huang F-S (黄发松), Sun Z-X (孙宗修), Hu P-S (胡培松), et al. Present situations and prospects for the research on rice grain quality forming. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 1998, 12(3): 172—176
- [2] Cheng F-M (程方民), Jiang D-A (蒋德安), Wu P (吴平), et al. The dynamic change of starch synthesis enzymes during the grain filling stage and effects of temperature upon it. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2001, 27(2): 201—206
- [3] Kato T. Change of sucrose synthase activity in developing endosperm of rice cultivars. *Crop Sci*, 1995, 35: 827—839
- [4] Nakamura Y, Yuki K, Park S, et al. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30(6): 833—839
- [5] Liang J-S (梁建生), Cao X-Z (曹显祖), Xu S (徐生), et al. Studies on the relationship between the grain sink strength and its starch accumulation in rice (*O. sativa*). *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1994, 20(6): 685—691
- [6] Peng J-S (彭佶松), Zheng Z-R (郑志仁), Liu D (刘涤), et al. Starch biosynthesis and its key enzymes. *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), 1997, 33(4): 297—303
- [7] Perez C M, Perdon A A, Resurreccion A P. Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rice grain. *Plant Physiol*, 1975, 56: 579—583
- [8] Umemoto T, Nakamura Y, Ishikura N. Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm. *Phytochemistry*, 1995, 40(6): 1613—1616
- [9] Akiho K, Naoko F, Kyuya H, et al. The starch de-branching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol*, 1999, 121: 399—409
- [10] Zhong L-J (钟连进), Cheng F-M (程方民). A method for determining amylose content of fresh rice sample. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)* [浙江大学学报(农业与生命科学版)], 2002, 28(1): 33—36
- [11] Smith A M, Denyer K, Martin C. What controls the amount and structure of starch in store organ. *Plant Physiol*, 1995, 107: 673—677
- [12] Li T-G (李太贵), Shen B (沈波), Chen N (陈能). Effect of Q-enzyme on the chalkiness formation of rice grain. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1997, 23(3): 338—344
- [13] Pan X-H (潘晓华), Li M-Y (李木英), Cao L-M (曹黎明), et al. Starch accumulation and changes in enzyme activities involved in starch synthesis during the development of rice endosperm. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 1999, 21(4): 456—462
- [14] Kouichi M, Koji K, Yuji A, et al. Starch branching enzymes from immature rice seeds. *J Biochem*, 1992, 112: 643—651
- [15] Denyer H, Hylton M, Jenner. Identification of multiple isoform of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta*, 1995, 196: 256—261
- [16] Kuiper G, Veer J, Meyer H, et al. Field evaluation of antisense RNA mediated inhibition of GBSS gene expression in potato. *Euphytica*, 1992, 59: 83—89
- [17] Wang Z-Y, Wu Z-L, Xing Y-Y. Molecular characterization of rice Wx gene. *Science in China (Series B)*, 1992, 35(5): 558—561
- [18] Asaka M, Okuno K, Sugimoto Y. Development changes in the structure of endosperm starch of rice. *Agric Biol Chem*, 1985, 49: 1973—1978
- [19] Luo K (罗科). Starch accumulation and changes of gelatin temperature in filling rice grain. *Journal of Guangxi Agricultural College* (广西农学院学报), 1987, (1): 136—140
- [20] Zhu Q-S (朱庆森), Du Y (杜永), Yang J-C (杨建昌), et al. Study on relationship between amylose content and grain anatomical structure of hybrid rice. *Journal of Yangzhou University (Natural Science Edition)* [扬州大学学报(自然科学版)], 2000, 3(3): 41—43