

# 水稻胚乳淀粉合成相关酶的结构、功能及其互作研究进展

陈雅玲 包劲松\*

(浙江大学 农业与生物技术学院 原子核农业科学研究所, 杭州 310029; \* 通讯联系人, E-mail: jsbao@zju.edu.cn)

## Progress in Structures, Functions and Interactions of Starch Synthesis Related Enzymes in Rice Endosperm

CHEN Yaling, BAO Jinsong\*

(*Institute of Nuclear Agricultural Science, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; \* Corresponding author, E-mail: jsbao@zju.edu.cn*)

**Abstract:** Starch is the predominant rice seed reserves. Rice yield and eating quality are influenced by the process of starch biosynthesis. In endosperm amyloplast, starch biosynthesis is a result of complex network of many enzymes. This report summarized the structures, functions and interactions of ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), starch synthases (SSs), starch branching enzymes (BEs) and starch debranching enzymes (DBEs). It will provide helpful information to breed high yield and good quality rice.

**Key words:** rice; starch synthesis; endosperm

**摘要:** 淀粉作为稻米最主要的储藏物质,其生物合成过程直接影响水稻的产量和品质。水稻淀粉的生物合成在造粉体中通过一系列酶促反应完成。本文综述了淀粉合成过程中 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)、淀粉合酶(SSs)、淀粉分支酶(BE)及淀粉脱支酶(DBE)的结构、功能以及各酶之间的相互作用的最新研究进展,以期对稻米品质改良提供理论参考依据。

**关键词:** 水稻; 淀粉合成; 胚乳

**中图分类号:** Q944.46; S511.01

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7216(2017)01-0001-12

稻米作为中国主要口粮,全国有 60% 的人口食用。全国除西藏和青海水稻种植面积较小外,其他各省均种植一定面积的水稻<sup>[1]</sup>。因此,稻米的产量和品质与人民生活水平的提高息息相关。杂交水稻育种已实现了水稻产量的大幅度提高,但是杂交稻的品质却不能满足广大群众的需求。稻米品质已成为稻米消费和各国育种学家的主要考虑因素。

淀粉作为稻米最主要的储藏物质,约占水稻种子总质量的 80%~90%<sup>[2]</sup>,其合成量的增加直接影响水稻的产量。而淀粉颗粒的理化特性如表观直链淀粉含量(AAC)、糊化温度(GT)、胶稠度(GC)、淀粉黏滞性(starch paste viscosity, 又称 RVA 谱, RVA profile)及支链淀粉的结构等直接或间接影响稻米的食用及蒸煮品质<sup>[3, 4]</sup>。因此,深入了解和研究水稻淀粉的生物合成过程,对水稻产量的提高和品质的改良具有重要意义。

水稻淀粉的生物合成在叶绿体或造粉体中通过一系列酶促反应完成,包括 ADPG 焦磷酸化酶(AGPase)、颗粒结合型淀粉合酶(GBSS)、可溶性淀粉合酶(SSs)、淀粉分支酶(BEs)、淀粉去分支酶(DBEs)和淀粉磷酸化酶(PHO)<sup>[5, 6]</sup>。GBSS 催化直链淀粉的合成,SSs、BEs 和 DBEs 共同完成支链淀粉的合成。目前,通过对水稻胚乳突变体材料的培育及研究,淀粉合成过程中相关酶的功能已基本确定。本文概述了水稻淀粉合成和积累过程中几个关键酶的功能及其相互作用研究的最新进展,以期对稻米品质改良提供理论参考依据。

### 1 水稻胚乳中淀粉合成途径

水稻淀粉合成包括瞬时淀粉合成和储藏淀粉合成两种形式。瞬时淀粉在白天积累,晚上降解为植物组织提供能量,主要合成场所在叶绿体中;而储藏

收稿日期: 2016-09-30; 修改稿收到日期: 2016-11-1。

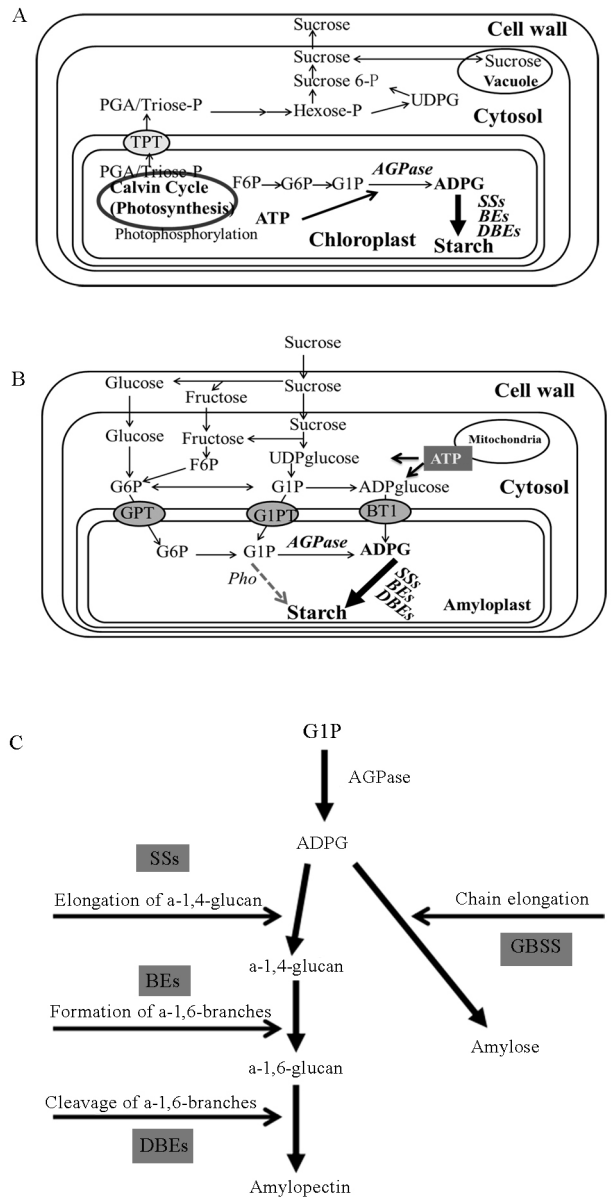
基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2016XZZX001-09); 浙江省自然科学基金资助项目(LZ13C130001)。

淀粉能不断合成和积累,可作为种子发芽时的营养物质,主要合成场所是在造粉体中。

在高等植物中,瞬时淀粉和储藏淀粉的合成过程具有很大的差别。在叶绿体中,通过卡尔文循环形成的磷酸丙糖(triose-P)或3-磷酸甘油酸(PGA)经磷酸丙糖转运蛋白(TPT)进入细胞质中,然后由一系列酶催化形成磷酸己糖(Hexose-P),最后用于蔗糖(sucrose)的合成(图1-A);而果糖-6-磷酸(F6P)则用于瞬时淀粉的合成。首先,F6P转换为葡萄糖-6-磷酸(G6P),而后在细胞质葡萄糖磷酸异构酶(PGI)和葡萄糖磷酸变位酶(PGM)作用下合成葡萄糖-1-磷酸(G1P),随后G1P在AGPase的催化作用下合成ADPG,ADPG作为淀粉合成相关酶的底物合成瞬时淀粉<sup>[7]</sup>(图1-A)。储藏淀粉的生物合成以蔗糖为底物,蔗糖水解是储藏淀粉合成的第一步<sup>[7]</sup>;来自叶片光合作用合成的或淀粉降解的蔗糖,经韧皮部运输至胚乳后,通过蔗糖转运蛋白进入细胞质基质,在蔗糖合成酶(SuS)催化下水解形成果糖(Fructose)和UDP-葡萄糖(UDPG),UDP-葡萄糖继而形成G1P;此外,蔗糖还可水解为己糖,经己糖转运子转运到胚乳细胞质中,再经变构酶、己糖激酶等转化成G1P;然后G1P在细胞质ADPGase的作用下形成ADPG;ADPG在由Brittle1基因编码的内包膜蛋白作用下进入造粉体中(图1-B)。Fettke等<sup>[8]</sup>研究发现,G1P可能通过假定的G1P转运蛋白直接进入造粉体,然后在AGPase催化下合成ADPG。由葡萄糖-1-磷酸形成的ADPG经GBSS催化合成直链淀粉,SSs负责延伸 $\alpha$ -1,4糖苷键连接的葡萄糖链,而后由BEs形成分支,最后由DBEs去除不合适的分支完成支链淀粉合成(图1-C)。

## 2 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶

在高等植物中,ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AG-Pase)催化G1P和ATP形成ADPG和焦磷酸(PPi),是胚乳淀粉合成过程中的限速酶<sup>[9,10]</sup>,直接决定淀粉的合成速率和淀粉累积水平。在水稻中,AGPase以异源四聚体( $\alpha_2\beta_2$ )的形式存在,由两个大亚基(LSs)和两个小亚基(SSs)组成<sup>[11,12]</sup>(表1)。Dawar等<sup>[13]</sup>通过SWISS-Model Server网站(<http://swissmodel.expasy.org>)预测了水稻的AG-Pase结构,并利用SAVES网站(<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES>)对预测结构进行分析,发现



TPT—磷酸丙糖转运蛋白; GPT—G6P 转运蛋白; G1PT—假定的G1P 转运蛋白<sup>[8]</sup>; BT1—Brittle1 内包膜蛋白。A—叶片中瞬时淀粉合成; B—造粉体中储藏淀粉合成; C—淀粉合成途径。

TPT, Triose phosphate translocator; GPT, G6P translocator; G1PT, Putative G1P transporter<sup>[8]</sup>; BT1, Brittle-1 protein. A, The synthesis of assimilatory starch in the leaf; B, The synthesis of reserve starch in storage tissues; C, The starch synthetic pathway from G1P.

图1 光合作用组织和非光合作用组织中淀粉合成途径和相关代谢<sup>[7]</sup>

Fig. 1. Schematic representation of the starch biosynthetic pathway and the related metabolism in photosynthetic and non-photosynthetic tissues<sup>[7]</sup>.

表 1 水稻胚乳中淀粉合成相关基因、功能及表达特征

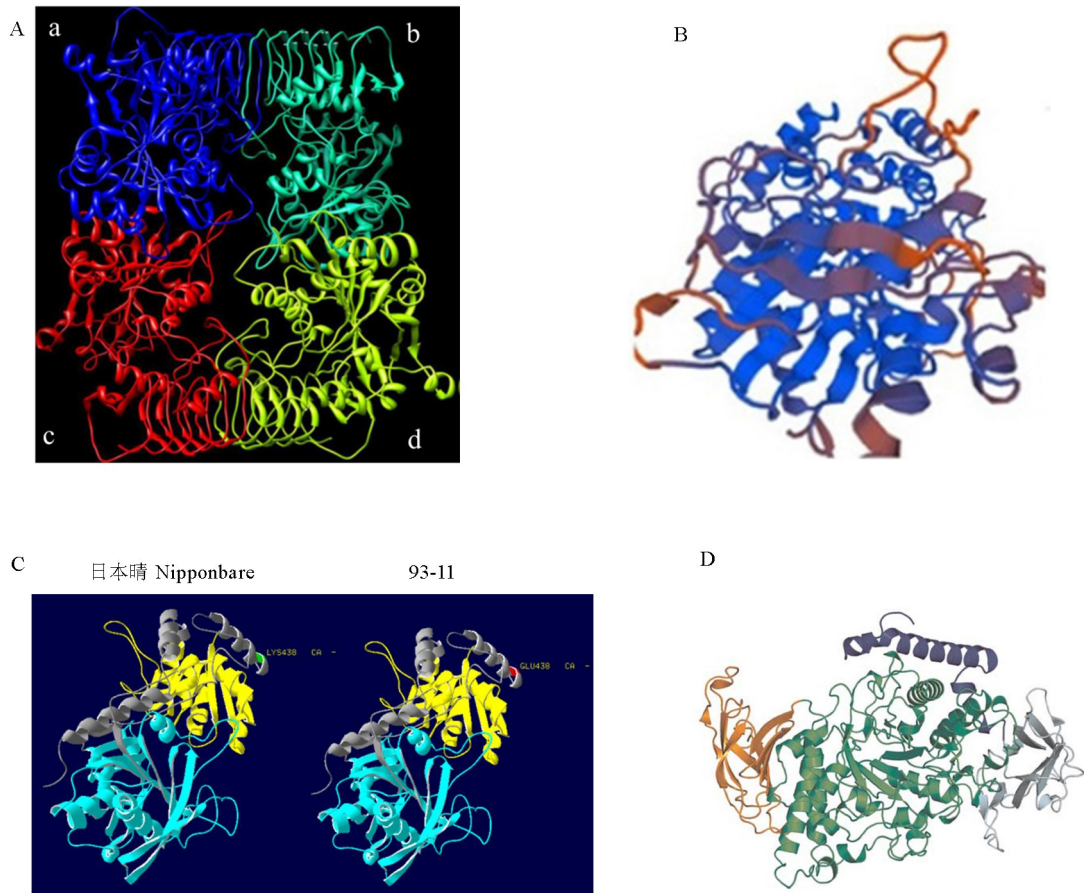
Table 1. Function and expression pattern of starch synthesis genes in rice endosperm.

酶 Enzyme	基因 Gene	染色体 Chromosome	最高表达时期 Highest expression stage(DAF)	突变体 Mutant	功能 Function
AGPase	<i>AGPLSU</i>	5,1,3,7	6~15	<i>osagpl2</i>	酶的调控中心 Regulation center of the enzyme
	<i>AGPSSU</i>	9,8	6	<i>osagps2</i>	酶的活性中心 Activity center of the enzyme
SSs	<i>GBSS I</i>	6	6,15	<i>waxy</i>	合成直连淀粉或形成超长链 Synthesis of amylose or formation of extra-long chain
	<i>SS I</i>	6	10	<i>ss I</i>	延伸 DP 6-7 的链形成 DP 8-12 的链 Formation of the DP 8-12 chain through elongated the DP 6-7 chain
	<i>SS II a/SS II -3</i>	6	无明显表达高峰 No obvious peaks	<i>Most japonica</i>	延伸 DP≤10 的短链形成 DP 12-24 的中链 Formation of the DP 12-24 chain through elongated the DP≤10 short chain
	<i>SS III a/SS III -2</i>	8	无明显表达高峰 No obvious peak	<i>flo5</i>	形成 DP>30 的长链 Formation of DP>30 long chain
	<i>SS IV a</i>	1	无明显表达高峰 No obvious peak	—	涉及淀粉颗粒的形成及控制颗粒数量 Involve formation of starch granules and control the number of starch granules
	<i>SS IV b</i>	5	10	<i>ss4b</i>	涉及淀粉颗粒的形成及控制颗粒数量 Involve formation of starch granules and control the number of starch granules
BEs	<i>BE I</i>	6	10	<i>sbe1</i>	分支多聚葡萄糖链,形成 B 链簇状结构 Branch glucose chain and form the cluster structure of b chain
	<i>BE II b</i>	2	10	<i>ae</i>	分支多聚葡萄糖链,形成 A 链 Branch glucose chain and form A chain
DBEs	<i>ISA1</i>	8	10	<i>sugary1</i>	形成同源复合物,去除不当分支 Cleavage improper branch through homologous complexes of ISA1
	<i>ISA2</i>	5	10	—	与 ISA1 形成异源复合物 Form the heterogeneous complexes with ISA1
	<i>PUL</i>	4	10	<i>pul</i>	补偿 ISA 功能 Compensate the function of ISA

LSs 具有 19 个  $\beta$  链和 15 个  $\alpha$  螺旋,SSs 具有 18 个  $\beta$  链和 15 个  $\alpha$  螺旋。对二聚体表面氨基酸、疏水作用及氢键研究可知,A 链和 B 链之间有 19 个氢键和 28 个疏水分子连接,而 A 链和 D 链之间仅有 4 个氢键和 15 个疏水分子连接;相似的 B 链和 C 链之间有 10 个氢键和 19 个疏水分子连接,C 链和 D 链之间的氢键和疏水分子最多,分别为 27 和 38 个<sup>[13]</sup>(图 2-A)。

目前对水稻胚乳突变体的研究,LSs 和 SSs 的功能也基本明确。SSs 是酶的活性中心,与底物结合,参与催化和拟制作用,保守性高;而 LSs 是酶的调控中心,可以调节 SSs 对 3-磷酸甘油酸和无机磷酸的变构效应来控制淀粉合成。在植物中,通过位于 SSs 的 N 末端区域的保守 Cys<sup>12</sup> 氨基酸的氧化还

原反应形成二硫键来进行 AGPase 的变构调节<sup>[14]</sup>。在水稻胚乳中,细胞质中 AGPase 的 LSs 和 SSs 分别由 *OsAGPS2b* 和 *OsAGPL2* 基因编码;但是 *OsAGPS2b* 编码的 S2b 亚单位缺少变构调节的保守氨基酸 Cys<sup>12</sup><sup>[15]</sup>。Tuncel 等<sup>[15]</sup>对水稻胚乳的 LSs 进行点突变发现,位于 LSs 的 N 末端 Cys<sup>47</sup> 和 Cys<sup>58</sup> 控制 AGPase 的氧化还原反应,表明水稻胚乳中的 AGPase 酶活性主要由大亚基通过氧化还原调控小亚基共同决定。Tang 等<sup>[16]</sup>利用酵母双杂交技术对水稻皱缩突变体 *w24* 进行研究,也发现 *OsAGPS2b* 和 *OSAGPL2* 存在着直接的相互作用控制淀粉的合成。因此,位于细胞质中的 *OsAGPSb* 和 *OsAG-PL2* 对于正常水稻胚乳中 AGPase 活性和淀粉合成起着关键性作用。



A—水稻 AGPase 的最小分子动力学结构<sup>[13]</sup>。蓝色的 a 链—LS；绿色的 c 链—LS；蓝绿色的 b 链—SS；红色的 d 链—SS。B—水稻 GBSS I 的同源模型<sup>[21]</sup>。蓝色为  $\alpha$  螺旋，棕色为  $\beta$  片层，橙色为无规则卷曲。C—日本晴和 93-11 的 SS I 三维结构<sup>[35]</sup>。蓝色为淀粉合酶催化区域；黄色为葡萄糖转移酶区域。D—水稻 BE I 结构<sup>[53]</sup>。紫色为 N-末端，淡蓝色为 CBM48 区域，蓝绿色为  $\alpha$  淀粉酶区域，橙色为 C-末端。

A, Molecular dynamics minimized structure of the rice AGPase<sup>[13]</sup>. Blue chain a, LS; Green chain c, LS; Cyan chain b, SS; Red chain d, SS. B, Homology model of GBSS I, alpha helices are in blue, beta plated sheets in orange and coils in brown. C, Computational models of the 3D structure of SS I of Nipponbare and 93-11. The blue color represents the starch synthase catalytic domain, and the yellow color represents the glycosyl transferase group. D, Structure of BE I from *Oryza sativa* L. The purple color represents N-domain; The natter blue represents CBM48; The blue-green color represents  $\alpha$ -amylase; The orange represents C-domain.

图 2 水稻淀粉合成相关酶 3D 结构

Fig. 2. 3D structure of starch synthesis related enzymes in rice.

### 3 淀粉合酶

淀粉合酶是一类葡萄糖转移酶，以 ADPG 为底物，葡萄糖残基通过  $\alpha$ -1, 4 糖苷键掺入寡聚糖引物的非还原末端，最终形成以  $\alpha$ -1, 4 糖苷键连接的葡聚糖，葡聚糖又作为淀粉分支酶的底物合成支链淀粉<sup>[17]</sup>。淀粉合酶由多个基因编码，并形成多个共同体。根据其在淀粉体中存在的状态，淀粉合酶可分为颗粒结合型淀粉合酶(GBSS)和可溶性淀粉合酶(SS)。每一种淀粉合酶又有许多同工型，它们由不

同的基因编码并在淀粉生物合成过程中承担着不同的角色。水稻淀粉合酶由 GBSS、SS I、SS II、SS III 和 SS IV 5 种类型组成(表 1)。最新的研究数据显示，水稻和马铃薯可能具有 SS V 类型<sup>[18]</sup>。

#### 3.1 颗粒结合型淀粉合酶(GBSS)

GBSS 通过与淀粉颗粒特异性结合，参与直链淀粉的合成。水稻 GBSS 有两种同工酶，GBSS I 和 GBSS II；GBSS I 主要控制胚乳等贮藏器官中直链淀粉的合成<sup>[19]</sup>，而 GBSS II 主要控制根、茎、叶等营养器官中瞬时淀粉的合成<sup>[20]</sup>。将水稻 GBSS I 的氨

基酸序列提交到 SWISS Model Server 进行 3D 结构预测,并对预测的结构进行分析,发现水稻 GBSS I 结构具有  $\beta$  片层、 $\alpha$  螺旋和无规则卷曲;其中  $\alpha$  螺旋可能负责物质运输和酶活性,而  $\beta$  片层可能负责酶的亚细胞定位<sup>[21]</sup>(图 2-B)。

在水稻中,GBSS I 由  $Wx$  编码, $Wx$  位于第 6 染色体上,蛋白质大小为 60 kD 左右。大量研究表明, $Wx$  外显子和内含子的结构发生改变,都将影响其表达量和蛋白质功能。目前在水稻中已经报道了 7 个  $Wx$  等位基因和 7 个功能位点,包括  $Wx^b$  等位基因的第 1 内含子 5' 端剪切位点 G/T 突变<sup>[22]</sup>、 $wx$  等位基因的第 2 外显子 23 bp 碱基重复插入<sup>[23]</sup>、 $Wx^{op}$  和  $Wx^{hp}$  等位基因的第 4 外显子 A/G 突变<sup>[24, 25]</sup>、 $Wx^{mq}$  等位基因的第 4 外显子 G/A 突变和第 5 外显子 T/C 突变<sup>[26]</sup>、 $Wx^{im}$  等位基因的第 6 外显子 A/C 突变<sup>[27]</sup> 和第 10 外显子的 C/T 突变<sup>[28]</sup>;这 7 个功能位点已被证实与稻米直链淀粉含量变化显著相关<sup>[29]</sup>。

此外,GBSS 不仅与直链淀粉合成相关,而且还可能涉及淀粉颗粒中支链淀粉超长链(ELC)的合成。Hanashiro 等<sup>[30]</sup>将 GBSS I 基因导入  $wx$  水稻突变体中,发现 ELC 增加了 7.5%~8.4%。水稻 SS III a 缺失突变体中,GBSS I 活性的增加伴随着大量高 ELC 含量的支链淀粉产生<sup>[31]</sup>。Teng 等<sup>[32]</sup>研究也发现, $Wx$  等位基因的差异还影响 SSs、BEs 以及 PUL 的活性,进而造成支链淀粉的结构和淀粉理化特性差异。因而,GBSS I 不仅负责催化直链淀粉合成,对支链淀粉的合成也有一定的影响。

### 3.2 淀粉合酶 I (SS I)

利用离子交换色谱分析发现,从灌浆期水稻胚乳中提取的可溶性淀粉合酶存在两个主要的峰,SS I 和 SS III;说明 SS I 和 SS III 为胚乳中主要的 SS 酶,且 SS I 活性显著高于 SS III,约占总 SS 活性的 70%<sup>[33]</sup>。这一结果在小麦和玉米胚乳中也得到了证实。水稻的 SS I 包含 15 个外显子和 14 个内含子,位于第 6 染色体上,与  $Wx$  距离仅 5 cM。Take-moto-Kuno 等<sup>[34]</sup>发现,SS I 活性在籼稻和粳稻品种中有显著差异,Native-PAGE 揭示籼稻品种 Kasalath 中 SS I 的活性只有粳稻品种日本晴的 1/6 甚至更少。Chen 和 Bao<sup>[35]</sup>利用 Native-PAGE 研究发现 SS I 在不同水稻品种中具有酶谱多态性,且 SS I 酶谱多态性可能由于氨基酸 K<sup>438</sup> 替换为氨基酸 E<sup>438</sup> 所

导致;并对预测的日本晴和 93-11 的 3D 结构分析发现,这一突变位点不位于酶的催化区域(黄色和蓝色区域),但是与氨基酸残基结合区位于同一平面(图 2-C)。

SS 和 BE 重组系玉米胚乳中淀粉链长分布分析表明 SS I 主要负责支链淀粉短链(聚合度为 6~15)的合成<sup>[36]</sup>。玉米胚乳中 SS I 更倾向于以短支链为底物,将其底物增加葡聚糖的链长时,SS I 的活性也显著下降,且发现大部分 ADPG 都被催化成了聚合度<10 的短链,说明 SS I 主要控制 A 链和 B1 链的延伸<sup>[37]</sup>。在水稻中,Fujita 等<sup>[38]</sup>通过 *Tos17* 逆转座子插入技术筛选获得 SS I 缺失突变体 *ssI*,在 *ssI* 的胚乳中,支链淀粉聚合度为 8~12 的链降低,聚合度为 6~7 和 16~19 的链增加,而长链聚合度不小于 21 的比例基本不变,表明 SS I 延伸聚合度为 6~7 的 A 链或者 B 链形成聚合度为 8~12 的链。进一步研究发现,SS I 活性的完全缺失并不影响淀粉颗粒的大小和直链淀粉含量,也不影响淀粉颗粒晶体结构的形成,说明具有其他 SS 能够补偿 SS I 功能的缺失或降低。

### 3.3 淀粉合酶 II (SS II)

水稻中具有 3 个 SS II 同工酶,即 SS II a、SS II b 和 SS II c,分别位于水稻的第 6、2 和 10 染色体上。SS II a 也称为 SS II -3 或 ALK,在水稻胚乳中特异性表达;SS II b 也称为 SS II -2,在叶片中特异性表达,可能与瞬时淀粉合成相关;SS II c 又称为 SS II -1,主要在胚乳中低丰度表达<sup>[39]</sup>。3 个水稻 SS II 同工酶相互之间的氨基酸同源性为 51%~64%,与其他植物 SS II 蛋白有 52%~73%的同源性<sup>[39]</sup>。

Umemoto 等<sup>[40]</sup>研究表明,SS II a 的等位基因差异是导致粳稻日本晴和籼稻 Kasalath 胚乳支链淀粉链长分布差异的最主要原因。Nakamura 等<sup>[33]</sup>研究证明,栽培稻支链淀粉结构可分为 L-型和 S-型,L 型主要存在于籼型品种中,大多数粳型品种为 S-型;S-型支链淀粉具有较多的短链(DP 6-10)和较少的中长链(DP 12-24),而长链 B2 和 B3 链的比率没有明显的差异;在蛋白水平上,籼稻的 SS II a 活性显著高于粳型品种。通过转基因技术,将籼型品种 IR36 的 SS II a 的 cDNA 导入粳型品种中,聚合度<11 的链减少,聚合度为 13~25 的链增加,支链淀粉从 S-型转换成 L-型<sup>[33]</sup>。

大量的研究也表明,在植物胚乳中,SS II a 通过

延长支链淀粉短链聚合度 $\leq 10$ 合成中链聚合度为12~24<sup>[41, 42]</sup>。Fujita等<sup>[43]</sup>将高活性的籼稻SS II *a*<sup>i</sup> cDNA导入 *isa1* 突变体中,发现SS II *a*<sup>i</sup>/*isa1* 转基因系中聚合度大于30的链增加,且SS II *a*能延伸 $\alpha$ -葡聚糖链。Wang等<sup>[44]</sup>对具有不同SS II *a*等位基因的水稻育种系材料进行淀粉结构及糊化温度分析,发现SS II *a*能合成中长链(聚合度为16~21),进而影响淀粉的糊化温度。这些研究结果表明SS II *a*通过延长A链和B1链合成中长链,不形成B2链或者更长的链,且直接影响淀粉的理化特性。

### 3.4 淀粉合酶Ⅲ(SSⅢ)

在水稻胚乳中,SSⅢ活性是仅次于SSⅠ的第二大类淀粉合酶。水稻中已克隆到2个SSⅢ基因SSⅢ*a*和SSⅢ*b*,分别位于第3和第8染色体上,其中SSⅢ*a*主要存在于胚乳中,SSⅢ*b*在叶片中表达<sup>[11]</sup>。Fujita等<sup>[38]</sup>从水稻胚乳中分离纯化获得SSⅢ*a*酶,其在离体条件下能够以糖原为引物,延伸链长为聚合度为 $\leq 11$ 的链合成长链。对水稻SSⅢ*a*缺失突变体*ssⅢa*研究发现,其淀粉颗粒结构松散,导致白色中心粉质胚乳的形成,相较于野生型,*ssⅢa*胚乳中支链淀粉聚合度为6~9、16~19和33~55的链减少,而聚合度为10~15和20~25的链增加<sup>[31]</sup>。Li等<sup>[45]</sup>对大麦*ss3a*突变体(*amol*)胚乳支链淀粉链长分布研究表明,短链聚合度为9~10减少,聚合度为15~24的链增加,而长链基本没有变化。这些结果说明SSⅢ*a*的功能主要是利用中长链合成支链淀粉聚合度 $> 30$ 的长链。此外,SSⅢ*a*活性的缺失会导致内源SSⅠ活性的增加,进而促进聚合度为9~15和22~29的链合成。对玉米SSⅢ*a*突变体*dull*的研究发现内源SSⅠ活性高于野生型,与水稻结果类似<sup>[46]</sup>。最近对水稻高抗性淀粉(RS)突变体的研究发现,SSⅢ*a*基因突变后显著提高了水稻胚乳中抗性淀粉、直链淀粉、脂类、直链淀粉-脂质复合体含量以及糊化温度;进一步研究发现,SSⅢ*a*对RS的调控依赖于*Wxa*的高水平表达<sup>[36]</sup>。因此,可以推断SS亚型之间存在互作,可以对部分不具功能或功能不足的SS亚型进行功能补偿。

### 3.5 淀粉合酶Ⅳ(SSⅣ)

目前为止,人们对SSⅣ在谷物中对葡萄糖链长的作用知之甚少。Hirose和Terao<sup>[39]</sup>在水稻中发现SSⅣ有二种同工型SSⅣ*a*和SSⅣ*b*,且它们

在水稻生长的整个阶段表达相对稳定,表明其在胚乳淀粉合成过程中具有一定的作用。Roldán等<sup>[47]</sup>从拟南芥中获得SSⅣ突变体,其胚乳直链淀粉与支链淀粉的比率基本不变,且支链淀粉链长分布也未发生变化,但是拟南芥胚乳中淀粉颗粒数量急剧下降,颗粒大小增加,说明SSⅣ可能涉及淀粉颗粒的形成及控制淀粉颗粒数量。Toyosawa等<sup>[48]</sup>发现SSⅣ*a*或者SSⅣ*b*基因突变对水稻胚乳中淀粉颗粒特性影响不大,在*ss4b/ss3b*双突变体中淀粉颗粒的数量和种子中淀粉含量变化不大,但是淀粉颗粒的形态由规则的多边形变成了球形,表明SSⅣ在淀粉颗粒的形成中具有重要的作用。

## 4 淀粉分支酶

淀粉分支酶(BE)是合成支链淀粉的关键酶,主要作用是切开 $\alpha$ -1,4糖苷键连接的葡聚糖,然后转移断裂的链将其还原末端连接到C6羟基上形成 $\alpha$ -1,6糖苷键从而产生支链淀粉的分支结构。根据淀粉分支酶的生物化学特性,水稻中的BE有BEⅠ和BEⅡ两种亚型(表1)。

### 4.1 淀粉分支酶Ⅰ(BEⅠ)

基于玉米BEⅠ和BEⅡ体外*E.coli*表达实验发现,BEⅠ倾向于形成聚合度大于16的长链,而BEⅡ产生聚合度小于12的短链<sup>[49]</sup>。对水稻BEⅠ突变体*sbeⅠ*研究发现,其胚乳中支链淀粉长链(聚合度大于37和聚合度为12~21)显著下降,而短链(聚合度小于10)和中长链(聚合度为24~34)增加,表明水稻BEⅠ可能主要用于B1链的合成,形成B链的簇状结构<sup>[50]</sup>。此外,*sbeⅠ*突变体胚乳淀粉相较于野生型具有更低的起始糊化温度,这一结果支持支链淀粉具有中高比例的长链会增加糊化的难度<sup>[31, 51]</sup>。Nakamura等<sup>[52]</sup>研究发现,BEⅠ通过分枝内层及外层葡萄糖链形成短链及聚合度不小于40的中长链。

成熟的BEⅠ蛋白由755个氨基酸残基组成,属于GH13家族蛋白;BEⅠ结构由3个模块组成,分别为碳水化合物结合区域48(CBM48)、中心催化区域(GH13)、C末端 $\alpha$ -淀粉酶区域。BEⅠ中高度保守的氨基酸残基Tyr235、Asp270、His275、Arg342、Asp344、Glu399和His467为假定的催化活性氨基酸残基;尤其是Asp344和Glu399非常接近于糖苷键,进一步确定其为活性中心<sup>[53]</sup>(图2-D)。

## 4.2 淀粉分支酶 II (BE II)

水稻中具有两种 BE II 同工型, BE II a 和 BE II b, BE II a 在不同组织中均有存在, BE II b 仅在胚乳中表达。水稻 BE II a 缺失突变体 *be2a* 胚乳中, 支链淀粉链长分布相较于野生型没有显著的改变。由此推测, BE II a 可能对其他 BE 同工型具有辅助作用。Nishi 等<sup>[54]</sup> 分离鉴定获得水稻 BE II b 突变体 *Amylose-Extender* (*ae* 突变体), 支链淀粉长链聚合度  $\geq 35$  (B2 和 B3 链) 和中长链 (聚合度为 15~30, A 链和 B1 链) 显著增加, 短链 (聚合度为 6~12) 显著减少。Nakamura 等<sup>[52]</sup> 研究发现 BE II b 专一的转移聚合度 6 和聚合度 7 的链。利用 RNA 干扰技术, 沉默水稻 BE II b 基因, 导致表观直链淀粉含量显著增加, 直链淀粉含量最高可增加 47.61%<sup>[55]</sup>。在水稻 *ae/wx* 双突变体胚乳中, 不仅无直链淀粉, 而且产生更多的长链, 少量的聚合度不大于 17 的链, 而聚合度为 8~12 的链也大幅度减少。这些数据表明 BE II b 在支链淀粉 A 链的合成过程中起着重要的作用。

## 5 淀粉脱分支酶

淀粉脱分支酶 (DBE) 能特异性地水解淀粉中的  $\alpha$ -1,6 糖苷键, 在氨基酸序列上与  $\alpha$ -淀粉酶相似, 属于淀粉水解酶家族。根据 DBE 作用底物不同, 可分为两大类 (表 1): 一类是异淀粉酶 (ISA), ISA 以变性支链淀粉、糖原和支链淀粉类似物为底物, 特异去除其  $\alpha$ -1,6 糖苷键, 不能作用于极限糊精和普鲁蓝; 另一类是普鲁蓝酶 (PUL), PUL 以极限糊精和普鲁蓝等为底物, 特异去除其  $\alpha$ -1,6 糖苷键。

### 5.1 异淀粉酶 (ISA)

水稻 ISA 有 3 个同工型, ISA1、ISA2 和 ISA3, ISA1 在胚乳发育早期表达, ISA2 在叶片和胚乳中均有表达, ISA3 在胚乳中表达量较低, 主要在叶片中表达<sup>[11]</sup>。对水稻 ISA1 突变体 *sug1* 研究发现 ISA 的表达与支链淀粉聚合度小于 12 的链长比例有关<sup>[56]</sup>。将正常的水稻 *ISA1* 基因导入突变体 *sugary-1* 中, 突变体表型转换为野生型<sup>[57, 58]</sup>。ISA2 缺少酶催化位点, 生物化学研究揭示 ISA2 可能与 ISA1 形成异源复合体后起催化作用。Utsumi 等<sup>[58]</sup> 研究发现, 在水稻胚乳中, 只有 ISA1 同源复合体在淀粉合成过程中具有功能, 异源复合体不具有功能, 但是在叶片中 ISA1-ISA2 异源复合体也参与

淀粉合成, 且比 ISA1 同源复合体更适应高温 (40℃) 条件下淀粉的合成。朱立楠等<sup>[59]</sup> 对 5 个直链淀粉和支链淀粉含量不同的粳稻品种胚乳发育过程中 *ISA* 基因表达量和活性研究发现, *ISA1* 在整个胚乳发育过程中的表达量明显高于 *ISA2*, 且 *ISA1* 的基因表达量、酶活性与支链淀粉含量正相关。这些研究表明, *ISA* 对支链淀粉的正确合成具有重要的作用, 包括剪切支链淀粉的过分支或者移除不当分支, 保证支链淀粉簇状结构的形成。

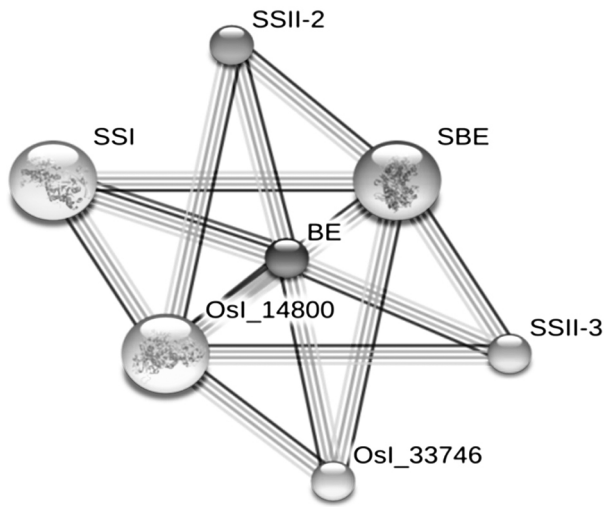
### 5.2 普鲁蓝酶 (PUL)

在水稻中, *PUL* 基因位于第 4 染色体上, 在整个灌浆过程中都有较高水平的表达, 同时在灌浆的中后期达到峰值<sup>[60]</sup>。Fujita 等<sup>[61]</sup> 研究发现水稻 *PUL* 缺失突变体聚合度为 13~29 的链降低, 聚合度小于 12 的短链增加, 但其增加幅度要低于 *sug1* 突变体; 但 *pul/sug1* 双突变体聚合度小于 7 的短链增幅则高于 *sug1* 突变体。玉米 *PUL* 突变体 *z-pul-204* 的胚乳结构和组成相较于野生型并没有明显不同, 但其 *sul/z-pul-204* 双突变体胚乳中大量积累植物糖原。这些研究结果表明, 在胚乳淀粉合成过程中, *PUL* 可能对 *ISA* 起到补偿作用。

最近的研究表明, *PUL* 与稻米淀粉的理化特性具有显著的相关性。Tian 等<sup>[62]</sup> 研究发现 *PUL* + 885 的 SNPs 对直链淀粉的含量具有微效的影响。Yan 等<sup>[63]</sup> 分析了 118 份糯稻中 17 个淀粉合成相关基因发现, 10 个淀粉合成基因涉及控制 RVA 谱特性, 其中 *PUL* 与 *PKV*、*HPV*、*CPV*、*BDV* 和 *PT* 显著相关。Kharabian-Masouleh 等<sup>[64]</sup> 对 233 份水稻淀粉合成相关基因进行测序, 并将获得的 SNPs 与淀粉理化特性进行关联分析发现, *PUL* 的两个 SNP 与 *PT*、*GT* 和 *CHK* 有相关性。Yang 等<sup>[65]</sup> 研究发现, 在以 SS II a 的 GC/TT SNP 为协变量条件下, *PUL* 为 HD 的主效位点。这些研究结果表明, *PUL* 在水稻淀粉合成过程中具有重要的作用。

## 6 淀粉合成相关酶之间的互作

淀粉合成相关酶之间的互作在小麦、大麦、玉米胚乳中早已被发现。在小麦胚乳中, SS I、SS II a 和 BE II a 或 BE II b 形成约 260 kD 的蛋白质复合物参与淀粉的合成<sup>[66]</sup>。Liu 等<sup>[67]</sup> 研究发现, 在玉米胚乳中, SS I、SS II a 和 BE II b 形成主要的蛋白复合物, 并可能与 BE II a 形成分子量更大的复合物。利用



BE—淀粉分支酶 I; SBE—淀粉分支酶 II b; Osl-14800—普鲁蓝酶; Osl-33746—淀粉合酶 II c。

BE, Branching enzyme I; BE II b, Branching enzyme II b; Osl-14800, Pullulanase; Osl-33746, Starch synthase II c.

图 3 水稻中淀粉合成相关酶之间的关联网络

Fig. 3. Potential association networks of starch synthesis enzymes in rice endosperm.

凝胶渗透色谱法能分离到约 670 kD 包括 SS I、SS II a、BE II a、BE II b 和 SS III 的较大蛋白质复合物,进一步研究显示 BE II b 在复合物中呈磷酸化状态<sup>[67, 68]</sup>。在玉米 *ae* 突变体胚乳中野生型蛋白复合物(SS I、SS II a 和 SBE II b)被由 SS I、SS II a、SBE I、BE II a 和 PHO1 组成的新的复合物代替,且 SBE I 和 SP 都被磷酸化了<sup>[67]</sup>。Liu 等<sup>[69]</sup>利用新的玉米 *ae* 突变体研究发现,BE II b 活性的缺失导致胚乳淀粉中形成 SS I、SS II a 和 BE I 复合体,PHO1 不参与形成复合体。

将水稻胚乳淀粉合成过程中主要的淀粉合成相关酶氨基酸序列提交到 STRING 网站(<http://string-db.org>)预测其蛋白质之间的互作,发现 SSs、BEs 和 DBEs 之间可能存在互作,但未得到实验验证(图 2)。近年来,对水稻胚乳中淀粉合成相关酶之间的互作也已从体内和体外实验中得到证实。Bao 等<sup>[70]</sup>对稻米淀粉直链淀粉含量(AAC)和糊化温度(GT)的研究发现,低 AAC 水稻具有高或低 GT,高 AAC 水稻具有中或低 GT;推测控制 AAC 的酶 GBSS I 与控制 GT 的酶 SS II a 之间可能存在互作;并假定了一个 SS II a 和 GBSS I 互作模型。Nakamura 等<sup>[71]</sup>研究证明纯化的水稻 PHO1 与 BE

I、BE II a 或者 BE II b 复合物具有功能互作。Nakamura 等<sup>[72]</sup>在体外对水稻 SS 和 BEs 酶促反应进行研究发现,SS I 酶促反应能被 BEs 所促进,BEs 活性也能被 SS I 所促进,说明 SS I 和 BEs 具有相互作用。Crofts 等<sup>[73]</sup>利用凝胶渗透色谱、免疫共沉淀等方法,对日本晴胚乳中淀粉合成相关酶进行分析发现,>700 kD 的蛋白复合物中包括 SS II a、SS III a、SS IV b、BE I、BE II b 和 PUL,200~400 kD 的蛋白复合物中包括 SS I、SS II a、BE II b、ISA、PUL 和 Pho1,免疫共沉淀揭示 SSs-BEs、BE II a-Pho1 以及 DBE-BE I 形成蛋白复合物。Chen 和 Bao 等<sup>[35]</sup>研究发现,SS I 与 PUL,SS I 与 BEs,PUL 与 BEs 具有互作,且日本晴和 93-11 胚乳中蛋白质互作模式不同。尽管水稻胚乳中淀粉合酶之间已确定能形成蛋白质复合物,但这种复合物的形成所起的作用还没有被完全了解。蛋白质复合物的形成提高了淀粉合成效率,因为一个反应的产物作为下一个反应的底物时可以在复合物内部很快传递(底物运输通道),但是具体的机制还有待进一步的研究。

## 7 展望

淀粉代谢途径研究一直受到广泛的关注,随着分子生物学、遗传学、生物化学以及结构分析等方法的应用,水稻淀粉生物合成过程中涉及到的关键酶的结构、功能及互作已基本明确,但是对于淀粉合成相关酶是如何与葡萄糖链进行互作以及淀粉合成相关酶复合体是如何参与淀粉的生物合成过程,所知甚少。淀粉合成相关酶是通过不同的方式与环境中的葡萄糖链相互作用,如 GBSS、BE II b 以及 SS I 通过紧密或松散的方式结合于淀粉颗粒的不同位置,进而与葡萄糖链互作;但是一些酶如 DBEs 几乎完全溶于基质中,以非共价的方式与碳水化合物结合,因而对其如何与葡萄糖链相互作用的机制还需要更多的体内或体外分析数据进行阐明。此外,淀粉合成过程还受一些调控因子的调节,如 *flo2* 编码一种具有 RPT 结构蛋白调节淀粉合成相关基因的表达<sup>[74]</sup>; *flo6* 编码具有 CBM48 结构域的蛋白,与 ISA1 结合调控淀粉合成<sup>[75]</sup>; 锌指蛋白 *OsbZIP58* 能激活水稻淀粉合成,影响淀粉颗粒数量以及改变短链和中长链比例<sup>[76]</sup>; 而这些调控因子之间是否存在联系,淀粉合成过程中是否存在调控网络对其基因及蛋白质进行调节还未可知,有待进一步的研究。



淀粉合成相关基因已成功应用于分子标记辅助育种筛选优质稻米中的优异基因。利用分子标记已经培育出一系列含低直链淀粉含量基因 *Wx-mq* 的优良食味粳稻品种如 Milk Queen、关东 194、南粳 46、南粳 9108 等<sup>[77-79]</sup>。杨瑞芳<sup>[80]</sup> 利用控制水稻抗性淀粉合成的主效基因 *sbe3-rs* 进行分子标记辅助育种获得了 3 个高产和优质的抗性淀粉水稻。但是,目前开发获得的淀粉合成相关基因的分子标记仍较少,优质水稻的培育仍需较多的分子标记进行辅助育种。

在过去的几十年,全球环境逐渐变暖;在水稻种植的季节里,最高温和最低温平均每 10 年分别升高 0.3℃ 和 0.2℃<sup>[81]</sup>。环境的恶化对水稻的产量和品质具有重大的冲击。Liu 等<sup>[82]</sup> 研究发现,高温会增加垩白率,降低水稻产量、直链淀粉含量以及总淀粉含量。Chen 等<sup>[83]</sup> 研究也发现,短期的高温增加了垩白率,使得淀粉颗粒变得松散,增加了单个淀粉颗粒。最近的研究表明,淀粉合成过程中相关基因如 *GBSS*、*BE I* 和 *BE II b* 在高温条件下下调表达<sup>[84, 85]</sup>。然而在高温条件下,垩白率的增加及淀粉颗粒的变化与淀粉合成相关基因有何关联,其分子机制仍不清楚;是否存在新的淀粉合酶复合体介导高温下淀粉合成也待进一步的研究。因而,在越来越严峻的环境条件下,以水稻为研究对象,阐明水稻淀粉的合成分子机制,对于提高水稻产量、改良稻米品质,提高中国农业竞争力,具有重要的意义。

## 参考文献:

- [1] 朱德峰, 张玉屏, 陈惠哲, 向镜, 张义凯. 中国水稻高产栽培技术创新与实践. 中国农业科学, 2015, 48(17): 3404-3414.  
Zhu D F, Zhang Y P, Chen H Z, Xiang J, Zhang Y K. Innovation and practice of high-yield rice cultivation technology in China. *Sci Agric Sin*, 2015, 48(17): 3404-3414. (in Chinese with English abstract)
- [2] Vandeputte G E, Delcour J A. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: A focus on rice starch. *Carbohydr Polym*, 2004, 58: 245-266.
- [3] Singh N, Kaur L, Sandhu K S, Nishinari K. Relationships between physicochemical, morphological, thermal, rheological properties of rice starches. *Food Hydrocolloid*, 2006, 20(4): 532-542.
- [4] 包劲松. 稻米淀粉品质遗传与改良研究进展. 分子植物育种, 2007, 5(6s): 1-20.  
Bao J S. Progress in studies on inheritance and improvement of rice starch quality. *Mol Plant Breeding*, 2007, 5(6s): 1-20. (in Chinese with English abstract)
- [5] Nakamura Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 718-725.
- [6] Hannah L C, James M. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Curr Opin Biotech*, 2008, 19: 160-165.
- [7] Nakamura Y. Biosynthesis of reserve starch//Nakamura Y. Starch: Metabolism and Structure. Springer, Japan, 2015: 161-209.
- [8] Fettke J, Malinova I, Albrecht T, Hejazi M, Steup M. Glucose-1-phosphate transport into protoplasts and chloroplasts from leaves of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 155(4): 1723-1734.
- [9] Tetlow I J, Davies E J, Vardy K A, Bowsher C G, Burrell M M, Emes M J. Subcellular localization of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of a plastidial isoform. *J Exp Bot*, 2003, 54: 715-725.
- [10] Bowsher C G, Scrase-Field E F A L, Esposito S, Emes M J, Tetlow I J. Characterization of ADP-glucose transport across the cereal endosperm amyloplast envelope. *J Exp Bot*, 2007, 58: 1321-1332.
- [11] Ohdan T, Francisco P B, Sawada T, Hirose T, Terao T, Sato H, Nakamura Y. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J Exp Bot*, 2005, 56(422): 3229-3244.
- [12] Lee S K, Hwang S K, Han M, Eom J S, Kang H G, Han Y, Choi S B, Cho M H, Bhoo S H, An G H, Hahn T R, Okita T W, Jeon J S. Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 2007, 65(4): 531-546.
- [13] Dawar C, Jain S, Kumar S. Insight into the 3D structure of ADP-glucose pyrophosphorylase from rice (*Oryza sativa* L.). *J Mol Model*, 2013, 19(8): 3351-3367.
- [14] Seferoglu A B, Koper K, Can F B, Cevahir G, Kavakli I H. Enhanced heterotetrameric assembly of potato ADP-glucose pyrophosphorylase using reverse genetics. *Plant Cell Physiol*, 2014, pcu078.
- [15] Tuncel A, Cakir B, Hwang S K, Okita T W. The role of the large subunit in redox regulation of the rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *FEBS J*, 2014, 281(21): 4951-4963.
- [16] Tang X J, Peng C, Zhang J, Cai Y, You X M, Kong F, Yan H G, Wang G X, Wang L, Jin J, Chen W W, Chen X G, Ma J, Wang P, Tiang L, Zhang W W, Wan J M. ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 2 is essential for storage substance accumulation and subunit interactions in rice endosperm. *Plant Sci*, 2016, 249: 70-83.
- [17] Tetlow I J, Morell M K, Emes M J. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot*, 2004, 55(406): 2131-2145.
- [18] Fujita N, Nakamura Y. Distinct and overlapping functions of starch synthase isoforms. *Essent Rev Exp Biol*, 2012a, 5: 115-140.

- [19] Denyer K. The isolation and characterization of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Environ*, 1995, 18(9):1019-1026.
- [20] Diail W M, Jiang H W, Chen Q S, Liu F, Wu P. Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: Gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm. *Planta*, 2003, 218(2): 261-268.
- [21] Wattoo J I, Iqbal M S, Arif M, Saleem Z, Shahid M N, Iqbal M. Homology modeling, functional annotation and comparative genome analysis of GBSS enzyme in rice and maize genomes. *Int J Agric Biol*, 2015, 17(5): 1061-1065.
- [22] Bligh H F J, Larkin P D, Roach P S, Jones C A, Fu H, Park W D. Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties. *Plant Mol Biol*, 1998, 38(3): 407-415.
- [23] Inukai T, Sako A, Hirano H Y, Sano Y. Analysis of intragenic recombination at wx in rice: Correlation between the molecular and genetic maps within the locus. *Genome*, 2000, 43(4): 589-596.
- [24] Mikami I, Aikawa M, Hirano H Y, Sano Y. Altered tissue-specific expression at the *Wx* gene of the opaque mutants in rice. *Euphytica*, 1999, 105(2): 91-97.
- [25] Liu L L, Ma X D, Liu S J, Zhu C L, Jiang L, Wang Y H, Shen Y, Ren Y L, Dong H, Chen L M, Liu X, Zhao Z G, Zhai H Q, Wan J M. Identification and characterization of a novel *Waxy* allele from a Yunnan rice landrace. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(6): 609-626.
- [26] Sato H, Suzuki Y, Sakai M, Imbe T. Molecular characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Sci*, 2002, 52(2): 131-135.
- [27] Larkin P D, Park W D. Association of *waxy* gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breeding*, 2003, 12(4): 335-339.
- [28] Bergman C J, Delgado J T, McClung A M, Fjellstrom R G. An improved method for using a microsatellite in the rice *waxy* gene to determine amylose class. *Cereal Chem*, 2001, 78(3): 257-260.
- [29] 李枝桦, 陆春明, 卢宝荣, 王云月. 云南传统栽培稻品种 *waxy* 基因序列分析. 分子植物育种, 2011, 9(6):665-671.  
Li Z H, Lu C M, Lu B R, Wang Y Y. Sequence analysis of *waxy* gene of yunnan rice landrace. *Mol Plant Breeding*, 2011, 9(6):665-671. (in Chinese with English abstract)
- [30] Hanashiro I, Itoh K, Kuratomi Y, Yamazaki M, Igarashi T, Matsugasako J I, Takeda Y. Granule-bound starch synthase I is responsible for biosynthesis of extra-long unit chains of amylopectin in rice. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(6): 925-933.
- [31] Fujita N, Yoshida M, Kondo T, Saito K, Utsumi Y, Tokunaga T, Nishi H, Satoh J H, Park J L, Jane A, Miyao A, Hirochika Y, Nakamura Y. Characterization of SS III a-deficient mutants of rice: The function of SS III a and pleiotropic effects by SS III a deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol*, 2007, 144(4): 2009-2023.
- [32] Teng B, Zhang C, Zhang Y, Wu J, Li Z, Luo Z, Yang J. Comparison of amylopectin structure and activities of key starch synthesis enzymes in the grains of rice single-segment substitution lines with different *Wx* alleles. *Plant Growth Reg*, 2015, 77(2): 117-124.
- [33] Nakamura Y, Francisco P B, Hosaka Y, Sato A, Sawada T, Kubo A, Fujita N. Essential amino acids of starch synthase II a differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice varieties. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(2): 213-227.
- [34] Takemoto-Kuno Y, Suzuki K, Nakamura S, Satoh H, Ohtsubo K. Soluble starch synthase I effects differences in amylopectin structure between *indica* and *japonica* rice varieties. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(24): 9234-9240.
- [35] Chen Y L, Bao J S. Underlying mechanisms of zymographic diversity in starch synthase I and pullulanase in rice-developing endosperm. *J Agr Food Chem*, 2016, 64(9): 2030-2037.
- [36] Cao H, James M G, Myers A M. Purification and characterization of soluble starch synthases from maize endosperm. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 373(1): 135-146.
- [37] Commuri P D, Keeling P L. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: Studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant J*, 2001, 25: 475-486.
- [38] Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol*, 2006, 140(3): 1070-1084.
- [39] Hirose T, Terao T. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2004, 220(1): 9-16.
- [40] Umamoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor Appl Genet*, 2002, 104(1): 1-8.
- [41] Jeon J S, Nayeon R, Tae-Ryong H, Harkamal W, Yasunori N. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Bioch*, 2010, 48: 383-392.
- [42] Tetlow I J. Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Sci Res*, 2011, 21: 5-32.
- [43] Fujita N, Hanashiro I, Suzuki S, Higuchi T, Toyosawa Y, Utsumi Y, Itoh R, Aihara S, Nakamura Y. Elongated phyto-glycogen chain length in transgenic rice endosperm expressing active starch synthase II a affects the altered solubility and crystallinity of the storage  $\alpha$ -glucan. *J Exp Bot*, 2012b, 63(16): 5859-5872.
- [44] Wang K, Hasjim J, Wu A C, Li E, Henry R J, Gilbert R G. Roles of GBSS I and SS II a in determining amylose fine structure. *Carbohydr Polym*, 2015, 127: 264-274.
- [45] Li Z, Li D, Du X, Wang H, Larroque O, Jenkins C L, Jobling S A, Morell M K. The barley *amol* locus is tightly linked to the starch synthase III a gene and negatively regulates expression of granule-bound starch synthetic genes. *J Exp Bot*, 2011, 62(14): 5217-5231.
- [46] Lin Q, Huang B, Zhang M, Zhang X, Rivenbark J, Lappe R L, James M G, Myers A M, Hennen-Bierwagen T A. Func-

- tional interactions between starch synthase III and isoamylase-type starch-debranching enzyme in maize endosperm. *Plant Physiol*, 2012, 158(2): 679-692.
- [47] Roldán I, Wattedbled F, Mercedes Lucas M, Delvallé D, Planchot V, Jiménez S, Pérez R, Ball S, D'Hulst C, Mérida Á. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J*, 2007, 49(3): 492-504.
- [48] Toyosawa Y, Kawagoe Y, Matsushima R, Crofts N, Ogawa M, Fukuda M, Kumamaru T, Okazaki Y, Kusano M, Saito K, Toyooka K, Sato M, Ai Y F, Jane J L, Nakamura Y, Fujita N. Deficiency of starch synthase IIIa and IVb alters starch granule morphology from polyhedral to spherical in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2016, 170(3): 1255-1270.
- [49] Guan H, Li P, Imparl-Radosevich J, Preiss J, Keeling P. Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 342(1): 92-98.
- [50] Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A, Fujita N, Nakamura Y. Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2003, 133(3): 1111-1121.
- [51] Ryoo N, Yu C, Park C S, Baik M Y, Park I M, Cho M H, Bhoo S H, An G, Hahn T R, Jeon J S. Knockout of a starch synthase gene *OsSS III a/Flo5* causes white-core floury endosperm in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep*, 2007, 26(7): 1083-1095.
- [52] Nakamura Y, Utsumi Y, Sawada T, Aihara S, Utsumi C, Yoshida M, Kitamura S. Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(5): 776-794.
- [53] Noguchi J, Chaen K, Vu N T, Akasaka T, Shimada H, Nakashima T, Nishi A, Satoh H, Omori T, Kakuta Y, Kimura M. Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis and substrate binding. *Glycobiology*, 2011, 21(8): 1108-1116.
- [54] Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H. Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2001, 127: 459-472.
- [55] Jiang H, Zhang J, Wang J, Xia M, Zhu S, Cheng B J. RNA interference-mediated silencing of the starch branching enzyme gene improves amylose content in rice. *Genet Mol Res*, 2013, doi http://dx. doi. org/10.4238.
- [56] Wong K S, Kubo A, Jane J L, Harada K, Satoh H, Nakamura Y. Structures and properties of amylopectin and phytyglycogen in the endosperm of *sugary-1* mutants of rice. *J Cereal Sci*, 2003, 37: 139-149.
- [57] Kubo A, Rahman S, Utsumi Y, Li Z, Mukai Y, Yamamoto M, Ugaki M, Harada K, Satoh H, Konik-Rose C, Morell M, Nakamura Y. Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat isoamylase1 gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol*, 2005, 137(1): 43-56.
- [58] Utsumi Y, Utsumi C, Sawada T, Fujita N, Nakamura Y. Functional diversity of isoamylase oligomers; The ISA1 homooligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2011, 156: 61-77.
- [59] 朱立楠, 刘海英, 孙璐璐, 孙涛, 郭雪冬, 朱方旭, 张忠臣, 金正勋. 水稻灌浆过程中胚乳异淀粉酶基因家族表达特性及其与淀粉含量间关系分析. *中国水稻科学*, 2015, 29(5): 528-534. Zhu L N, Liu H Y, Sun L L, Sun T, Guo X D, Zhu F X, Zhang Z C, Jin Z X. Analysis of expression characteristics of isoamylase and the correlation with starch content during grain filling in rice. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(5): 528-534. (in Chinese with English abstract)
- [60] Li Q F, Zhang G Y, Dong Z W, Yu H X, Gu M H, Sun S S M, Liu Q Q. Characterization of expression of the *OsPUL* gene encoding a pullulanase-type debranching enzyme during seed development and germination in rice. *Plant Physiol Bioch*, 2009, 47: 351-358.
- [61] Fujita N, Toyosawa Y, Utsumi Y, Higuchi T, Hanashiro I, Ikegami A, Akuzawa S, Yoshida M, Mori A, Inomata K, Itoh R, Miyao A, Hirochika H, Satoh H, Nakamura Y. Characterization of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm. *J Exp Bot*, 2009, 60: 1009-1023.
- [62] Tian Z X, Qian Q, Liu Q, Yan M, Liu X, Yan C J, Liu G, Gao Z, Tang S, Zeng D, Wang Y, Yu J, Gu M, Li J. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. *PNAS*, 2009, 106(51): 21760-21765.
- [63] Yan C J, Tian Z X, Fang Y W, Yang Y C, Li J, Zeng S Y, Gu S L, Xu C W, Tang Z S, Gu M H. Genetic analysis of starch paste viscosity parameters in glutinous rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2011, 122: 63-76.
- [64] Kharabian-Masouleh A, Waters D L, Reinke R F, Ward R, Henry R J. SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. *Sci Rep*, 2012, 2.
- [65] Yang F, Chen Y L, Tong C, Huang Y, Xu F F, Li K H, Corke H, Sun M, Bao J S. Association mapping of starch physicochemical properties with starch synthesis-related gene markers in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breeding*, 2014, 34(4): 1747-1763.
- [66] Tetlow I J, Beisel K G, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, Bresolin N S, Wait R, Morell M K, Emes M J. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1878-1891.
- [67] Liu F, Makhmoudova A, Lee E A, Wait R, Emes M J, Tetlow I J. The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *J Exp Bot*, 2009b, 60(15): 4423-4440.
- [68] Hennen-Bierwagen T A, Liu F, Marsh R S, Kim S, Gan Q, Tetlow I J, Emes M J, James M G, Myers A M. Starch bio-

- synthetic enzymes from developing *Zea mays* endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol*, 2008, 146: 1892-1908.
- [69] Liu F, Ahmed Z, Lee E A, Donner E, Liu Q, Ahmed R, Morrell, M K, Emes M J, Tetlow I J. Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein-protein interactions. *J Exp Bot*, 2012, 63(3): 1167-1183.
- [70] Bao J S. Towards understanding of the genetic and molecular basis of eating and cooking quality of rice. *Cereal Food World*, 2012, 57: 148-156.
- [71] Nakamura Y, Ono M, Utsumi C, Steup M. Functional interaction between plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice during the synthesis of branched maltodextrins. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(5): 869-878.
- [72] Nakamura Y, Aihara S, Crofts N, Sawada T, Fujita N. In vitro studies of enzymatic properties of starch synthases and interactions between starch synthase I and starch branching enzymes from rice. *Plant Sci*, 2014, 224: 1-8.
- [73] Crofts N, Abe N, Oitome N F, Matsushima R, Hayashi M, Tetlow, I J, Emes M J, Nakamura Y, Fujita N. Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes. *J Exp Bot*, 2015, 66: 4469-4482.
- [74] She K C, Kusano H, Koizumi K, Yamakawa H, Hakata M, Imamura T, Fukuda M, Naito N, Tsurumaki Y, Yaeshima M, Tsuge T, Matsumoto K, Kudoh M, Itoh E, Kikuchi S, Kishimoto N, Yazaki J, Ando T, Yano M, Aoyama T, Sasaki T, Satoh H, Shimada H. A novel factor FLOURY ENDOSPERM2 is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *Plant Cell*, 2010, 22: 3280-3294.
- [75] Peng C, Wang Y, Liu F, Ren Y, Zhou K, Lv J, Zheng M, Zhao S L, Zhang L, Wang C M, Jiang L, Zhang X, Guo X P, Bao Y Q, Wan J M. FLOURY ENDOSPERM6 encodes a CBM48 domain-containing protein involved in compound granule formation and starch synthesis in rice endosperm. *Plant J*, 2014, 77: 917-930.
- [76] Wang J C, Xu H, Zhu Y, Liu Q Q, Cai X L. OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm. *J Exp Bot*, 2013, 64: 3453-3466.
- [77] Tomita K, Horiuchi H, Terada K, Tanoi M, Kobayashi A, Kanda K, Tanaka I, Minobe T, Furuta H, Yamamoto A, Shinoyama H, Aoki K, Masaki N, Minami T, Sugimoto A, Kagashima C, Horiuchi K. New-hikari, a new rice cultivar. *Bull Fukui Agric Exp*, 2007, 44: 1-20.
- [78] 王才林, 陈摇涛, 张亚东, 朱镇, 赵凌, 林静. 通过分子标记辅助选择培育优良食味水稻新品种. *中国水稻科学*, 2009, 23: 25-30.
- Wang C L, Chen T, Zhang Y D, Zhu Z, Zhao L, Lin J. Breeding of a new rice variety with good eating quality by marker assisted selection. *Chin J Rice Sci*, 2009, 23(1): 25-30. (in Chinese with English abstract)
- [79] 王才林, 张亚东, 朱摇镇, 姚姝, 赵庆勇, 陈涛, 周丽慧, 赵凌. 优良食味粳稻新品种南粳 9108 的选育与利用. *江苏农业科学*, 2013, 41: 86-88.
- Wang C L, Zhang Y D, Zhu Y Z, Yao S, Zhao Q Y, Chen T, Zhou L H, Zhao L. Breeding and utilization of a new good eating quality rice variety Nanjing 9108. *Jiangsu Agric Sci*, 2013, 41: 86-88. (in Chinese with English abstract)
- [80] 杨瑞芳, 白建江, 方军, 曾威, 朴钟泽, 李刚. 分子标记辅助选择选育高抗性淀粉水稻新品种. *核农学报*, 2015, 29: 2259-2267.
- Yang R F, Bai J J, Fang J, Zeng W, Piao Z Z, Lee G S. Establishment of marker-assisted selection system for breeding rice varieties with high resistant starch content. *J Nucl Agric Sci*, 2015, 29(12): 2259-2267. (in Chinese with English abstract)
- [81] Sacks W J, Deryng D, Foley J A, Ramankutty N. Crop planting dates: an analysis of global patterns. *Global Ecol Biogeogr*, 2010, 19(5): 607-620.
- [82] Liu Q, Wu X, Ma J, Li T, Zhou X, Guo T. Effects of high air temperature on rice grain quality and yield under field condition. *Agron J*, 2013, 105(2): 446-454.
- [83] Chen J, Tang L, Shi P, Yang B, Sun T, Cao W, Zhu Y. Effects of short-term high temperature on grain quality and starch granules of rice (*Oryza sativa* L.) at post-anthesis stage. *Protoplasma*, 2016: 1-9.
- [84] Liao J L, Zhou H W, Zhang H Y, Zhong P A, Huang Y J. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the early milky stage of rice grains during high temperature stress. *J Exp Bot*, 2014, 65(2): 655-671.
- [85] Sreenivasulu N, Butardo V M, Misra G, Cuevas R P, Anacleto R, Kishor P B K. Designing climate-resilient rice with ideal grain quality suited for high-temperature stress. *J Exp Bot*, 2015, 66(7): 1737-1748.
- [86] Zhou H J, Wang L J, Liu G F, Meng X B, Jing Y H, Shu X L, Kong X L, Sun J, Yu H, Smith S M, Wu D X, Li J Y. (2016). Critical roles of soluble starch synthase SS III a and granule-bound starch synthase Waxy in synthesizing resistant starch in rice. *P Natl Acad Sci*, 2016, DOI: 10.1073/pnas.1615104113.