

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00018

## 花后高温下水稻可溶性淀粉合酶同工型基因的表达模式

韦克苏<sup>1</sup> 张其芳<sup>1</sup> 程方民<sup>1,\*</sup> 陈 能<sup>2</sup> 谢黎红<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029; <sup>2</sup> 中国水稻研究所 / 农业部稻米及制品质量检测中心, 浙江杭州 310016

**摘 要:** 利用人工气候箱设高温(32℃)和适温(22℃)两个温度处理, 结合实时荧光定量 PCR 技术, 对水稻胚乳中可溶性淀粉合酶(SSS)8 个主要同工型基因的表达特征及其温度响应进行了检测分析。结果表明, 水稻 SSS 各同工型基因对花后高温胁迫的响应表达模式明显不同, SSSIb、SSSIc、SSSIb 和 SSSIVa 等同工型基因呈上调表达模式, 而 SSSIIa、SSSIIIa 等则呈下调表达模式; SSSI 和 SSSIIIa 是水稻 SSSs 基因在胚乳中表达的主要形式, 而其他 6 种同工型基因的相对表达量均较低; 与 SSSI、SSSIc、SSSIb 和 SSSIVb 相比, 水稻胚乳中 SSSIb、SSSIIIa 和 SSSIVa 等同工型基因对高温胁迫的响应表达更敏感。

**关键词:** 实时定量 PCR; 水稻; 高温胁迫; SSS 基因; 同工型; 表达模式

## Expression Profiles of Rice Soluble Starch Synthase(SSS) Genes in Response to High Temperature Stress at Filling Stage

WEI Ke-Su<sup>1</sup>, ZHANG Qi-Fang<sup>1</sup>, CHENG Fang-Min<sup>1,\*</sup>, CHEN Neng<sup>2</sup>, and XIE Li-Hong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup> Rice Product Quality Supervision and Inspection Center, Ministry of Agriculture/China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

**Abstract:** The expression responses of eight soluble starch synthase (SSS) isoform genes involved in starch synthesis metabolism in rice endosperms were detected by using two temperature treatments (32℃ and 22℃ for the mean daily temperature, respectively) in chambers and real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). The result showed that the expression patterns of SSS genes in rice endosperms under high temperature stress were isoform-dependent, with relatively high expression levels and the up-regulated patterns for some isoform genes (SSSIb, SSSIc, SSSIb, and SSSIVa, etc.), but relatively low expression levels and the down-regulated patterns for other isoform genes (SSSIIa and SSSIIIa, etc.); SSSI and SSSIIIa were highly expressed in rice endosperms during whole filling stages in two temperature treatments, implying that SSSI and SSSIIIa are two major isoform genes of SSS; the expressions of SSSIb, SSSIIIa, and SSSIVa genes were much more sensitive to high temperature stress compared to those of SSSI, SSSIc, SSSIb, and SSSIVb.

**Keywords:** Real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR); Rice (*Oryza sativa* L.); High temperature; Soluble starch synthase (SSS); Isoform; Expression pattern

稻米的主要组分是淀粉, 包括直链淀粉和支链淀粉, 两种类型淀粉的比例、组成及其精细结构差异是影响稻米食用品质的一个主要决定因素<sup>[1-2]</sup>。现已基本明确, 在水稻籽粒淀粉合成过程中, 蔗糖合酶(SuSy)、ADPG 焦磷酸化酶(ADPGpp)、可溶性淀粉合酶(SSS)、束缚态淀粉合酶(GBSS)、淀粉分支酶(SBE)和淀粉去分支酶(DBE)是控制籽粒蔗糖卸载和淀粉合成代谢的几个关键酶<sup>[3-5]</sup>。其中, 可溶性淀粉合酶(SSS)是对水稻灌浆结实期高温胁迫表现相对较敏感的一个关键酶, 它通常是以游离态存在于胚

乳淀粉体中, 与淀粉分支酶一起合成支链淀粉, 最终影响淀粉的链长和分支频率<sup>[6-8]</sup>。

近年来, 国内外在小麦、玉米、水稻、大麦、大豆等植物中已发现了 SSS 的多种同工酶或同工型<sup>[4,9-11]</sup>。根据其催化性质、氨基酸序列同源性和基因结构的保守性, 这些 SSS 同工型可分为 4 个基因家族(SSSI、SSSII、SSSIII 和 SSSIV)<sup>[5,11-12]</sup>。在氨基酸序列上, 各类 SSS 的 C-末端都具有非常强的催化部位的保守性, 但是 N-末端明显不同, 决定了它们在淀粉合成过程中的特异性<sup>[13-14]</sup>。利用转基因和突变

本研究由国家自然科学基金项目(30671228), 教育部高等学校博士点专项科研基金项目(20070335104)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 程方民, E-mail: chengfm@zju.edu.cn

Received(收稿日期): 2008-05-14; Accepted(接受日期): 2008-07-17.

体的研究结果证实, 单一 SSS 同工酶的缺失不会使淀粉合成终止, 但能改变淀粉的分子结构和淀粉粒形态<sup>[10,15]</sup>。

水稻灌浆结实期温度是对稻米品质影响最明显、最深刻的一个环境因子<sup>[1,16]</sup>。近年来, 针对灌浆结实期高温导致稻米食用品质不佳的生理原因, 国内外已有不少学者相继利用人工气候箱或大田温控试验, 对不同温度处理下水稻灌浆过程中籽粒淀粉合成代谢诸关键酶的生理活性差异进行过较系统的研究分析<sup>[6,8]</sup>。但是, 对于上述诸关键酶在不同温度处理下的各类同工型变化及其与稻米淀粉精细结构间的联系, 目前尚不清楚。为此, 本文采用人工气候箱控温处理和荧光定量 PCR (Fluorescence Quantitative PCR, FQ-PCR) 技术, 对不同温度处理下 SSS 各类同工型基因在水稻灌浆主要时期的表达模式变化及其差异特征进行了比较分析, 旨在从同工型层次上初步认识高温胁迫与稻米淀粉品质形成间的关系, 为进一步深入开展稻米品质的环境调控及其分子机理研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2007 年在浙江大学教学实验农场种植早籼品种浙辐 49。3 月 28 日播种, 湿润育秧, 4 月 25 日移栽, 田间常规管理, 及时防治病虫杂草。孕穗后期选取发育进程与长势基本一致的稻株 20 株, 带泥移入盆钵培育 7~10 d。当盆钵中的稻株齐穗时, 选同日开花且发育良好的单穗挂牌标记, 并分别移入不同温度的气候箱中, 在开花后的第 4 天、第 8 天、第 12 天和第 16 天分别取样, 进行胚乳相关酶基因的表达特征分析。

### 1.2 人工气候箱控温处理

使用两台 CONVIRON 人工气候箱, 日均温度分别为 32℃(高温处理, HT)和 22℃(适温处理, LT), 温度日变化模拟自然气候特征, 以 24 h 为一循环, 按文献[6]设定程序自动控制。其中, 高温处理的最高温度和最低温度分别为 36℃和 28℃, 适温处理的最高温度和最低温度分别为 26℃和 18℃, 日最大温差均为 8℃。两台气候箱中的其他生长条件均保持完全一致。其中, 光照时间为 6:00~19:00, 光照强度为 100~120 J m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 相对湿度为 75%~80%, 风速为 0.5 m s<sup>-1</sup>。

### 1.3 水稻籽粒 RNA 的提取、纯化与反转录

提取和纯化样品总 RNA 采用冻融法, 参照张海燕等<sup>[17]</sup>的方法略做改进。取稻穗中上部、且灌浆进程基本一致的籽粒 20 粒, 去壳去胚、加液氮研磨成粉, 取 100 mg 的研碎粉末用 1 mL 预冷的 Trizol 试剂提取, 之后加入约 1/5 上层体积的氯仿, 离心后用无水乙醇沉淀。RNA 沉淀经 75% DEPC-乙醇洗涤 2 次, 以 DEPC-H<sub>2</sub>O 充分溶解。为了将发育胚乳中沉积的淀粉等多糖类物质析出, 在 RNA 的提取过程中, 将粗提总 RNA 于 -70℃ 下 30 min, 加入 DSG [(2% CTAB(W/V), 2% PVPK25 (W/V), 100 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol L<sup>-1</sup> Sodium-EDTA (pH 8.0), 2.0 mol L<sup>-1</sup> NaCl, 用前再加入终体积 2% 的 2-Mercaptoethanol)], 随之在 65℃ 水浴 1 min, 然后又转入 -70℃ 下冷冻, 反复冻融 5 次, 沉淀分离后, 用琼脂糖甲醛变性凝胶电泳和分光光度计扫描检测提取的 RNA 纯度, 并将剩余的总 RNA 贮存于 -70℃ 冰箱备用。

反转录试剂盒 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) 购于 Fermentas 公司。采用 20 μL 的反转录反应体系, 其中包含 1 μg 总 RNA, 1 μL 的 Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer, 并加 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 12 μL; 反应体系于 70℃ 下变性 5 min, 冰浴迅速冷却, 加入 4 μL 5× reaction buffer, 1 μL RiboLock Ribonuclease Inhibitor (20 U μL<sup>-1</sup>) 及 2 μL 的 dNTPs (10 mmol L<sup>-1</sup>), 35℃ 保温 5 min, 加入 1 μL RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U μL<sup>-1</sup>) 后 42℃ 保温 60 min, 再在 70℃ 保温 10 min 终止反应, 冷却。反转录得到的 cDNA 用于实时荧光定量分析。

### 1.4 SSS 同工型基因的引物设计

按照荧光定量 PCR 引物设计原则, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计水稻 SSS 家族各同工型基因的 FQ-PCR 引物(表 1)。以 A-actin 基因为内标, 设计 1 对特异引物。其中, 正向引物为 5'-CAGCACATTC CAGCAGATGT-3', 反向引物为 5'-TAGGCCGGT TGAAACTTTG-3'。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

采用 Roche 公司 EvaGreen qPCR Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒, 25 μL 反应体系中包含 12.5 μL EvaGreen qPCR Master Mix, 上、下游引物 (10 μmol L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, 2.5 μL 反转录 cDNA 模板, 9 μL 无菌离子水。每个样品做 3 次平行反应, 扩增程序为, 95℃ 15 min 激活 HotStart DNA 聚合酶, 95℃ 变

表 1 SSS 各同工型基因的 FQ-PCR 引物序列  
Table 1 The primer sequences of SSS isoforms involving in starch biosynthesis pathway in rice grains

基因名称 Gene name	登录号 Accession No.	上游引物 Up-primer (5'–3')	下游引物 Down-primer (3'–5')	退火温度 $T_m$ (°C)
SSSI	D16202	CGGGACAATATTCAATTCGTC	GGTGGGAAACTGGAACACTAAA	53
SSSIIa	AF419099	GGCCAAGTACCAATGGTAAA	GCATGATGCATCTGAAACAAAGC	60
SSSIIb	AF395537	CGGAACTACAAGGAGAGCTGGA	GTGCCGCCGTCTCAGCAG	58
SSSIIc	AF383878	GACCGAAATGCCTTTTTCTCG	GGGCTTGAGCCTCTCCTTA	62
SSSIIIa	AY100469	GCCTGCCCTGGACTACATTG	GCAAACATATGTACACGGTTCTGG	53
SSSIIIb	AF432915	ATTCCGCTCGCAAGAAGCTGA	CAACCGCAGGATAACGGAAA	53
SSSIVa	AY100470	GGGAGCGGCTCAAACATAAA	CCGTGCACTGACTGCAAAAT	55
SSSIVb	AY373258	TTTCAGCTGGGCCTCTTCAG	TGCAGATGAAGCCATGTTTCG	56

性 15 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s (荧光信号检测), 40 个循环后利用 BioRad icycler iQ 荧光定量 PCR 仪完成扩增过程。

做实时荧光定量 PCR 前, 先进行普通 PCR 扩增判断引物的特异性, 对扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。若电泳结果有引物二聚体, 则调整退火温度, 直到没有引物二聚体。选择最佳退火温度(表 1), 按该退火温度进行实时荧光定量 PCR 扩增。每样品重复 3 次。

1.6 数据分析

采用参照基因的  $\Delta C_T$  法<sup>[18]</sup>, 在调整 Baseline cycles 和 Threshold value( $C_t$ ) 后, 利用公式  $\Delta C_T = 2^{C_{t(\text{reference})} - C_{t(\text{target})}}$ , 计算出各目标基因(SSSI, SSSIIa, SSSIIb, SSSIIc, SSSIIIa, SSSIIIb, SSSIVa, SSSIVb) 的相对表达倍数。其中, Baseline cycles 是样本的荧光背景值和阴性对照的荧光值,  $C_t$  值是 PCR 扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数, 该点位于 PCR 产物消除荧光背景后进入指数增长期的始点。 $C_{t(\text{reference})}$  和  $C_{t(\text{target})}$  分别为内标基因表达量和目标基因达到设定荧光值时的扩增循环次数。

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度和完整性检测

经紫外分光光度计检测, 所有 RNA 样品的  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  值均在 1.9 与 2.0 之间, 表明所提取总 RNA 纯度较好。经变性琼脂糖凝胶电泳鉴定, 28S 和 18S RNA 条带清晰可见, 无明显降解(图 1), 所提取总 RNA 符合要求。



图 1 水稻籽粒总 RNA 的 1% 变性琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Total RNA of rice grains in 1% denatured agarose electrophoresis

2.2 SSS 各同工型基因的 FQ-PCR 扩增曲线与融解曲线分析

各同工型基因在荧光定量 PCR 过程中, 荧光强度均有不同程度的增加, 最后得到可以反映其核酸扩增过程的 S 形荧光定量动力学曲线(图 2-A)。由图 2 可见, 各基因的指数区间均较明显, 在 18~36 个循环都能测出较为理想的扩增曲线。此外, 各同工型

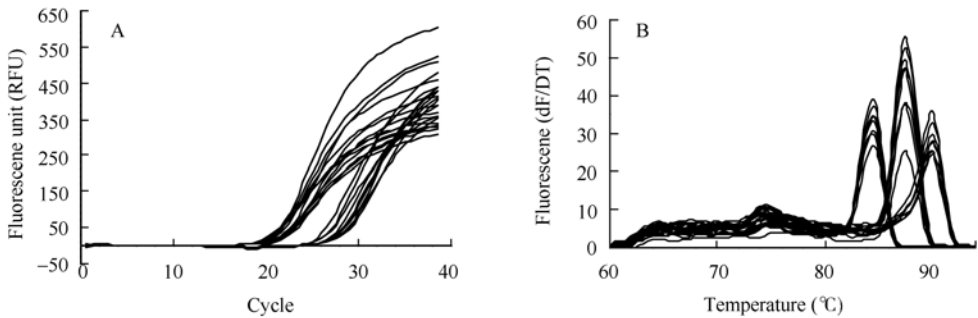


图 2 部分 SSS 同工型基因的 FQ-PCR 扩增曲线(A)和融解曲线(B)  
Fig. 2 The amplification curves (A) and melting curves (B) of SSS isoform genes by FQ-PCR

基因的融解曲线, 在所检测的温度范围内只有单一的峰型(图 2-B), 说明在 PCR 扩增过程中没有非特异性扩增, 定量 PCR 扩增所获得的数据是可靠的。

### 2.3 灌浆期高温对水稻胚乳中 SSS 各同工型基因表达的影响效应

由图 3 可见, SSS 各同工型基因在发育胚乳中的相对表达量有明显差异。其中, SSSI 和 SSSIIIa 两个同工型基因的相对表达量较高, 在开花后的 4~16 d, 两者的相对表达量分别约占各类 SSS 总表达量的 48.7%~61.7%和 24.3%~32.1%, 而其他 6 种同工型的相对表达量均较低, 且在水稻开花后的不同时期表现基本一致, 这说明 SSSI 和 SSSIIIa 是水稻胚乳灌浆过程中 SSS 的主要表现形式。

由对水稻灌浆不同时期 SSSI 相对表达量的温度处理间差异的比较可知(图 3-A~D), 在开花后的第 4 天, SSSI 基因在高温处理(HT)下的相对表达量高于其适温处理(LT), 之后高温处理下 SSSI 基因的相对表达量呈明显下降趋势, 同时也显著低于其相应灌浆时期的低温处理; 与 SSSI 相比, SSSIIIa 在高温胁迫处理下的相对表达量在水稻开花后的第 8 天达到最高, 之后迅速下降, 且相对下降幅度比 SSSI 更明显。

从高温胁迫对 SSS 各同工型基因表达的调控效应(上调或下调)与诸基因在不同温度处理下相对表

达量的差异倍数来看(表 2), SSS 各同工型基因对高温胁迫的响应表达也存在明显差异。其中, SSSIIb、SSSIc、SSSIIIb 和 SSSIVa 受高温胁迫呈上调表达模式, 而 SSSIIa 和 SSSIIIa 则相反, 受高温胁迫处理后呈下调表达模式, 且上调或下调的差异倍数随同工型的类型和水稻开花后的时期不同而异, 反映出高温胁迫处理对 SSS 同工型基因的表达调控及其籽粒淀粉合成代谢影响的复杂性。从总体上看, SSSIIb(上调)、SSSIIIa(下调)和 SSSIVa(上调)等同工型基因对高温胁迫的响应表达要比 SSSIc(上调)、SSSIIIb(上调)和 SSSIVb(上调与下调)等基因相对更敏感; 在水稻胚乳中高表达的两种 SSS 同工型(SSSI 和 SSSIIIa)中, SSSI 表达对高温处理的敏感程度在灌浆初期(开花后的第 4 天)略高于 SSSIIIa, 但后者在灌浆中期(开花后的第 12 天和第 16 天)对温度处理的响应敏感性却远高于前者, 表现出较明显的时期效应特征。

### 3 讨论

可溶性淀粉合酶(SSS)是催化淀粉合成的一个关键酶, 它通常是以游离态存在于胚乳淀粉体中, 催化 ADPG 与淀粉引物(葡聚糖)反应, 将一个葡萄糖分子转移到淀粉引物上, 使淀粉延长<sup>[10-11]</sup>。前人

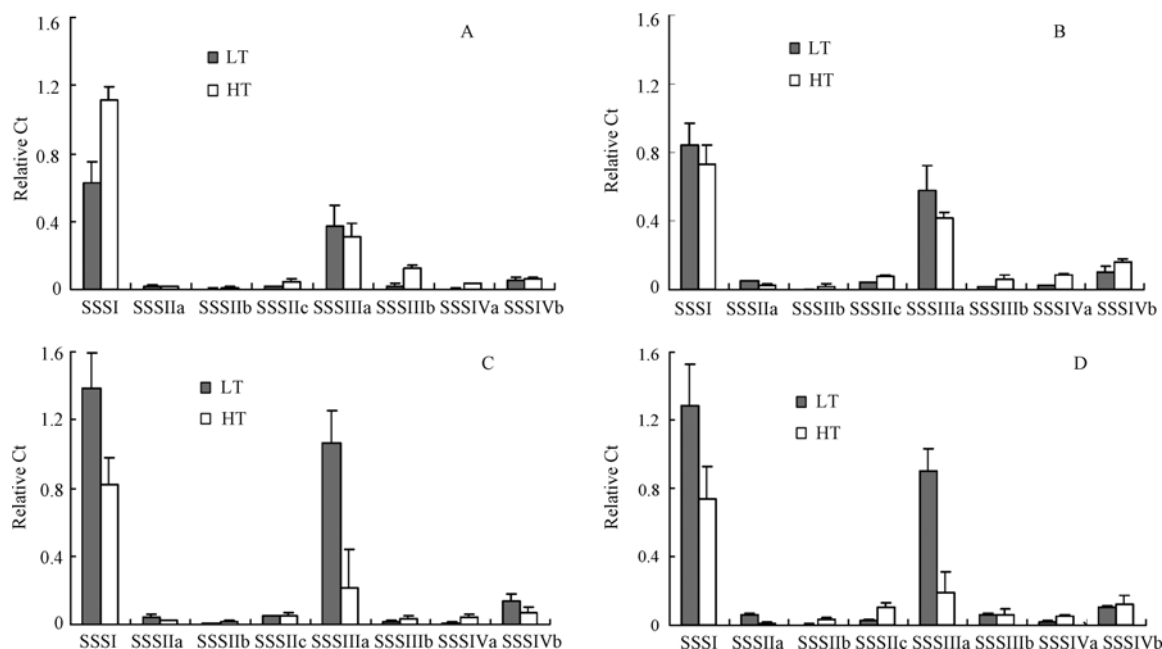


图 3 SSS 各同工型基因在水稻灌浆不同时期的相对表达量差异

Fig 3 Difference of relative expressing amount among various SSS genes at different days of filling stage for two temperature treatments

A: 开花后第 4 天; B: 开花后第 8 天; C: 开花后第 12 天; D: 开花后第 16 天。LT 表示低温处理(22°C), HT 表示高温处理(32°C)。

A: 4<sup>th</sup> day after flowering; B: 8<sup>th</sup> day after flowering; C: 12<sup>th</sup> day after flowering; D: 16<sup>th</sup> day after flowering). LT and HT denote low temperature treatment (22°C) and high temperature treatment (32°C), respectively.

表 2 不同温度处理下 SSS 各同工型基因的差异表达分析  
Table 2 Different expression ways of SSS genes in rice grains between two temperature treatments

基因 Gene	开花后第 4 天(4 d)		开花后第 8 天(8 d)		开花后第 12 天(12 d)		开花后第 16 天(16 d)	
	表达方式 Expression way	倍数 <sup>1)</sup> Times <sup>1)</sup>	表达方式 Expression way	倍数 <sup>1)</sup> Times <sup>1)</sup>	表达方式 Expression way	倍数 <sup>1)</sup> Times <sup>1)</sup>	表达方式 Expression way	倍数 <sup>1)</sup> Times <sup>1)</sup>
SSSI	上调 UR	1.77**	下调 DR	1.14	下调 DR	1.69*	下调 DR	1.75**
SSSIIa	下调 DR	1.29*	下调 DR	2.01**	下调 DR	8.55**	下调 DR	5.07**
SSSIIb	上调 UR	2.75**	上调 UR	11.87**	上调 UR	4.18*	上调 UR	9.58**
SSSIIc	上调 UR	2.35**	上调 UR	1.88*	上调 UR	1.07	上调 UR	4.01**
SSSIIIa	下调 DR	1.21	下调 DR	1.73**	下调 DR	4.85**	下调 DR	4.72**
SSSIIIb	上调 UR	5.65*	上调 UR	4.34**	上调 UR	2.07**	上调 UR	1.10
SSSIVa	上调 UR	8.40**	上调 UR	13.37**	上调 UR	3.80*	上调 UR	3.58**
SSSIVb	上调 UR	1.14	上调 UR	1.58*	下调 DR	2.03*	上调 UR	1.19*

<sup>1)</sup> 倍数=高温(或低温)处理下的相对表达量/适温(或高温)处理下的相对表达量; \* 和 \*\* 分别表示统计检验达 0.05 和 0.01 差异显著水平。

<sup>1)</sup> Times: relative expression amount at HT(or LT)/ that at LT(or HT) for the same genes and filling stage; \* and \*\* indicated statistically significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively. UR: up-regulated; DR: down-regulated.

研究已证实, 高温导致发育胚乳中 SSS 的生理活性下降, 是高温胁迫条件下水稻籽粒淀粉积累降低、淀粉粒发育不良的重要生理因素之一<sup>[6, 8, 19]</sup>。据 Keeling 等报道, 在小麦、水稻等作物的籽粒淀粉合成途径中, SSS 是对花后高温表现较敏感的一个关键酶, 其生理活性变化与籽粒灌浆速率及淀粉组分间存在着密切联系<sup>[7, 19-20]</sup>。SSS 具有多种同工型, 且在不同植物中的表达部位有所不同<sup>[5, 21-22]</sup>。据报道, 在豌豆胚中高表达的 SSS 主要是 SSSII, 占 SSS 总活性的 60% 左右<sup>[23]</sup>, 而在马铃薯的发育块茎中, SSSII 活性仅占其 SSS 总酶活的 10%~15%, SSSIII 却占到其总酶活的 80%<sup>[24]</sup>。本文结果表明, SSSI 和 SSSIIIa 两种同工型是灌浆水稻胚乳中 SSS 的主要表现形式, 其相对表达量分别约占水稻发育胚乳中各类 SSS 总表达量的 48.7%~61.7% 和 24.3%~32.1%, 而其他 6 种同工型在水稻发育胚乳的相对表达量均较低(图 3)。上述结论进一步证实了 Baba 等<sup>[14, 25]</sup>的观点, SSSII 基因主要在水稻的叶中表达, 参与叶片等非贮藏器官内临时型淀粉的合成, 而 SSSI 在水稻的叶片和未成熟种子中均有一定程度的表达, 但主要与胚乳器官中的淀粉合成有关<sup>[14]</sup>。此外, 本研究发现, 高温处理(HT)下 SSSI 基因在水稻开花后第 4 天的相对表达量高于其适温处理(LT), 之后明显下降并显著低于其相应灌浆时期的低温处理(图 3)。不难发现, 发育水稻胚乳中 SSSI 在不同温度处理下的基因表达差异与其 SSS 总酶活的变化趋势<sup>[6]</sup>基本一致。说明在水稻胚乳灌浆过程所涉及各类的 SSS 同工型中, SSSI 对其淀粉合成代谢所催化环节的影响可能起着主导

作用。

近年来, 国内外在 SSS 同工型对底物的亲和性与催化长度的特异性研究方面已取得了重要进展<sup>[22]</sup>。现已基本明确, SSS 各同工型间的相对数量以及相互间关系是导致不同组织器官中淀粉结构差异的主要原因之一<sup>[5, 12, 26]</sup>。据报道, 玉米的 SSSI 与 DP6~15 的短链合成有关, 而 SSSII 主要参与 DP>24 的长链合成<sup>[4]</sup>; 马铃薯的 SSSIII 催化了 DP25~35 的长链合成, 而 SSSII 在中等长度的支链淀粉合成中起着其他 SSS 所不能替代的作用<sup>[11]</sup>。由此可见, SSSs 各类同工型在支链淀粉合成中发挥着不同作用, 并具有特定的功能<sup>[4, 22]</sup>。其中, SSSI 的功能可能主要是起始支链淀粉链的延长, 作用于其短链的合成, 而 SSSII 和 SSSIII 则分别负责合成支链淀粉的中等长度链和长链<sup>[5, 9, 12]</sup>。从本研究结果看, SSSs 各类同工型对高温胁迫处理响应(上调或下调及其程度)有所不同, 且同一类型中的不同亚类(如 SSSII 中的 SSSIIa、SSSIIb 和 SSSIIc 3 个亚类)之间也会表现出明显差异, 反映出不同温度处理下水稻籽粒中 SSSs 基因表达的复杂性。结合本课题组对不同温度处理下稻米淀粉分支结构和链长分布特征的测定结果<sup>[27]</sup>, 笔者推测, 高温下稻米中的长 B 链比例减小、平均分子聚合度下降等现象<sup>[1, 21]</sup>, 在很大程度上是 SSSIIIa 基因在高温胁迫下的下调表达所致。尽管 SSSIIIb 基因对高温胁迫的影响呈上调表达响应, 但相对于 SSSIIIa, 前者在发育水稻胚乳的相对表达量却显著低于后者。鉴于不同温度处理下稻米淀粉中的长 B 链组分及其分子聚合度变化对稻米蒸煮食味品质的影响,

进一步加强对 SSSIIIa 基因表达的温度响应特征及其与水稻籽粒淀粉链长分布结构间关系的认识, 对于揭示高温下稻米食用品质不佳的分子生态机制有着重要意义。

#### 4 结论

水稻胚乳中 SSSs 各类同工型基因对花后高温胁迫的响应方式存在明显差异。SSSIb、SSSIc、SSSIb 和 SSSIVa 等同工型基因主要呈上调表达模式, 而 SSSIIa 和 SSSIIIa 等同工型基因则主要呈下调表达模式。随水稻开花后的时期不同, 各 SSSs 对高温胁迫响应的表达模式(上调或下调)及其相对敏感性也会有所不同。但从各同工型基因的相对表达量来看, SSSI 和 SSSIIIa 这两个同工型属 SSS 基因家族在发育水稻胚乳中的高表达基因, 是水稻胚乳灌浆过程中各类 SSSs 的主体表现形式, 两者在高温胁迫处理下的第 4 天或第 8 天开始均表现出较明显的下调特征, 从而导致高温下发育胚乳中 SSS 总酶活和淀粉合成代谢的迅速降低。SSSI 表达对高温处理的敏感程度在灌浆初期(开花后的第 4 天)略高于 SSSIIIa, 但在灌浆中期(开花后的第 12 天和第 16 天)后者却远高于前者。结合两者在植物淀粉合成代谢途径所催化链长的特异性和高温胁迫下稻米中淀粉链长结构的变化特征, 笔者认为, SSSIIIa 可能是水稻灌浆结实期高温对稻米淀粉精细结构产生调控的一个重要基因位点。

#### References

- [1] Asaoka M, Okuno K, Sugimoto Y, Fuwa H. Effect of environmental temperature at the milky stage on amylose content and fine structure of amylopectin of waxy and nonwaxy endosperm starches of rice (*Oryza sativa* L.). *Agric Biol Chem*, 1985, 49: 373–379
- [2] Zhong L J, Cheng F M, Sun Z X, Zhang G P. The deterioration of eating and cooking quality caused by high temperature during grain filling in early-season *indica* rice cultivars. *J Agron Crop Sci*, 2005, 191: 218–225
- [3] Nakamura Y, Yuki K, Park S Y, Ohya T. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grain quality. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30: 833–839
- [4] Martha G, James Y, Kay D, Alan M M. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 215–222
- [5] Vandeputte G E, Delcour J A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: A focus on rice starch. *Carbohydrate Polymer*, 2004, 58: 245–266
- [6] Cheng F-M(程方民), Zhong L-J(钟连进), Sun Z-X(孙宗修). Change of starch synthase in early *indica* rice grain and its response to air temperature at the filling stage. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2003, 27(2): 201–206(in Chinese with English abstract)
- [7] Keeling P L, Bacon P J, Holt D C. Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta*, 1993, 191: 342–348
- [8] Li M-Y(李木英), Shi Q-H(石庆华), Hu Z-H(胡志红), Pan X-H(潘晓华), Tan X-M(谭雪明). Effects of high temperature stress on activity of amylosynthase in endosperm of early *indica* rice varieties. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2007, 40(8): 1622–1629(in Chinese with English abstract)
- [9] Myers A M, Morell M K, James M G, Ball S G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol*, 2000, 122: 989–997
- [10] Craig J, Lioyd J R, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang T L, Martin C, Hedley C L, Smith A M. Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea endosperm. *Plant Cell*, 1998, 10: 413–426
- [11] Edwards A, Fulton D C, Hylton C M, Jobling S A, Gidley M. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J*, 1999, 17: 251–261
- [12] 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
- [13] Padmavathi D C, Peter L K. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme—studies of ucanafinity and catalytic properties. *Plant J*, 2001, 25: 475–486
- [14] Baba T, Nishihara M, Mizuno K. Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds. *Plant Physiol*, 1993, 103: 565–573
- [15] 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: 459–471
- [16] Normita C L, Kumar R P, Rajendra P, Khush G S. Effect of temperature during grain development on stability of cooking quality components in rice. *Jpn J Breed*, 1989, 39: 292–306
- [17] Zhang H-Y(张海燕), Dong H-T(董海涛), Yao H-G(姚海根), Xiang Y-W(向跃武), Tan X-L(谭学林), Li D-B(李德葆). Isolation of total RNA from rice endosperm and expression of important genes related to grain quality in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2005, 19(2): 105–110 (in Chinese with English abstract)
- [18] Rajeevan M S, Ranamukhaarachi D G, Vernon S D, Unger E R. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*, 2001, 25: 443–451
- [19] William J H, Kent F M, Susan B A, Anna K, Charlene K T, Kerry M K, Erika L J. Effect of temperature on expression of gene encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm. *Plant Sci*, 2003, 164: 873–881
- [20] Zhao H(赵辉), Jing Q(荆奇), Dai T-B(戴廷波), Jiang D(姜东),

- Cao W-X(曹卫星). Effects of high temperature during grain filling on key enzymes involved in starch synthesis in two wheat cultivars with different quality types. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(3): 423–429 (in Chinese with English abstract)
- [21] Jiang H W, Dian W M, Wu P. Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of starch branching enzyme. *Phytochemistry*, 2003, 63: 53–59
- [22] Zhu C-L(朱昌兰), Zhai H-Q(翟虎渠), Wan J-M(万建民). Progresses in the studies of genetic and molecular bases of eating quality in rice. *Acta Agric Univ Jiangxiensi* (江西农业大学学报), 2002, 24(4): 454–459 (in Chinese with English abstract)
- [23] Denyer K, Smith A M. The purification and characterization of the two forms of soluble starch synthase from developing pea embryos. *Planta*, 1992, 186: 609–627
- [24] Marshall J, Sidebottom C, Debet M, Martin C, Smith A M, Edwards A. Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell*, 1996, 8: 1121–1135
- [25] Tatsuro H, Takashi O, Yasunori N, Tomio T. Expression profiling of genes related to starch synthesis in rice leaf sheaths during the heading period. *Physiol Plant*, 2006, 128: 425–435
- [26] Commuri P D, Keeling P L. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: Studies of glucan affinity and catalytic properties. *Planta*, 2001, 25: 475–486
- [27] Zhong L-J(钟连进), Cheng F-M(程方民), Zhang G-P(张国平), Sun Z-X(孙宗修). Differences in starch chain length distribution and structure characteristics of early-*indica* rice under different temperature treatments during grain-filling. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38(2): 272–276 (in Chinese with English abstract)

## 《作物学报》获基金资助

- (1) 2000 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助
- (2) 2002 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助
- (3) 2004 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助
- (4) 2006 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助
- (5) 2008 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助
- (6) 2006 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B 类)”的资助
- (7) 2007 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B 类)”的资助
- (8) 2008 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B 类)”的资助
- (9) 从 1997—2005 年连续 9 年获中国科协“择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助经费”的资助