

玉米淀粉生物合成及其遗传操纵

张红伟^{1,2}, 谭振波¹, 陈荣军¹, 李建生², 陈刚¹

(1. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100089; 2. 中国农业大学作物学院, 北京 100094)

摘要: 淀粉是许多植物重要的储藏物质。淀粉突变体以及转基因植物中淀粉变异的特点使我们对淀粉生物合成的过程有了较深入的了解, 许多研究的结果揭示了玉米淀粉的生物合成涉及 4 类酶——ADPG 焦磷酸化酶、淀粉合成酶、淀粉分支酶和去分支酶。随着编码这些酶的基因的克隆, 利用转基因技术对淀粉合成过程进行遗传操纵业已成为可能, 并且在提高淀粉产量以及不同特性淀粉品质的种质资源创新等方面展示出巨大的潜力。

关键词: 玉米; 突变体; 淀粉生物合成; 转基因技术

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)04-0455-06

Maize Starch Biosynthesis and Its Genetic Manipulation

ZHANG Hong-Wei^{1,2}, TAN Zhen-Bo¹, CHEN Rong-Jun¹, LI Jian-Sheng², CHEN Gang¹

(1. Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China; 2. Crop Institute, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Starch is the most important source of calories and a vital storage component in plants. The characterization and production of starch variants from mutation and with transgenic technology has improved our understanding of the synthesis of starch granule. In starch biosynthesis in plants, four enzymes, including ADP-glucose pyrophosphorylase, starch synthase, starch branching enzyme and starch debranching enzyme, are widely accepted from an enormous amount of research aimed primarily at enzyme characterization. As many genes encoding the enzymes and their multiple isoforms in starch biosynthesis pathway have been isolated, genetic manipulation of the starch biosynthesis pathway shows to be a practical way by which starch quantity is increased and starch with novel properties can be created.

Key words: maize; mutant; starch biosynthesis; transgenic technology

淀粉是世界绝大多数人口的主要食物来源, 同时也是食品和化学工业的重要原料。淀粉在不同领域中的应用取决于其分子结构。淀粉分子结构的重要参数包括: (1) 直链淀粉和支链淀粉的比例(直/支比); (2) 直链淀粉的聚合度; (3) 支链淀粉分支链长及分布等等, 这些参数影响淀粉加工的理化和功能特性。淀粉的理化性质主要包括: (1) 淀粉凝胶化所需温度; (2) 凝胶化淀粉的黏性; (3) 长期保存或冻融过程稳定性。这些特性决定着其在食品和工业应用中的价值。其中, 直/支比是淀粉分子结构最重要的分子结构参数, 例如, 普通玉米淀粉直/支比为 1:3, 但是直/支比 > 1 的高直链淀粉, 具有

更快的凝胶化作用, 凝胶强度高, 作为食品添加剂在改善食品的质地和结构方面有独特效果。许多类型的胶卷中用高直链淀粉, 是因其具有独特的透明性, 柔韧性, 拉伸强度及防水性。目前人们对环保日益关注, 高直链淀粉生产的可再生、可降解膜可以减少工业废气及减弱温室效应气体的释放, 正日益引起人们的兴趣。支链淀粉具有更好的黏性, 可增加膨化食品的体积, 作为食品添加剂具有不同于直链淀粉的效果, 在黏合剂领域具有较多应用。此外, 那些介于直链淀粉和支链淀粉之间的中间成分, 其淀粉分支链的长度和分支程度等物理参数有所不同, 可能会有不同的理化性质, 因而有着不同的用途。

收稿日期: 2002-07-15; 修回日期: 2002-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270832)和北京市自然科学基金重点项目(5001001)资助

作者简介: 张红伟(1972-), 女, 助理研究员。博士研究生, 专业方向: 玉米分子生物学

通讯作者: 谭振波(1964-), 男, 博士, 研究方向: 植物分子生物学。010-51503668, znbotan@public3.bta.net.cn

当天然淀粉满足不了某一功能需求时,就要对淀粉实行化学改性,而这些加工过程会增加耗费、加重环境污染。另一产生具有不同理化特性淀粉的途径就是从遗传上改变淀粉的代谢途径,快速发展的生物技术为创造新型淀粉提供了有效的手段。

1 与淀粉合成有关的酶

在高等植物中,淀粉的生物合成为许多因素所调节。在光合器官叶肉细胞的叶绿体内,CO₂ 通过卡尔文循环固定,形成 3-磷酸甘油酸(3-PGA),然后转变为三碳糖磷酸(Triose-P),Triose-P 通过其转运子进入细胞质并形成蔗糖,或者留在叶绿体内形成果糖 6 磷酸(F6P)和葡萄糖 1 磷酸(G1P)。G1P 在腺苷磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGP)的作用下形成 ADP 葡萄糖(ADPG)。ADPG 作为合成淀粉的底物,在淀粉合成酶(starch synthase, SS)、淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE)和淀粉去分支酶(starch debranching enzyme, SDBE)的作用下合成直链淀粉和支链淀粉^[1,2]。每种酶有多种同工酶形式(isoforms),每种同工酶又由独立的基因编码(表 1)。

表 1 玉米主要淀粉代谢酶的编码基因

Table 1 Genes encoding major starch enzymes in starch biosynthesis in maize endosperms

玉米淀粉生物合成有关的酶	已发现的同工酶及其相应基因
腺苷磷酸葡萄糖焦磷酸化酶	AGP1(大亚基 <i>sh2</i> , 小亚基 <i>bt2</i>)
淀粉合成酶	
可溶性淀粉合成酶	SSI, SSII, SSIII (<i>dul</i>) GBSSI (<i>wx</i>), GB-
颗粒包裹淀粉合成酶	SSII
淀粉分支酶	SBE I (<i>sbe1</i>), SBE II a (<i>sbe2a</i>), SBE II b (<i>sbe2b</i>)
淀粉脱分支酶	SDBE(<i>sul</i>)

1.1 AGP

AGP 的主要功能是把葡萄糖转变为合成淀粉的底物——ADPG^[3]。该酶在叶片和种子中均有存在,是影响淀粉合成速率的关键因子^[4]。叶片中 AGP 主要存在于叶绿体膜上^[5],受异构化调节,3-PGA 激活,无机磷(Pi)抑制。胚乳 AGP 在不同物种的种子中的定位及调控有所不同,如马铃薯、大豆的 AGP 酶存在于造粉体,玉米、大麦、水稻的存在于细胞质中^[3];马铃薯^[6]、玉米^[7]胚乳中 AGP 酶均受到 3-PGA 和 Pi 相对比率的调节,但在小麦、大麦胚乳中该酶不受此调节^[8]。玉米 AGP 是由大小两个亚基构成的异源四聚体,大、小亚基分别由 2、3 个基因编码。在编码大、小亚基基因的突变体 *shrunk-2* 和 *brittle-2* 胚乳中,AGP 酶的活性下降,淀粉含量降低。

1.2 SS

SS 分为两大类,即可溶性淀粉合成酶(SSS)和颗粒结合淀粉合成酶(GBSS)。SS 的主要功能是形成 α -1,4 键,形成直链淀粉或延伸支链淀粉的分支链,并且对支链淀粉的合成也产生一定的作用^[9,14]。

GBSS 有多种同工酶形式,如小麦、大麦、玉米分别有 2、3、4 种同工酶^[10]。GBSSI 存在于胚乳中,是植物储藏器官中颗粒结合蛋白的主要部分,分子量约为 60kDa,其氨基酸序列在不同的物种间具有很高的保守性。其他同工酶除了存在于胚乳外,也存在于胚、种皮、叶片等非储藏器官中,例如小麦的 GBSSII 存在于叶片和胚中,编码基因定位于 2 号染色体^[11,12]。这些同工酶的分子量在 77~105kDa 之间,其氨基酸序列与 GBSSI 的保守性较低。在多数禾谷类作物的 GBSSI 突变体胚乳中合成的淀粉是支链淀粉,如水稻、玉米、小麦等。但是大麦的 GBSSI 突变体胚乳中仍有少量直链淀粉的合成,其含量占总淀粉的 0.4%~9%^[13]。以上均表明 GBSSI 对胚乳直链淀粉的合成起着最为重要的作用。此外,Delrue 等观察到在 *Chlamydomonas sta2* 突变体的胚乳中,GBSSI 活性丧失,介于直链和支链淀粉的中间类型的淀粉也缺乏,这表明 GBSSI 也对胚乳支链淀粉的合成具有一定作用^[14]。

从水稻、玉米、小麦、豌豆、拟南芥等种子的胚乳和胚以及马铃薯的块茎中,分离到 SS 的分子量介于 60~180kDa,随着编码 SS 的基因的克隆,将 SS 分为三类,即 SSI(分子量介于 68~76kDa)、II(分子量介于 75~95kDa)、III(分子量约 135kDa)。通过对 SS 淀粉突变体以及 SS 转基因植物中淀粉变异特点的分析,发现某些 SS 对淀粉的合成及淀粉结构产生显著的影响。例如,豌豆 SSII 存在于胚中,Dry 等 1992 观察到 SSII 基因的突变体 *rug5* 胚中的淀粉含量降低,支链淀粉中中等长度的糖苷链的数目减少,而更短或更长的糖苷链增多^[15]。最近,从玉米转座子插入突变体中筛选到 *dull1* 的插入突变体,克隆的 *dull1* 基因编码蛋白的氨基酸序列与马铃薯 SSIII 具有较高的同源性,因而将其归属于 SSIII。该突变体胚乳中 SS 和 SBEIIa 的活性下降,胚乳中直链淀粉含量、中间类型的淀粉含量以及支链淀粉的分支度显著提高。于是认为 DU1 是玉米胚乳淀粉结构的决定因子之一^[16]。

1.3 SBE

玉米 SBE 可分为三种同工酶 SBE I (属 SBE class B)、SBE II a、SBE II b(属 SBE class A)。SBEI、SBEIIb 主要在胚乳中存在,SBEIIa 主要在叶片中存在。在离体条件下,观察到 SBE 同工酶在支链淀粉生物合成中所起的作用不同。SBE I 作用的底物是直链淀粉,它能使较长的糖苷链转移到直链淀粉上,但转移到支链淀粉上的能力很弱。SBEI 在直链上产生分支的效率是在支链上产生分支的十倍以上^[17];与之相反,SBE II 作用的底物是支链淀粉,能使较短的糖苷键转移到支链淀粉上,而且 SBE II a 的活性大大高于 SBE II

b. SBEIIb 对胚乳直链淀粉含量的作用最大,其编码基因的突变(玉米 *ae* 突变体)可使玉米胚乳中直链淀粉的含量达到 50%。此外,将玉米 *sbe2a* 和 *sbe2b* 在酵母体内表达,发现在决定葡聚糖结构方面,SBEIIa 对 SBEIIb 具有显性作用^[18]。

1.4 SDBE

SDBE 主要作用是水解 α -1,6 键,分为两类,即直接去分支酶和间接去分支酶。直接去分支酶存在于植物和细菌中,水解作用不需其他酶的参与。间接去分支酶存在于动物、酵母中,需 4- α 葡萄糖苷转移酶等的参与才能完成脱分支过程。直接去分支酶又分为两种,R 酶(RE,又叫 pullulanase)和异淀粉酶(isoamylase, ISA)^[19]。最近,在水稻、玉米 *sugary* 突变体胚乳中 SDBE 的缺失,会造成两种直接脱分支酶 RE 或 ISA 水平严重下降或丧失,产生较支链淀粉更高度分支化的植物糖原(phytoglycogen)^[20]。类似研究表明,大麦种子发育的胚乳中 ISA 活性丧失,导致胚乳淀粉含量降低,植物糖元积累,淀粉粒的结构、数目及淀粉合成的引发过程都发生改变,且该酶还可能影响到淀粉代谢过程中的其他相关酶的活性,如 SS, SBE 等^[21]。为研究 ISA 在支链淀粉合成中的作用,Genschel 等检测到该酶在小麦的叶片和处于发育的种子中都存在,但主要存在于发育的胚乳中,且以可溶性形式为主,很少一部分与淀粉粒结合,这表明 ISA 可能同时参与叶片和籽粒中的淀粉合成^[22]。

2 玉米淀粉突变体

玉米籽粒的突变体涉及颜色突变、发育突变及化学组成突变。有的突变涉及到外观表型的变化,有的则只是内部化学成分的变化。与玉米胚乳淀粉生物合成有关基因的突变往往引起玉米籽粒的外观变化,也明显改变了淀粉合成途径和淀粉结构(表 2)。例如,从玉米转座子插入突变体中筛选到 *sbe1* 和 *sbe2a* 的插入突变体,*sbe2a* 突变体叶片中淀粉的支链数目大为减少,但胚乳中淀粉的 SEC(size-exclusion chromatography)及 HPSEC(high performance SEC)特性与野生型无明显差别。此外,*sbe2a* 突变体植株出现严重早衰,空秆率高。这表明 *sbe2a* 主要在叶片淀粉合成中起作用,同时对植株正常发育有一定影响^[23]。*sbe1* 突变体胚乳中 SBEI 水平大大下降,但淀粉 SEC 及 HPSEC 与正常的无明显不同^[24]。玉米 *bt1* 基因,编码将质体外合成的 ADP-Glucose 转移到胚乳造粉体的转运蛋白,*bt1* 突变导致合成淀粉的直接底物 ADPG 在胚乳中积累,造粉体吸收和利用 ADPG 的能力只有正常基因型的 25%^[25,26]。

同一突变基因在不同遗传背景下对子粒表型及其淀粉结构的影响存在差异,引起这一现象的主要原因是不同遗传背景对这些“主基因”产生不同的修饰作用,即基因互作效应。突变基因与背景基因的互作对淀粉两种成分的含量和淀粉结构均有很大影响。例如,玉米 *sbe2b* 基因在不同遗传背景下对直链淀粉的含量的效应明显不同^[27]。另外,突变基因间也存在不同的互作方式,有显性、上位性等(表 3,4)^[28,29]。如 *wx* 对其他基因有上位性效应,只要有 *wx* 突变基因存在,即只产生支链淀粉。但深入分析发现,*wx* 单基因突变和 *wx* 与其他基因的双基因突变造成的淀粉虽都表现支链淀粉含量高,但淀粉的结构不同。*durwx* 和 *aedurwx* 多基因的突变体除了含有高分子量的支链淀粉外,还分别含有 40% 和 80% 的中间成分,其淀粉的理化性质也不同于 *wx* 单基因的突变体^[30]。此外,李敬玲等通过扫描电镜观察到,11 种多胞质系玉米(Mo17)胚乳中淀粉粒的形状及结构显著不同,表明了核质互作效应对胚乳淀粉粒的形状及结构产生重要的影响^[31]。

表 2 与玉米淀粉合成有关的突变基因及突变体表型特征*

Table 2 Mutation genes in maize starch biosynthesis and mutant phenotypes*

基因	符号	染色体	突变体表型
<i>amylose extender</i> **	<i>ae</i>	5	无光泽,透明或不透明,有时不饱满
<i>brittle</i>	<i>bt</i>	5	皱缩,不透明,无光泽
<i>brittle-2</i>	<i>bt-2</i>	4	同上
<i>dull</i>	<i>dul</i>	10	不透明,无光泽。甜玉米背景下半塌陷,透明,有不透明区域
<i>miniature seed</i>	<i>mn</i>	2	小,有一定程度缺陷
<i>shrunk</i>	<i>sh</i>	9	塌陷,不透明
<i>shrunk-2</i>	<i>sh2</i>	3	皱缩,透明或不透明
<i>shrunk-4</i> ^[33,34]	<i>sh4</i>	5	皱缩,不透明
<i>shrunk-5</i> ^[35]	<i>sh5</i>		
<i>shrunk-6</i> ^[36,37]	<i>sh6</i>		
<i>soft starch</i>	<i>h</i>		不透明
<i>sugary</i>	<i>su</i>	4	皮皱,玻璃质,甜玉米背景下特点不明显
<i>sugary-2</i>	<i>su2</i>	6	轻微无光泽或无光泽
<i>sugary-2</i> ^[38,39]	<i>su3</i>		
<i>waxy</i>	<i>wx</i>	9	不透明

* 除另外标注外,资料来源于《specialty corns》。

** 玉米 *ae* 为隐性突变,另外还有一种显性突变形式,记号 *Ae-5180*,在不同的遗传背景下可使直链淀粉含量达到 30%~70%,甚至更高^[32]。

表 3 玉米不同淀粉突变基因型的直链淀粉含量

Table 3 Amylose content of different mutant genotypes of maize

突变基因型	<i>su</i>	<i>du</i>	<i>ae</i>	<i>dusu</i>	<i>aedu</i>	<i>aedusu</i>	<i>aesu</i>	<i>aewx</i>	<i>durwx</i>	<i>surwx</i>	<i>aedurwx</i>	<i>aesurwx</i>	<i>dusurwx</i>	<i>aedusurwx</i>
直链淀粉含量%	65	55	33	70	47	31	28	0	0	0	0	0	0	0

表 4 玉米淀粉突变基因的互作及其表型
Table 4 Interaction of starch mutation genes
in maize and their phenotypes

突变基因型	互作	表型
<i>aebt</i>	<i>bt</i> 上位	缩小,不透明,无光泽
<i>bt2su</i>	<i>bt2</i> 上位	缩小,透明,无光泽
<i>shsu</i>	互补	极度皱缩,玻璃质伴有不透明区域
<i>aesh2wx</i>	<i>sh2</i> 上位	缩小,不透明
<i>surwx</i>	<i>su</i> 上位	皱缩,玻璃质到不透明
<i>aesu</i>	互补	不如 <i>ae</i> 突变体饱满,透明,有时顶部有不透明“帽子”
<i>aesusu2</i>	互补	部分皱缩,透明,无光泽
<i>aeduwx</i>	互补	缩小,不透明,无光泽

由于突变基因间或突变基因与背景基因的互作,导致直链淀粉和支链淀粉含量的变化,或者含量差异不大,但结构发生不同程度的变化。育种家可用通过选择使有效背景基因积累,培育出淀粉品质不同的玉米自交系。如,*ae* 基因在不同背景基因下可以使直链淀粉含量达到 20% 至 70%。*su* 及其修饰基因 *se* (sugary enhancer) 的互作 (*suse*) 能大大提高籽粒中可溶性糖的含量。

3 转基因技术对淀粉生物合成途径的操纵

20 世纪 80 年代初,世界上第一例转基因植物问世以来,转基因技术就成为品种资源创新与改良的有效途径,取得了举世瞩目的成就,一大批抗虫、抗除草剂的转基因农作物品种已经用于商品化生产。随着与淀粉合成有关基因的克隆,通过转基因技术可实现对淀粉生物合成过程的调控,选育具有不同理化特性的淀粉玉米新品种(表 5)。

表 5 转基因技术调控淀粉生物合成的途径

Table 5 Genetic manipulation of starch biosynthesis pathway through transgenic technology

目的	途径:操纵的主要基因
提高总淀粉含量或提高产量	a 提高 AGP 水平; <i>sh2</i> , <i>bt2</i> 单个或同时转入,使其过量表达
	b 提高 ATP/ADP/ADP-Glucose 的转运; <i>bt1</i> 过量表达
提高直链淀粉含量	a 抑制 SBE; <i>sbe1</i> , <i>sbe2a</i> , <i>sbe2b</i> 单个或同时反义抑制
	b 抑制 SSS; <i>dul</i> 反义抑制
提高支链淀粉含量	a 抑制 GBSS; <i>wx</i> 反义抑制
改变淀粉结构	a SBE, SDBE 相互作用; <i>sbe1</i> , <i>sbe2a</i> , <i>sbe2b</i> , <i>sal</i> 过量表达或反义抑制
	b 利用两个或多个淀粉合成基因的互作
其它,如改变淀粉的 Pi 含量改变淀粉粒的大小及提高完整性	a 抑制 AGP; <i>sh2</i> , <i>bt2</i> 反义抑制
	b 抑制 GBSS; <i>wx</i> 反义抑制
	c 抑制 SBE; <i>sbe1</i> , <i>sbe2a</i> , <i>sbe2b</i> 单个或同时反义抑制

3.1 AGP 基因

E. coli AGP 基因 *glg C16* 转化拟南芥和烟草使 AGP

过量表达从而显著提高了淀粉含量^[40]。玉米 AGP 的大基因 *sh2* 转到小麦中,与小麦小亚基因互作产生的新酶对抑制因子(Pi)敏感性减弱,发育中的籽粒 AGP 活性提高,单株粒重平均提高 38%,整株生物产量也提高^[41]。

AGP 反义抑制的转基因蚕豆种子中 AGP 活性显著降低,但淀粉总量只是轻度降低,直链淀粉含量降低,而可溶性糖含量升高。转基因植株水分利用率增强,N 吸收率高,导致成熟子叶中脂类和富硫清蛋白的含量提高^[42]。

3.2 SS 基因

E. coli 糖元合成酶基因(glycogen synthase gene,*glgA*) 转化马铃薯,块茎总淀粉含量、直/支比及淀粉中 Pi 含量均降低,支链淀粉的分支程度极大地提高,同时可溶性糖含量提高 80%。理化分析表明,转化体淀粉的面团黏度(paste viscosity)稳定性降低,只有对照的 30%,熔及凝胶化特征均发生显著改变,这表明转化植株产生了一种新型淀粉^[43]。

Kuipers 等用马铃薯 *wx* 基因的全长反向 gDNA 和 cDNA 转化马铃薯,块茎中直链淀粉含量显著降低,此外还观察到全长 cDNA 的抑制效果较全长 gDNA 好,且用 *wx* 基因的启动子较用 35S CaMV 启动子的抑制效果好^[44,45]。利用反义 RNA 技术获得的 *wx* 转基因水稻胚乳和花粉中直链淀粉含量降低^[46];对不同基因型水稻进行转化,获得的 *wx* 转基因水稻的淀粉产量的下降幅度不同,因而有可能得到既不影响产量直链淀粉含量又降低的水稻新品种^[47,48]。

反义抑制一种或多种 SS 对淀粉结构尤其是支链淀粉的链长、分支度等方面产生明显不同的影响。反义抑制马铃薯的 SSIII,对直链淀粉含量及支链淀粉的链长分布均无影响,只是淀粉粒的形状及 Pi 水平发生改变。同时抑制马铃薯的两种 SS,转基因植株块茎中淀粉总量和直链淀粉含量无明显变化,但是淀粉粒形状改变,支链淀粉中短链(少于 15 个残基)以及极长链明显增多,中等长度链(15~80 个残基)减少^[49]。若同时抑制马铃薯的 3 种 SS 产生的淀粉为短的支链淀粉形式,无直链淀粉成分,这种新型淀粉在食品加工中具有良好的冻融稳定性,避免了普通淀粉的化学改性加工过程^[50]。

3.3 SBE 基因

E. coli 的淀粉分支酶基因 *glgB* 与马铃薯的 GBSS 基因的启动子构建的融合基因转化马铃薯,得到的块茎中的支链淀粉的分支点数提高 25%,分支链变短^[51]。利用反义 RNA 技术,Safford 等 1998 年报道转基因(SBE B)马铃薯的淀粉的支链数目减少有限^[52]。Stephen 等 1999 年报道转基因(SBE A)马铃薯的直链淀粉含量大大提高^[53]。国际专利 W094/04693A2 报道了利用反义 RNA 技术使转基因 *sbe2b* 的玉米胚乳直链淀粉含量大大提高。Gerhard 等 2000 年通过反义抑制马铃薯 SBE A、SBE B 酶,使其活性低于野生型的 1%,直链淀粉含量达 74%~89%,淀粉中 Pi 的含量提高,并使淀粉的成分、结构发生了改变^[54],使我们首次认识到这两个基因的互作对马铃薯淀粉品质产生重要的影响。

除上述 4 类酶外,是否还存在其他较重要的淀粉代谢酶? 分支酶的最终产物除支链淀粉外是否还有其他产物? 基因互作如何影响淀粉的结构? 对这些问题的进一步研究,有助于我们更灵活地操纵基因,控制淀粉的代谢过程。

参 考 文 献 (References):

- [1] Nelson O, Pan D. Starch synthesis in maize endosperms[J]. *Annu Rev plant physiol PMB*, 1995, 46: 475~496.
- [2] Preiss J, Ball K, Smith-white B, Iglesias A. Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation[J]. *Oxf Surv Plant Mol Cell Biol*, 1994, 7: 59~114.
- [3] Slattery C J, Kavakli I H, Thomas W, Okita. Engineering starch for increased quantity and quality[J]. *Trends in plant sci*, 2000, 5(7): 291~298.
- [4] Giroux M J, Okagaki R J, Hannah L C. Ds revertant alleles from *sh2-m1* show a high frequency of precise excision[J]. *Maize-Genetics-Cooperation-Newsletter*, 1993, 67: 44.
- [5] Russell D A, DeBoer D L, Stark D M, Preiss J, Fromm M E. Plastid targeting of *E. coli* beta-glucuronidase and ADP-glucose pyrophosphorylase in maize (*Zea mays* L.) cells [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 13(1): 24~27.
- [6] Iglesias A A, Charng Y Y, Ball S, Bloksberg L, Nakata P A, Greene T, Laughlin M J, Okita T W, Kishore G M, Preiss J. Characterization of the kinetic, regulatory, and structural properties of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *J of Biol Chem*, 1993, 268: 1081~1086.
- [7] Plaxton W C, Preiss J. Purification and properties of nonproteolytic degraded ADPglucose pyrophosphorylase from maize endosperm[J]. *Plant Physiol*, 1987, 83: 105~112.
- [8] Hannah L C. 3-phosphorylase acid activation of maize endosperm ADP-glucose pyrophorylase following proteolytic cleavage of the *sh2* or *bt2* subunits[J]. *American Society of Plant Physiol*, 1995, (14): 72~79.
- [9] Tsai C Y. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm[J]. *Biochem Genet. iochem Genet*, 1974, 11: 83~96.
- [10] Hylton C M, Denyer K, Keeling P L, Chang M T, Smith A M. The effect of waxy mutations on the granule bound starch synthase of barley and maize endosperms[J]. *Planta*, 1996, 198: 230~237.
- [11] Toshiki Nakamura, Patricia Vrinten, Kazuhiro Hayakawa, Junichi Ikeda. Characterization of a granule bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat[J]. *Plant physiol*, 1998, 118: 451~59.
- [12] Vrinten P L, Toshiki Nakamura. Wheat granule bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues[J]. *Plant physiology*, 2000, 122: 255~263.
- [13] Patron N J, Smith A M, Fahy B F, Hylton C M, Naldrett M J, Rossnagel B G, Denyer K. The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low-amylose berley cultivars is attributable to a single mutant allele of granule-bound starch synthase I with a deletion in the 5'-non-coding region[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130: 190~198.
- [14] Delrue B, Fontaine T, Routier F. Waxy *Chlamydomonas reinhardtii* monocellular algal mutants defective in amylose biothesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174: 3612~3620.
- [15] Dry I, Smith A, Edward A. Characterization of cDNA encoding two isoforms of granule bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato[J]. *Plant J*, 1992(2): 193~202.
- [16] Gao Ming, Wanat J, Stinard P S, James M G, Myers A M. Characterization of dull1, a maize gene coding for a novel starch synthase[J]. *The plant cell*. 1998, 10: 399~412.
- [17] Guan H P, Baba T, Preiss J. Expression of branching enzyme I of maize endosperm in *Escherichia coli* [J]. *Plant physiology*, 1994, 104(4): 1449~1453.
- [18] Seo B S, Kim S, Scott M P, Singletary G W, Wong K S, James M G, Meyers A M. Functional interaction between heterologously expressed starch-branching enzymes of maize and the glycogen synthase of brewer's yeast [J]. *Plant physiology*, 2002, 128: 1189~1199.
- [19] Fujita N, Kubo A, Francisco P B Jr, Nakakita M, Harada K, Minaka N, Nakamura Y. Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice [J]. *Planta*, 1999, 208(2): 283~93.
- [20] Rahman A, Wong K S, Jane J L, Myers A M, James M G. Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize[J]. *Plant physiology*, 1998, 117: 425~435.
- [21] Burton R A, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher G B, Hylton C, Laurie D A, Parker M, Waite D, Wagen S V, Verhoeven T, Denyer K. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutant that lack isoamylase activity[J]. *The Plant Journal*, 2002, 31(1): 97~112.
- [22] Genschel U, Abel G, Lorz H. The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localization[J]. *Planta*. 2002, 214(5): 813~820.
- [23] Blauth S L, Yuan Yao, Klucinec J D, Shannon J C, Thompson D B, Gultinan M J. Identification of mutator insertional mutants of starch branching enzyme 2a in corn[J]. *plant physiol*, 2001, 125: 1396~1405.
- [24] Blauth S L, Kim K N, Klucinec J, Shannon J C, Thompson D, Gultinan M. Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L. [J]. *PMB*, 2002, 3: 287~297.
- [25] Shannon J C, F M Pien, K C Luet, Pien F M, Liu K C. Nucleotides and nucleotide sugars in developing maize endosperms (synthesis of ADP-glucose in brittle-1) [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 835~843.
- [26] Shannon J C, Pien F M, Cao H P, Liu K C. Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial synthesized ADP-Glucose into amyloplasts of maize endosperms[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1235~1252.
- [27] TENG Wen-Tao, SONG Tong-Ming, CHEN Qing-Liang, DUAN Min-Xiao, FAN Hong-Wei. Study on genetic effect of endosperm mutation gene *ae* in near-isogenic background in Chinese maize germplasm[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(2): 190~195.

- 滕文滔,宋同明,陈庆亮,段民孝,范弘伟.近等基因背景下对玉米胚乳突变基因 *ae* 的遗传效应研究[J].作物学报,2001,27(2):190~195.
- [28] Wang Y J, White P, Pollak L, Jane J. Characterization of starch structure of 17 maize endosperm mutant genotypes with oh43 inbred line background[J]. Cereal Chemistry, 1993, 70: 2, 171~179.
- [29] Hallauer A R. Specialty corns[M]. CRC press US, 1994.
- [30] Bertoft E, Boyer C. Observation on the alpha-amylolysis pattern of some waxy maize starch from inbred Ia453[J]. Cereal Chemistry, 2000, 77(5): 657~664.
- [31] LI Jing-Ling, JIA Jing-Luan, LIU Min, ZHAO Shi-Min, LIU Ya-Nan, ZENG Meng-Qian, LI She-Rong. Scanning electron microscope observation on endosperm starch grain characters in multiphasic maize. Acta genetica sinica, 1999, 26(3): 249~253.
李敬玲,贾敬奎,刘敏,赵世民,刘雅楠,曾孟潜,李社荣.多胞质玉米胚乳淀粉性状的扫描电镜观察[J].遗传学报,1999,26(3):249~253.
- [32] Kasemsuwan T, Jane J, Schnable P. Characterization of the dominant mutant amylose extender (*Ae-5180*) maize starch[J]. Cereal chemistry, 1995, 72(5): 457~464.
- [33] Stinard P S. Miscellaneous allelism tests[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1999, 73: 90.
- [34] Park S U, Cha S W, Kim I H, Kim S L, Cho C Y, Ryu H Y, Lee S Y, Ryu I M, Kim C H, Heo C H. A new early maturing and super sweet corn hybrid Chodangok [J]. RDA Journal of Agricultural Science Upland and Industrial Crops, 1993, 35: 1, 190~194.
- [35] Stinard P. *sh5* is allelic to *bt1*[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1995, 69: 130.
- [36] Stinard P S, Schnable P. Four point linkage data for *ae*, *pr*, *lu2*, *gl8* on 5L [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1993, 67: 8~9.
- [37] Neuffer M G. Location and designation of four EMS induced kernel mutants[J]. Maize-Genetics-Cooperation-Newsletter, 1992, 66: 39.
- [38] Stinard P S, Schnable P S. New alleles of *et2* and *su3*[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1994, 68: 107~108.
- [39] Stinard P. Isolation of a new *su3* allele[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1997, 71: 83.
- [40] Preiss J, Stark D. Improvement of cereal quality by genetic engineering. Proceedings of the Royal Australian Chemistry Institute, Cereal Chemistry Division Symposium on Improvement of Cereal Quality by Genetic Engineering[J]. Sydney, Australia, 12~16 September 1993. 1994, 37: 115~127.
- [41] Smidansky E D, Clancy M, Meyer F D, Lanning S P, Blake N K, Luther E, Talbert and Michael J. Giroux. Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield[J]. PNAS, 2002, 99(3): 1724~1729.
- [42] Rolletschek H, Hajirezaei M R, Wobus U. Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake[J]. Planta, 2002, 214(6): 954~964.
- [43] Shewmaker C K, Boyer C D, Wiesenborn D P, Thompson D B, Boersig M R, Oakes J V, Stalker D M. Expression of *Escherichia coli* glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a highly branched Starch [J]. Plant Physiol, 1994, 104(4): 1159~1166.
- [44] Kuipers A G, Soppe W J, Jacobsen E. Factors affecting the inhibition by antisense RNA of granule-bound starch synthase gene expression in potato[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26(6): 1759~1773.
- [45] Kuipers A G, Soppe W J, Jacobson E, V Visser R G F. Factors affecting the inhibition by antisense RNA of granule-bound starch synthase gene expression in potato[J]. Mol Gen Genet, 1995, 246(6): 745~755.
- [46] Terada R, Nakajima M, Isshiki M. Antisense waxy genes with highly active promoters effectively suppress waxy gene expression in transgenic rice[J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41(7): 881~888.
- [47] GE Hong-Fei, WANG Zong-Yang, HONG Meng-Min. A 31 bp fragment within the 5'-upstream region of rice waxy gene enhances gene expression. Acta phytophysiologica Sinica, 2002, 26(2): 159~163.
葛鸿飞,王宗阳,洪孟民.水稻蜡质基因 5'上游区中 31bp 序列增强基因表达的作用[J].植物生理学报,2000,26(2):159~163.
- [48] LIU Qiao-Quan, WANG Xing-Wen, CHEN Xiu-hua, WANG Zong-Yang, TANG Shu-Zhu, HONG Meng-Min, GU Ming-Hong. Effect of dominant waxy character on kernel weight of transgenic rice with antisense *wx* gene[J]. Scientia Agricultura sinica, 2002, 35(2): 117~122.
刘巧泉,王兴稳,陈秀花,王宗阳,汤述翥,洪孟民,顾铭洪.转反义 *wx* 基因糯稻的显性遗传及对稻米粒重的效应分析[J].中国农业科学,2002,35(2):117~122.
- [49] Lloyd J R, Landschutze V, Kossmann J. Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin[J]. Biochem J, 1999, 338 (Pt 2): 515~521.
- [50] Jobling S A, Westcott R J, Tayal A, Jeffcoat R, Schwall G P. Production of a freeze thaw stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 295~299.
- [51] Kortstee A J, Vermeesch A M, de Vries B J, Jacobsen E, Visser RGF, De Vries B J. Expression of *Escherichia coli* branching enzyme in tubers of amylose-free transgenic potato leads to an increased branching degree of the amylopectin [J]. Plant J, 1996, 10(1): 83~90.
- [52] Jobling S R, Sidebottom S A, Westcott R J, Cooke D, Tober K J, Strongtharm B H. Consequences of antisense RNA inhibition of starch branching enzyme activity on properties of potato starch[J]. Carbohydr polym, 1998, 35: 155~168.
- [53] Jobling S A, Schwall G P, Westcott R J, Sidebottom C M, Debet M, Gidley M J, Jeffcoat R, Safford R. A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers has a major effect on starch structure; cloning and characterisation of multiple forms of SBE A[J]. Plant J, 1999, 18(2): 163~171.
- [54] Schwall G P, Schwall R, Westcott R J, Jeffcoat R, Tayal A, Shi Y C, Gidley M J, Jobling S A. Production of very high amylose potato starch by inhibition of SBEA and B[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 551~554.