

转反义 *Wx* 基因水稻颖果的发育及物质积累

陈刚 王忠* 刘巧泉 熊飞 顾蕴洁 顾国俊

(扬州大学 江苏省作物遗传生理重点实验室, 江苏 扬州 225009; E-mail: zwsl@yzu.edu.cn; * 通讯联系人)

Caryopsis Development and Substance Accumulation of Transgenic Rice with Antisense *Wx* Gene

CHEN Gang, WANG Zhong*, LIU Qiaoquan, XIONG Fei, GU Yunjie, GU Guojun

(Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; E-mail: zwsl@yzu.edu.cn; * Corresponding author)

Abstract: The development and substance accumulation of rice caryopsis were studied by using the transgenic japonica and indica rice lines with antisense *Wx* gene. The weights of caryopses in the transgenic rice were lower than those of the non-transgenic ones, and the reduction of weight was significantly correlated with the degree of reduction in amylose content. In the caryopsis of the transgenic rice, the number of endosperm cells was less, but the proliferation speed was obviously higher compared with non-transgenic ones during the first six days after flowering (DAF). During the first nine DAF, the content of soluble sugar in the caryopsis of the transgenic rice was less than that in non-transgenic ones, but it was reversed after 9 DAF. With the decrease of amylose content in the caryopsis of the transgenic rice, the total starch content also declined while the amylopectin content increased accordingly, so the composition of starch in caryopsis was changed, but it did not affect the accumulation of protein in the caryopsis of the transgenic rice.

Key words: rice; transgene; caryopsis; development; substance accumulation; waxy gene

摘要: 以转反义 *Wx* 基因籼稻和粳稻品系为材料, 研究其颖果的发育和物质积累。结果表明, 直链淀粉含量降低后的转基因水稻品系籽粒的粒重会有所下降, 而且直链淀粉含量下降越多, 粒重的下降幅度也越大。单个颖果胚乳细胞的数目也有不同程度的下降, 但在籽粒发育早期(花后 6 d 前), 转基因水稻的胚乳细胞增殖速率明显高于其亲本。直链淀粉降低后的转基因品系籽粒可溶性糖含量在发育初期(花后 9 d 前)低于其同时期的亲本, 而花后 9 d 后则明显高于其亲本。转基因水稻籽粒中的总淀粉含量有不同程度的下降, 而支链淀粉的含量却相对增加, 从而改变了籽粒中淀粉的组成, 但对籽粒中蛋白质的积累没有显著影响。

关键词: 水稻; 转基因; 颖果; 发育; 物质积累; 蜡质基因

中图分类号: Q943.1; Q945.6+5; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)03-0277-06

我国是水稻生产大国, 同时又是稻米消费大国, 约有一半以上的人口以稻米为主食。但目前我国生产上大面积种植的水稻品种大部分米质不优, 特别是直链淀粉含量偏高^[1]。稻米直链淀粉含量偏高, 往往使米饭的黏性、柔软性和光泽度变差, 影响米饭的质地和适口性。稻米胚乳中的淀粉主要分为直链淀粉和支链淀粉两种, 其中的直链淀粉含量主要由 *Wx* 蛋白即淀粉粒结合型淀粉合成酶 (granule bound starch synthetase, GBSS) 决定, 它是由水稻蜡质 (*waxy*, *Wx*) 基因编码的。不同水稻类型或品种中蜡质基因的表达水平不同, 其胚乳中的直链淀粉含量也不相同^[2]。而直链淀粉积累的差异必然会影响籽粒中淀粉的合成与积累, 从而影响粒重的形成。徐云碧等^[3]、何祖华等^[4] 利用糯和非糯的近等基因系分析了 *Wx* 基因对产量构成因素和籽粒物质积累的影响, 认为糯质基因可使谷粒灌浆不充实, 粒重显著降低。利用农杆菌介导的水稻高效转化系统^[5], 将反义 *Wx* 基因导入多个高产水稻品种

中^[6-7], 引起 *Wx* 蛋白不同程度缺失, 获得了直链淀粉含量不同程度下降的转基因品系, 并可稳定遗传。这为研究 *Wx* 基因对水稻籽粒发育和物质积累的影响, 了解 *Wx* 基因表达的生理生化基础提供了很好的材料。本研究以转反义 *Wx* 基因籼稻和粳稻品系为材料, 分析其直链淀粉含量下降对水稻颖果发育和物质积累的影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 材料为高产粳稻品种武运粳 7 号 (试验编号 2200, 直链淀粉含量 17.0%) 及其转反义 *Wx* 基因水稻 (试验编号 2201、

收稿日期: 2005-09-01; 修改稿收到日期: 2005-12-27。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471045, 3030026); 国家 863 计划资助项目 (2004AA212092); 扬州大学高层次人才科研启动基金资助项目。

第一作者简介: 陈刚 (1973-), 男, 讲师。

2203,直链淀粉含量分别为8.5%和2.0%),我国重点粳型杂交稻亲本龙特甫B(简称LP03,直链淀粉含量28.0%)及其转反义 Wx 基因水稻(试验编号A199,直链淀粉含量9.0%)^[6-8]。各材料按常规栽培方法于每年正季种植于扬州大学试验农场。

1.2 发育不同天数颖果的采集

在盛花期采用记号笔点颖与挂牌相结合的方法准确标记水稻开颖日期。分别取花后3、6、9、12、15、18、21、24、30、36、42 d的颖果测定。

1.3 颖果鲜、干质量和含水率的测定

取花后不同天数的籽粒,剥去颖壳,以30粒为单位,称其鲜质量,然后在105℃下杀青15 min,80℃烘干至恒重后称量,并计算含水率,重复3次。

1.4 颖果胚乳细胞数的测定

采用酶解法^[9]测定胚乳细胞数。取花后不同天数的颖果,置于卡诺固定液($V_{乙醇} : V_{冰乙酸} = 3 : 1$)中固定3 h,然后保存于70%酒精中备用。测定时先剥去果皮、种皮和胚,然后按染色、酶解、滤至微孔滤膜、镜检计数等程序进行胚乳细胞计数,重复6次。

1.5 颖果中可溶性糖和淀粉含量的测定

取花后不同天数的颖果,烘干后碾磨成粉,并过

100目筛,用蒽酮法测定可溶性糖和总淀粉含量^[10];按农业部标准NY147-88所示方法测定直链淀粉含量,并计算支链淀粉含量,重复3次。

1.6 颖果蛋白质含量测定

用凯氏定氮法测定蛋白质含量,重复3次。

2 结果与分析

2.1 转反义 Wx 基因水稻颖果的生物量和含水量变化动态

灌浆期转反义 Wx 基因水稻颖果的鲜质量和干质量以及含水率的变化情况如图1所示。

随着开花后籽粒的发育和贮藏物质的积累,籽粒的鲜质量和干质量不断增加,而含水量则迅速下降。但转反义 Wx 基因粳稻A199在籽粒发育过程中,其鲜质量明显低于相同发育时期的亲本LP03,而籽粒的含水量却相反,要高于同时期的亲本LP03,从而导致A199籽粒的干质量显著低于同期的亲本LP03。转基因粳稻籽粒发育前期的鲜、干质量与亲本差异不大,但花后21 d后2201和2203籽粒的鲜、干质量均低于同时期的亲本2200,而籽粒的含水量在灌浆后期则略高于其亲本。说明在遗传背景及环境条件基本相同的情况下,直链淀粉含量

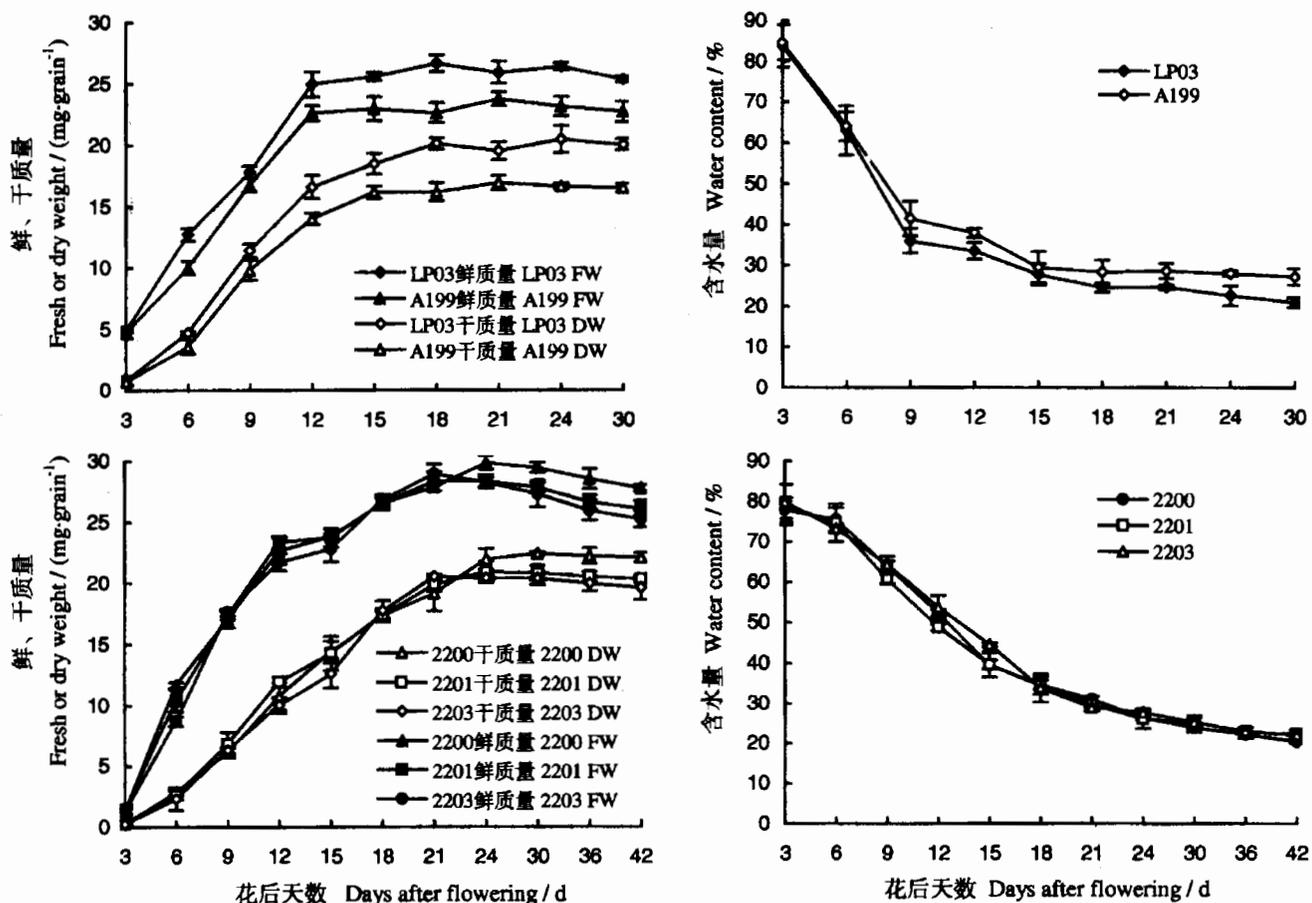


图1 转反义 Wx 基因水稻颖果的鲜、干质量和含水量的变化

Fig. 1. Changes of biomass and water content in the caryopses of the transgenic rice with antisense Wx gene.

图中FW为鲜质量,DW为干质量。

FW, Fresh weight; DW, Dry weight. Lines 2201 and 2203 are transgenic lines from rice variety 2200(Wuyunjing 7); Line A199 is a transgenic line from rice restorer line LP03(Longtefu B).

降低后的转基因水稻籽粒的粒重会有所下降,而且直链淀粉含量下降越多,粒重的下降幅度也越大。这种直链淀粉含量下降对粒重的负效应与自然隐性糯性位点对稻米粒重的效应是一致的^[3-4,11-12]。

2.2 转反义 *Wx* 基因水稻颖果胚乳细胞的增殖

胚乳细胞数是构成籽粒库强的重要组成之一。许多试验结果表明,籽粒的发育和淀粉的积累与胚乳细胞数呈极显著的正相关^[13]。水稻胚乳发育初期主要是细胞的分裂增殖,然后是淀粉等贮藏物质的积累和因此而导致的粒重增加。由图 2 可以看出,花后 3~6 d 是胚乳细胞增殖最快的时期,花后 9 d 胚乳细胞数即达最大值,此后随着颖果的发育,胚

乳细胞数有所下降。结果还表明,随着直链淀粉含量的下降,单个颖果胚乳细胞数有不同程度的下降。但在籽粒发育早期(花后 6 d 前),转基因水稻的胚乳细胞增殖速率明显高于其亲本。

2.3 转反义 *Wx* 基因水稻颖果发育过程中可溶性糖含量的变化

水稻籽粒灌浆过程中运输到水稻籽粒中的光合产物最初以可溶性糖的形式存在,可溶性糖经过相关酶降解、合成淀粉并贮藏起来。因此,籽粒中可溶性糖含量高有利于淀粉的积累。由图 3 可见,单位干质量籽粒的可溶性糖含量在籽粒灌浆过程中不断下降,并最终维持在较低的水平。特别是籼稻在花

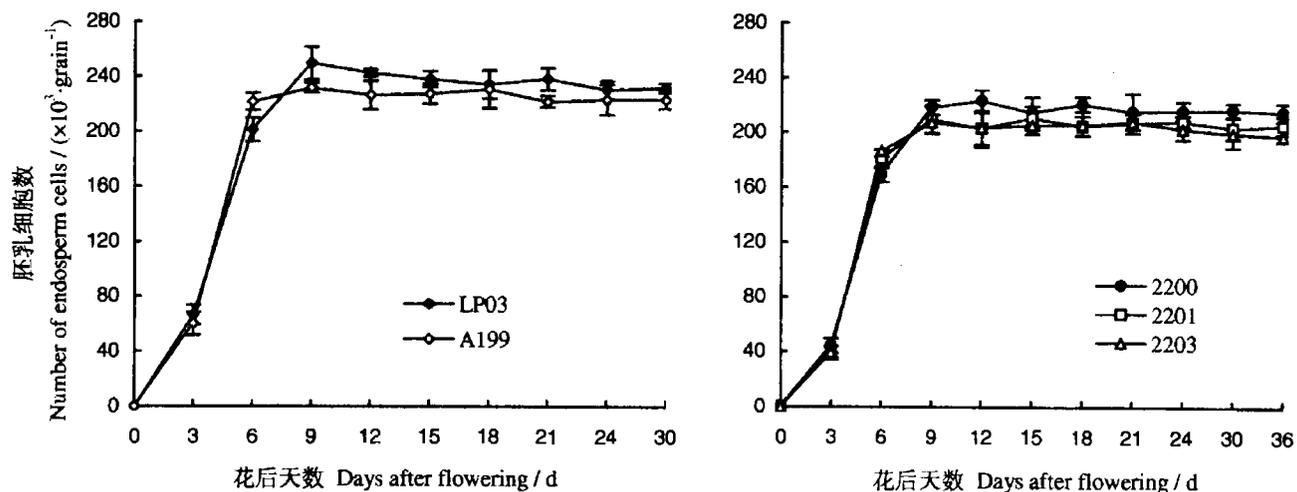


图 2 转反义 *Wx* 基因水稻颖果胚乳细胞数目的变化

Fig. 2. Changes of endosperm cell number in the caryopses of transgenic rice with antisense *Wx* gene.

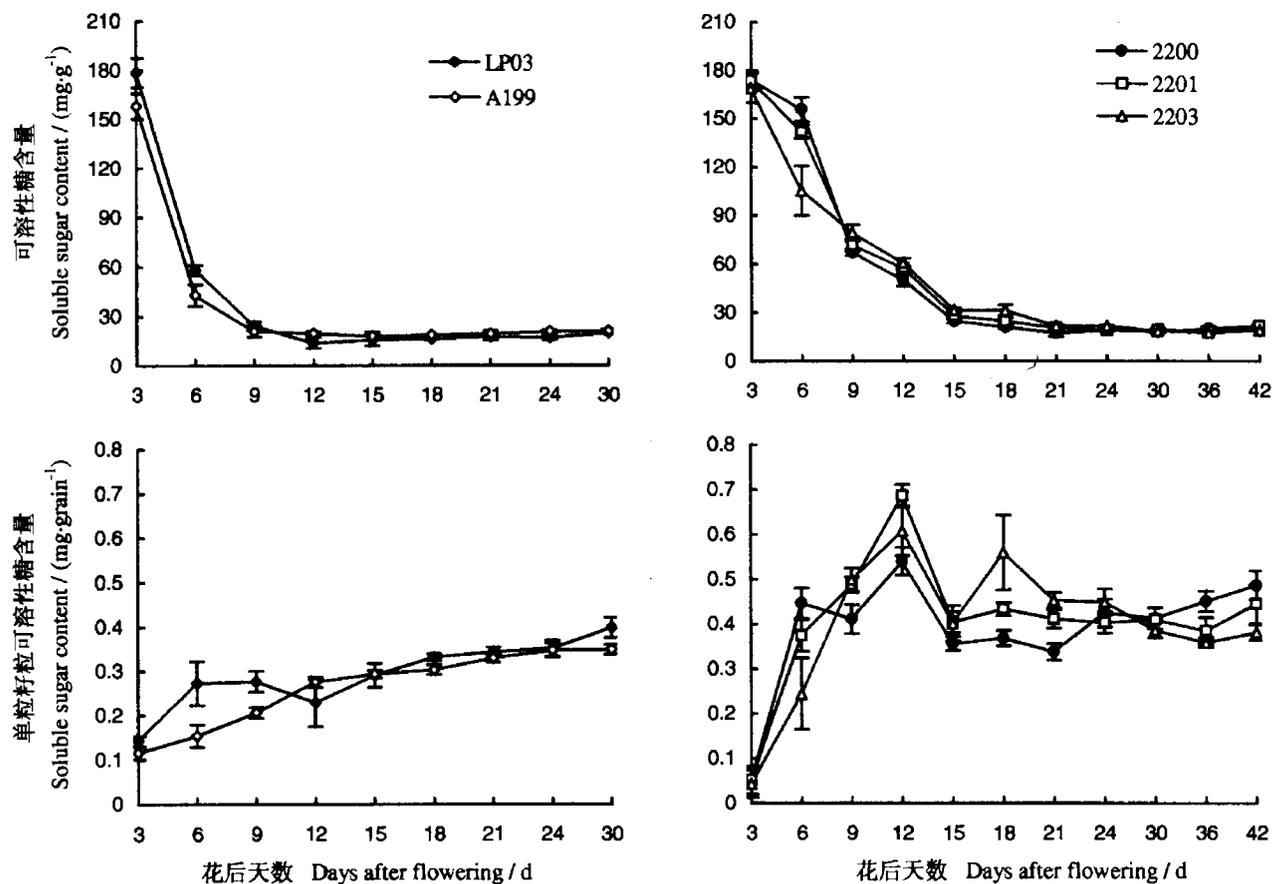


图 3 转反义 *Wx* 基因水稻颖果可溶性糖含量的变化

Fig. 3. Changes of soluble sugar content in the caryopses of the transgenic rice with antisense *Wx* gene.

后9 d前、粳稻在花后15 d前,其可溶性糖含量下降最快。因为此阶段正好是胚乳细胞物质充实期,蔗糖等可溶性糖作为淀粉合成的底物被大量合成为淀粉,使颖果中可溶性糖的输入少于消耗,因而含量下降。从图3中还可以看出,直链淀粉含量降低后的转基因品系籽粒可溶性糖含量在发育初期(花后9 d前)低于其同时期的亲本,而花后9 d后则明显高于其亲本。

对于单粒籽粒来说,可溶性糖的变化又不同,其中籼稻籽粒中可溶性糖含量在花后不断升高,且转基因品系的可溶糖含量低于相应时期的亲本;而粳稻籽粒中可溶性糖在花后先逐渐升高,到花后12 d达最大值,此后又下降并维持在一定水平,而且转基因品系的可溶性糖含量在籽粒发育中期(花后9~24 d)要明显高于相应时期的亲本(图3)。

2.4 转反义 *Wx* 基因水稻颖果发育过程中淀粉的积累

水稻胚乳细胞开始分裂的前3~4 d,胚囊中一

般没有淀粉积累,而在子房壁的中层细胞中有较多的淀粉粒^[14]。在花后5 d以后,胚乳细胞中开始出现淀粉体,此后随着籽粒的发育,淀粉积累迅速上升。转基因籼稻 A199 的直链淀粉含量从28%降低到9%,下降了67.9%,但总淀粉含量只比亲本低15.5%,支链淀粉含量反而比亲本增加了14.2%,说明直链淀粉合成受抑制后,由源提供的可溶性糖相对增多,促进了支链淀粉的合成,从而改变了籽粒中淀粉的组成。转基因粳稻 2201 和 2203 籽粒的直链淀粉含量分别比亲本下降了49.0%和88.2%,但支链淀粉含量只分别比亲本增加了3.3%和7.5%,从而导致转基因水稻籽粒的总淀粉含量比其亲本显著降低,分别下降了9.1%和15.3%。另外,转基因水稻颖果的直链淀粉积累快于其亲本,也快于支链淀粉的积累。在花后9 d转基因水稻籽粒的直链淀粉含量即达最大值,而其亲本则在花后15~18 d才能达到(图4)。这是由于转基因品系的直链淀粉含量降低后,其直链淀粉合成的总量下降,到达最大值

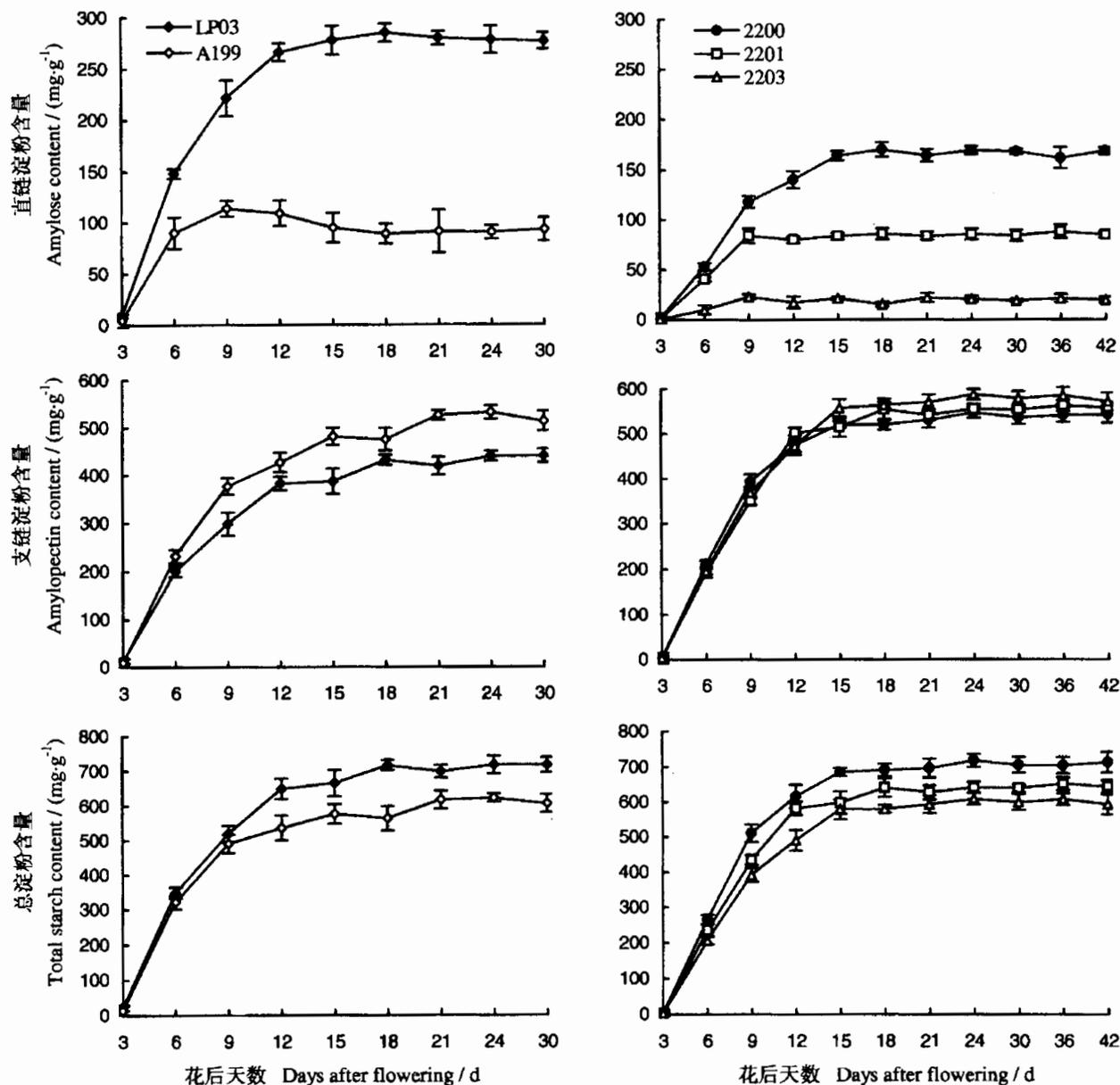


图4 转反义 *Wx* 基因水稻颖果淀粉积累的动态

Fig. 4. Changes of starch content in the caryopses of transgenic rice with antisense *Wx* gene.

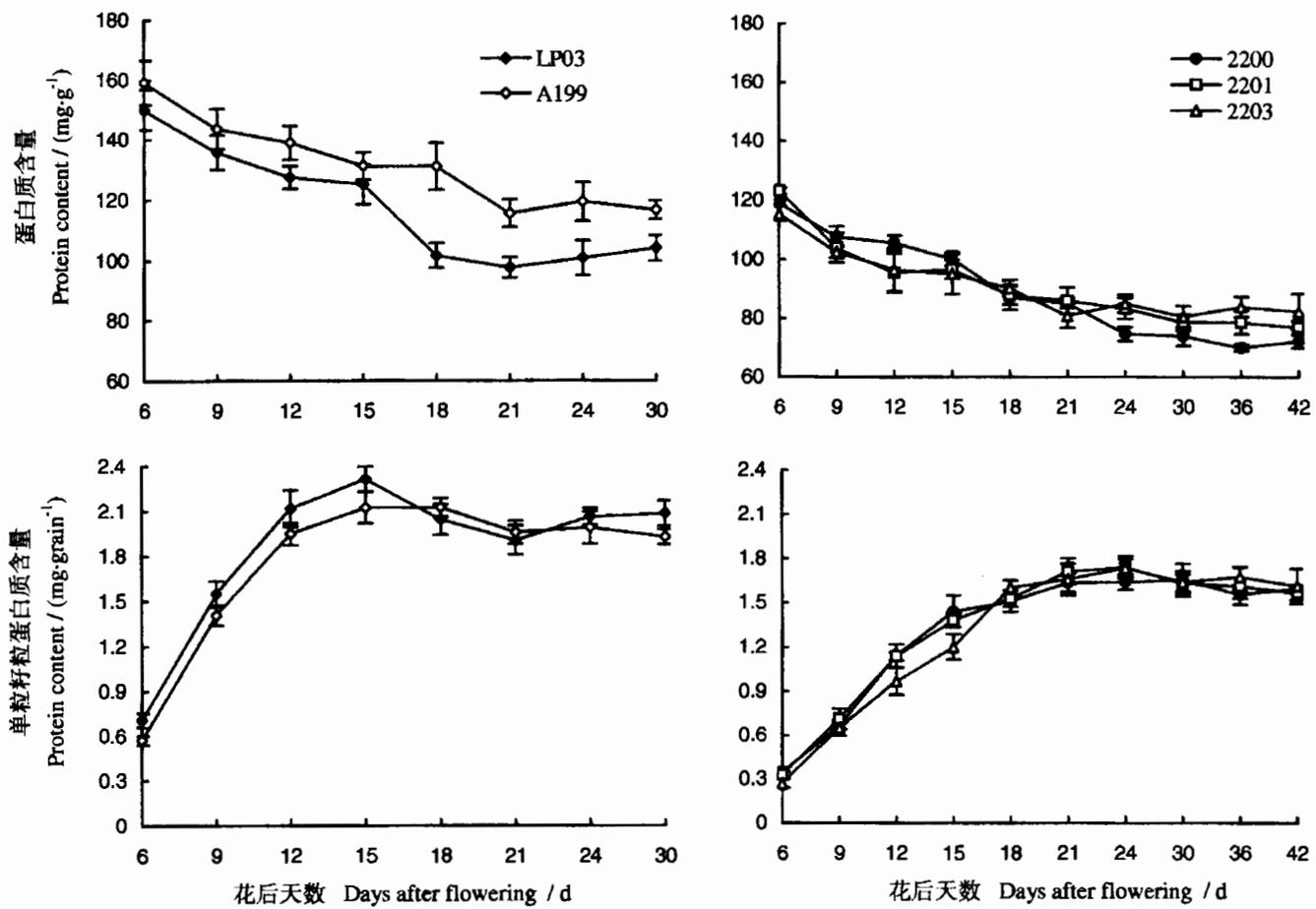
图5 转反义 *Wx* 基因水稻颖果蛋白质积累的动态

Fig. 5. Changes of protein content in the caryopses of the transgenic rice with antisense *Wx* gene.

的时间就相应缩短。

2.5 转反义 *Wx* 基因水稻颖果发育过程中蛋白质的积累动态

在籽粒发育过程中,若以单位干质量籽粒的蛋白质含量计,各品种颖果蛋白质含量呈不断下降的趋势,到后期基本达到平衡(图5)。颖果中蛋白质含量在灌浆初期最高,主要是由于这时期颖果中贮藏物质刚开始积累,淀粉含量较少,蛋白质占籽粒干物质的比重最大。以后随着籽粒灌浆时间的增加,淀粉大量积累,蛋白质占籽粒干物质的比重逐渐降低。在花后21~24 d时颖果中的蛋白质含量基本趋于稳定。若以单粒籽粒来表示的话,则其蛋白质含量是随着灌浆日期的增加而增加的,且到了灌浆后期略有下降。另外,无论是籼稻还是粳稻,当直链淀粉含量不同程度下降后单位干质量籽粒的蛋白质含量在灌浆中后期均比相应的亲本高,达显著(粳稻)或极显著(籼稻)水平。而转基因品系单粒籽粒的蛋白质含量与其亲本相比则没有显著差异。这说明直链淀粉合成受抑虽然影响了籽粒淀粉的积累,但对蛋白质的积累没有显著影响,只是由于其影响了颖果的粒重,从而使转基因品系单位干质量籽粒的蛋白质含量有所上升。

3 讨论

自然界中水稻糯质性状主要受一对隐性基因控制。Takeda^[15-16]曾经系统地研究过糯性基因对谷粒性状的影响,发现糯稻籽粒往往比非糯籽粒轻。徐云碧等^[3]、何祖华等^[4]分别利用糯和非糯近等基因系研究 *Wx* 基因对水稻颖果物质积累和产量性状的影响,表明 *Wx* 基因影响了颖果中物质的积累,使颖果灌浆不充分、籽粒内容物较疏松,导致千粒重显著下降。将反义 *Wx* 基因转入水稻后获得的低直链淀粉含量的品系,虽然在遗传上表现为显性(与自然突变或人工诱变获得的糯性隐性性状正好相反^[8]),但其粒重也明显下降,而且直链淀粉含量下降越多,粒重的下降幅度也越大,这也再次证实了糯性基因对稻米粒重确实具有负效应。

水稻籽粒的灌浆充实主要是胚乳组织的生长,包括胚乳细胞的分裂增殖和胚乳细胞内物质的充实两个过程,是稻米粒重形成的生物学基础^[17-18]。其中,胚乳细胞数是籽粒库容特征的表现基础,它决定了籽粒的最大灌浆潜力^[13]。本研究表明,直链淀粉含量降低后的转基因品系胚乳细胞数要低于其亲本,说明直链淀粉合成受抑后籽粒的库容量有所缩

小,而单个细胞的物质充实量受影响的程度较小,籽粒的最大灌浆潜力无疑会受到影响,进而影响到粒重。但研究还发现,籽粒发育初期转基因品系的胚乳细胞增殖速率要明显高于同时期的亲本,而细胞的增殖应该有较好的营养为基础^[13],这就说明转基因品系籽粒发育初期需要消耗更多的营养物质。因此,在灌浆早期转基因品系籽粒的代谢对养分的需求要高于相应的亲本,从而导致转基因水稻籽粒发育初期可溶性糖含量低于同时期的亲本。

在水稻籽粒发育过程中,淀粉生物合成的原料来自于源器官的光合产物,这些光合产物以可溶性糖的形式输入库器官的胚乳细胞中,供淀粉的生物合成^[19]。随着籽粒中的可溶性糖转变成淀粉,可溶性糖含量逐渐下降,淀粉含量不断增加,而且可溶性糖的下降过程和淀粉的积累过程是一致的(图 3 和图 4)。淀粉合成后降低了胚乳细胞中游离糖的含量,从而促进了光合产物向淀粉合成方向转移,这是淀粉合成的正反馈机制。而转基因水稻直链淀粉合成下降,必然会影响淀粉在胚乳中的积累,最终影响可溶性糖在籽粒中转变成淀粉^[20]。因此,转基因水稻籽粒中可溶性糖含量在灌浆中后期要比其相应的亲本高,不利于粒重的形成^[21]。而籽粒中可溶性糖含量的增加,又会影响叶片中的光合产物向籽粒输送,从而使花后剑叶的生理活性高于亲本,其功能期也相应比亲本长。由此推断,尽管转基因品系直链淀粉含量下降引起籽粒重量下降,但如果通过栽培措施来提高库容量,并增加同化物向籽粒的运转速率和时间,那么实现优质高产的目标,仍然是可行的。

参考文献:

- [1] 张玉华. 稻米直链淀粉含量及其影响因素研究. 黑龙江农业科学, 2002(3): 34-37.
- [2] Wang Z Y, Zheng F Q, Shen G Z, et al. The amylose content in rice endosperm is related to the post transcriptional regulation of the waxy gene. *Plant J*, 1995, 7: 613-622.
- [3] 徐云碧, 申宗坦. 水稻糯质基因对产量构成性状的影响. 作物学报, 1989, 15(3): 237-241.
- [4] 何祖华, 申宗坦. 水稻糯质基因对籽粒物质积累的影响. 中国农业科学, 1995, 28(4): 20-24.
- [5] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259-271.
- [6] 陈秀花, 刘巧泉, 王宗阳, 等. 反义 Wx 基因导入我国籼型杂交稻重点亲本. 科学通报, 2002, 47(9): 684-688.
- [7] Liu Q Q, Wan Z Y, Chen X H, et al. Stable inheritance of the antisense waxy gene in transgenic rice with reduced amylose level and improved quality. *Transgenic Res*, 2003, 12(1): 71-82.
- [8] 刘巧泉, 王兴稳, 陈秀花, 等. 转反义 wx 基因糯稻的显性遗传及对稻米粒重的效应分析. 中国农业科学, 2002, 35(2): 117-122.
- [9] 张祖建, 朱庆森, 王志琴. 水稻胚乳细胞计数方法研究. 江苏农学院学报, 1996, 17(2): 7-11.
- [10] 邹琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2000: 110-114.
- [11] 顾兴友, 顾铭洪, 张正根, 等. 糯性位点对稻米粒重的效应分析. 杂交水稻, 1995(6): 31-32, 39.
- [12] Takeda K, Nakayama R, Saito K. Influence of waxy character on grain size. *Japan J Breeding*, 1975, 25(2): 87-92.
- [13] 张祖建, 朱庆森, 王志琴, 等. 水稻品种源库特性与胚乳细胞增殖和充实的关系. 作物学报, 1998, 24(1): 21-27.
- [14] 顾蕴洁, 王忠, 陈娟, 等. 水稻果皮的结构与功能. 作物学报, 2002, 28(4): 439-444.
- [15] Takeda K. Grain filling process in waxy (glutinous) and non waxy isogenic line of rice. *Japan J Breeding*, 1980, 30(4): 329-334.
- [16] Takeda K. Response of grain filling to ripening conditions in waxy (glutinous) and non waxy isogenic lines and their F₁ hybrid of rice. *Japan J Breeding*, 1981, 31(1): 1-8.
- [17] 王忠, 李卫芳, 顾蕴洁, 等. 水稻胚乳的发育及其养分输入的途径. 作物学报, 1995, 21(5): 520-527.
- [18] 张祖建, 王志琴, 朱庆森. 水稻胚乳细胞增殖动态分析及其与籽粒生长的关系. 作物学报, 1998, 24(3): 257-264.
- [19] Boyer C D. Biochemical genetics of carbohydrate metabolism in source and sink tissue // Photoassimilate Distribution and Partitioning in Plant and Crops: Source Sink Relationships. New York: Marcel Dekker, 1996: 341-368.
- [20] 何祖华, 华金渭, 申宗坦. 水稻 wx 基因对籽粒糖类积累和萌发种子淀粉酶活力的影响. 中国水稻科学, 1994, 8(1): 21-26.
- [21] 梁康迳, 林文雄, 李亚娟, 等. 水稻籽粒发育过程中可溶性糖含量的遗传及其与品质的关系. 分子植物育种, 2003, 1(2): 207-215.