

小麦地方品种淀粉颗粒结合蛋白及淀粉含量差异研究

高丽鹃^{1,2}, 潘志芬¹, 邓光兵¹, 龙海¹, 余懋群¹

(¹ 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; ² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 淀粉颗粒结合蛋白包含了多种淀粉生物合成的关键酶, 对作物淀粉品质有重要影响。本研究利用 1D-SDS-PAGE, 分离了 74 份四川、西藏及云南毗邻地区小麦的淀粉颗粒结合蛋白, 对突变材料进行了分子标记检测, 对总淀粉和直链淀粉含量差异进行了比较。发现供试材料中, 在分子量 57~130 kDa 区域共有 9 种不同的蛋白条带。其中, 2 个条带可能为新的淀粉颗粒结合蛋白; 存在 12 份 Wx-B1 缺失的自然突变体和 3 份稀有的 SGP-B1 缺失突变体; 筛选到直链淀粉含量超过 30% 的材料 2 份, 直链淀粉含量为 15% 左右的材料 10 份。这些材料为小麦淀粉品质改良及淀粉生化合成机理研究提供了基础。

关键词: 小麦; 淀粉颗粒结合蛋白; 直链淀粉; SDS-PAGE

Starch Granule-Associated Proteins and Starch Content in Wheat Landrace

GAO Li-juan^{1,2}, PAN Zhi-fen¹, DENG Guang-bing¹, LONG Hai¹, YU Mao-qun¹

(¹ Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041;

² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: The majority of Starch granule-associated proteins (SGAPs) is believed to correspond to starch biological enzymes and thus is important to starch quality in the breeding programmes. In this study, SGAPs of 74 indigenous wheat lines from the adjacent areas of Sichuan, Tibet, and Yunnan of China using 1D-SDS-PAGE were separated. A total of nine bands with molecular weights 57~130 kDa were observed, of which two bands was not reported in previous study and might represent novel proteins. Twelve and three lines were respectively identified to have a deletion of Wx-B1 and SGP-B1 (SSII). The amylose content of the 74 lines varied from 14.73% to 40.73%, with an average of 20.39%. Among them, 10 lines showed a low level of 15% while 2 lines showed a high level of over 30%. These lines are very important for further study on the starch synthesis mechanism and improvement of starch quality.

Key words: Wheat; starch granule-associated proteins; amylose; SDS-PAGE

淀粉是禾谷类作物子粒的重要组成成分, 其含量和质量影响作物品质及利用。通过调控淀粉的生物合成途径, 改善淀粉合成的数量和质量, 可发展特色淀粉品种。禾谷类作物贮藏淀粉的生物合成和积累在种子的形成过程中完成, 由一系列生物合成酶催化, 目前发现至少有 5 类关键酶参与, 包括 ADPG

焦磷酸化酶 (AGPase, ADP glucose pyrophosphorylase)、淀粉颗粒结合酶 (GBSS, granule bound starch synthase)、淀粉合成酶 (SS, starch synthase)、淀粉分支酶 (SBE, starch branching enzyme) 和淀粉去分支酶 (DBE, starch debranching enzyme)^[1-3]。这些酶都存在多种具有独特作用的异构体, 协同调控淀粉的

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-04-25 网络出版日期: 2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1617.011.html>

基金项目: 科技部基础研究项目 (2006FY110700); 国家自然科学基金项目 (31101150); 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2011ZX08009-003); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX3-EW-N-02-2); 四川省育种攻关项目

作者简介: 高丽鹃, 硕士研究生, 麦类作物品质研究。E-mail: gaolijuan824@163.com

通信作者: 潘志芬, 博士, 副研究员, 麦类作物品质资源筛选与机理研究。E-mail: panzf@cib.ac.cn

余懋群, 博士, 研究员, 麦类作物遗传育种。E-mail: yumq@cib.ac.cn

合成和积累,影响淀粉的含量和质量。淀粉颗粒常常紧密结合多种微量蛋白,被称作淀粉颗粒结合蛋白(SGAPs, starch granule associated protein),其中包含多种淀粉生物合成的关键酶,这些结合酶的种类和性质随植物种类、基因型及发育时间而不同^[4-8]。例如,在玉米的 SGAPs 中已发现了 GBSSI、SSI、SSII 和 BEIIb,水稻 SGAPs 包含了 GBSSI 和 SSI,大麦中已鉴定出 GBSSI、SSI、SSIIa、SSIIb、BEIIa、BEIIb 和 BEIc 等与淀粉颗粒结合,但大麦 SSII 突变体的淀粉粒中没有结合 BEIIa、BEIIb 和 SSI^[9]。加强淀粉颗粒结合蛋白的鉴定和研究,有助于发掘新的淀粉合成相关酶,推动淀粉合成过程的深入理解,促进作物淀粉品质改良。关于小麦 SGAPs 组成,有少量报道。S. Rahman 等^[4]发现存在分子量为 60、75、85、100 和 105 kDa 等 5 种不同的 SGAPs; K. Denyer 等^[10]和 M. Yamamori 等^[6]发现小麦 SGP-1 (SGP-A1, 115 kDa; SGP-B1, 100 kDa; SGP-D1, 108 kDa), SGP-2 (92 kDa) 和 SGP-3 (80 kDa)。通过研究 SGP 蛋白的特性和功能,M. Yamamori 等^[11]发现 SGP-1、2、3 分别为 SSII (100~105 kDa)、SBE (92 kDa)、SSI (77~80 kDa)。近年来,通过突变体研究发现了 SSIII (180 kDa)^[12]、SSIV 酶蛋白^[13]及 SBEIc (140 kDa 和 145 kDa)^[14-15]等与淀粉颗粒紧密结合,其中 SBEIc 异构酶与小麦胚乳中 A 型淀粉颗粒特异结合。这些研究为淀粉合成机理及改良研究奠定了重要基础。但是,目前还未对中国小麦 SGAPs 进行研究。四川、西藏与云南毗邻地区生物资源多样性丰富,人为干扰少,能够较好地保留基因资源的原初状态。本研究对来自该区域的地方小麦品种的 SGAPs 组成进行分析,以期发掘新的 SGAPs 种类或突变体,为小麦淀粉品质改良及淀粉生化合成机理研究提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料共 74 份,来自四川、西藏与云南毗邻地区,直接用于分析,全为当地种植 20 年以上的宝贵地方小麦资源,分布在海拔高度为 677~4094 m 的区域,其中分布在 2000~3000 m 区域的有 35 份(占 50%),分布在 3000 m 以上的材料 24 份(占 30%),分布在 4000 m 以上的材料 1 份。以青稞和中国春为对照。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦 SGAPs 的分离 小麦 SGAPs 的提取、

电泳分离及染色参照潘志芬等^[16]报道的方法,略有改进。条带命名采用数字命名法,随电泳迁移距离递增而递增。

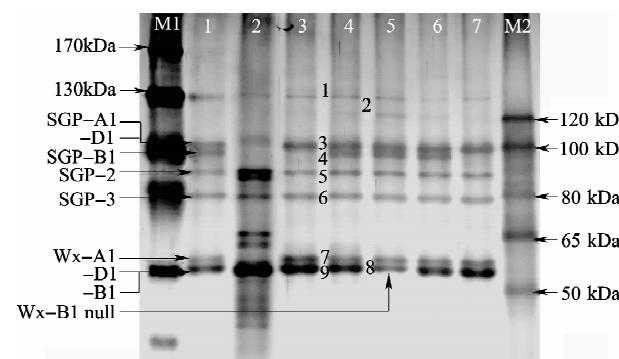
1.2.2 小麦 SSII 及 Wx 蛋白的分子标记检测 小麦 SSII (SGP-1) 和 Wx-B1 的分子标记检测分别参照 T. Shimbata 等^[17] 和 T. Nakamura 等^[18] 的方法,以幼嫩的小麦叶片为材料,其基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[19]。

1.2.3 总淀粉和直链淀粉含量的测定 小麦总淀粉和直链淀粉含量测定分别参照 GB 5006-85、GB/T 15683,采用 PerkinElmer M341 全自动精密旋光仪和 UV755B 型紫外分光光度计进行,重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 小麦淀粉颗粒结合蛋白组成及突变体筛选

供试材料中共分离出 9 种不同的 SGAPs,其分子量约为 57~130 kDa,其中条带 1、2、3 和 9 呈现多态性(图 1)。条带 1 和 2 的分子量大小约为 130 kDa 和 125 kDa,目前还未见此分子量的 SGAPs 的报道,可能是 2 种新的 SGAPs。根据 M. Yamamori 等^[6,11]的研究,条带 3、4 对应为 SSII,条带 5、6 分别为 BEI、SSI,条带 7、8、9 为小麦的 GBSSI。供试材料中发现了 3 份 SGP-B1 (SSII) 的缺失突变体(图 1 泳道 3 和 7),12 份 Wx-B1 缺失突变体(图 1 泳道 5)。



M1, M2:蛋白分子量标准 Molecular weight standards;

1:中国春(对照) Chinese spring(CK);

2:青稞(对照) Naked barley (CK);

3:011Z1236;4:011Z1324;5:011Z1314;6:011Z1424;7:011Z1247

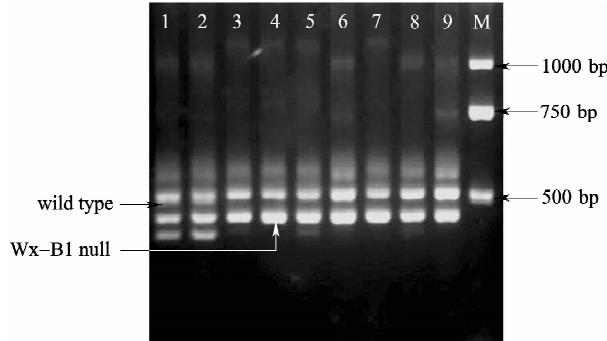
图 1 小麦淀粉颗粒结合蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of starch granule-associated proteins (SGAPs) in wheat

2.2 分子标记检测 Wx 及 SSII 突变体

通过特异分子标记对 12 份 SDS-PAGE 鉴定为 Wx-B1 缺失突变体进行了检测,发现其扩增结果

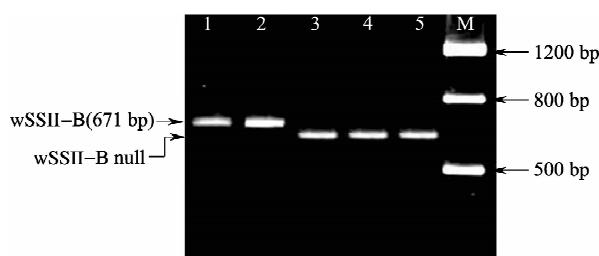
与 T. Nakamura 等^[18]报道的 Wx-B1 缺失体的扩增结果一致(图 2),表明这些材料的 Wx-B1 位点没有表达。同样对 1D-SDS-PAGE 鉴定为 SGP-B1 缺失的 3 份材料进行了分子标记检测(图 3),发现扩增产物缺失一段 671 bp 的 wSSII-B 的特异产物,从分子水平验证了该 3 份材料为 SGP-B1 缺失的自然突变体。



1:中国春(对照);2:011Z1397;3:011Z1327;4:011Z1248;
5:011Z1348;6:011Z1314;7:011Z1322;8:011Z1358;9:011Z1320;
M:DNA marker;1、2:野生型;3~9:Wx-B1 缺失型
1:Chinese spring(CK),1-2:Wild-type,3-9:Wx-B1 null

图 2 引物 Wx-B1(BDFL/BRD) 的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR products amplified with Wx-B1
(BDFL/BRD) specific primers



1:中国春(对照)Chinese spring(CK);2:011Z1397;
3:011Z1247;4:011Z1280;5:011Z1236;M:DNA Marker

图 3 引物 SSII BF1/BR1 的扩增产物

Fig. 3 PCR products amplified with SSII
BF1/SSII BR1 specific primers

2.3 小麦总淀粉和直链淀粉的含量差异

供试材料的总淀粉含量变幅为 42.31% ~ 77.89%,平均为 60.70% (表 1);直链淀粉含量变幅为 14.73% ~ 40.73%,平均为 20.39% (表 2),直链淀粉含量为 15% 左右的材料 10 份,直链淀粉含量超过 30% 的材料 2 份 (40.73%、31.91%),Wx-B1 缺失体的直链淀粉为 19.06%,SSII 缺失体为 22.64%,但两者跟野生型的 (20.54%) 差异不显著。

表 1 不同类型小麦总淀粉含量差异比较

Table 1 Comparision of the total starch content among different types of wheat

群体 Population	材料数 No. of accession	极差(%) Range	总淀粉含量(%) Total starch content
野生型 Wild type	59	58.33 ~ 60.95	60.0 ± 0.65
Wx-B1 缺失型 Wx-B1 null	12	59.75 ~ 64.28	62.0 ± 1.05
SSII 缺失型 SSII null	3	42.31 ~ 77.89	60.1 ± 1.40
Total	74	42.31 ~ 77.89	60.7 ± 1.12

表 2 不同类型小麦直链淀粉含量差异比较

Table 2 Comparision of the amylose content among different types of wheat

群体 Population	材料数 No. of accession	极差(%) Range	直链淀粉含量(%) Amylose content
野生型 Wild type	59	15.59 ~ 40.73	20.54 ± 0.52
Wx-B1 缺失型 Wx-B1 null	12	14.73 ~ 24.98	19.06 ± 0.83
SSII 缺失型 SSII null	3	20.24 ~ 27.05	22.64 ± 2.21
Total	74	14.73 ~ 40.73	20.39 ± 0.45

3 讨论

谷物子粒中的淀粉颗粒结合蛋白(SGAPs)与淀粉代谢及淀粉品质密切相关,其研究已受到关注^[20-23]。小麦中已报道了 60 kDa、77 kDa、92 kDa、100 ~ 105 kDa、180 kDa、140 ~ 145 kDa 等多种 SGAPs,它们均与相应的淀粉代谢酶对应,但还没有分子量为 120 ~ 130 kDa 的 SGAPs 报道,本研究电泳分离出了分子量约为 120 kDa 和 130 kDa(图 1,条带 1、2)的蛋白带,此蛋白带在玉米、水稻、大麦等谷类作物中均未报到,推测可能是新的 SGAPs^[24-25]。通过生物质谱、免疫杂交及其酶活性鉴定等技术,研究这些新的蛋白的特性及功能非常重要,将有助于淀粉合成机理的深入理解。

小麦中 SSII 主要负责支链淀粉的合成,胚乳发育早期 SSII 以可溶性及颗粒结合型 2 方式存在,而

在发育中期及后期只存在于淀粉颗粒中^[26],它的3个亚基(SGP-A1、SGP-B1、SGP-D1)分子量分别是105 kDa、100 kDa、104 kDa,由分别位于7AS、7BS、7DS染色体上的基因编码。目前已报道的SSII缺失体有SGP-B1缺失体(Kanto 79)、SGP-D1缺失体(Turkey 116)、SGP-A1缺失体(Chousen 30/Chousen 57)及SGP-1全缺失体^[11],还没有关于中国小麦缺失SGP-1的突变体的报道,本研究通过1D-SDS-PAGE技术在74份供试材料中筛选到了3份SGP-B1缺失的自然突变体。

研究发现,SGP-1缺失体的短链支链淀粉增加,淀粉粒形态发生很大变化,产生新特性的胚乳淀粉,能够拓展作物在食品及工业中的应用^[11,27-28],但由于缺乏SGP-1突变体材料,单个SGP-A1、SGP-B1、SGP-D1缺失或某2个缺失对淀粉特性的影响目前研究很少。因此,本研究获得的SGP-B1突变体,为深入研究此类缺失材料的淀粉特性及特色淀粉品种选育和工业应用新淀粉的发展提供了重要的材料基础。

GBSSI(Waxy蛋白)主要控制胚乳中直链淀粉的合成。普通小麦Waxy蛋白由3种亚基(Wx-A1、Wx-B1和Wx-D1)组成,不同Waxy蛋白缺失类型的直链淀粉含量和淀粉糊化特性不同。对我国小麦Wx位点研究发现主要以Wx-B1缺失为主,王子宁等^[29]从900份小麦品种中,鉴定出Wx-D1缺失材料1份,Wx-B1缺失材料6份;余春梅等^[30]从国内外的293份小麦品种(系)中,鉴定出Wx-A1缺失材料2份,Wx-B1缺失材料15份,Wx-D1缺失材料2份,同时缺失Wx-A1和Wx-B1的材料2份,全缺的材料3份;徐兆华等^[31]从国内外306份小麦品种(系)中,鉴定出Wx-B1缺失材料46份。本研究鉴定出了12份Wx-B1缺失材料,没发现缺失Wx-A1或Wx-D1的材料,也表明我国小麦Wx位点Wx-B1缺失的几率较大。Wx基因对直链淀粉含量的影响已有很多研究,发现Wx-B1的缺失影响直链淀粉含量,可使直链淀粉含量降低2%左右^[32],本研究中Wx-B1缺失型的直链淀粉含量最低(19.05%),比野生型的低1.48%,但是差异不显著。

谷类作物子粒淀粉组成对其应用有很大影响。直链淀粉含量高的作物胚乳可能其抗性淀粉含量更高,对糖尿病、肠道疾病有一定的疗效作用^[33-34],本研究所获得的高直链淀粉材料(>30%)可为保健食品行业提供珍贵的原料。直链淀粉含量较低的小麦适合做面条^[35-40]。本研究获得的直链淀粉含量

为15%左右的10份材料,可为面条小麦的选育提供宝贵材料。

参考文献

- [1] Myers A M, Morell M K, James M G, et al. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 989-997
- [2] James M G, Denyer K, Myers A M. Starch synthesis in the cereal endosperm [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 215-222
- [3] Morell M K, Konik-Rose C, Ahmed R, et al. Synthesis of resistant starches in plants [J]. *J Aoac Int*, 2004, 87(3): 740-748
- [4] Rahman S, Kosar-Hashemi B, Samuel M S, et al. The major proteins of wheat endosperm starch granules [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1995, 22: 793-803
- [5] Mu-Forster C, Huang R M, Powers J R, et al. Physical association of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm: granule-associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 821-29
- [6] Yamamori M, Endo T R. Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 275-281
- [7] Baldwin P M. Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review [J]. *Starch*, 2001, 53: 475-503
- [8] Grimaud F, Rogniaux H, James M G, et al. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59: 3395-3406
- [9] Tetlow I J, Beisel K G, Cameron S, et al. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 1878-1891
- [10] Denyer K, Hyton C M, Jenner C F, et al. Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm [J]. *Planta*, 1995, 196: 256-265
- [11] Yamamori M, Fujita S, Hayakawa K, et al. Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylase [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 21-29
- [12] Li Z Y, Mouille G, Kosar-Hashemi B, et al. The structure and expression of wheat starch synthase III gene: motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase III gene family [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123: 613-624
- [13] Leterrier M, Holappa L D, Broglie K E, et al. Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8(1): 98-119
- [14] Baga M, Nair R B, Repellin A, et al. Isolation of a cDNA encoding a granule-bound 152-kilodalton starch-branched enzyme in wheat [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 253-263
- [15] Peng M S, Gao M, Baga M, et al. Starch-branched enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 265-272
- [16] 潘志芬, 邓光兵, 王涛, 等. 小麦Waxy蛋白亚基1D-SDS-PAGE分离方法改良 [J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(5): 487-489
- [17] Shimbata T, Nakamura T, Vrinten P, et al. Mutations in wheat starch synthase II genes and PCR-based selection of a SGP-1 null line [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1072-1079
- [18] Nakamura T, Vrinten P, Saito M, et al. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR based markers [J]. *Genome*, 2002, 45(6): 1150-1156
- [19] Doyle J J, Doyle J L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue [J]. *Focus*, 1990, 12: 13-15

- [20] Borén M, Larsson H, Falk A, et al. The barley starch granule proteome-internalized granule polypeptides of the mature endosperm [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 617-626
- [21] Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z Y, et al. Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-synthetic locus [J]. *Planta*, 2005, 222: 899-909
- [22] Alexander R D, Morris P C. A proteomic analysis of 14-3-3 binding proteins from developing barley grains [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 1886-1896
- [23] Hennen-Bierwagen T A, Lin Q, Grimaud F, et al. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts [J]. *Plant Physiol*, 2009, 149: 1541-1559
- [24] Grimaud F, Rogiaux H, James M G, et al. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(12): 3395-3406
- [25] Wang C P, Pan Z F, Nima Z X, et al. Starch granule-associated proteins of hull-less barley (*Hordeum vulgare* L.) from the Qinghai-Tibet Plateau in China [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91: 616-624
- [26] Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, et al. Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of Amylose-Extender Mutation in Rice Endosperm [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 459-472
- [27] 张业伦, 杜皓月, 李杏普, 等. 普通小麦 SGP-A1 缺失对淀粉品质的影响 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(12): 2590-2594
- [28] Konik-Rose C, Thistleton J, Chanvrier H, et al. Effects of starch synthase II a gene dosage on grain, protein and starch in endosperm of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 1053-1065
- [29] 王子宁, 郭北海, 李洪杰. 小麦 (*T. aestivum*) Waxy-D1 基因缺失材料的发现及分析 [J]. *作物学报*, 2000, 26(3): 257-260
- [30] 余春梅, 陈佩度. 普通小麦 (*T. aestivum*) Waxy 蛋白种质资源研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(3): 1-6
- [31] 徐兆华, 夏兰芹, 陈新民, 等. 中国冬小麦品种 Waxy 蛋白分析及分子标记研究 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1514-1521
- [32] 王芳, 赵辉, 王燕, 等. 小麦 *Wx-B1* 基因酶切片段长度多态性及其与直链淀粉含量的关系 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(3): 269-274
- [33] Coudray C, Demigne C, Rayssiguier Y. Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans [J]. *Am Soc Nutr Sci*, 2003, 133(1): 1-4
- [34] 张志转, 陈多璞, 沈希宏, 等. 抗性淀粉形成的影响因素 [J]. *核农学报*, 2008, 22(4): 483-487
- [35] Briney A, Wilson R, Potter R H, et al. A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat [J]. *Mol Breeding*, 1998, 4(5): 427-433
- [36] Zhao X C, Batey I L, Sharp P J, et al. A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat [J]. *J Cereal Sci*, 1998, 27(1): 7-13
- [37] Souza E J, Martin J M, Guttieri M J, et al. Influence of genotype, environment and nitrogen management on spring wheat quality [J]. *Crop Sci*, 2004, 44(2): 425-432
- [38] Sasaki T, Kohyama K, Yasui T, et al. Rheological properties of white salted noodles with different amylose content at small and large deformation [J]. *Cereal Chem*, 2004, 81(2): 226-231
- [39] Park C S, Baik B K. Significance of amylose content of wheat starch on processing and textural properties of instant noodles [J]. *Cereal Chem*, 2004, 81(4): 521-526
- [40] 姚金保, 杨学明, 姚国才, 等. 中国糯小麦研究进展 [J]. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(2): 201-204