

2个籼稻低直链淀粉突变体 W_x 等位基因序列的研究

郭涛[†], 韩诗曼[†], 夏斌, 王慧, 刘永柱, 张建国, 陈志强

(华南农业大学, 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:根据粳型水稻 W_x 基因全序列设计引物, 扩增2个空间诱变低直链淀粉突变体 XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 等位基因。序列分析结果表明: XLA-1、XLA-2 与原种籼小占在 W_x 基因 DNA 序列上存在较多碱基差异, 这种差异以碱基改变为主; XLA-1、XLA-2 在第10外显子(+1 208 bp)处存在一个单核苷酸突变(籼小占为碱基 T, 突变体为碱基 C), 编码子由 TCT 突变为 CCT, 导致丝氨酸突变成脯氨酸, 氨基酸的改变可能改变了 W_x 蛋白的空间结构, 致使它不能充分结合在淀粉颗粒上, 进而导致直链淀粉含量下降。本研究初步证明在2个籼稻突变体中存在 W_x 的复等位基因影响直链淀粉含量。

关键词:籼稻; 空间诱变; 低直链淀粉突变体; W_x 基因; 序列分析

中图分类号: S335

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0006-04

Study on the W_x Allele Gene Sequences of Two Low Amylose Content Mutants of *Oryza indica*

GUO Tao[†], HAN Shi-man[†], XIA Bin, WANG Hui, LIU Yong-zhu, ZHANG Jian-guo, Chen Zhi-qiang
(National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Based on the W_x gene sequence of *japonica* rice, the W_x gene sequences of the two low-amylose mutants XLA-1 and XLA-2 of *Oryza indica* were detected by PCR and sequencing analysis. The main results showed that: There were many mutant sites among XLA-1, XLA-2 and Xianxiaozhan (the wild type), most of them were base change. There was a single nucleotide polymorphisms (SNP) in the 10th exon (+1 208 bp) of XLA-1 and XLA-2 (Xianxiaozhan for the T, mutant for the C), codon TCT changed into CCT, which resulted in the substitution of a proline residue for serine. The substitution could alter the spatial structure of W_x protein, which may not be fully integrated on the starch granules, leading to the decreased of amylose content. The preliminary results indicated that the existence of W_x alleles affected amylose content in the two mutants.

Key words: *Oryza indica*; space mutation; low amylose content mutants; W_x gene; sequence analysis

淀粉是水稻 *Oryza sativa* 籽粒中重要的组成部分, 其组成和性质决定着稻米的品质。水稻的淀粉由直链淀粉 (Amylose, AM) 和支链淀粉 (Amylopectin, AP) 2 部分组成, 其中直链淀粉的含量对稻米品质的影响最大, 是评价水稻的重要指标之一^[1]。W_x 基因是影响稻米直链淀粉含量的主要因素, 具有一系列复等位基因^[2,4], 是目前生产上利用的最主要的稻米

品质改良基因资源。目前已检测到的 W_x 复等位基因数目有限, 难以满足生产上对稻米直链淀粉含量的多样化要求, 因此, 继续探求具有育种利用价值的直链淀粉突变体具有重要的理论与实践意义。

本研究所利用的低直链淀粉突变体 XLA-1 和 XLA-2 是 2004 年在籼小占 (籼粘稻) 空间诱变二代中选择出的 2 个低直链淀粉突变体, 经多代观察测

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 郭涛 (1978—), 男, 助理研究员, 硕士; 韩诗曼 (1987—), 女, 硕士研究生; [†] 对本文贡献相同; 通信作者: 陈志强 (1956—), 男, 教授, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (10151064201000058); 863 计划项目 (2007AA1F00101); 国家科技支撑计划项目 (2008BAD97B02); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助

定, XLA-1 和 XLA-2 的突变性状均稳定遗传. XLA-1 低直链淀粉特性受 2 对隐性基因控制, 它们具有连锁关系和互补作用, 这 2 对基因一对可能为 W_x 的复等位基因, 另一对可能是与 W_x 不等位的基因, 任何一对基因隐性纯合都将导致直链淀粉含量降低; XLA-2 低直链淀粉特性受一对 W_x 的复等位基因控制, 同时受微效基因的修饰^[5]. 本研究分析了 XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 等位基因序列变异情况, 以期为稻米品质改良提供部分理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

籼粘稻品系: 籼小占、XLA-1、XLA-2, 直链淀粉质

量分数分别为 28.01%、15.87% 和 14.88% (数据来源于 2010 年 8 月, 尚未发表). XLA-1 和 XLA-2 是籼小占于 2003 年 10 月搭载返回式卫星, 2004 年在诱变二代 (SP₂) 中发现的 2 个低直链淀粉突变体. 上述品系均由国家植物航天育种工程技术研究中心提供.

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 提取 参照王慧等^[6]的方法提取水稻叶片基因组总 DNA.

1.2.2 W_x 基因扩增测序及分析 根据已公布的粳型水稻 W_x 全序列 (GenBank accession no. X53694) 设计引物扩增籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 启动子、远端调控区和编码区全序列, 各对引物序列如表 1.

表 1 用于扩增 W_x 基因的引物序列
Tab.1 Primers for amplifying the W_x gene

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	引物位置(5'→3')	预期扩增长度/bp
H2	ATCTTTCATTGCTCGTTTTTCC	TTGAAGTATGGGTTGTTGTTGAG	107 ~ 2 285	2 179
4	CTCACCAAACCTTAAACAAT	TATGGCAAGAACAAGCATAG	1 144 ~ 2 511	1 368
H4	ATCCTAAACCTCAACAACAACCCAT	GCAGTTCCTGACCATCTCCTCGT	2 254 ~ 4 190	1 937
H7	TTTACATGGTTGCTGGTTAT	AGCACATTCTCCAGTTCTT	4 050 ~ 4 600	551
8	TACCAGGAGATGGTCAGG	TCAGGGTCCGATAAGATAC	4 167 ~ 4 863	697
H11	CTGCGAAGAAGTGGGAGAATGT	TCCTTCGTATCCACTCCCTCC	4 576 ~ 5 492	917

PCR 扩增反应体系 (50 μL): 1 μL 的模板 DNA, 10 μmol/L 的正向和反向引物各 1 μL, 25 μL 2 × Power Taq PCR MasterMix, 双蒸灭菌水 (ddH₂O) 补足至 50 μL. PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 53 ~ 60 °C 40 s, 72 °C 0.5 ~ 2.0 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min.

PCR 产物经回收纯化后, 利用上、下游引物进行双向测序, 然后根据双向测序结果, 拼接其完整序列. PCR 产物纯化、序列测定和序列拼接均由深圳华大基因生物技术公司完成.

获得的 W_x 序列利用 DNASTAR 6.0 软件的 BLAST2 程序在 NCBI 数据库中与原种籼小占的序列进行比对. 籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 序列多重比对由 DNAMAN 软件完成.

1.2.3 胚乳 RNA 的提取及反转录反应 参照郑霏琴等^[7]的冷酚法, 对籼小占、XLA-1 和 XLA-2 开花 10 ~ 14 d 左右的未成熟胚乳进行 RNA 的提取. 反转录反应采用 TOYOBO 的 First Strand cDNA Synthesis Kit (ReverTra Ace-a-) 试剂盒进行.

1.2.4 W_x 基因 cDNA 扩增测序及 dCAPs 分析 根据已经公布的日本晴 W_x 的 mRNA (GenBank: EU735072.1) 全编码区在起始密码子和终止密码子处设计引物扩增籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 基因 cDNA 序列, 引物序列为正向引物 m-F: 5'-AT-

GTCGGCTCTCACCACGTC-3', 反向引物 m-R: 5'-TCAAGGAGCAGCCACGTTCT-3'. W_x 基因 cDNA 序列的多重比对由 DNAMAN 软件完成.

dCAPS 标记设计用 Primer 5 软件完成. 根据籼小占、XLA-1 和 XLA-2 间的单核苷酸多态性设计引物: 正向引物 ap-F: 5'-CGTTTCAGCCTTCTTTGCC-3', 反向引物 ap-R: 5'-GCGTTCGGTATCTCATCCC-3'. PCR 反应体系 (50 μL): DNA 模板 1 μL, 正向和反向引物各 1 μL, 2 × Power Taq PCR MasterMix 25 μL, ddH₂O 补足至 50 μL. PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 扩增产物于 4 °C 下保存备用. 酶切体系: 10 μL PCR 产物, 2 μL 10 × Buffer, 1 μL *Apa*I 限制性内切酶, ddH₂O 补足至 20 μL. 37 °C 酶切 1 h 后, 制备 10 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 观察结果并照相保存.

2 结果与分析

2.1 W_x 基因组序列分析

经过测序及序列拼接, 原种籼小占 W_x 基因组序列长为 5 321 bp, XLA-1 获得长为 5 200 bp 的 DNA 序列, XLA-2 获得长为 5 293 bp 的 DNA 序列. 序列分析表明, 籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 等位基因由 13 个内含子与 14 个外显子构成. 与原种籼小占

比对, XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 基因 DNA 序列有多个碱基的改变(表 2). XLA-1 共有 62 个位点发生变化(碱基缺失位点 5 个、碱基改变位点 46 个、碱基插入位点 11 个); XLA-2 共有 59 个位点发生变化(碱基缺失位点 4 个、碱基改变位点 45 个、碱基插入位点 10 个), XLA-1 和 XLA-2 在第 10 外显子上均有 1 个碱基改变.

对 XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 基因组序列进行比对, 发现 XLA-2 仅比 XLA-1 多插入 2 个碱基, 分别位于第 10 bp 和第 5 135 bp 处, 其余位点均一致.

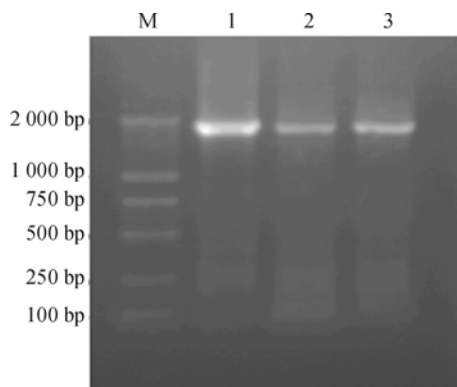
表 2 XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 等位基因序列变异情况

Tab. 2 Variation of W_x allele gene in XLA-1 and XLA-2

区域	XLA-1/个			XLA-2/个		
	碱基缺失	碱基改变	碱基插入	碱基缺失	碱基改变	碱基插入
内含子	2	26	4	3	26	4
外显子		1			1	
3'调控	3	19	7	1	18	6
合计	5	46	11	4	45	10

2.2 W_x 基因 cDNA 序列分析

以日本晴 W_x 基因 cDNA(1 830 bp) 为模板设计引物, 扩增突变体 XLA-1、XLA-2 及原种籼小占 W_x 基因全长 cDNA. 经测序及序列拼接, 籼小占获得 1 752 bp 长度片段, XLA-1 获得 1 745 bp 长度片段, XLA-2 获得 1 753 bp 长度片段, 与预期 cDNA 片段大小相近(图 1).



M: DNA marker DL2000; 1: 籼小占; 2: XLA-1; 3: XLA-2.

图 1 籼小占、XLA-1 和 XLA-2 未成熟胚乳中 W_x 基因 cDNA 的 PCR 扩增

Fig. 1 The cDNA of W_x gene amplified by PCR of Xianxiaozhan, XLA-1 and XLA-2

cDNA 序列分析表明, XLA-1 和 XLA-2 在第 10 外显子(+1 208 bp)处存在一个单核苷酸突变(籼小占为碱基 T, 2 个突变体均为碱基 C)(图 2), 编码子由 TCT 突变为 CCT, 导致丝氨酸突变成脯氨酸, 并在突变体中产生了一个限制性内切酶 *Apa* I 酶切位点.

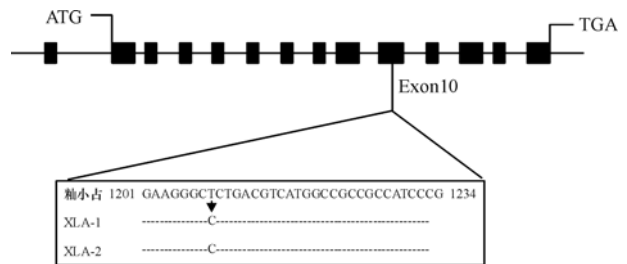
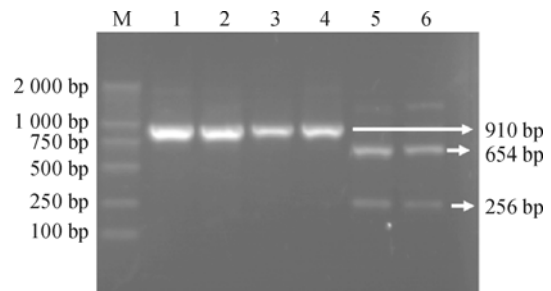


图 2 XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 等位基因第 10 外显子中 SNP 所在基因组序列中的位置

Fig. 2 The SNP site in the tenth exon of W_x allele gene in XLA-1 and XLA-2

设计 dCAPs 标记对该突变位点进行验证, 根据 1 208 bp 附近的 cDNA 序列设计引物, 扩增的 PCR 产物(910 bp)用 *Apa* I 酶进行酶切反应. XLA-1 和 XLA-2 均被酶切成 2 条带(654 与 256 bp), 而原种不能被酶切(910 bp)(图 3). 说明 XLA-1 和 XLA-2 在 1 208 bp 处确实发生了突变.



M: DNA marker DL2000; 1~3 分别为未酶切的籼小占、XLA-1、XLA-2; 4~6 分别为酶切后的籼小占、XLA-1、XLA-2.

图 3 利用 dCAPs 标记检测籼小占、XLA-1 和 XLA-2 单核苷酸多态性

Fig. 3 SNP detection by dCAPs of Xianxiaozhan, XLA-1 and XLA-2

3 讨论

水稻胚乳直链淀粉含量主要受到自身遗传特性的作用, 其中非糯性基因(W_x)是影响稻米直链淀粉含量最主要的基因. 水稻 W_x 基因编码蜡质蛋白(颗粒结合淀粉合成酶 GBSS), 该蛋白活性水平直接决定水稻胚乳直链淀粉含量. 王宗阳等^[2]公布了对籼稻 W_x 序列分析的结果, 并提出水稻蜡质基因(W_x)由 13 个内含子和 14 个外显子组成, 而且在水稻 W_x 中有 2 个较大的内含子. 本研究对籼小占、XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 序列分析表明, 三者的 W_x 基因结构与前人报道相符.

W_x 等位基因的不同是导致胚乳直链淀粉含量变异的主要原因, 目前已成功克隆多个 W_x 基因的不同突变类型, 表明内含子及外显子的序列变异均有可能影响 W_x 基因表达. Mikami 等^[8]分析了 W_x^a (籼

稻)与 W_x^b(粳稻)在 W_x 座位上等位基因的多样性, W_x^b 和 W_x^a 相比主要是第1内含子+1位上的碱基 G 到 T 的突变,降低 W_x 基因 3.3 kb 前体 mRNA 的剪接效率,从而导致直链淀粉含量下降. 本研究所用材料 XLA-1 和 XLA-2 在内含子区域有多个碱基变化,其中在第1内含子+1位上存在碱基 G 到 T 的突变,该处变异可能导致突变体 W_x 基因前体 mRNA 剪接效率降低,进而影响突变体直链淀粉含量. Ikuo 等^[9] 在第6染色体上发现一个与 W_x 等位的基因 Wx1-1,第10内含子上有 37 bp 的缺失,并且 WX 蛋白表达量减少. 本研究发现,XLA-1 和 XLA-2 在多个内含子上存在单碱基缺失,这些缺失是否影响 WX 蛋白表达有待深入研究.

W_x 基因外显子区域的变异是影响 W_x 基因表达的重要原因. Larkin 等^[10] 对一系列不同淀粉特性的材料进行 cDNA 克隆的测序,在第6外显子(A-C)和第10外显子(T-C)发现2个单核苷酸多态性,导致氨基酸替换,初步估计这个氨基酸的替换使蛋白质结构发生变化,从而导致 GBSS 酶活性和淀粉特性的改变. Sato 等^[11] 采用 RT-PCR 方法分别获得了越光和低直链淀粉突变体“Milky Queen”W_x 基因的全长 cDNA,序列比对发现,突变体在第4和第5外显子处分别发生了1个单碱基突变,其中497位的 G 突变为 A,595位的 T 突变为 C,从而导致了2个错义突变. 马晓东^[12] 的研究指出我国云南软米品种毫屁、毫皮、毫木细和毫安闷的低直链淀粉性状均由 W_x 复等位基因 W_x^{hp} 控制,该基因编码区第4外显子(+497)处存在1个单碱基突变(碱基 A 突变为 G),编码子由 GAC 突变为 GGC,导致了天门冬氨酸突变为甘氨酸,从而导致直链淀粉含量降低. 本研究对 XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 等位基因的 cDNA 序列分析表明,2个突变体在第10外显子1208 bp 处存在1个单碱基突变(T到C),导致翻译氨基酸由丝氨酸变成脯氨酸. 根据氨基酸的极性判断,丝氨酸属于极性氨基酸,脯氨酸属于非极性氨基酸;氨基酸的改变很可能改变了 W_x 蛋白的空间结构,致使它不能充分结合在淀粉颗粒上,从而导致直链淀粉含量下降.

与前人研究结果相比,本研究所用材料 XLA-1 和 XLA-2 在内含子、外显子、3'调控区域均存在多个碱基变化(碱基缺失、碱基改变、碱基插入). 3'调控区域包含了多个影响基因表达的重要构造,如多聚 A 位点、终止点、下游增强子、miRNA 结合位点等,突变体中 3'调控区域的碱基变化是否影响到这些重要构造进而影响基因表达有待今后进一步研究.

前期的研究表明,XLA-1 低直链淀粉遗传特性受2对隐性基因控制,它们具有连锁关系和互补作

用,这2对基因一对可能为 W_x 的复等位基因,另一对可能是与 W_x 不等位的基因,任何一对基因隐性纯合都将导致直链淀粉含量降低;XLA-2 低直链淀粉遗传特性受一对 W_x 的复等位基因控制^[5]. 本研究对 XLA-1 和 XLA-2 的 W_x 等位基因序列进行比对发现,XLA-1 与 XLA-2 绝大部分序列均一致,仅在序列起始和结尾处存在2个碱基差异. 在目前已知影响 W_x 基因表达的重要位点上两者变化一致,如两者在第1内含子+1位上存在碱基 G 到 T 的突变;两者第10外显子1208 bp 处均有一个单碱基突变(T到C). 上述结果表明,在2个突变体中确实存在 W_x 的复等位基因影响直链淀粉含量. 对 XLA-1 中非 W_x 基因的分析有待深入.

参考文献:

- [1] TAN Y, CORKE H. Factor analysis of physicochemical properties of 63 rice varieties[J]. Food Agric, 2002(82): 745-752.
- [2] 王宗阳, 武质亮, 邢彦彦, 等. 水稻蜡质基因分子特性的研究[J]. 中国科学: B 辑, 1991(8): 824-829.
- [3] 王飞华. 利用近等基因系研究淀粉合成相关基因对稻米食味品质的影响[D]. 扬州: 扬州大学图书馆, 2009.
- [4] 何凤华, 曾瑞珍, 席章营, 等. 不同 W_x 基因型水稻的遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 179-186.
- [5] 郭涛, 韦璇, 王慧, 等. 2个低直链淀粉含量籼稻突变体的遗传分析[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(1): 10-13.
- [6] 王慧, 张书涛, 郭涛, 等. 籼型矮秆突变体 CHA-2 的矮生性状遗传分析及基因初步定位[J]. 分子植物育种, 2006, 4(6S): 1-6.
- [7] 郑霁琴, 王宗阳, 高继平, 等. 水稻胚乳中核糖核酸的分离[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(6): 438-440.
- [8] MIKAMI I, UWATOKO N, IKEDA Y, et al. Allelic diversification at the wx locus in landraces of Asian rice[J]. Theor Appl Genet, 2008(116): 979-989.
- [9] IKUO A, HIROYUKI S, NORIYUKI A, et al. Genetic analysis of the low-amylose characteristics of rice cultivars Oborozuki and Hokkai-PL9[J]. Breeding Science, 2010, 60: 187-194.
- [10] LARKIN P D, PARK W D. Association of waxy gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Breeding, 2003(12): 335-339.
- [11] SATO H, SUZUKI Y. Molecular characterization of W_x^{mq}, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice[J]. Breeding Science, 2002, 52: 131-135.
- [12] 马晓东. 四个云南软米水稻品种低直链淀粉含量形成机制研究[D]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2007.