

研究报告

Research Report

水稻 *AGPase* 小亚基基因的克隆测序及种质间遗传分化的研究

赵颖[✉], 朱高倩[✉], 孙朝华[✉], 金寿林[✉], 谭学林[✉]

云南农业大学稻作研究所, 昆明, 650201

✉ 通讯作者: riyau@public.km.yn.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 58 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0058

收稿日期: 2012 年 05 月 02 日

接受日期: 2012 年 05 月 07 日

发表日期: 2012 年 12 月 15 日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012 年第 10 卷第 5 期 559-567 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

赵颖等, 2012, 水稻 *AGPase* 小亚基基因的克隆测序及种质间遗传分化的研究, 分子植物育种(online) Vol.10 No.58 pp.1422-1430 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0058)

引用格式(英文):

Zhao et al., 2012, Cloning and Sequencing of Rice ADP-Glucose Pyrophosphorylase Small Subunit Gene and Study on Genetic Transformation among Germplasm, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.58 pp. 1422-1430 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0058)

摘要 淀粉是构成和影响水稻产量和品质的最主要因素; ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(*AGPase*)基因是影响淀粉合成的关键酶基因之一。本研究用编码 *AGPase* 小亚基基因(*AGP_{sma}*)序列的特异引物(序列为 F: 5'-TACGCTATGCTCTTGAAAC-3'; R: 5'-TATCTTCCCAGTAACCATCA-3')对普通野生稻(元江)、粳稻(榆密 15)、籼稻(93-11)及籼粳交品系(南 34)进行 PCR 扩增、克隆、测序和序列对比。又用该引物对来源于 13 个国家的 15 份 AA 基因组和 5 份 CCDD 基因组的共 20 份野生稻及 205 份包括 40 份籼稻和 165 份粳稻的云南地方品种和改良品种(系)进行 PCR 检测。在以上 4 个不同类型水稻材料该引物上扩增出 184 bp 和 215 bp 的 2 个片段均为 *AGPase* 小亚基基因的序列。在该序列的 109 bp 处, 元江普通野生稻和榆密 15 为 T, 而 93-11 和南 34 为 C; 籼粳交品系南 34 在 121~151 bp 区间缺失 31 个碱基。所有的 225 份供试材料可分为 3 类。第一类具有 215 bp 大小的条带, 包括了全部的野生稻材料和 196 份籼粳材料。其中籼稻数占籼稻样本总数的 95%, 籼稻地方品种占籼稻地方品种总数的 75%; 粳稻数占粳稻样本总数的 83.6%, 粳稻地方品种占粳稻地方品种总数的 60%。第二类具有 184 bp 的条带, 包括 28 个籼粳材料。第三类同时具有 215 bp 和 184 bp 的片段, 此类只有 1 个父母本具不同片段的滇型杂交粳稻品种。结果表明 *AGP_{sma}* 序列在野生稻中可能尚未出现分化, 但在籼稻、粳稻和地方老品种及改良品种中都出现了遗传分化。

关键词 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶; *AGP_{sma}*; 栽培稻; 野生稻; 遗传分化

Cloning and Sequencing of Rice ADP-Glucose Pyrophosphorylase Small Subunit Gene and Study on Genetic Transformation among Germplasm

Zhao Ying[✉], Zhu Gaoqian[✉], Sun Chaohua[✉], Jin Shoulin[✉], Tan Xuelin[✉]

Rice Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201, P.R. China

✉ Corresponding author, riyau@public.km.yn.cn; ✉ Authors

Abstract The quality and yield of rice are characterized by starch. ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene is one of the key enzyme genes of starch synthesis. In this study, PCR amplification, cloning, sequencing and sequence alignment of Common wild rice (from Yuanjiang), *japonica* (Yumi15), *indica* (93-11) and *indica-japonica* lines (Nan34) were analyzed by specific primer (sequences of F: 5'-TACGCTATGCTCTTGAAAC-3'; R: 5'-TATCTTCCCAGTAACCATCA-3') to ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit gene (*AGP_{sma}*). Besides, 20 accessions of wild rice of 15 AA and 5 CCDD genomes from 13 countries, and 205 rice cultivars which covers 40 *Indica* and 165 *Japonica* including Yunnan landraces and improved lines were PCR detected by the primer. The fragments of 184 bp and 215 bp in four different rice with the primer were sequences of *AGP_{sma}*. The similarity between common wild rice (from Yuanjiang) and Yumi15, between common wild rice and 93-11, and between common wild rice and Nan34 was 100%, 99.54%, and 85.19%, respectively. On 109 bp of the sequence, common wild rice from Yuanjiang and Yumi15 were T, but 93-11 and Nan34 were C. In the range of 121~151 bp, *indica-japonica* lines Nan34 deleted 31 bases. The total rice accessions were divided into three classes. The first class only has 215 bp fragment, including all the wild rice and 196 *indica* and *Japonica* materials. The number of *indica* accounted for 95% of the total *indica* samples, and *indica* landraces accounted for 75% of the total *indica* landraces; The number of *Japonica* accounted for 83.6% of the total *Japonica* samples, and *Japonica* landraces accounted for 60% of the total *Japonica* landraces; The second class only has 184 bp fragment, including 28 and *Japonica* materials. The third class have 215 bp and 184 bp

fragments, including only one *japonica* hybrid material, the fragments of which parents were different. The results indicated that genetic differential of the sequence of *AGP_{sma}* has not yet appeared in the wild rice, but it appeared between *indica* and *Japonica* and between Yunnan landraces and improved lines.

Keywords ADP-glucose pyrophosphorylase; *AGP_{sma}*, Cultivated rice; Wild rice; Genetic differential

研究背景

水稻为世界三分之一以上人口提供粮食和能量,是我国最重要的粮食作物,也是世界上最重要的粮食作物之一。随着人口的不断增加和耕地面积的不断缩减,以及人民生活水平的不断提高,对粮食的需求及对品质的要求将愈来愈高。要想提高水稻的产量在很大程度上依赖对水稻,特别是野生稻中丰富基因资源的开发和持续利用(卢宝荣, 1998)。

水稻所隶属的稻属包含 22 个种(朱其慧, 2005),其中有 2 个栽培种,即亚洲栽培稻(*O. sativa*)和非洲栽培稻(*O. glaberrima*)。非洲栽培稻仅在非洲种植,亚洲栽培稻在世界各地广泛栽培。稻属的一年生野生稻(*O. nivara*)和多年生野生稻(*O. rufipogon*),分布于亚洲热带和亚热带地区,与栽培稻具有相同的基因组(AA 基因组),被认为是亚洲栽培稻(*O. sativa* L.)的祖先种(段世华等, 2009)。除 AA 基因组的野生稻外,稻属还包括其它基因组的野生稻,如 CCDD 基因组的大颖野生稻等。

亚洲栽培稻迄今已经有一万一千多年的栽培驯化历史(Normile, 1997),在其栽培驯化过程中由于适应不同的农业生态环境和人工的共同选择形成了丰富的遗传多样性和明显的遗传分化,如: 籼稻(*Indica*)-粳稻(*Japonica*)分化(Vaughan et al., 2008; Lu et al., 2002; 刘克德等, 1995),水稻-旱稻分化(王一平等, 2007)和粘稻-糯稻分化(Olsen et al., 2006)。在栽培稻的遗传分化中,籼稻和粳稻的遗传分化最为重要,产生了适应不同生态环境种植的类型(Morishima and Oka, 1981)。因生境不同而带来的丰富的稻种资源又是栽培稻进一步改良的物质基础,而优异的稻种资源的利用是水稻育种取得突破性进展的关键之一。

淀粉是稻米的主要成分,占稻米干重的 90% 左右,是决定水稻籽粒产量和稻米品质的关键因素。淀粉生物合成和积累的过程发生在稻米淀粉体中,并在一系列酶的催化作用下形成。在水稻中参与这一反应的酶约有 33 种,其中 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, *AGPase*)起着重要作用。它的主要功能是把葡萄糖转变为合成淀粉的底物

ADP 葡萄糖(Amir and Cherry, 1972),它是植物代谢活动向淀粉合成方向发展涉及到的第一个关键酶,它催化 Glc-1-P 和 ATP 生成的 ADP 葡萄糖将作为淀粉合酶的底物参与直链淀粉和支链淀粉的合成(Okita, 1992)。研究表明, *AGPase* 是淀粉合成的限速酶,与籽粒灌浆速率具有相关性(杨建昌等, 2001; Greene and Hannah, 1998; 潘晓华等, 1999),但不影响淀粉的结构和组成(朱昌兰等, 2002)。导入 *AGPase* 基因的粳稻转基因株系的产量显著高于对照(高照等, 1999; 刘吉新等, 2001; 宋敏等, 2001)。研究发现将 *E. coli* 中编码 *AGPase* 的基因 *glgC-TM* 导入多个水稻品种,此基因编码的 *AGPase* 不受 Pi 抑制,而受 3-PGA 正调控,发现可以提高籽粒中淀粉的合成,并改进水稻产量性状(林鸿生等, 2002)。高等植物中的 *AGPase* 是由 2 个大亚基和 2 个小亚基构成的异型四聚体,此酶催化部位位于小亚基,而调节部位位于大亚基上(Smith-white and Presis, 1992)。在不同的水稻品种中小亚基基因(*AGP_{sma}*)可分为 4 种等位基因(田志喜等, 2010)。

本研究以包括籼稻和粳稻亚种的亚洲栽培稻和 AA、CCDD 基因组的野生稻为实验材料,基于 PCR 技术,分析了不同水稻种质间 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶小亚基基因(以下简称 *AGP_{sma}*) PCR 片段的特点,为发掘淀粉合成方面的优异水稻种质提供理论参考。

1 结果分析

1.1 *AGP_{sma}* 的 PCR 扩增结果及序列相似性分析

AGP_{sma} 的 PCR 引物在元江野生稻、93-11、南 34 和榆密 15 这 4 份种质材料中扩增出 2 个片段,其大小分别为 184 bp 和 215 bp (图 1)。这 4 个种质材料扩增出的片段与 NCBI 登记的 9308 和苏御糯这 2 个品种的序列的相似度最低达 99%, 最高达 100%。其中元江野生稻与品种 9308 的序列比对相似度为 100% (图 2); 榆密 15 与品种 9308 的相似度与元江野生稻与这一品种的相似度相同(图 3); 93-11 与品种 9308 相似度为 99% (图 4); 南 34 与品种苏御糯的相似度分别为 100% (图 5)。结果说明本研究所用 PCR 引物得到的这 2 个片段均为 *AGP_{sma}* 的序列。

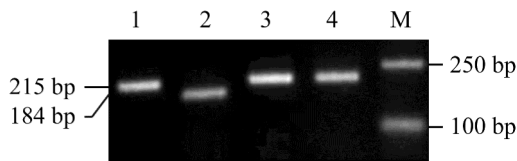


图 1 *AGPsmA* 引物 PCR 扩增得到的 2 种片段
注: M: BM2000 marker; 1: 元江野生稻; 2: 南 34; 3: 榆密 15; 4: 93-11

Figure 1 Two PCR fragments amplified by the primer of *AGPsmA*

Note: M: BM2000 marker; 1: Wild rice from Yuanjiang; 2: Nan34; 3: Yumi15; 4: 93-11

1.2 *AGPsmA* PCR 片段序列比对及序列聚类分析

对元江野生稻、93-11、南 34 和榆密 15 这 4 份种质的 *AGPsmA* PCR 片段序列比对后发现: 水稻的不同种质间在该基因的序列上发生较大分化。(1)元江野生稻与榆密 15、93-11、南 34 的相似度分别为 100%, 99.54% 和 85.19%; 南 34 与 93-11 的相似度为 85.65%。(2)元江野生稻和榆密 15 与南 34 和 93-11 相比, 在 109 bp 处, 存在一个 T/C 碱基变化, 元江野生稻和榆密 15 为 T, 南 34 和 93-11 为 C。(3)在 121~151 bp 处, 有该序列(图 6)。从聚类结果来看, 元江野生稻和榆密 1 南 34 缺失一个 31 个碱基的序列, 其它三个材料均 5 聚合在一组, 南 34 和 93-11 聚合在另一组(图 7)。

1.3 *AGPsmA* 的序列分化

本研究用 *AGPsmA* PCR 引物在所有的供试材料中共检测出 A 和 B 两种等位基因(图 8)。据此所

有的供试材料可分为 3 类, 其中 2 类为 A 或 B 纯合体, 个别材料为杂合体(表 1)。第一类具有 216 bp 大小的条带, 记为 A 型, 此类型有 196 个材料, 包括了大多数材料, 有 20 个野生稻材料, 38 个籼稻, 还有 138 个粳稻。在这类中, 籼稻样本数占籼稻总样本数的 95%, 另有籼稻地方品种共 6 个, 占籼稻地方品种总数的 75%; 粳稻数占粳稻总数的 83.6%, 另有地方品种共 3 个, 占粳稻地方品种总数的 60%; 第二类具有 185 bp 的条带, 记为 B 型。此类型有 28 个材料, 包括 2 个籼稻地方品种和 26 个粳稻, 其中有 2 个粳稻地方品种。第三类材料为杂合型, 同时具有 216 bp 和 185 bp 的带型, 记为 C 型, 此类型有 1 个材料杂交粳稻滇杂 35。由此可见, *AGPsmA* 序列在野生稻中可能尚未出现分化, 但在籼稻、粳稻和地方老品种及改良品种中都出现了遗传分化。

2 讨论

本研所得到的 *AGPsmA* 片段与已报道的 *AGPsmA* 的 DNA 序列比较, 发现本研究所克隆的 *AGPsmA* 片段与它们有很高的相似度, 说明在不同类型水稻或品种间 *AGPsmA* 的保守性是非常高的。通过序列比对后发现, *AGPsmA* 的片段序列在野生稻和栽培稻间, 籼稻与粳稻间有差异, 此差异暗示着它们在决定蛋白质序列、结构和 *AGPase* 功能方面可能是有差异的, 但是这种序列变异是否与该基因的功能有关还有待于进一步研究。改良品种的杂

gb|GQ150850.1| *Oryza sativa* Indica Group cultivar 9308 ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (*AGPsmA*) gene, complete cds
Length = 6 131
Score = 389 bits (430), Expect = 6e-105
Identities = 215/215 (100%), Gaps = 0/215 (0%)

Query	1	TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTTATCCTTCTCTCAGITTCATG	60
Sbjct	4 102	TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTTATCCTTCTCTCAGITTCATG	4 161
Query	61	CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAACTGCAGTTACATCATTATTGTGAAATGTT	120
Sbjct	4 162	CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAACTGCAGTTACATCATTATTGTGAAATGTT	4 221
Query	121	ACTTCTTTACTTAAATTTTTACTTTGCATGTTTGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGT	180
Sbjct	4 222	ACTTCTTTACTTAAATTTTTACTTTGCATGTTTGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGT	4 281
Query	181	GCAAGCTTACTTATATGATGGTACTGGGAAGATA	215
Sbjct	4 282	GCAAGCTTACTTATATGATGGTACTGGGAAGATA	4 316

图 2 元江野生稻 215 bp 片段与 9308(籼稻)的序列比对
Figure 2 Sequence blast between 215 bp fragment of wild rice from Yuanjiang and 9308 (*Indica*)

```

gb|GQ150850.1| Oryza sativa Indica Group cultivar 9308 ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (AGPsma)
gene, complete cds
Length = 6 131
Score = 389 bits (430), Expect = 6e-105
Identities = 215/215 (100%), Gaps = 0/215 (0%)

Query      1      TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATG      60
          |||
Sbjct     4 102  TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATG      4 161

Query      61      CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAAACTGCAGTTACATCAITTTATTGTGAAATGTT      120
          |||
Sbjct     4 162  CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAAACTGCAGTTACATCAITTTATTGTGAAATGTT      4 221

Query      121     ACTTCTTTACTTAATTTTTACTTTGCATGTTTGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGT      180
          |||
Sbjct     4 222  ACTTCTTTACTTAATTTTTACTTTGCATGTTTGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGT      4 281

Query      181     GCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA                                215
          |||
Sbjct     4 282  GCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA                                4 316
    
```

图 3 榆密 15 215 bp 片段与 9308 (籼稻)的序列比对
Figure 3 Sequence blast between 215 bp fragment of Yumi15 and 9308 (*Indica*)

```

gb|GQ150850.1| Oryza sativa Indica Group cultivar 9308 ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (AGPsma)
gene, complete cds
Length = 6 131
Score = 383 bits (424), Expect = 2e-103
Identities = 214/215 (99%), Gaps = 0/215 (0%)

Query      1      TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATG      60
          |||
Sbjct0    4 102  TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATG      4 161

Query      61      CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAAACTGCAGTTACATCAITTTACTGTGAAATGTT      120
          |||
Sbjct     4 162  CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAAACTGCAGTTACATCAITTTATTGTGAAATGTT      4 221

Query      121     ACTTCTTTACTTAATTTTTACTTTGCATGTTTGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGT      180
          |||
Sbjct     4 222  ACTTCTTTACTTAATTTTTACTTTGCATGTTTGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGT      4 281

Query      181     GCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA                                215
          |||
Sbjct     4 282  GCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA                                4 316
    
```

图 4 93-11 215 bp 片段与 9308 (籼稻)的序列比对
Figure 4 Sequence blast between 215 bp fragment of 93-11 and 9308 (*Indica*)

交粳稻恢复系南 34 和杂交粳稻保持系榆密 15 同样有明显的遗传差异, 两者的相似度仅为 85.19%。这结果说明在常规的育种工作中, 由于选用的亲本不同和育种目标的不同可导致改良品种间遗传差异明显。

本研究中野生稻的 PCR 带型全部属于 A 型, 而籼稻样本总数的 95% 和籼稻地方品种总数的 75% 都属于 A 型, 说明本研究中的野生稻材料可能与籼稻存在更近的遗传亲缘关系。本研究中, 在 *AGP_{sma}*

上, 地方品种中不论是粳稻还是籼稻 PCR 带型在 A 型和 B 型中均存在, 而籼稻的改良品系 PCR 带型只具有 A 型, 说明地方品种受到的人工选择压力可能小于改良品种(系)。亚洲栽培稻的栽培和驯化经历了一万多年的历史(Normile, 1997), 在自然选择和人工选择的共同作用下, 在适应不同生态类型的过程中形成了众多的地方品种和改良品种, 随之亚洲栽培稻在基因组序列上发生了大规模的变异(蔡星



gb|GQ150847.1| *Oryza sativa* Japonica Group cultivar SuYuNuo ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (*AGP_{sma}*) gene, complete cds
Length = 6111
Score = 333 bits (368), Expect = 3e-88
Identities = 184/184 (100%), Gaps = 0/184 (0%)

```

Query      1      TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATG      60
          |||
Sbjct0    4 113  TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATG      4 172

Query     61      CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAAACTGCAGTTACATCATTTACTGTGAAATGTT      120
          |||
Sbjct    4 173  CTGTAGGTTTTGTGAAGTTTGGTATGTAAACTGCAGTTACATCATTTACTGTGAAATGTT      4 232

Query     121     TGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGTGCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAA      180
          |||
Sbjct    4 233  TGCTTATGCTGCTAATGTATTTGATAGGTGCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAA      4 292

Query     181      GATA      184
          |||
Sbjct    4 293  GATA      4 296
    
```

图 5 南 34 184 bp 片段与苏御糯(粳稻)的序列比对
Figure 5 Sequence blast between 184 bp fragment of Nan34 and SuYuNuo (*Japonica*)

```

1 : TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATGCTGTAGGTTTTGTGAAGTTT : 80
2 : TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATGCTGTAGGTTTTGTGAAGTTT : 80
3 : TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATGCTGTAGGTTTTGTGAAGTTT : 80
4 : TACGCTATGCTCTTGAAACTTGTAGCATGTAGGGAATTTTATCCTTCTCTCAGTTCATGCTGTAGGTTTTGTGAAGTTT : 80
   tacgctatgctcttgaaacttgttagcatgtaggggaattttatccttctctcagttcatgctgtaggTTTTGTGAAGTTT

1 : GGTATGTAAACTGCAGTTACATCATTTATTGTGAAATGTTACTTCTTTACTTAAATTTTACTTTGCATGTTTGCCTATGC : 160
2 : GGTATGTAAACTGCAGTTACATCATTTATTGTGAAATGTTACTTCTTTACTTAAATTTTACTTTGCATGTTTGCCTATGC : 160
3 : GGTATGTAAACTGCAGTTACATCATTTACTGTGAAATGTTACTTCTTTACTTAAATTTTACTTTGCATGTTTGCCTATGC : 160
4 : GGTATGTAAACTGCAGTTACATCATTTACTGTGAAATGTT-----TGCTTATGC : 129
   ggtatgtaaactgcagttacatcattta tgtgaaatgTT-----TGCTTATGC
   ggatgtgaaactgcagttacatcattta tgtgaaatgTT-----TGCTTATGC

1 : TGCTAATGTATTTGATAGGTGCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA : 215
2 : TGCTAATGTATTTGATAGGTGCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA : 215
3 : TGCTAATGTATTTGATAGGTGCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA : 215
4 : TGCTAATGTATTTGATAGGTGCAAGCTTACTTATATGATGGTTACTGGGAAGATA : 184
   tgctaagtattttgataggtgcaagcttacttatatgatggttactgggaagata
   tgctaagtattttgataggtgcaagcttacttatatgatggttactgggaagata
    
```

图 6 供试水稻种质材料间 *AGP_{sma}* 序列的比对分析
注: 1: 元江野生稻; 2: 榆密 15; 3: 93-11; 4: 南 34
Figure 6 Alignment of the *AGP_{sma}* sequences among tested materials
Note: 1: Yuanjiangp; 2: Yumi15B; 3: 93-11; 4: Nan34

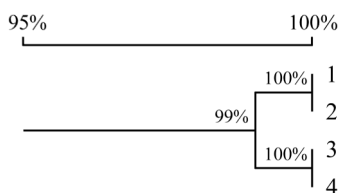


图 7 供试水稻材料的 *AGP_{sma}* PCR 片段序列的聚类
注: 1: 元江野生稻; 2: 榆密 15; 3: 93-11; 4: 南 34
Figure 7 Cluster analysis of the PCR fragment sequence of *AGP_{sma}* from tested materials
Note: 1: Yuanjiangp; 2: Yumi15B; 3: 93-11; 4: Nan34

星等, 2006), 这种变异究竟是人工选择的强大压力导致的还是在栽培稻驯化之前产生了这种变异, 还值得进一步研究。

前人的研究主要集中于对 *AGPase* 基因的表达研究(Levi and Preiss, 1976; Anderson et al., 1991; Weber et al., 1995; La Congnata et al., 1995)。瞿礼嘉等(1995)和宋波涛等(2005)分别对水稻 *AGPase* 基因和马铃薯 *AGP_{sma}* 进行 cDNA 克隆和序列分析及表达分析。本研究是提取水稻总 DNA 直接进行 PCR 扩增, 并对 *AGP_{sma}* PCR 片段进行克隆分析, 从而

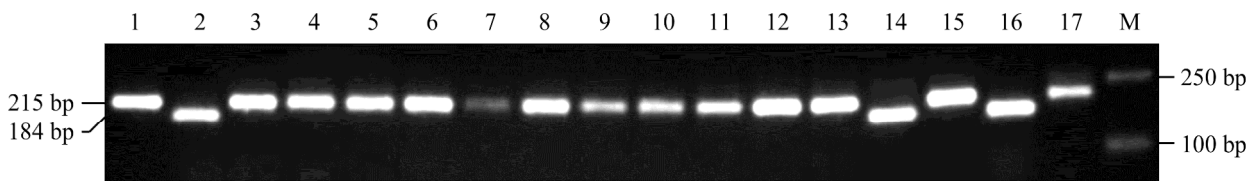


图 8 *AGP_sma* PCR 引物对野生稻和籼粳稻的扩增

注: M: BM2000 marker; 1: 来自元江的普通野生稻; 2: 南 34; 3: 榆密 15B; 4: 93-11; 5: 元江邢诺; 6: 滇屯 502; 7: 腾 58-6; 8: 腾 58-7; 9: 观山谷; 10: 花谷; 11: 月亮谷; 12: 黄皮糯; 13: 白脚老粳; 14: 爱久权; 15: 辐恢 838; 16: 南 34/巴西陆稻; 17: 元江籼稻

Figure 8 PCR products from wild rice, Indica and japonica amplified by the primer of *AGP_sma*

Note: M: BM2000 marker; 1: Wild rice from Yuanjiang; 2: Nan34; 3: Yumi15B; 4: 93-11; 5: Yuanjiangxingnuo; 6: Diantun502; 7: Teng58-6; 8: Teng58-7; 9: Guanshangu; 10: Huagu; 11: Yuelianggu; 12: Huangpinuo; 13: Baijiaolaojing; 14: Aijiquan; 15: Fuhui838; 16: Nan34/Baxiludao; 17: Yuanjingxiandao

表 1 供试野生稻、栽培稻的种名、基因组类型及其所属 *AGP_sma* 上的各类型总数

Table 1 The species of wild rice, name of cultivated rice varieties, types of genomes and their enzymetic types (A, B and C type) of *AGP_sma*

种名 Species	基因组类型 Type of genomes	份数 Number of copies	<i>AGP_sma</i> 类型 Type of <i>AGP_sma</i>		
			A 型 A type	B 型 B type	C 型 C type
长雄蕊野生稻 <i>O. Longistaminata</i>	AA	1	1	0	0
长药野生稻 <i>O. Longistaminata</i>	AA	4	4	0	0
普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	AA	9	9	0	0
展颖野生稻 <i>O. glumaepatula</i>	AA	1	1	0	0
大颖野生稻 <i>O. grandiglumis</i>	CCDD	2	2	0	0
高秆野生稻 <i>O. alta Swallen</i>	CCDD	2	2	0	0
宽叶野生稻 <i>O. latifolia Des</i>	CCDD	1	1	0	0
籼稻 <i>indica</i>	AA	40	38	2	0
粳稻 <i>japonica</i>	AA	165	138	26	1

研究 *AGP_sma* PCR 片段的特点。本研究得到的 2 个 *AGP_sma* PCR 片段与田志喜等(2010)和谢会兰(2007)的研究一致, 但是他们的研究主要是关于 *AGP_sma* 与水稻品质的关系研究。本研究主要是分析 *AGP_sma* 在不同类型水稻材料间的序列差异。本研究结果表明 *AGP_sma* 在不同类型的水稻间存在不同, 说明本研究中的水稻种质在这一功能基因的利用上有很大的潜力, 因此本研究结果可为有效利用和开发新的种质资源提供参考信息。

3 材料与方法

3.1 实验材料与试剂

本实验材料包括来自于不同国家和地区的野生

稻 20 份, 其中 AA 基因组野生稻有 15 份、CCDD 基因组野生稻有 5 份, 和 205 份亚洲栽培稻品种(系), 其中籼稻有 40, 地方品种有 8 份、粳稻有 165 份, 地方品种有 5 份(表 1)。

实验所用的试剂: 琼脂糖 DNA 回收试剂盒和 LB 培养基均购自上海生工生物有限公司; 克隆载体 *pEASYTM-T1 Simple Cloning Vector* 和 *Trans1-T1* 感受态细胞均购于北京全式金生物技术有限公司; DNA Marker BM2000 购于昆明硕阳有限公司。

3.2 实验方法

3.2.1 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取水稻单株叶片的总

DNA (Murray and Thompson, 1980)

3.2.2 PCR 扩增

AGP_{sma} 的 PCR 扩增引物来自于文献(田志喜等, 2010)。引物序列为 F: 5'-TACGCTATGCTCTTG-AAAC-3', R: 5'-TATCTTCCCAGTAACCATC-A-3'。引物 PCR 反应体系: 20 μL 总体积中包含 DNA 模板, 10× PCR Buffer, dNTP (2.5 mmol/L), 20 pmol 引物 (20~40 ng), *Taq* E (5 U/μL), 加水至 20 μL。PCR 反应条件: 首先 94℃ 预变性 4 min; 然后 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 45 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 照相。

3.3 PCR 产物的克隆与测序

克隆测序的 DNA 分别来自元江的普通野生稻(以下简称元江野生稻)、籼稻品种 93-11、籼粳交偏粳品种南 34 以及粳稻品种榆密 15 的 PCR 产物。使用琼脂糖 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 取 2 μL 回收产物和 1 μL *pEASY*TM-T1 Simple Cloning Vecto 及 2 μL ddH₂O 室温下连接 10 min。加连接产物于 50 μL 的 *Trans*I-T1 感受态细胞中转化, 菌落 PCR 检测阳性, 将阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。同一目的 PCR 片段选取 6 个克隆, 用通用引物 M13 测序。

3.4 数据分析

序列比对在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行、用 DNAMAN 软件分析材料间 DNA 片段序列差异并对供试材料进行聚类分析。以元江野生稻、93-11、南 34 和榆密 15 作为基本参照, 对 *AGP-sma* 引物在所有的 225 份材料中扩增出的条带进行统计分析。

作者贡献

赵颖和谭学林是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 赵颖和朱高倩完成数据分析, 论文初稿的写作; 孙朝华参与 DNA 的提取, 金寿林参与实验材料的种植和管理工作; 谭学林是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由云南省科技攻关重点项目(2009BB007)资助。

参考文献

Amir J., and Cherry J.H., 1972, Purification and properties of andeosine diphosphoglucose pyrophosphorylase from sweet corn, *Plant Physiol.*, 49(6): 893-897 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.49.6.893> PMID:16658078 PMCID:366074

- Anderson J.M., Larson R., Laudencia D., Kim W.T., Morrow D., Okita T.W., and Preiss J., 1991, Molecular characterization of the gene encoding a rice endosperm specific ADP glucose pyrophosphorylase subunit and its developmental pattern of transcription, *Gene*, 97(2): 199-205 [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90052-D](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(91)90052-D)
- Cai X.X., Liu J., Qiu Y.Q., Zhao W., Song Z.P., and Lu B.R., 2006, Differentiation of *Indica-Japonica* rice revealed by insertion/deletion fragments obtained from comparative genomic study of DNA sequences between 93-11 (*Indica*) and Nipponbare (*Japonica*), *Fudan Xuebao (Journal of Fudan University (Natural Science))*, 45(3): 309-315 (蔡星星, 刘晶, 仇吟秋, 赵伟, 宋志平, 卢宝荣, 2006, 籼稻93-11和粳稻日本晴DNA插入缺失差异片段揭示的水稻籼-粳分化, *复旦学报(自然科学版)*, 45(3): 309-315)
- Duan S.H., Li S.Q., Li S.B., and Zhu Y.G., 2009, Genetic diversity of wild rice and cultivated rice, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 35(3): 467-474 (段世华, 李绍清, 李绍波, 朱英国, 2009, 野生稻与亚洲栽培稻的遗传多样性, *作物学报*, 35(3): 467-474)
- Gao Z., Zhang Y.S., Wang L., Chen Y., Wang Y., and Liu J.X., 1999, Heredity and variation of yield traits of AGP gene transgenic japonica rice in low progenies plants, *Yunnan Daxue Xuebao (Journal of Yunnan University (Natural Science))*, 21(2): 99-101 (高照, 张云孙, 王力, 陈屹, 王愉, 刘吉星, 1999, AGP转基因粳稻产量性状在低世代中的遗传与变异, *云南大学学报(自然科学版)*, 21(2): 99-101)
- Greene T.W., and Hannah L.C., 1998, Andenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, a rate-limiting step in starch biosynthesis, *Physiol. Plant.*, 103(4): 574-580 <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030417.x>
- La Congnata U., Willmitzer L., and Müller-Rober B., 1995, Molecular cloning and characterization of a novel isoforms of potato ADP-glucose phyophosphorylase, *Mol. Gen. Genet.*, 246(5): 538-548 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00298960>
- Levi C., and Preiss J., 1976, Regulatory properties of the ADP-Glucose pyrophosphorylase of the blue-green bacterium *synechococcus* 6301, *Plant Physiol.*, 58(6): 753-756 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.58.6.753> PMID:16659760 PMCID:542302
- Lin H.S., Hua Z.H., Li N., Gao Y., Lu D.Z., Yan M.X., Qian Q., Hua Z.T., Shao G.J., Okita T.W., and Huang D.N., 2002, Transformation of *glgC-TM* gene into rice mediated by *agrobacterium*, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 16(2): 129-133 (林鸿生, 华志

- 华, 李娜, 高勇, 卢德赵, 颜美仙, 钱前, 华泽田, 邵国军, Okita T.W., 黄大年, 2002, 农杆菌介导*glgC-TM*基因转化水稻研究, 中国水稻科学, 16(2): 129-133)
- Liu J.X., He J., Zhao G.Z., Shi R., Chen G.X., Du J., and Zhang Y.S., 2001, Study on yield traits of AGP gene transgenic rice Hexi42, Yunnan Daxue Xuebao (Journal of Yunnan University (Natural Science)), 23(1): 71-73 (刘吉新, 贺静, 赵国珍, 世荣, 陈国新, 杜鹃, 张云孙, 2001, 合系42号AGP转基因株系产量性状研究, 云南大学学报(自然科学版), 23(1): 71-73)
- Liu K.D., Zhang Q.F., Zhang R.P., and Xie Y.F., 1995, Genetic variation and Indica-Japonica differentiation in Yunnan indigenous rice, Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica), 37(9): 718-724 (刘克德, 张启发, 张瑞品, 谢岳峰, 1995, 云南地方稻种的遗传变异和籼粳分化, 植物学报, 37(9): 718-724)
- Lu B.R., 1998, Diversity of rice genetic resources and its utilization and conservation, Shengwu Duoyangxing (Chinese Biodiversity), 6(1): 63-72 (卢宝荣, 1998, 稻种遗传资源多样性的开发利用及保护, 生物多样性, 6(1): 63-72)
- Lu B.R., Zheng K.L., Qian H.R., and Zhuang J.Y., 2002, Genetic differentiation of wild relatives of rice as assessed by RFLP analysis, Theor. Appl. Genet., 106(1): 101-106
- Morishima H., and Oka H.I., 1981, Phylogenetic differentiation of cultivated rice, XXII. Numerical evaluation of the *indica-japonica* differentiation, Jpn. J. Breed., 31(4): 402-413
- Murray M.G., and Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucl. Acids Res., 8(9): 4321-4325 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/8.19.4321> PMID: 7433111 PMID:324241
- Normile D., 1997, Archaeology: Yangtze seen as earliest rice site, Science, 275(5298): 309 <http://dx.doi.org/10.1126/science.275.5298.309>
- Okita T.W., 1992, Is there an alternative pathways for starch synthesis? Plant Physiol., 100(2): 560-564 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.100.2.560> PMID:16653029 PMID:1075595
- Olsen K.M., Caicedo A.L., Polato N., McClung A., McCouch S., Purugganan M.D., McCouch S., and Purugganan M.D., 2006, Selection under domestication: evidence for a sweep in the rice *Waxy* genomic region, Genetics, 173(2): 975-983 <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.056473> PMID: 16547098 PMID:1526538
- Pan X.H., Li M.Y., Cao L.M., and Liu S.Y., 1999, Starch accumulation and changes in enzyme activities involved in starch synthesis during the developing of rice endosperm, Jiangxi Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis), 21(4): 456-462 (潘晓华, 李木英, 曹黎明, 刘水英, 1999, 水稻发育胚乳中淀粉的积累及淀粉合成的酶活性变化, 江西农业大学学报, 21(4): 456-462)
- Qu L.J., Ji M., Lan N., Xie M., Gu H.Y., and Chen Z.L., 1995, cDNA cloning and structural analysis of rice ADP-glucose pyrophosphorylase gene, Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica), 37(12): 919-926 (瞿礼嘉, 纪梅, 蓝宁, 谢明, 顾红雅, 陈章良, 1995, 水稻ADP-葡萄糖焦磷酸化酶的cDNA基因克隆和结构分析, 植物学报, 37(12): 919-926)
- Smith-white B.J., and Presis J., 1992, Comparison of proteins of ADP-giucose pyrophosphorylase from diverse sources, J. Mol. Evol., 34(5): 449-464 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00162999> PMID:1318389
- Song B.T., Liu J., Xie C.H., and Cheng S.H., 2005, Cloning of the small subunit cDNA of ADP glucose pyrophosphorylase from potato and its expression in yeast *Pichia-methabolica*, Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology), 13(3): 282-287 (宋波涛, 柳俊, 谢从华, 成善汉, 2005, 马铃薯腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶小亚基基因(*sAGP*)的克隆及其在毕赤酵母中的表达, 农业生物技术学报, 13(3): 282-287)
- Song M., Li Y.Y., and Zhang Y.S., 2001, Studies on transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants transformed with *AGPase* gene and its economic characters, Huabei Nongxuebao (Acta Agricultural Boreali-Sinica), 16(4):11-14 (宋敏, 李援亚, 张云孙, 2001, 导入*AGPase*基因的转基因可育水稻及其经济性状的研究, 华北农学报, 16(4):11-14)
- Tian Z.X., Yan C.J., Qian Q., Yan S., Xie H.L., Wang F., Xu J.F., Liu G.F., Wang Y.H., Liu Q.Q., Tang S.X., Li J.Y., and Gu M.H., 2010, Development of gene-tagged molecular markers for starch synthesis-related genes in rice, Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin), 55(26): 2591-2601 (田志喜, 严长杰, 钱前, 严松, 谢会兰, 王芳, 徐洁芬, 刘贵富, 王永红, 刘巧泉, 汤述翥, 李家洋, 顾铭洪, 2010, 水稻淀粉合成相关基因分子标记的建立, 科学通报, 55(26): 2591-2601)
- Vaughan D.A., Lu B.R., and Tomooka N., 2008, The evolving story of rice evolution, Plant Science, 174(4): 394-408 <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.01.016>
- Wang Y.P., Wei X.H., Hua L., Yuan X.P., Yu H.Y., Xu Q., and Tang S.X., 2007, Genetic diversity in upland rice germplasm from different geographic regions, Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica), 33(12): 2034-2040 (王一平, 魏兴华, 华蕾, 袁筱萍, 余汉勇, 徐群, 汤圣祥, 2007, 不同地理来源早稻种质资源的遗传多样性分析, 作物学报, 33(12): 2034-2040)
- Weber H., Heim U., Borisjuk L., and Wobus U., 1995, Cell-type specific, coordinate expression of two ADP-glucose

- pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *vicia faba* L., *Planta*, 195(3): 352-361 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00202592> PMID: 7766042
- Xie H.L., 2007, Development of molecular markers on rice starch synthesis related genes genetic network analysis of starch synthesis, Thesis for M.S., Yangzhou University, Supervisor: Yan C.J., pp.17-20 (谢会兰, 2007, 水稻淀粉合成相关基因分子标记的建立及其遗传网络初步探析, 硕士学位论文, 扬州大学, 导师: 严长杰, pp.17-20)
- Yang J.C., Peng S.B., Gu S.L., Visperas R.M., and Zhu Q.S., 2001, Changes in activities of three enzymes associated with synthesis in rice grains during grain filling, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 27(2): 157-164 (杨建昌, 彭少兵, 顾世梁, Visperas R.M., 朱庆森, 2001, 水稻灌浆期籽粒中3个与淀粉合成有关的酶活性变化, *作物学报*, 27(2): 157-164)
- Zhu C.L., Zhai H.Q., and Wan J.M., 2002, Progresses in the studies of genetic and molecular bases of eating-quality in rice, *Jiangxi Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis)*, 24(4): 454-460 (朱昌兰, 翟虎渠, 万建民, 2002, 稻米食味品质的遗传和分子生物学基础研究, *江西农业大学学报*, 24(4): 454-460)
- Zhu Q.H., 2005, Molecular phylogeny of the A-genome species of *Oryza*, with a reference to origin of the Asian cultivated rice, Dissertation for Ph.D., Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Supervisor: Song G.E., pp.1 (朱其慧, 2005, 稻属A基因组的分子系统发育—兼论亚洲栽培稻的起源, 博士学位论文, 中国科学院植物研究所, 导师: 葛颂, pp.1)